



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Priscilla Gomes Welter

Efeitos do ambiente enriquecido nos déficits motores, comportamentais e nos níveis de monoaminas no modelo YAC128 da Doença de Huntington

Florianópolis

2021

Priscilla Gomes Welter

Efeitos do ambiente enriquecido nos déficits motores, comportamentais e nos níveis de monoaminas no modelo YAC128 da Doença de Huntington

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Neurociências
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patricia de Souza Brocardo

Florianópolis

2021

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

Welter, Priscilla Gomes

Efeitos do ambiente enriquecido nos déficits motores,
comportamentais e nos níveis de monoaminas no modelo YAC128
da Doença de Huntington / Priscilla Gomes Welter ;
orientadora, Patricia de Souza Brocardo, 2021.
91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Neurodegeneração. 3. Estilo de
Vida. 4. Modelo transgênico. I. Brocardo, Patricia de
Souza. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

Priscilla Gomes Welter

Efeitos do ambiente enriquecido nos déficits motores, comportamentais e nos níveis de monoaminas no modelo 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 Joana Gil-Mohapel

University of Victoria

Prof. Dr. Marcelo Farina

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr.^a Eloisa Pavesi

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr.^a Manuella Pinto Kaster

Universidade Federal de Santa Catarina

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.

Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira
Coordenador do Programa

Prof. Dra. Patricia de Souza Brocardo
Orientadora

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado aos cientistas brasileiros que mesmo com pouco lançam muita luz sobre a vastidão de nossa incompreensão.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível graças a generosidade e colaboração de muitas pessoas, laboratórios e agências de fomento à pesquisa. Por isso meus agradecimentos especiais:

À minha incrível orientadora Patricia. Muito obrigada primeiramente pela oportunidade que me proporcionou ao me aceitar em seu laboratório, pela confiança depositada, pela paciência e gentileza, por todas as vezes que foi à bancada comigo, por tudo que fez por mim e por este trabalho. Um obrigada especial pelo suporte que você (e sua família) me deram nesse momento de pandemia e que tornou as últimas etapas deste trabalho possíveis. Foi um privilégio ser orientada por uma cientista inspiradora que transborda energia e dedicação e que constantemente nos incentiva a irmos além e atravessar fronteiras quaisquer que elas sejam.

À todos os integrantes do LANEP que tive a oportunidade de conhecer: Tine, Evelini, Claudia, Ian, Pâmela, Marina, Laura, Aléxia e Anelise. Obrigada pelos aprendizados que me proporcionaram, pelas contribuições, pelos cafés e por todos os momentos compartilhados (presenciais ou virtuais)! Obrigada pela pronta disposição em me ajudar em todas às vezes que recorri a vocês. À Claudia, Ian e, especialmente, à Evelini, um obrigada especial porque foram as pessoas que me acolheram quando cheguei e com as quais aprendi a realizar os procedimentos para a execução deste trabalho. E claro, obrigada aos breves passageiros do LANEP, os intercambistas, que tornaram minha passagem ainda mais rica e divertida. Obrigada também aos demais professores e estudantes que se somam no nosso grupo e que trazem mais diversidade e qualidade aos nossos seminários e à nossa pesquisa. Obrigada!

Gostaria também de registrar meus agradecimentos ao laboratório da Prof. Manuella, especialmente a Bruna, Axel e Nicolle, por compartilharem seu espaço conosco e por onde talvez eu tenha passado mais tempo do que nas instalações do LANEP, muito obrigada também pela confiança e pelas conversas! Agradeço também ao Prof. Alcir e seu grupo, em especial à Gabriela, por possibilitarem a análise das monoaminas, o que foi essencial para este trabalho. Aos laboratórios dos Professores Marcelo, Patricia Stoco e Rodrigo, obrigada pelos empréstimos de equipamentos, como o termociclador e bomba de perfusão, que ocorreram por repetidas vezes. Obrigada ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e aos técnicos pela prontidão em nos atender permitindo coletar os resultados de muitas genotipagens. Obrigada ao laboratório do Prof. Rui, especialmente à Bruna Soares, por possibilitar a utilização das salas de comportamento e por todo o suporte que nos forneceram. Obrigada também ao Wilson e Luciana pelo zelo com o biotério e com os animais e pela disponibilidade em nos

atender a qualquer momento. Aos animais que foram essenciais para este trabalho, meu respeito e gratidão.

Ao PPG-Neurociências, obrigada aos colegas e professores pela convivência, ensinamentos e por fazer deste um PPG de qualidade excepcional! Um obrigada especial ao Prof. Eduardo porque como coordenador faz um trabalho admirável por este programa! Um obrigada especial também à UFSC que se tornou minha segunda casa desde os tempos da graduação. Não poderia deixar de mencionar os laboratórios pelos quais passei, porque de alguma forma também são o motivo de eu chegar até aqui. Por isso agradeço ao Laboratório de Neuroquímica 1, Laboratório de Neuroquímica 3 e ao LANEBI. Cada lugar proporcionou encontros de pessoas que me incentivaram a estar aqui e que me tornaram uma pessoa mais qualificada. Ao longo desse percurso algumas pessoas me acompanharam mais de perto e gostaria de deixar meus agradecimentos especiais a Ingrid, Ana Paula, Adriana, Adriano, Matheus, Gianni; também aos demais já mencionados ou não, obrigada!

Agradeço também às agências de fomento por possibilitar o auxílio financeiro para execução desta pesquisa e à CAPES pela bolsa concedida neste período do mestrado. Também agradeço as demais agências de fomento, como o CNPq, que contribuíram para minha formação científica através de bolsas concedidas tanto no ensino médio quanto na graduação.

À banca composta pela Prof. Joana, Marcelo, Eloisa e Manuella, meu muito obrigada por disponibilizarem tempo e dedicação para avaliar este trabalho e pelas contribuições.

Gostaria de agradecer especialmente aos meus pais porque sem seu apoio jamais teria a possibilidade de chegar até aqui. Um agradecimento especial também às minhas duas queridas irmãs, muito obrigada pelas boas risadas e por tornar tudo mais leve. Obrigada também aos meus avós, tios, primos e amigos que, mesmo às vezes longe, sempre me acompanham e torcem por mim! Obrigada ao meu namorado, pelo incentivo de sempre, mas em especial por ter sido um dos grandes incentivadores para eu entrar neste mestrado; obrigada por se disponibilizar para me acompanhar sempre que precisei, pela paciência nas longas horas de espera na UFSC e pelos momentos compartilhados que guardo com carinho. Obrigada!

Obrigada a todos que me incentivaram e acreditaram em mim talvez mais do que eu mesma. Enfim, são muitas as pessoas que de forma direta ou indireta fizeram este trabalho se tornar possível e mais leve. Foi um trabalho que começou um ano antes da pandemia e que no caminho enfrentou alguns desafios pelo momento pandêmico, mas sempre com a colaboração das pessoas mencionadas superou os desafios e agora está sendo entregue.

Grata!

Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele. Por isso, o universo de cada um, se resume no tamanho de seu saber.

(Albert Einstein)

RESUMO

A Doença de Huntington (DH) é um distúrbio genético neurodegenerativo caracterizado por déficits motores, psiquiátricos, cognitivos e periféricos. O estriado é a região encefálica mais afetada, no entanto outras regiões como o córtex pré-frontal e o hipocampo também estão comprometidas nessa condição. Estudos em humanos e modelos animais têm observado que mesmo antes da degeneração ocorrer, alguns sintomas já estão presentes. Isso implica que outras disfunções devem estar ocorrendo para justificar um fenótipo anterior a degeneração. Apesar de ser uma doença de natureza genética, evidências mostram que o estilo de vida é capaz de modificar a idade de início dos sintomas na DH e a taxa de sua progressão. Neste trabalho, buscou-se avaliar se o ambiente enriquecido (AE), uma analogia para intervenções benéficas ao estilo de vida, poderia atuar de maneira preventiva sobre déficits motores e comportamentais e se os efeitos proporcionados pelo AE no início da vida persistem em idades posteriores. Também avaliamos se o AE apresentava algum efeito sobre os níveis de monoaminas. Para tanto, camundongos machos e fêmeas do tipo selvagem (WT) e YAC128 foram expostos a condições padrão de habitação (AC) ou AE por 39 dias (do dia 21 ao dia 60 pós-natal). Aos 2 meses de idade, uma bateria de testes comportamentais foi aplicada. Após o último teste, o hipocampo, o córtex pré-frontal e o estriado foram dissecados para medir os níveis de monoaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Em uma segunda coorte de animais, o AE foi aplicado durante o mesmo período, mas só foram avaliados aos 4 meses quando novamente uma bateria de testes comportamentais foi realizada. Diferenças entre os camundongos YAC128 e WT alojados no AC foram encontradas no peso corporal de machos, no comportamento do tipo-ansioso e no desempenho motor aos 2 meses de idade. O AE foi capaz de prevenir o ganho de peso corporal nos machos, teve efeito ansiolítico nos machos e preveniu os déficits motores. A avaliação dos níveis de monoaminas não mostrou alterações em relação ao genótipo aos 2 meses de idade. No entanto, foi observado que o ambiente foi capaz de diminuir os níveis de monoaminas nas três regiões avaliadas. Interessantemente uma correlação significativa e negativa foi encontrada entre melhor performance motora e menores níveis de monoaminas principalmente no estriado. Em relação aos camundongos analisados aos 4 meses, diferenças genótípicas foram encontradas no comportamento anedônico e o AE intermitente trouxe benefícios parciais. Nossos resultados confirmaram os déficits motores, comportamento do tipo-ansioso, anedônico e ganho de peso corporal em camundongos YAC128 e o AE preveniu ou trouxe benefícios parciais nestas avaliações. Alguns benefícios proporcionados pelo AE podem ter ocorrido, pelo menos em parte, pela modulação dos níveis de monoaminas. Portanto, nossos achados apoiam as intervenções ambientais como uma abordagem terapêutica benéfica para atrasar o início e a sintomatologia da DH.

Palavras-chave: Neurodegeneração. Modelo transgênico. Estilo de vida.

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative genetic disorder characterized by motor, psychiatric, cognitive, and peripheral deficits. The striatum is the most affected brain region; however, other areas such as the prefrontal cortex and hippocampus are also compromised in this condition. Studies in humans and animal models have observed that some symptoms are already present even before degeneration occurs, implying that other dysfunctions must be happening to justify a phenotype before degeneration. Despite being a disease of genetic nature, evidence shows that lifestyle can modify the age of onset of symptoms in HD and the rate of its progression. In this work, we sought to assess whether the enriched environment (EE), an analogy for beneficial interventions to lifestyle, could act preventively on motor and behavioral deficits and whether the effects provided by EE in early life persist in later ages. We also assessed whether EE had any effect on monoamine levels. For this purpose, wild-type (WT) and YAC128 male and female mice were exposed to standard housing conditions (CE, control environmental) or EE for 39 days (from postnatal day 21 to postnatal day 60). At 2 months of age, a battery of behavioral tests was applied. After the last test, the hippocampus, prefrontal cortex, and striatum were dissected to measure monoamine levels by high-performance liquid chromatography (HPLC). In the second cohort of animals, the EE was applied during the same period. However, they were only behaviorally evaluated at 4 months of age. Differences between YAC128 and WT mice housed in the CE were found in male body weight, anxiety-like behavior, and motor performance at 2 months of age. The EE was able to prevent body weight gain in males, had anxiolytic effect in males and prevented motor deficits. The evaluation of monoamine levels showed no changes concerning genotype at 2 months of age. However, it was observed that the EE reduced the levels of monoamines in the three regions evaluated. Interestingly, a significant and negative correlation was found between better motor performance and lower levels of monoamines, mainly in the striatum. Genotypic differences were found in anhedonic behavior in mice analyzed at 4 months of age, and intermittent EE exposure showed partial benefits. Our results confirmed the motor deficits, anxiety-like behavior, anhedonia and body weight gain in YAC128 mice and the EE prevented or brought partial benefits to these evaluations. Some benefits provided by EE may have occurred, at least in part, by modulating the levels of monoamines. Therefore, our findings support environmental interventions as a beneficial therapeutic approach to delay the onset and symptomatology of HD.

Keywords: Neurodegeneration. Transgenic model. Lifestyle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação das repetições CAG e significado clínico	16
Figura 2 – Divisão do Curso Temporal da DH.....	18
Figura 3 – Linha do Tempo relativa à DH	21
Figura 4 - Regulação da transcrição do gene <i>BDNF</i> pela proteína Htt	24
Figura 5 - Tétrade de sinais e sintomas relacionados a DH	26
Figura 6 – Representação esquemática das vias direta e indireta nos núcleos da base	31
Figura 7 – Modelos animais genéticos para o estudo da DH.	34
Figura 8 - Imagem representativa do gel de genotipagem dos camundongos WT e YAC128	43
Figura 9 – Exemplos de AE	44
Figura 10 – Desenho Experimental 1	45
Figura 11 – Desenho Experimental 2	46
Figura 12 – Comportamento do tipo-ansioso aos 2 meses de idade.....	53
Figura 13 – Comportamento do tipo-depressivo aos 2 meses de idade.....	54
Figura 14 – Performance motora aos 2 meses de idade	55
Figura 15 – Níveis de monoaminas nos camundongos aos 2 meses de idade.....	57
Figura 16 – Correlação entre níveis de monoaminas e latência para queda no rotarod	58
Figura 17 – Correlação entre níveis de monoaminas no córtex pré-frontal e performance no CA	59
Figura 18 - Comportamento do tipo-ansioso aos 4 meses de idade	62
Figura 19 - Comportamento do tipo-depressivo aos 4 meses de idade	63
Figura 20 – Performance motora aos 4 meses de idade	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso corporal dos camundongos aos 2 meses de idade	51
Tabela 2 – Correlação de Spearman entre níveis de monoaminas no estriado e hipocampo <i>versus</i> distância percorrida no CA	60
Tabela 3 - Correlação de Spearman entre níveis de monoaminas no estriado e hipocampo <i>versus</i> número de entradas no centro do CA	60
Tabela 4 - Peso corporal dos camundongos aos 4 meses de idade.....	61
Tabela 5 – Resumo dos comprometimentos encontrados nos camundongos YAC128	75
Tabela 6 – Resumo das diferenças entre machos e fêmeas YAC128.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - serotonina

AC - ambiente controle

AE - ambiente enriquecido

ANOVA - análise de variância, do inglês *analysis of variance*

ASO - do inglês *antisense oligonucleotides*

ATV - área tegmental ventral

BDNF - fator neurotrófico derivado do encéfalo, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*

CA - campo aberto

CAG - citosina, adenina, guanina

CEUA - comissão de ética no uso de animais

coREST - do inglês *REST co-repressor 1*

DA - dopamina

DH - doença de Huntington

DPN – dia pós-natal

FDA - do inglês *Food and Drug Administration*

HAP1 - proteína 1 associada a huntingtina, do inglês *huntingtin-associated protein 1*

HDAC - histona deacetilase

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high-performance liquid chromatography*

HTT - gene huntingtina

Htt - proteína huntingtina

HVA - ácido homovalínico

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina-1

ISRS - inibidores seletivos de recaptção de serotonina

IT15 – do inglês *interesting transcript 15*

kDa - kilodalton

LCE - labirinto em cruz elevado

LYA - do inglês *left YAC arm*

mHtt - versão mutada da proteína huntingtina

m*HTT* - versão mutada do gene huntingtina

MSNs - neurônios espinhosos médios, do inglês *medium spiny neurons*

NE - norepinefrina
pb - pares de base
PCR - reação em cadeia da polimerase
PGC-1 α - do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α*
PT - pole teste
RE1 - do inglês *repressor element 1*
REST - do inglês *RE1-silencing transcription factor*
RILP - do inglês *REST-interacting LIM domain protein*
RYA – do inglês *right YAC arm*
Sin3a - do inglês *switch independent homologue 3a*
SNPs - polimorfismos de nucleotídeo único, do inglês *single nucleotide polymorphisms*
TBS - teste da borrifada com solução de sacarose
TCA - teste do campo aberto
TDM - transtorno depressivo maior
TH - tirosina hidroxilase
TNF - teste do nado forçado
TSC - teste da suspensão pela cauda
UCP – proteína de desacoplamento, do inglês *uncoupling protein*
UHDRS – do inglês *Unified Huntington Disease Rating Scale*
VMAT2- transportador de monoamina vesicular 2
WT – tipo selvagem, do inglês *wild-type*
YAC - cromossomo artificial de levedura, do inglês *yeast artificial chromosome*
YAC128 - do inglês *full-length transgenic mouse model of HD*

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE O MESTRADO (2019 – 2021)

PLÁCIDO, E.; NASCIMENTO-CASTRO, C. P; **WELTER, P.G**; GIL-MOHAPEL, J.; BROCARD, P.S. Linking Huntington disease, brain-derived neurotrophic factor, and depressive-like behaviors. *The Neuroscience of Depression*, p. 161-177, 2021. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-817935-2.00042-8>.

KIM, A.; LALONDE, K.; TRUESDELL, A.; **WELTER, P.G**; BROCARD, P.S.; ROSENSTOCK, T.R.; GIL-MOHAPEL, J. New Avenues for the Treatment of Huntington's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 16, p. 1-51. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22168363>.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	BREVE HISTÓRICO DA DH	19
1.2	HUNTINGTINA	21
1.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DH	25
1.3.1	Alterações motoras	26
1.3.2	Características psiquiátricas	27
1.3.3	Alterações cognitivas	28
1.3.4	Alterações em tecidos periféricos	28
1.4	NEUROPTOLOGIA DA DH	29
1.5	NEUROTRANSMISSORES NA DH	32
1.6	MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA DH	33
1.6.1	Camundongos YAC128	34
1.7	FATORES QUE AFETAM O INÍCIO DOS SINTOMAS DA DH	36
1.7.1	Estilo de vida e ambiente enriquecido	38
1.8	JUSTIFICATIVA	40
1.9	OBJETIVOS	41
1.9.1	Objetivo Geral	41
1.9.2	Objetivos Específicos	41
2	MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1	ANIMAIS	42
2.2	GENOTIPAGEM	42
2.3	DESENHO EXPERIMENTAL	43
2.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	46
2.4.1	Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	47
2.4.2	Pole Teste (PT)	47
2.4.3	Teste do Campo Aberto (TCA)	47

2.4.4	Teste da Borrifada com solução de Sacarose (TBS).....	48
2.4.5	Teste da Suspensão pela Cauda (TSC).....	48
2.4.6	Teste do Nado Forçado (TNF).....	48
2.4.7	Teste de aceleração da barra giratória (Rotarod).....	49
2.5	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MONOAMINAS CEREBRAIS.....	49
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
3	RESULTADOS	51
3.1	EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO	51
3.1.1	Peso corporal.....	51
3.1.2	Comportamentos do tipo-ansioso e depressivo.....	51
3.1.3	Avaliação motora.....	54
3.1.4	Níveis de monoaminas.....	56
3.1.5	Análise de Correlações.....	57
3.2	PERSISTÊNCIA DOS EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO	60
3.2.1	Peso corporal.....	61
3.2.2	Comportamentos do tipo-ansioso e tipo-depressivo.....	61
3.2.3	Avaliação Motora	63
4	DISCUSSÃO	65
5	CONCLUSÃO	76
5.1	PERSPECTIVAS FUTURAS	77
	REFERÊNCIAS	78

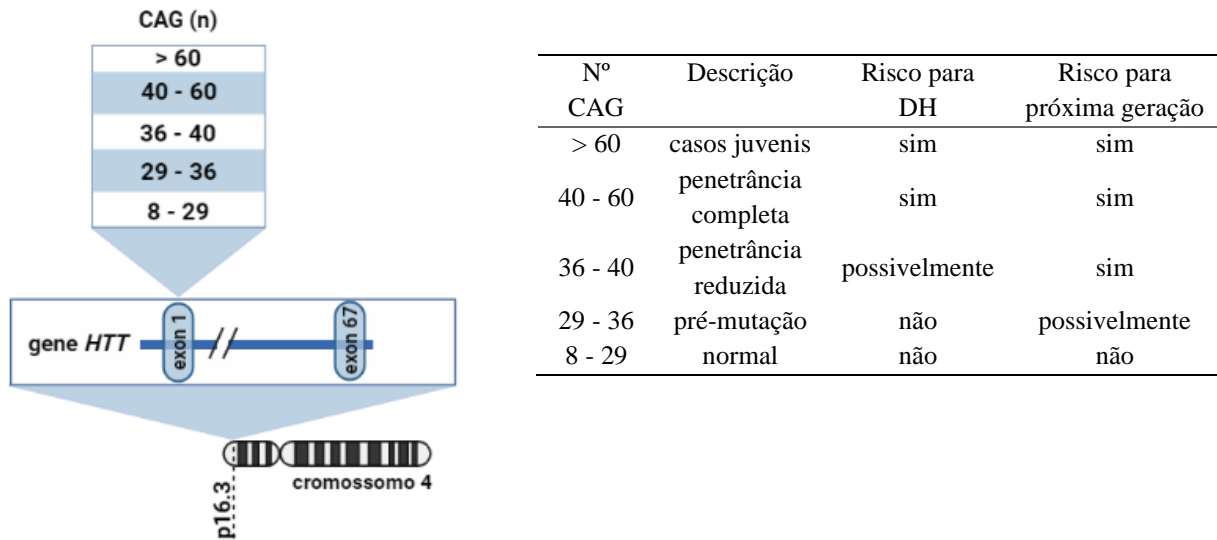
1 INTRODUÇÃO

A Doença de Huntington (DH) é uma doença rara, neurodegenerativa com padrão de herança autossômico dominante que apresenta uma combinação de características motoras, cognitivas, comportamentais (ROOS, 2010; BATES et al., 2015) e periféricas (GLIDDEN et al., 2020). A prevalência mundial da DH varia amplamente. Nas populações ocidentais, afeta de 3,60 a 7,33 indivíduos por 100.000 habitantes, enquanto que nos países asiáticos a prevalência é de 0,40 a cada 100.000 habitantes (RAWLINS et al., 2016).

A causa genética da DH é uma expansão instável no número de repetições CAG (referente aos nucleotídeos citosina, adenina e guanina) no éxon 1 do gene *HTT* (MACDONALD et al., 1993) localizado na posição 4p16.3 (MACDONALD et al., 1989). Este gene codifica a proteína huntingtina (Htt), que é amplamente expressa periféricamente e no sistema nervoso central (SNC) (STRONG et al., 1993). A mutação resulta em uma proteína com um trecho de poliglutamina expandido (cauda poli-Q) próximo ao N-terminal (mHtt) (MACDONALD et al., 1993). Devido a esta característica, a DH é também classificada como uma doença de poliglutamina, onde também se encontram alguns tipos de ataxias espinocerebelares (REGO; DE ALMEIDA, 2005).

No gene *HTT* não-mutado, a sequência de repetições CAG varia entre 8 e 29 cópias. A manifestação da DH está associada à expansão para 40 ou mais repetições CAG, sendo a faixa de 40 a 60 associada a um início dos sintomas motores na meia idade e 60 repetições ou mais aos casos juvenis (início antes dos 20 anos). Existe uma faixa entre 36 e 40 repetições que é associada à penetrância incompleta e, portanto, pela possibilidade de o portador não apresentar os sintomas do distúrbio. A faixa de 29-36 repetições é considerada uma pré-mutação e o indivíduo portador não desenvolve a DH. No entanto, isso pode trazer implicações para a próxima geração uma vez que a natureza instável das repetições CAG possibilita a expansão para uma faixa de desenvolvimento da DH (REGO; DE ALMEIDA, 2005; RUBINSZTEIN et al., 1996) (Figura 1).

Figura 1 – Classificação das repetições CAG e significado clínico



Legenda: à esquerda é apresentado a localização do gene *HTT* (4p16.3) que é constituído por 67 éxons. A mutação responsável pelo desenvolvimento da DH encontra-se no éxon 1 e consiste em uma expansão das repetições CAG. Cada faixa de repetição é associado a um significado clínico que é apresentado na tabela à direita.

Fonte: figura modificada a partir de (GATTO et al., 2020) e produzida com a ferramenta Biorender.com.

A maioria dos pacientes são heterozigotos para *HTT* mutada (MARTIN et al., 2015) e, portanto, o risco para o desenvolvimento da DH na próxima geração é de 50% considerando apenas um dos pais afetado. No entanto, existem casos em que o paciente é homozigoto para a mutação e, neste caso, além de apresentar um curso clínico mais severo do que um paciente heterozigoto (SQUITIERI et al., 2003), a chance de herdabilidade pelos seus filhos é igual a 100%.

Na transmissão intergeracional, a mudança de comprimento das repetições CAG (aumento ou diminuição) é comum, ocorrendo em aproximadamente em 74% dos casos, sendo que o aumento é mais comum do que a diminuição. Neste contexto, herdar a mutação por transmissão paterna ou materna pode ter implicações significativas já que é na transmissão paterna onde ocorrem as maiores mudanças e geralmente no sentido de acréscimo do comprimento das repetições (WHEELER et al., 2007). Por este motivo, a transmissão paterna geralmente está associada aos casos esporádicos (sem histórico familiar antecedente, mas com uma pré-mutação) e aos casos de DH juvenil (KUMAR; GARG, 2016; WHEELER et al., 2007).

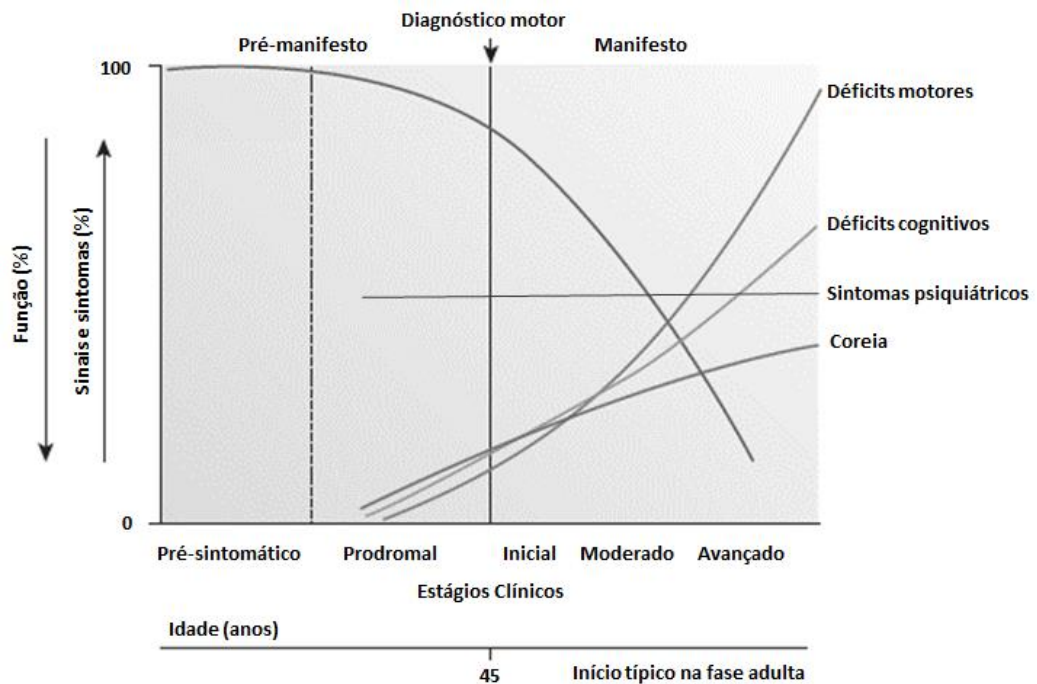
Nota-se pelo exposto que maiores repetições de CAG estão associadas ao início precoce da DH. De fato, já é conhecido há algum tempo que a idade inicial dos sintomas é inversamente proporcional a expansão de CAG (ANDREW et al., 1993). Além disso, a

severidade da doença e a taxa de progressão também parecem estar associadas ao tamanho das repetições (AZIZ et al., 2009). Observado isto, foi criada a escala DBS (do inglês, *Disease Burden Score*) que é calculada da seguinte maneira: $[(CAG - 35,5) \times idade]$, onde CAG representa o número de repetições e 35,5 representa o número limite de repetições para a não manifestação da DH. Portanto, nota-se que a gravidade da doença é diretamente proporcional ao número de repetições e a idade. Outra escala amplamente utilizada na DH é a UHDRS (do inglês, *Unified Huntington Disease Rating Scale*) que objetiva mensurar os seguintes domínios: função motora; função cognitiva; anormalidades comportamentais e capacidade funcional (GROUP, 1996).

Apesar dos diversos domínios que são comprometidos pela DH, como pode-se notar pela escala UHDRS, sua manifestação apresenta-se de maneira heterogênea. Os sinais motores parecem ser os mais consistentes e por isso o diagnóstico motor é utilizado como marcador de “início” da DH (no inglês, *age of onset*). De acordo com os critérios atuais, o “início” é definido como o ponto em que a pessoa que possui *HTT* mutado, desenvolve “a presença inequívoca de um distúrbio de movimento extrapiramidal, de outra forma inexplicável (por exemplo, coreia, distonia, bradicinesia ou rigidez)” (HOGARTH et al., 2005).

O diagnóstico clínico motor divide o curso da DH em períodos denominados “pré-manifesto” e “manifesto”. Dentro do período “pré-manifesto” existe ainda uma subdivisão entre o período “pré-sintomático” e “prodromal” que se diferenciam pela ausência de sinais e sintomas no período pré-sintomático em contraste com sinais e sintomas presentes no período prodromático mas que antecedem o diagnóstico motor (ROSS et al., 2014) (Figura 2).

Figura 2 – Divisão do Curso Temporal da DH



Legenda. Representação gráfica dos estágios clínicos da DH. As manifestações encontram-se divididas em 2 estágios clínicos: pré-manifesto (subdividido em fase pré-sintomática e prodromal) e manifesto (subdividido nas fases inicial, moderada e avançada). O eixo X representa os diferentes estágios clínicos da DH (com a idade média de 45 anos para o diagnóstico motor) e o eixo Y descendente representa a perda das habilidades funcionais e ascendente, a progressão da severidade dos sintomas ao longo das fases.

Fonte: Adaptado de Ross (2014) por Nascimento-Castro (2018).

A idade do diagnóstico motor é altamente variável (média aos 45 anos de idade), a partir de então, o paciente mostra progressão dos sintomas e apresenta uma sobrevida média de 18 anos (ROSS et al., 2014). A pneumonia por aspiração parece ser a causa de morte mais comum, sendo a disfagia apontada como provável fator causador desta aspiração (HEEMSKERK; ROOS, 2012); o suicídio aparece como a segunda causa de morte (HONRATH et al., 2018).

Apesar da causa genética conhecida e conseqüentemente a possibilidade de um teste preditivo, o requerimento do teste genético não é comum entre as pessoas com histórico familiar da DH (LACCONE et al., 1999). Em relação aos impactos psicológicos de um teste genético preditivo, a literatura é controversa mostrando tanto impactos positivos (PAULSEN et al., 2005) quanto impactos negativos (OLIVERI et al., 2018).

1.1 BREVE HISTÓRICO DA DH

George Huntington é autor da primeira publicação científica que contém uma descrição detalhada de uma desordem de caráter hereditário, com características clínicas que incluem a tendência a insanidade, ao suicídio e que apresenta movimentos involuntários denominados coreia (HUNTINGTON, 1872). Em sua homenagem, o nome Huntington foi utilizado tanto para nomear essa desordem quanto o gene e a proteína envolvidos na patologia (Figura 3).

O caráter hereditário da DH incentivou a busca pelo fator genético responsável pela hereditariedade. Em 1983, 111 anos após a descrição clínica da DH, o avanço das tecnologias de engenharia genética possibilitou a identificação do cromossomo carreador da mutação (cromossomo 4), o que se deu pela análise de amostras de sangue de duas famílias de diferentes origens étnicas (GUSELLA et al., 1983). Seis anos após, em 1989, a localização exata do gene era descrita (4p16.3) (MACDONALD et al., 1989).

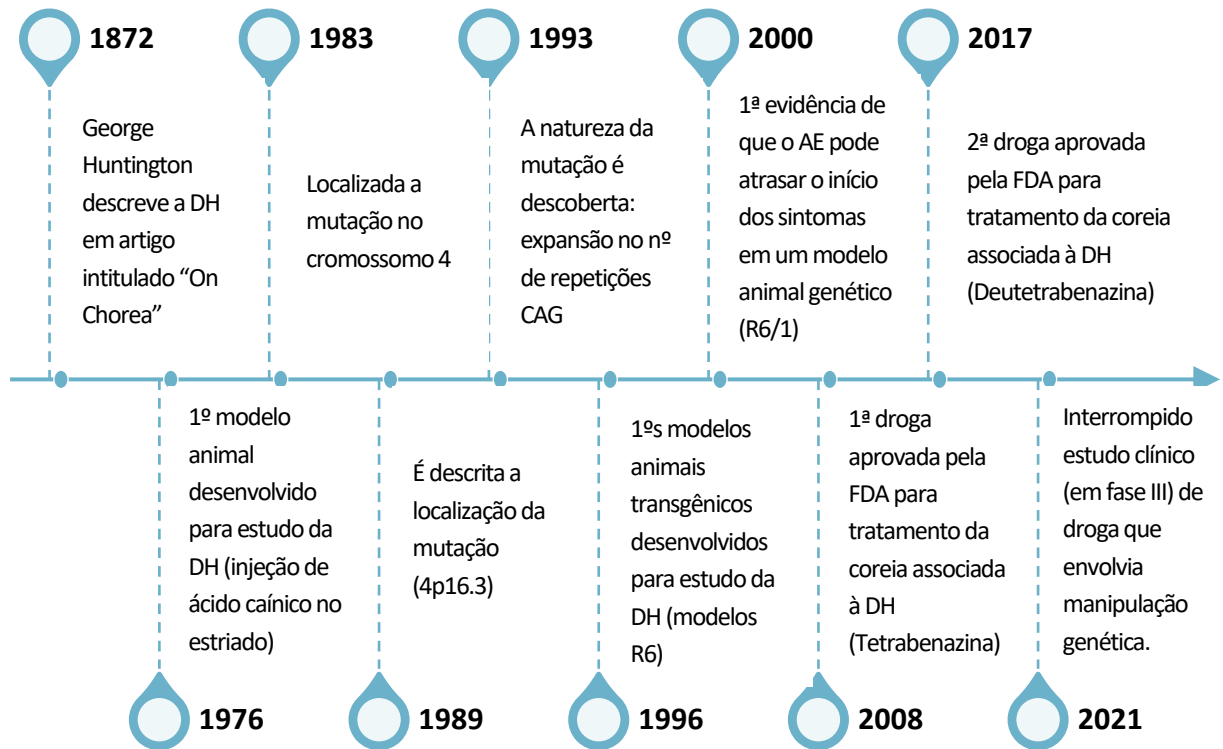
Finalmente em 1993 foi descoberta a natureza da mutação. A análise do material genético de 75 famílias afetadas pela DH possibilitou a identificação de um trinucleotídeo expandido e instável em um gene que ainda não estava depositado no banco de dados GenBank e que na época, foi denominado *IT15* (*Interesting Transcript 15*). Verificou-se, em todas as 75 famílias examinadas, que a repetição CAG no gene *IT15* era mais longa do que a variação normal. Sugeriram então, que a expansão do trinucleotídeo poderia ser a responsável pelos efeitos da DH (MACDONALD et al., 1993). A descoberta da natureza da mutação possibilitou o desenvolvimento de modelos animais genéticos para o estudo da DH e, em 1996, os modelos de camundongos transgênicos R6 já haviam sido desenvolvidos (MANGIARINI et al., 1996) (Figura 3).

Em 2008, a tetrabenazina (TBZ) foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) como o primeiro fármaco para o tratamento da coreia associada a DH. Em 2017, uma versão deuterada da TBZ (a Deutetrabenazina) também foi aprovada pela FDA. Ambas as drogas atuam como moduladores monoaminérgicos, diminuindo a disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica através da inibição de transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2). A aprovação da Deutetrabenazina em 2017, é também um marco na história da FDA, visto que se trata da primeira droga deuterada a ser aprovada pela agência americana

(DEAN; SUNG, 2018). A meia-vida mais longa da forma deuterada permite a administração em doses mais baixas e menos frequentes em comparação com a TBZ (HUNTINGTON STUDY GROUP et al., 2016). No entanto, ambos os fármacos trazem o aumento dos riscos para depressão e pensamentos suicidas que já são sintomas presentes na DH (FDA, 2008, 2017).

Atualmente, as drogas em estudo com humanos têm direcionado seus esforços para diferentes objetivos e alvos, a saber: modulação da função mitocondrial; inibição de agregados proteicos; modulação dos níveis de BDNF; modulação sináptica; modulação de dopamina e glutamato; bem como a modulação genética (KIM et al., 2021). Apesar das drogas envolvendo modulação genética parecerem as mais promissoras pela característica da doença, os ensaios clínicos que têm como alvo a manipulação diretamente a nível de DNA ou RNA também apresentam suas limitações. Só neste ano, ao menos cinco ensaios clínicos foram cancelados por falta de eficácia de drogas que atuavam com esta proposta (NCT03761849, NCT03225833, NCT04617847, NCT03225846, NCT04617860). Um deles encontrava-se em fase clínica III (NCT03761849) quando os estudos foram interrompidos em março de 2021 por recomendação do comitê independente de monitoramento de dados. O ensaio em questão refere-se a droga RO7234292 (também conhecida como IONIS-HTTRx ou Tominersen) que foi administrada intratecalmente com o objetivo de verificar sua eficácia e segurança. Tratava-se de uma terapia anti-sentido de oligonucleotídeos (ASO) que tem como alvo o RNA (não específico para mHtt), e uma vez ligados, tornam-se alvos para serem degradados por uma RNase H (RINALDI; WOOD, 2018) (Figura 3).

Figura 3 – Linha do Tempo relativa à DH



Legenda: a linha do tempo contempla 10 importantes marcos na história da DH compreendidos em um período de 149 anos (1872 – 2021).

Fonte: a autora.

1.2 HUNTINGTINA

O gene *HTT* humano contém 67 éxons e codifica para a Htt, uma proteína grande que contém 3.144 aminoácidos e 348 kDa (MACDONALD et al., 1993; SAUDOU; HUMBERT, 2016). A Htt é predominantemente composta por repetições HEAT que são unidades repetidas de cerca de 50 aminoácidos (ROSS; TABRIZI, 2011). As repetições HEAT também ocorrem em outras proteínas e parecem ser importantes na mediação proteína-proteína. Tais interações resultam em várias conformações tridimensionais possíveis para a Htt (SAUDOU; HUMBERT, 2016).

A Htt sofre extensa modificação pós-tradução, sendo que a principal modificação é fosforilação. Outra possível modificação é palmitoilação na cisteína 214, possibilitando a sua associação à membranas (ROSS; TABRIZI, 2011). Quanto à localização, a Htt é uma proteína citoplasmática mas também é encontrada no núcleo (SAUDOU; HUMBERT, 2016).

A região N-terminal foi extensivamente estudada, uma vez que contém o trecho polyQ expansível (SAUDOU; HUMBERT, 2016). Os 17 aminoácidos no N-terminal da Htt são especialmente suscetíveis a modificações pós-transcricionais, incluindo fosforilação, acetilação, ubiquitinação e SUMOilação (fixação de modificadores pequenos similares à ubiquitina) (ROSS; TABRIZI, 2011; SAUDOU; HUMBERT, 2016).

Embora muitas vezes seja reportada como uma proteína de função desconhecida, distintas funções já foram propostas embora ainda não totalmente compreendidas (LIU; ZEITLIN, 2017). O início do entendimento da função da Htt do tipo-selvagem, se deu em uma tentativa de desenvolver um camundongo knock-out para *HTT*. Verificou-se que esta manipulação era letal antes do dia embrionário 8,5, mostrando que a Htt é expressa logo no início do desenvolvimento embrionário inicial quando desempenha um papel crítico (DUYAO et al., 1995). Por esta e outras razões, a DH é também chamada de uma desordem do neurodesenvolvimento (VAN DER PLAS; SCHULTZ; NOPOULOS, 2020; WIATR et al., 2018).

Desde muito tempo, os cientistas procuraram compreender se a patologia da DH é causada por um ganho de função da mHtt ou por uma perda de função da Htt. A própria tentativa de realizar um camundongo knock-out para *HTT* foi uma busca que veio com o objetivo de distinguir entre essas duas possibilidades (DUYAO et al., 1995). Atualmente, a literatura apresenta evidências para as duas hipóteses, onde ocorreria tanto o ganho de uma propriedade tóxica pela mHtt quanto uma perda de função da Htt (GIL; REGO, 2008; SAUDOU; HUMBERT, 2016).

A revisão por Liu e Zeitlin (2017) traz uma tabela contendo 13 funções propostas para a proteína Htt do tipo-selvagem. São elas: (i) transporte através de microtúbulos; (ii) tráfego baseado em interação com F-actina; (iii) função de Rab11 e tráfego de outras proteínas Rab; (iv) transporte de BDNF; (v) ciliogênese; (vi) transcrição e modificações na cromatina; (vii) regulação da expressão gênica pós-transcricional; (viii) neurogênese; (ix) sinaptogênese e plasticidade sináptica; (x) vias de sinalização; (xi) sobrevivência celular e respostas ao estresse celular; (xii) macroautofagia; (xiii) reparo de dano ao DNA (LIU; ZEITLIN, 2017).

A hipótese referente ao ganho de função se baseia nos fragmentos tóxicos que mHtt pode gerar quando clivada. Um desses fragmentos é gerado quando mHtt é clivada pela caspase 6 na posição 586. Além disso, fragmentos menores do que aqueles gerados por caspases também são encontrados e denominados cp-1 (ou cp-A) e cp-2 (ou cp-B). Os fragmentos podem ser monoméricos, ou ainda, formar pequenos oligômeros. Alguns dos possíveis efeitos tóxicos causados pelos fragmentos no citoplasma incluem a inibição de chaperonas, proteassomas e autofagia, o que pode causar o acúmulo de proteínas anormalmente dobradas e outros constituintes celulares (ROSS; TABRIZI, 2011).

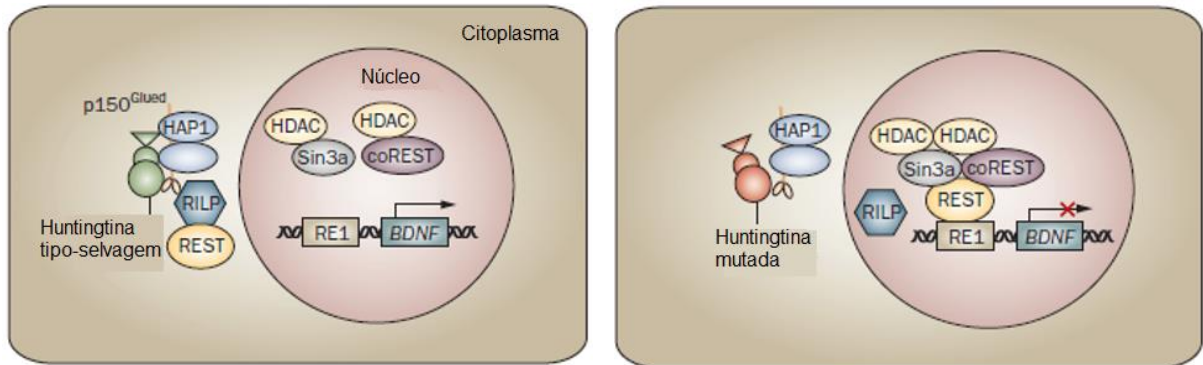
Na DH, é comum encontrar os chamados corpos de inclusão (ROSS; TABRIZI, 2011) que são o resultado do acúmulo de agregados proteicos (KOPITO, 2000). Estes corpos de inclusão podem ser tanto citoplasmáticos quanto nucleares (TABRIZI et al., 2020) e podem incluir outras proteínas além da Htt em sua constituição (BENNETT et al., 2005). Se as inclusões são benéficas, neutras ou patogênicas é uma questão que permanece em discussão e evidências em todos estes sentidos já foram relatadas (ARRASATE et al., 2004; BENNETT et al., 2005; CHEN; WOLYNES, 2017; TABRIZI et al., 2020).

Um aspecto importante a ser considerado na patogênese da DH é a interferência da Htt na transcrição de outros genes (ROSS; TABRIZI, 2011; ZUCCATO; CATTANEO, 2009). Por exemplo, a neurotrofina BDNF (do inglês *Brain-derived neurotrophic factor* ou fator neurotrófico derivado do encéfalo) é encontrado em níveis diminuídos no encéfalo de pacientes e em modelos animais para DH (PLÁCIDO et al., 2021). Uma ligação mecânica foi proposta entre Htt e *BDNF* (ZUCCATO; CATTANEO, 2009) e será explorada a seguir.

Estudos indicam que a transcrição de *BDNF* depende, pelo menos em parte, de um efeito estimulatório da proteína Htt. O *BDNF* tem 9 promotores, mas a proteína Htt parece exercer seu papel estimulatório através do promotor II (ZUCCATO; CATTANEO, 2009). Na região promotora II do *BDNF* encontra-se o silenciador RE1 e a Htt impede a ativação deste silenciador por um mecanismo explicado a seguir. A ativação do silenciador RE1 se dá pela passagem de REST do citoplasma para o núcleo. Quando REST é translocado para o núcleo, ele recruta co-repressores que ativam o silenciador RE1 e a transcrição de *BDNF* é impedida. No entanto, como a proteína Htt é capaz de reter REST no citoplasma ela impede a formação do complexo repressor aumentando assim a transcrição de *BDNF*. Já a mHtt é menos capaz de reter REST no citoplasma o que leva a menor transcrição de *BDNF*. Interessantemente, a Htt

também facilita a transcrição de muitos outros genes também controlados por RE1 (Figura 4) (CATTANEO; ZUCCATO; TARTARI, 2005; ZUCCATO; CATTANEO, 2009).

Figura 4 - Regulação da transcrição do gene *BDNF* pela proteína Htt



Legenda: na imagem à esquerda a proteína Htt do tipo-selvagem, juntamente com os demais componentes do complexo (HAP1, p150^{Glued}, RILP) retêm REST no citoplasma, evitando a formação de um complexo co-repressor e permitindo que o *BDNF* seja transcrito. Na imagem à direita, a proteína Htt está mutada e por isso é menos capaz de reter REST no citoplasma. O REST entra no núcleo e o complexo repressor, formado por REST, Sin3a, coREST e HDAC se forma ativando o silenciador RE1 dentro do promotor II. A formação deste complexo leva à redução da transcrição de genes neuronais, incluindo o *BDNF*.

Fonte: figura modificada a partir de (ZUCCATO; CATTANEO, 2009).

A relação de Htt com o BDNF é um caso interessante para a compreensão dos papéis da proteína Htt. Além de atuar na transcrição, Htt também está envolvida no transporte de vesículas contendo BDNF ao longo dos microtúbulos. Htt faz parte do complexo motor, sua fosforilação sinaliza para transporte anterógrado mediado por cinesina e Htt não fosforilada sinaliza para o transporte retrógrado mediado por dineína. Esse transporte é essencial na via cortico-estriatal e a mHtt reduz o transporte em ambas as direções. Visto que diferentes estudos têm demonstrado que o BDNF é produzido no córtex cerebral e, por via anterógrada, transportado para o estriado, o comprometimento da função da Htt leva à redução do suporte trófico nesta região (GAUTHIER et al., 2004; ZUCCATO; CATTANEO, 2009).

Uma série de proteínas interagem com a Htt e várias delas especificamente na região N-terminal, a exemplo da já mencionada proteína REST (LI; LI, 2004). A primeira proteína com interação à Htt a ser identificada foi a HAP1 (proteína 1 associada a huntingtina). Diferente da Htt que é expressa em todo o corpo, HAP1 é expressa predominantemente no SNC (WU; ZHOU, 2009) e faz parte dos processos mencionados anteriormente: é parte do complexo proteico que retem REST no citoplasma e também é parte do complexo motor associado aos microtúbulos (ZUCCATO; CATTANEO, 2009).

Como pode-se notar, a Htt possui uma série de funções essenciais não apenas no período de desenvolvimento embrionário, mas também no encéfalo adulto. Portanto, seria desejável que as terapias que têm como alvo o DNA ou RNA reduzissem apenas a expressão da mHtt. No entanto, as ferramentas atuais ainda são limitadas e encontram dificuldades em discriminar um alelo em que a única diferença universal é o maior número de repetições CAG. Além disso, outros genes também possuem repetições CAG o que torna a tarefa ainda mais complexa. Para solucionar este desafio, abordagens envolvendo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) têm sido desenvolvidas na tentativa de direcionar o tratamento para o alelo mutante. No entanto, visto que esses SNPs não são universais, abordagens a nível de grupos étnicos ou mesmo individuais precisam ainda ser desenvolvidas (FIELDS et al., 2021; SHANNON, 2020). Abordagens que tem como o alvo o promotor da *HTT* não parecem uma boa estratégia visto que o promotor da *HTT* é do tipo “*housekeeping*”, ou seja, um promotor que produz ampla expressão de genes, o que, mais uma vez, dificultaria o direcionamento adequado (ROSS; TABRIZI, 2011).

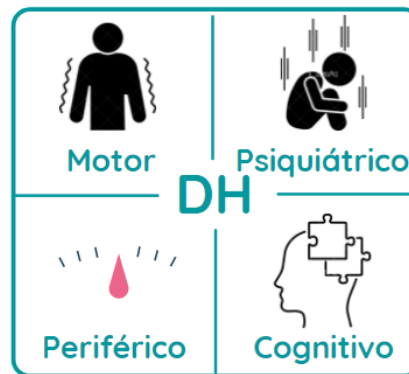
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DH

Embora a coreia não seja exclusividade desta desordem (HERMANN; WALKER, 2015), este é o sintoma mais reconhecível na DH (WYANT; RIDDER; DAYALU, 2017). Por isso, a DH é amplamente reconhecida como uma doença neurodegenerativa de caráter motor, o que traz consigo a ideia de que os sintomas motores são os de maior impacto na vida dos pacientes e familiares (WYANT; RIDDER; DAYALU, 2017). No entanto, um estudo recente que incluiu tanto indivíduos em fase prodromal quanto manifestos, mostrou que os três sintomas de maior impacto são dificuldade de pensamento, sono prejudicado ou sonolência diurna e problemas emocionais (GLIDDEN et al., 2020). Sintomas não-motores como estes podem estar presentes mais de uma década antes dos sintomas motores (DUFF et al., 2007; PAULSEN et al., 2008) e, portanto, podemos perceber que o impacto da DH na qualidade de vida dos indivíduos e familiares começa muito antes de um diagnóstico motor (BATES et al., 2015).

Apesar de há bastante tempo os sintomas clínicos serem geralmente referidos como uma tríade composta por distúrbios motores, cognitivos e psiquiátricos, os distúrbios

periféricos, como a perda de peso, estão também presentes (NANCE, 1998). Portanto, aqui iremos nos referir aos sinais e sintomas da DH como uma tétrede que é composta por distúrbios motores, cognitivos, psiquiátricos e periféricos (Figura 5) e serão abordados na sequência.

Figura 5 - Tétrede de sinais e sintomas relacionados a DH



Legenda: os sinais e sintomas da DH estão sendo representados como uma tétrede composta por distúrbios motores, psiquiátricos, cognitivos e periféricos.

Fonte: a autora. Imagem produzida com o auxílio da ferramenta canva.com

1.3.1 Alterações motoras

As alterações motoras apresentadas pela DH podem ser classificadas em 2 grupos: (i) a presença de movimentos involuntários e (ii) comprometimento dos movimentos voluntários. A coreia é a mais notável hipercinesia da DH é definida como um “estado de movimentos excessivos e espontâneos, de periodicidade irregular, não repetitivos, distribuídos aleatoriamente e de caráter abrupto” (LAKKE, 1981). Além da coreia, a distonia também pode compor os movimentos hipercinéticos. Em estágios mais avançados, ocorre o comprometimento dos movimentos voluntários que podem ser compostos por bradicinesia, acinesia e rigidez (REINER; DENG, 2018). Nos casos de manifestação juvenil da DH, a coreia deixa de ser a manifestação motora típica e dá lugar ao predomínio por rigidez e bradicinesia (RUOCCO et al., 2006). Outros sintomas motores também podem estar presentes na DH e incluem problemas de controle motor fino, disartria, disfagia e sintomas oculomotores (WEYDT; DUPUIS; PETERSEN, 2018).

1.3.2 Características psiquiátricas

Já no estágio pré-manifesto da DH, distúrbios neuropsiquiátricos podem estar presentes. Paoli e colaboradores (2017) apresentam em sua revisão uma lista e descrição detalhada de sintomas psiquiátricos que já foram relatados na DH. São eles: depressão; apatia; ansiedade; irritabilidade/agressão; desinibição; impulsividade; desordens sexuais; transtornos obsessivos e compulsivos e, com menos frequência, psicose. Os sintomas psiquiátricos mais frequentemente relatados são a depressão e a ansiedade, com prevalências que variam entre 15% - 69% (revisado por PLÁCIDO *et al.*, 2021) e 13% - 71% (DALE; VAN DUIJN, 2015) respectivamente, a depender do estudo. Talvez a depressão seja um dos sintomas psiquiátricos mais preocupante já que é um importante fator de risco para o suicídio (HONRATH *et al.*, 2018) e altas taxas de suicídio na DH são observadas desde a descrição clínica por Huntington (HUNTINGTON, 1872). A taxa de suicídio parece ser quatro vezes maior do que na população geral (FARRER, 1986) e é a segunda causa de morte na DH (HONRATH *et al.*, 2018).

A depressão na DH é tratada de modo semelhante ao transtorno depressivo maior (TDM) e os pacientes geralmente respondem bem ao tratamento com inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) (WYANT; RIDDER; DAYALU, 2017). Na TDM é bem descrito que a incidência é maior entre as mulheres (em torno de duas vezes a mais) (OTTE *et al.*, 2016). Na DH, em um estudo que avaliou a diferença entre os gêneros, as mulheres mostraram uma prevalência significativamente maior de história de episódios depressivos mas em uma proporção menor do que aquela encontrada no TDM (ZIELONKA *et al.*, 2013). A importância do quadro depressivo na DH também se dá por seus possíveis efeitos negativos na performance funcional, cognitiva e motora (MAYEUX *et al.*, 1986; ZIELONKA *et al.*, 2013; GALTS *et al.*, 2019).

Os sintomas psiquiátricos que afetam profundamente a qualidade de vida dos pacientes e familiares não se restringem a depressão (PAOLI *et al.*, 2017). Recentemente, McDonnell e colaboradores (2020) descreveram 9 domínios do comportamento de risco que podem estar comprometidos na DH. São eles: comportamentos impulsivos/compulsivos; comportamentos sociais adversos; abuso de substâncias; direção perigosa; comportamentos sexuais inadequados; comportamentos ilegais; prisões; abuso verbal/emocional e violência física (MCDONELL *et al.*, 2020). Esses comportamentos de risco parecem ter uma correlação negativa com a idade,

portanto indivíduos mais jovens tendem a apresentar mais comportamentos de risco. Tais comportamentos parecem estar associadas com o envolvimento de disfunções nas redes frontoestriatais e mesolímbicas (MCDONELL et al., 2020). Assim como a maior tendência ao suicídio já havia sido relatada por George Huntington, ele também relatou o que chamou de “tendência a insanidade” descrevendo em seu artigo sobre comportamentos sexuais inadequados que observou em dois indivíduos com DH (HUNTINGTON, 1872).

1.3.3 Alterações cognitivas

Embora o declínio cognitivo esteja presente na DH, os indivíduos variam em relação a como o distúrbio cognitivo se manifesta (PAPP; KAPLAN; SNYDER, 2011). Diversas funções cognitivas podem ser afetadas, tais como: velocidade de processamento; atenção; memória de trabalho; dificuldades de aprendizagem; funcionamento executivo; habilidades visuoespaciais; processamento emocional e consciência (PAPP; KAPLAN; SNYDER, 2011; PAULSEN et al., 2017). Dentre essas alterações, a velocidade de processamento parece ser o déficit cognitivo mais comum e um dos primeiros domínios afetados a serem notados na DH pré-manifesta (PAPP; KAPLAN; SNYDER, 2011).

Um ponto importante a ser considerado é a influência que a cognição e os sintomas psiquiátricos têm um sobre o outro. Por exemplo, Smith e colaboradores (2012) encontraram que a depressão é associada com uma pior performance cognitiva em diversas tarefas (SMITH et al., 2012). Uma influência oposta também pode ser observada. Mccusker e colaboradores (2013), encontraram que pacientes sem a consciência repleta da sua condição médica eram menos propensos a ficar deprimidos (MCCUSKER et al., 2013).

1.3.4 Alterações em tecidos periféricos

Além de alterações motoras, outros aspectos da doença se manifestam em tecidos periféricos. A origem das alterações periféricas podem ou não ter o envolvimento de disfunções advindas do SNC (AZIZ et al., 2010; VAN DER BURG; BJÖRKQVIST; BRUNDIN, 2009). A perda de peso é uma marca da DH (GILBERT, 2009) e, inclusive, um importante fator na taxa de progressão da DH, com maiores índices de massa corporal associadas e menores taxas de progressão (VAN DER BURG et al., 2017). Além da perda de peso, outras alterações incluem atrofia muscular, disfunção metabólica, distúrbios endócrinos, atrofia testicular

(ROSS; TABRIZI, 2011; VAN DER BURG; BJÖRKQVIST; BRUNDIN, 2009), alterações no sistema imune periférico (ANDRICH et al., 2009; VALADÃO et al., 2020) e, mais recentemente, alterações na microbiota intestinal (DU et al., 2021; RHUTIK S PATIL et al., 2021; WASSER et al., 2020). Anormalidades no sistema nervoso autônomo também podem acompanhar a DH e afetar diferentes domínios como: trato gastrointestinal; urinário; sexual e cardiovascular (AZIZ et al., 2010).

As alterações nos tecidos periféricos, são cada vez mais entendidas como características importantes do fenótipo. Por exemplo, alguns estudos apontam que os distúrbios cardíacos estariam entre as principais causas de morte na DH devido a uma série de alterações que já foram observadas no músculo cardíaco (MELKANI, 2016; ZIELONKA; MIELCAREK, 2014).

1.4 NEUROLOGIA DA DH

A proteína Htt é expressa em todo o corpo (MARQUES SOUSA; HUMBERT, 2013). No entanto, a vulnerabilidade de diferentes tecidos, regiões e células varia consideravelmente (VAN DER BURG; BJÖRKQVIST; BRUNDIN, 2009) e a razão disso é uma questão ainda não completamente compreendida.

Apesar do conhecimento da causa genética da DH, o mecanismo por trás da neuropatologia ainda não é bem compreendido. Existem algumas teorias e mais de um processo pode estar ocorrendo (AJITKUMAR; JESUS, 2021). Alguns desses possíveis mecanismos já foram citados como as inclusões, onde apesar de alguns trabalhos encontrarem efeitos benéficos (ARRASATE et al., 2004; SAUDOU et al., 1998) outros relacionaram com efeitos tóxicos (DAVIES et al., 1997; DIFIGLIA et al., 1997), a desregulação da transcrição de certos genes e mudanças no transporte axonal. Além dessas teorias, outras incluem ainda a disfunção sináptica, disfunção mitocondrial e alteração no metabolismo energético (AJITKUMAR; JESUS, 2021).

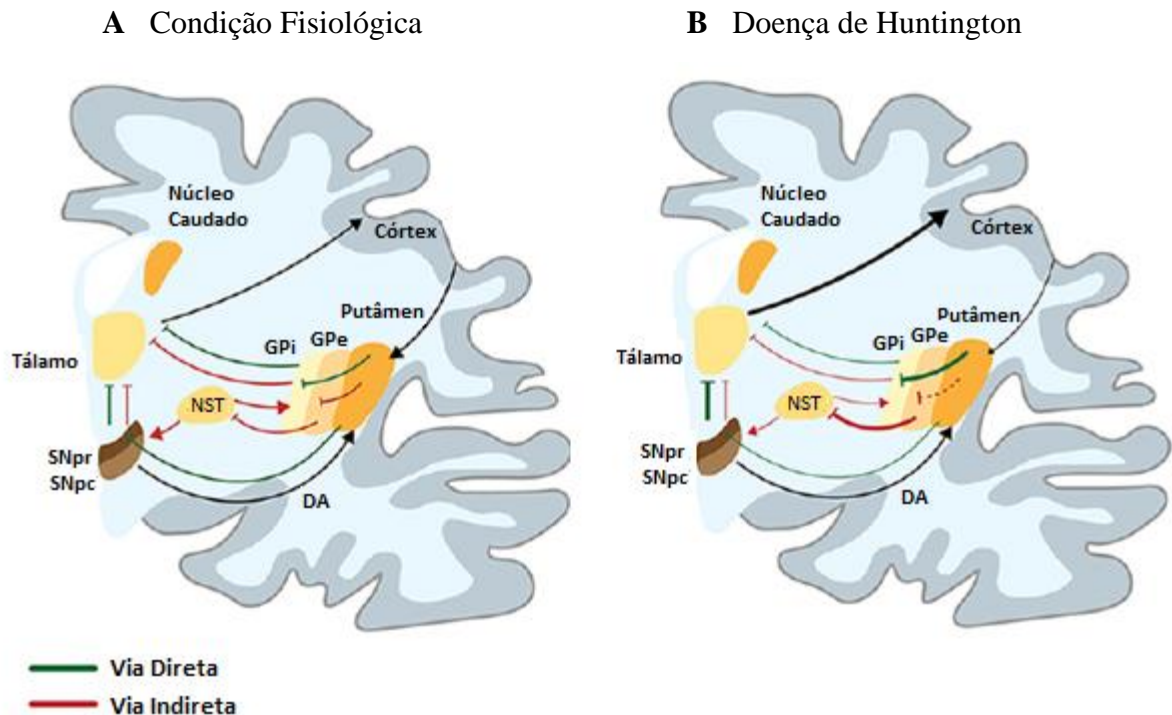
Sabe-se que o estriado é uma das principais regiões encefálicas onde ocorre perda neuronal (VONSATTEL; DIFIGLIA, 1998). Também já foi descrita degeneração em outras regiões encefálicas como o córtex cerebral, formação hipocampal, globo pálido, substância

negra *pars reticulata* (SNpr) e hipotálamo (WALDVOGEL et al., 2014). Mas, ao contrário do que se possa imaginar, os níveis da expressão de mHtt não são aumentados no estriado e, portanto, a degeneração seletiva não poderia ser explicado por aumentos seletivos na transcrição (STRONG et al., 1993; VAN RAAMSDONK; WARBY; HAYDEN, 2007). A maior vulnerabilidade encontrada no estriado também possui algumas teorias. Algumas delas são o menor suporte trófico de BDNF e a maior suscetibilidade a excitotoxicidade glutamatérgica na projeção cortico-estriatal (ROSS; TABRIZI, 2011).

Ainda, dentro do próprio estriado existe uma “preferência” na degeneração por um ou outro tipo neuronal. Os neurônios espinhosos médios GABAérgicos, conhecido pela sigla inglesa MSNs, compõem 95% do estriado e são os mais vulneráveis enquanto os interneurônios (que compõem 5% da população neuronal estriatal) são relativamente conservados. No entanto, dentro dos próprios MSNs existe uma seletividade que parece depender da expressão proteica. Os MSNs que contém encefalina e expressam o receptor de dopamina D2 participam da via indireta (iMSNs) e são preferencialmente afetados. Os MSNs que contém a substância-P e expressam o receptor de dopamina D1 participam da via direta (dMSN) e são afetados mais tarde na DH (Figura 6) (REINER; DENG, 2018).

Os iMSNs projetam-se para o globo pálido externo (GPe), núcleo subtalâmico (NST), globo pálido interno (GPi), tálamo e córtex. O resultado desta via que contém neurônios inibitórios GABAérgicos (estriado, GPe, GPi), e excitatórios glutamatérgicos (NST, tálamo) é a inibição de movimentos indesejados (prevenindo a hiperkinesia). Já a via direta projeta-se diretamente para o GPi, tálamo e córtex, resultando na facilitação de movimentos desejados (evitando hipocinesia) (CHEN et al., 2013) (Figura 6A). Como a via indireta é afetada primeiramente, os sintomas começam com hiperkinesia. Com a evolução da doença ocorre também morte dos neurônios da via direta e os sintomas mudam para hipocinesia (REINER; DENG, 2018). Essa seletividade poderia explicar o padrão motor bifásico que é encontrada na DH, onde os sintomas mudam de movimentos hiperkinéticos para hipocinesia ao longo do curso da DH (REINER; DENG, 2018) (Figura 6B).

Figura 6 – Representação esquemática das vias direta e indireta nos núcleos da base



Legenda: (A) Fisiologicamente, a via direta (linha verde) participa da ativação do movimento. Essa via é ativada quando a ativação do córtex produz a liberação de glutamato no estriado, ativando neurônios espinhosos médios (MSNs) GABAérgicos da via direta. Ao liberar GABA para o globo pálido interno (GPI), os MSNs inibem neurônios do GPI que também são GABAérgicos. Isso causa a ativação dos neurônios glutamatérgicos presentes no tálamo, que se projetam para o córtex, resultando na ativação dos movimentos. Ao contrário, a via indireta (linha vermelha) participa da inibição do movimento. Os iMSNs GABAérgicos se projetam para o globo pálido externo (GPe) e núcleo subtalâmico (NST). Os iMSNs liberam GABA no GPe, inibindo os neurônios também GABAérgicos presentes no GPe. Isso leva à desinibição dos neurônios glutamatérgicos do NST, que ativa os neurônios GABAérgicos do GPI. Esses neurônios inibem os neurônios presentes no tálamo, resultando em uma redução do movimento. (B) Na DH (estágio inicial), os iMSNs parecem ser afetados antes dos dMSNs, o que causa a perda da atividade inibitória da via indireta levando ao aparecimento de movimentos coreicos (distúrbio hiperkinético) em estágios iniciais. Essas vias também envolvem outras estruturas que estão representadas na figura.

Fonte: figura modificada a partir de (Troncoso-Escudero *et al.*, 2020) e reproduzida com a permissão dos autores.

Interessantemente, além do envolvimento clássico do estriado com a hipocinesia e hiperkinesia, esta região está também envolvida na impulsividade (DALLEY; ERSCHKE, 2019), uma característica que pode estar presente na DH (MCDONELL *et al.*, 2020), sendo o estriado ventral relacionado ao início do comportamento impulsivo e o estriado dorsal à interrupção de uma resposta motora impulsiva em andamento (DALLEY; ERSCHKE, 2019).

1.5 NEUROTRANSMISSORES NA DH

Como muitos sintomas aparecem antes da neurodegeneração significativa (VONSATTEL et al., 1985), possivelmente a explicação para fenótipo anterior a neurodegeneração vem de outras disfunções. Além disso, há relatos de casos com indivíduos com DH clinicamente reconhecível, mas sem anormalidades macroscópicas ou microscópicas que possam estar relacionadas à DH, sugerindo a presença de alterações patológicas alternativas (SMITH-DIJAK; SEPERS; RAYMOND, 2019; VONSATTEL et al., 1985). Um exemplo de alteração ocorre nos níveis de neurotransmissores e esta alteração é o alvo utilizado pelos dois únicos fármacos aprovados pela FDA para o tratamento da coreia associada à DH.

Tanto a regulação positiva quanto a negativa nos níveis de neurotransmissores tem sido relatada na literatura. Provavelmente resultados opostos estão relacionados com diferentes estágios de progressão da doença em que os tecidos foram analisados e, conseqüentemente, representando diferentes pontos do padrão motor bifásico (CEPEDA et al., 2018; CHEN et al., 2013). Alguns estudos *post mortem*, mostram concentrações elevadas de dopamina (DA) e norepinefrina (NE) nos núcleos da base (SPOKES, 1980, 1981). Além disso, uma regulação positiva da enzima tirosina hidroxilase (TH, a enzima limitante da biossíntese da dopamina) foi relatada no estriado de tecido *post-mortem* onde uma intensa zona TH + foi detectada ao longo da borda ventricular do núcleo caudado (PARENT; BÉDARD; POURCHER, 2013). No entanto, em outros estudos, as concentrações de DA, e de seu metabólito, o ácido homovanílico (HVA), encontravam-se reduzidas no estriado (BERNHEIMER et al., 1973; KISH; SHANNAK; HORNYKIEWICZ, 1987).

Utilizando um diferente tipo de amostra, um estudo com fluído cerebrospinal coletado por punção lombar encontrou níveis elevados de DA enquanto NE não estava alterado (GARRETT; SOARES-DA-SILVA, 1992). Em concordância com a hipótese do estágio para explicar esses resultados opostos, um mesmo estudo encontrou que HVA estava aumentado na DH manifesta, mas reduzido no plasma de pacientes em estágio pré-manifesto (ROSAS et al., 2015). No estudo publicado por Spokes (1980), além do aumento significativo de NE, e de seu precursor DA, encontrou-se que NE também estava aumentada nas seguintes regiões encefálicas: núcleo caudado, globo pálido lateral e região *pars reticulata* da substância negra. Já dopamina foi encontrada aumentada em um número maior de regiões: putâmen, núcleo caudado, globo pálido lateral, globo pálido medial, núcleo accumbens e região *pars compacta* da substância negra (SPOKES, 1980).

Alterações em outros neurotransmissores também são relatadas. Kish e colaboradores (1987) encontraram níveis elevados de serotonina (5-HT) e de seu principal metabólito, 5-HIAA (KISH; SHANNAK; HORNYKIEWICZ, 1987). Já outro estudo encontrou 5-HIAA e o precursor de 5-HT, triptofano, reduzido nos pacientes (DU; PANG; HANNAN, 2013).

A estratégia do tratamento para a coreia, tetrabenazina e deutetrabenazina, baseia-se na diminuição dos níveis de monoaminas na fenda sináptica, o que ocorre através do bloqueio de VMAT-2 (do inglês, *vesicular monoamine transporter 2*). Uma vez que VMAT-2 é um transportador responsável pelo empacotamento de 5-HT, DA e NE do citoplasma para as vesículas pré-sinápticas, sua inibição leva a uma degradação prematura dessas monoaminas. A depleção da DA reduz a coreia, no entanto, a depleção de 5-HT e NE possivelmente é o fator responsável pela piora dos sintomas de depressão e ansiedade que já acompanham a DH (HAYDEN et al., 2009; WYANT; RIDDER; DAYALU, 2017).

1.6 MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA DH

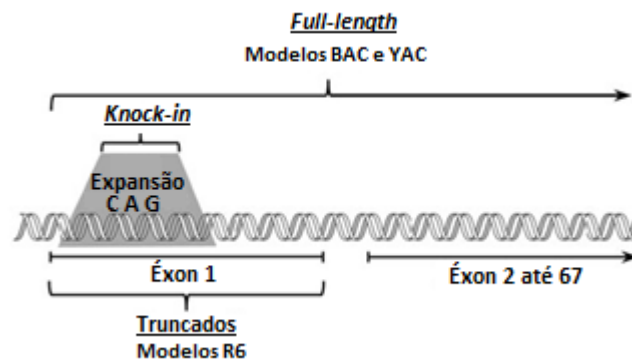
O envolvimento dos núcleos da base na produção dos movimentos coreicos é um conhecimento mais antigo do que o causa genética. Por isso, os primeiros modelos animais não foram modelos genéticos. Em 1976, já havia sido desenvolvido o primeiro modelo animal para DH através da injeção de ácido caínico diretamente no estriado dos animais causando degeneração da região (COYLE; SCHWARCZ, 1976).

Em 1996, três anos após a descoberta da mutação, os primeiros modelos genéticos foram desenvolvidos, os modelos R6/1 e R6/2. Estes são modelos transgênicos truncados, pois contém apenas o primeiro éxon do gene com uma expansão do triplete CAG (Figura 7) (MANGIARINI et al., 1996). Os camundongos R6 são um modelo bastante comum e especialmente úteis para o estudo dos estágios finais por possuir uma progressão do fenótipo acelerada (SMITH-DIJAK; SEPERS; RAYMOND, 2019).

Assim como em humanos, em modelos animais o tamanho das repetições também influencia a idade inicial dos sintomas. O modelo R6/1 possui aproximadamente 115 CAG e iniciam os sintomas aos 4/5 meses enquanto que R6/2 possui aproximadamente 150 CAG e o início se dá aos 2 meses de idade (BENN et al., 2010). Paradoxalmente, camundongos R6/2

com repetições super-longas (>350 repetições) foram selecionados ao longo de alguns anos (pela instabilidade inter-geracional natural que ocorre nesse modelo) e, ao contrário do que se poderia esperar, houve atraso no início dos sintomas desses animais (MORTON et al., 2009).

Figura 7 – Modelos animais genéticos para o estudo da DH.



Legenda: Duas categorias de modelos animais genéticos para o estudo da DH estão sendo representadas na figura. A primeira categoria refere-se aos modelos transgênicos que por sua vez incluem tanto os modelos truncados quanto os modelos de comprimento total (no inglês, *full-length*). Os modelos truncados contêm o éxon 1 com a expansão CAG e estão sendo representados pelos modelos R6, mas também compreendem outros modelos como o N171-82Q. Já os modelos de comprimento total incluem o gene humano completo e, nesta categoria, encontram-se os modelos BAC (do inglês, *Bacterial Artificial Chromosome*) e YAC (do inglês, *Yeast Artificial Chromosome*). A segunda categoria inclui os modelos *Knock-in*, nos quais apenas a expansão CAG é inserida dentro do genoma e inclui modelos como o HdhQ111.

Fonte: figura modificada de (REBEC, 2013) e reproduzida com a permissão da revista *Antioxidants & Redox Signaling*.

Ainda dentro da categoria dos transgênicos existem os modelos de comprimento total da *HTT* (no inglês, *full-length*). Aqui estão compreendidos os modelos BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) e YAC (*Yeast Artificial Chromosome*). Estes tiveram o gene humano completo inserido no genoma através de um cromossomo artificial de bactéria ou de um cromossomo artificial de levedura respectivamente (Figura 7) (REBEC, 2013).

Uma segunda categoria de modelos animais para o estudo da DH, inclui camundongos nas quais a repetição CAG expandida é inserida diretamente no gene da *HTT* do camundongo. Essa categoria inclui modelos como o HdhQ111 (Figura 7) (REBEC, 2013).

1.6.1 Camundongos YAC128

Diferente de modelos animais como R6 que possuem um fenótipo acelerado e tempo de vida mais curto, os camundongos YAC128 apresentam um fenótipo mais tardio, o que é ideal para a investigação de intervenções terapêuticas no período pré-sintomático.

Os primeiros modelos de camundongos YAC para DH, derivados da linhagem FVB/N, foram manipulados para conter tamanhos CAG semelhantes aos observados nos pacientes com início dos déficits motores na meia idade (YAC46 - com 46 repetições CAG) e em estágio juvenil (YAC72 - com 72 repetições CAG) (HODGSON et al., 1996; HODGSON et al., 1999). No entanto, em um esforço para criar um camundongo transgênico com um fenótipo um pouco mais acelerado, com menor variabilidade fenotípica e, portanto, mais adequado para ensaios terapêuticos, camundongos YAC com 128 repetições CAG (YAC128) foram desenvolvidos (SLOW et al., 2003; VAN RAAMSDONK; WARBY; HAYDEN, 2007).

Os camundongos YAC128 apresentam atrofia seletiva do estriado aos 12 meses, degeneração cortical (POULADI; MORTON; HAYDEN, 2013), além da diminuição da neurogênese hipocampal (SIMPSON et al., 2011). Em relação ao fenótipo, nosso grupo (DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO et al., 2018) e outros (GARCIA-MIRALLES et al., 2017; POULADI et al., 2008) demonstraram a presença de sintomas psiquiátricos, como comportamento do tipo-depressivo e ansioso, bem como déficits cognitivos pré- motores (VAN RAAMSDONK et al., 2005a). Assim como na condição humana, algumas alterações que precedem a degeneração no estriado também foram verificadas. Por exemplo, a análise de fibras mielinizadas do corpo caloso demonstrou que as bainhas de mielina são mais finas nos camundongos YAC128 com apenas 45 dias de idade (YI TEO et al., 2016). Os camundongos YAC128 também apresentam alterações nos níveis de neurotransmissores, como déficits de DA no estriado aos 5 meses de idade (GARCIA-MIRALLES et al., 2016).

Assim como nos pacientes, os camundongos YAC128 exibem um padrão locomotor bifásico com hiperlocomoção aos 3 meses de idade seguido por hipolocomoção detectada aos 12 meses de idade (SLOW et al., 2003). Em relação aos achados periféricos, ao contrário do que ocorre na condição humana, os camundongos YAC128 apresentam ganho de peso (POULADI et al., 2010), o que também ocorre no modelo BAC para a DH (GRAY et al., 2008).

Portanto, as similaridades entre o fenótipo dos camundongos YAC128 e a condição humana fazem deste modelo uma excelente ferramenta para compreender melhor a fisiopatologia da doença e para testar potenciais estratégias terapêuticas a fim de modificar a progressão da DH.

1.7 FATORES QUE AFETAM O INÍCIO DOS SINTOMAS DA DH

A DH é tipicamente uma doença de início na meia-idade, no entanto também apresenta casos juvenis e de início tardio (ROSS et al., 2014). O principal determinante do início dos sintomas parece ser o tamanho das repetições CAG com longas expansões acelerando o início e a taxa de progressão (DJOUSSÉ et al., 2003; LANGBEHN et al., 2019). No entanto, indivíduos compartilhando CAG de tamanho idêntico apresentam variabilidade nos sintomas e na idade de aparecimento dos mesmos (WEXLER et al., 2004). Um estudo de caso que, relatando diferença motoras e comportamentais importantes entre gêmeos monozigóticos portadores da DH, verificaram que eles se encontravam em diferentes estágios da DH mesmo possuindo a mesma idade (GEORGIOU et al., 1999). Em relação aos indivíduos homozigóticos, parece não haver um efeito sinérgico pela presença do segundo alelo mutante em relação a idade inicial (LEE et al., 2012).

Dependendo da população estudada, o número das repetições CAG explica 67% da variação na idade de aparecimento dos sintomas (DJOUSSÉ et al., 2003), o restante pode ser explicado por outros genes (40%) e pelo ambiente (60%) (GUSELLA; MACDONALD, 2009; WEXLER et al., 2004). Vários modificadores genéticos da idade inicial dos sintomas já foram relatados para DH. Um deles, já citado, é o BDNF que parece ser um bom candidato para modificar a idade de início da DH. Outro gene é o *PPARGC1A* que codifica para PGC-1 α (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor γ , coactivator 1 α*) (WEYDT et al., 2009). Interessantemente, a falta de expressão de PGC-1 α produz um fenótipo semelhante a DH em camundongos (CUI et al., 2006). A proteína PGC-1 α controla a transcrição de muitas outras proteínas necessárias para a função mitocondrial e para o metabolismo da energia celular, mas a própria transcrição de PGC-1 α pode ser prejudicada por mHtt (ROSS; TABRIZI, 2011).

PGC-1 α desempenha um papel crítico na biogênese mitocondrial, tem papel na termogênese adaptativa, e influencia o tipo de fibra muscular (JOHRI; CHANDRA; BEAL, 2013; PUIGSERVER et al., 1998). Fibras oxidativas resistentes à fadiga (contração lenta) são ricas em mitocôndrias e contêm níveis elevados de PGC-1 α . Já as fibras glicolíticas fatigáveis (contração rápida) contêm menos mitocôndrias e níveis baixos de PGC-1 α (JOHRI; CHANDRA; BEAL, 2013). De fato, a DH apresenta disfunção mitocondrial, metabolismo energético prejudicado, patologia muscular e déficit na termogênese adaptativa, o que pode ser o reflexo do papel da PGC-1 α alterado (WEYDT et al., 2006; WEYDT; DUPUIS; PETERSEN, 2018; ZIELONKA et al., 2014).

Originalmente, a PGC-1 α foi descrita como um mediador chave da termogênese adaptativa, sendo altamente expressa em adipócitos marrons mediando a expressão de UCP1 em resposta à estimulação noradrenérgica. As UCPs são proteínas que são localizadas junto a cadeia respiratória na membrana interna da mitocôndria. Lá dissipam o gradiente de prótons ligado a oxidação e geram calor (PUIGSERVER et al., 1998).

Interessantemente, a hipotermia já foi relatada em modelos animais e em humanos. O modelo transgênico truncado N171-82Q mostra hipotermia progressiva a partir de 17 semanas de idade (WEYDT et al., 2006). As evidências deste estudo mostraram que a termogênese prejudicada não seria originada de uma alteração no hipotálamo, mas em vez disso, os dados sugeriram que o defeito decorre da interferência da transcrição de PGC-1 α no tecido adiposo marrom. Neste mesmo estudo, os camundongos N171-82Q foram divididos em 2 grupos: o primeiro ficou a temperatura ambiente e o segundo grupo em uma temperatura de 30°C. Os animais que permaneceram em uma temperatura maior viveram significativamente mais tempo (24 dias a mais em média). Alguns outros modelos também foram testados, mas nem todos apresentam hipotermia como é o caso do modelo YAC72 (WEYDT et al., 2006). Até recentemente, a hipotermia era documentada apenas em modelos animais, no entanto um recente estudo mostrou um caso de um paciente de 29 anos de idade que apresentou temperatura corporal de 34°C (temperatura axilar) (ALTLNER; ARDIC; ÇEBI, 2020).

Além dos fatores genéticos, outros fatores também podem associados a idades mais precoces de diagnóstico. É o caso, por exemplo, de insultos perinatais (meningite, nascimento prematuro, asfixia) e distúrbios do neurodesenvolvimento (autismo, síndrome de down) (BARKHUIZEN et al., 2018). Em relação ao gênero, esta parece ser uma variável que não afeta a idade inicial dos sintomas. No entanto, parece que mulheres apresentam um fenótipo ligeiramente mais grave e taxa de progressão mais rápida especialmente nos domínios motor e funcional (ZIELONKA et al., 2013). Sabe-se também, que a transmissão paterna está associada a maiores expansões das repetições CAG e conseqüentemente piores diagnósticos e com a DH juvenil (KUMAR; GARG, 2016; WHEELER et al., 2007).

1.7.1 Estilo de vida e ambiente enriquecido

Excluindo a influência do tamanho das repetições CAG, parece que as contribuições do ambiente são predominantes sobre a parte genética representando 60% da explicação das variações observadas (GUSELLA; MACDONALD, 2009; WEXLER et al., 2004).

Investigando possíveis fatores que contribuem para esta variabilidade, Trembath e colaboradores (2010) investigaram a relação do estilo de vida e do comprimento da repetição CAG com a idade inicial dos sintomas. Neste trabalho foram realizadas entrevistas verificando uma série de atividades realizadas durante a fase assintomática e classificadas predominantemente como físicas, intelectuais ou passivas de 156 portadores da DH. Verificou-se que embora o comprimento da repetição CAG esteja relacionado à idade inicial dos sintomas, isto não é apenas atribuível ao tamanho da repetição. Parte do início precoce independe do comprimento da mutação. Verificou-se também que adotar um estilo de vida menos passivo pode atrasar significativamente a sintomatologia (TREMBATH *et al.*, 2010).

Apesar do cuidado em pontuar corretamente as experiências de cada indivíduo, os autores reconhecem que há uma imprecisão inerente neste tipo de pesquisa clínica (TREMBATH *et al.*, 2010). Um dos desafios que se apresentam quando se busca avaliar o estilo de vida é que essas pesquisas “clínicas” diferem das convencionais porque ocorrem em sentido retrospectivo, quando os pacientes já apresentam consideráveis prejuízos, e os fatores passam então a ser menos controláveis (KEMPERMANN, 2019).

Para estudos com pacientes em estágio pré-sintomático, outras dificuldades metodológicas também se apresentam. Essas dificuldades podem ser encontradas na própria seleção dos participantes. Geralmente os indivíduos que se submetem a estudos clínicos devem ser indivíduos que já possuem a confirmação genética através de um teste preditivo. Imagina-se que estes indivíduos talvez não sejam tão representativos e representem um parcela mais resiliente da população com DH visto que a realização de testes preditivos tem se mostrado estar associada com maior nível educacional, melhor status socioeconômico e também podem ser mais resilientes psicologicamente (PAPP; KAPLAN; SNYDER, 2011).

Apesar da complexa tarefa de isolamento dos diversos fatores que acompanham os indivíduos, um estilo de vida estimulante e controlado pode ser modelado em laboratório pelo ambiente enriquecido (AE) através de uma condição habitacional que reforça os envolvimento sensoriais, cognitivos, motores e sociais em relação às condições habitacionais padrão (MO; RENOIR; HANNAN, 2016). O contato social, estímulos sensoriais, tipo de recinto, nutrição,

enriquecimento físico e objetos inanimados podem ser controlados de diversas maneiras para proporcionar AE aos roedores (SINGHAL *et al.*, 2014).

A primeira evidência de que o AE poderia ser benéfico em um modelo genético de um distúrbio cerebral foi fornecida usando camundongos transgênicos para DH, R6/1. Foi verificado que o AE era capaz de atrasar o início dos sintomas motores, além de prevenir a perda do volume cerebral mesmo tratando-se de uma doença de origem genética (VAN DELLEN *et al.*, 2000).

Segundo Kempermann (2019), os efeitos do AE podem ser analisados em diferentes níveis, como: nível genético, molecular, celular, de órgãos, sistemas, do indivíduo e em nível comportamental (KEMPERMANN, 2019). Diversos modelos animais, inclusive modelos da DH, mostram efeitos positivos robustos do AE em diferentes níveis (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

Alguns aspectos positivos do AE foram “dissecados” por Hockly (2002). São eles: (i) estrutura social: os camundongos são animais sociais e um grupo social maior permite maiores níveis de interação social; (ii) calor: o tamanho do grupo maior e a disponibilidade de material para ninho adicional permitem que os animais regulem sua temperatura corporal de forma mais eficaz; (iii) espaço: as caixas geralmente maiores permitem maior área para exercícios e para estabelecer territórios dentro da gaiola; (iv) exercício: a gaiola maior e a disponibilidade de brinquedos, especialmente a roda de corrida, permitem que se exercitem mais; (v) novidade: os brinquedos, mudados com frequência, introduzem um elemento de novidade e podem estimular a cognição visto que a cada novidade um novo mapa mental deve ser formado.

Os mecanismos pelo quais o AE promove efeitos benéficos para o encéfalo ainda não são tão claros, mas há algumas possibilidades plausíveis. Entre elas a sinalização sináptica aumentada, aumento de densidade de espinhos dendríticos, modificação da conectividade neuronal e sináptica, transcrição de genes codificando proteínas neuronais importantes para a plasticidade, para a aprendizagem e memória (NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2009; ZUCCATO; CATTANEO, 2007). De particular interesse para a DH, o AE também regula positivamente neurotrofinas (ZUCCATO; CATTANEO, 2009), essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento neuronal, como o BDNF que se encontra em baixos níveis nessa condição (PLÁCIDO *et al.*, 2021).

É interessante notar, que embora as abordagens genéticas pareçam as mais promissoras devido à natureza genética da DH, os estudos com tratamentos genéticos encontram algumas barreiras como a dificuldade de direcionar o fármaco para o alelo mutado, a entrega complexa podendo envolver métodos invasivos como injeção intratecal e punção lombar que podem ainda ser em número repetido de doses (SHANNON, 2020).

Devido a previsibilidade genética, a DH é talvez a mais suscetível das doenças neurodegenerativas à intervenção precoce (ROSS; TABRIZI, 2011). No entanto, enquanto não há uma cura, a literatura segue controversa se testes preditivos trazem consequências negativas ou positivas. Em relação aos argumentos contrários a realização de teste preditivo para a DH, um estudo que analisou o impacto de testes preditivos para diversas condições clínicas chegou à conclusão que especificamente para essa condição o impacto psicológico poderia ser negativo, já que a depressão e ansiedade já são sintomas presentes na fase pré-manifesta (OLIVERI et al., 2018). No entanto, existem estudos demonstrando que o diagnóstico reduz o risco para o suicídio (PAULSEN et al., 2005) e pode trazer alguns benefícios sociais, conferindo legitimidade aos sintomas e abrindo acesso a serviços de apoio (ROSS et al., 2014). Nesse sentido, mudanças de estilo de vida parecem ser uma abordagem promissora em um momento em que ainda se encontram desafios para um tratamento efetivo. Soma-se a isso, o fato de que a abordagem proposta não necessita de um diagnóstico, visto que a princípio não traria prejuízos mesmo que direcionada para pessoas sem a DH.

1.8 JUSTIFICATIVA

A DH, uma doença neurodegenerativa de caráter progressivo e fatal, não possui cura e nem tratamento efetivo no controle de sua progressão. Devido ao padrão de herança autossômico dominante, a chance de ser acometido por esta condição quando um dos pais é afetado é de 50%. Apesar do sintoma característico da DH ser a coreia, sintomas cognitivos, neuropsiquiátricos e periféricos também a acompanham. Muitas vezes os sintomas não-motores aparecem anos antes do diagnóstico e frequentemente são relatados como de maior impacto pelo próprio paciente e familiares. Evidências apontam que o estilo de vida pode influenciar significativamente a progressão e idade inicial dos sintomas da DH. Isso gera a perspectiva do uso de estratégias não farmacológicas para atrasar ou atenuar os sintomas para os quais tratamentos efetivos permanecem distantes. A causa genética conhecida permite testes genéticos que possibilitam tais intervenções na fase pré-sintomática da doença. No entanto,

intervenções como um melhor estilo de vida são aplicáveis mesmo para aqueles que não desejam realizar o teste preditivo. A causa genética estabelecida proporcionou bons modelos para estudo da DH. Os camundongos YAC128 expressam o gene humano inteiro da DH e reproduzem o fenótipo que um indivíduo com DH apresenta ao longo da vida. Comparado a outros modelos transgênicos de DH, os camundongos YAC128 apresentam os sinais em um tempo de vida relativamente tardio o que é ideal para a aplicação de intervenções crônicas, como o AE, no período pré-sintomático. Desta forma, torna-se relevante o estudo dos efeitos de uma intervenção não-farmacológica em fase pré-sintomática, avaliando sua capacidade de retardar e atenuar todo o conjunto de sintomas, juntamente com uma análise de alterações moleculares.

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de uma exposição precoce ao AE sobre déficits motores e comportamentais bem como os níveis de neurotransmissores monoaminérgicos nos camundongos WT e YAC128.

1.9.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da exposição ao AE:

- Na atividade motora utilizando os testes do campo aberto, pole teste e da barra giratória;
- No comportamento tipo-depressivo utilizando o teste da borrifada com solução de sacarose, o teste da suspensão pela cauda e o teste do nado forçado;
- No comportamento tipo-ansioso utilizando o teste do labirinto em cruz elevado e o centro do campo aberto.
- Nos níveis de 5-HT, NE e DA no estriado, córtex pré-frontal e hipocampo e investigar possíveis correlações entre o comportamento e os níveis de monoaminas.

Verificar se os efeitos comportamentais da exposição ao AE persistem após 60 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

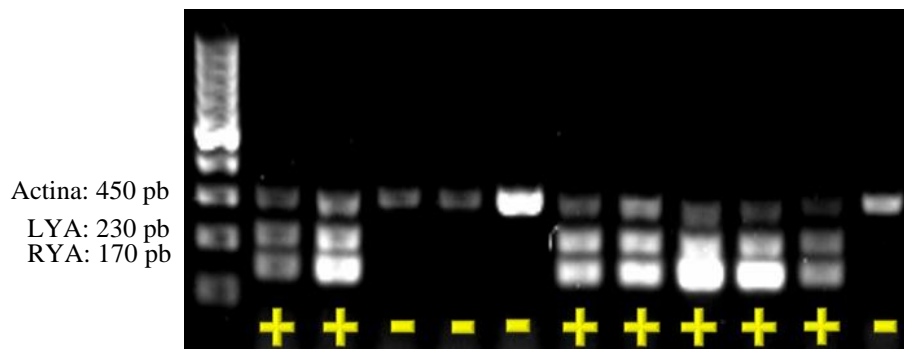
Camundongos da linhagem FVB/N, machos e fêmeas, do tipo selvagem (WT) e transgênicos (YAC128), foram utilizados. Os animais foram gerados em nossa colônia local com casais reprodutores generosamente fornecidos pelo Dr. Brian Christie (Universidade de Victoria, Canadá). Os animais foram desmamados e alojados por sexo no 21º dia pós-natal (DPN) em condições de biotério padrão: ciclo claro/escuro padrão de 12 horas (luzes acesas às 07:00 horas) e a temperatura de 20 - 22°C com livre acesso a água e comida. As gaiolas continham no máximo seis camundongos com ambos os genótipos (YAC128 e WT) na mesma gaiola. Todas as manipulações foram realizadas em período de 9h até 17h. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, Florianópolis, Brasil; Número do Protocolo: 4502210318).

2.2 GENOTIPAGEM

O material genético para a realização da genotipagem foi obtido a partir de amostras de tecido da orelha. A amplificação da sequência de interesse ocorreu pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers LYA (*left YAC arm*), RYA (*right YAC arm*) e actina, conforme procedimento previamente descrito (DA FONSÊCA et al., 2018).

Resumidamente, amostras de tecido da orelha dos camundongos foram coletadas e incubadas em solução de lise para digestão das amostras. Posteriormente, o DNA foi extraído e diluído na proporção 1:10. Para a PCR foi preparado um mix contendo 5µL de Master Mix e 0,5µL de cada primer (LYA F, LYA R, RYA F, RYA R, Actina F, Actina R) por amostra. Após a preparação do mix foi adicionado 2µL de cada amostra de DNA anteriormente diluído (concentração final 0,3 µM/primer). As amostras foram colocadas no termociclador para amplificação dos fragmentos de DNA. Após amplificação, foi realizada a eletroforese aplicando as amostras em gel de agarose 1,5% com 10,000X Syber e o resultado foi visualizado em fotodocumentador CHEMIDOC (Figura 8).

Figura 8 - Imagem representativa do gel de genotipagem dos camundongos WT e YAC128



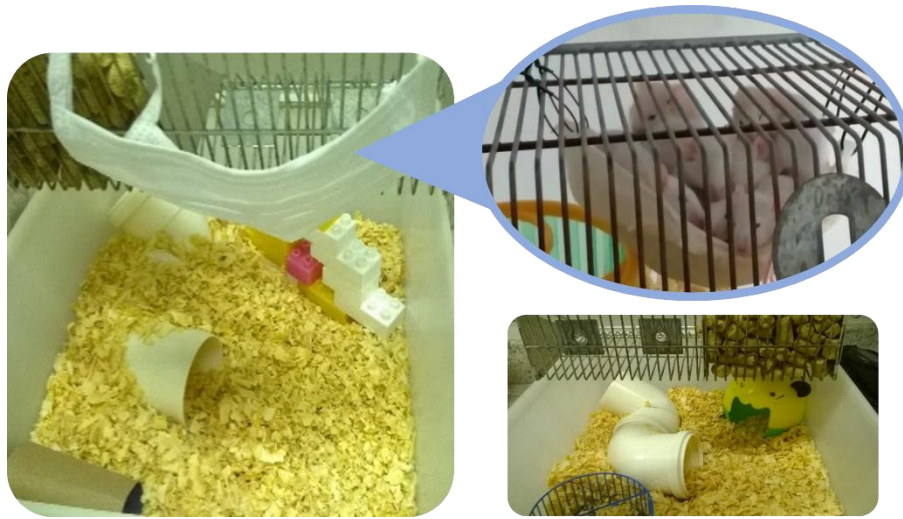
Legenda: Os símbolos (+) indicam animais positivos para a mutação (YAC128) e o (-) indicam animais negativos para a mutação (selvagens, WT). A primeira banda representa a banda de actina (450pb), presentes em todos os animais (controle positivo). As duas bandas seguintes representam a mutação genética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

Fonte: a autora.

2.3 DESENHO EXPERIMENTAL

No DPN 21, os camundongos foram desmamados e imediatamente separados em dois grupos: 1) Ambiente controle (AC), 2) Ambiente enriquecido (AE). Os animais do AC foram alojados em gaiolas padrão (29 × 18 × 12 cm) e os camundongos do AE foram alojados em uma gaiola maior (39 × 32 × 16 cm) contendo quatro objetos intercalados entre tubos de plástico ou papelão, barbante ou arame encapado, toca de plástico, rede produzida a partir de máscaras cirúrgicas, algodão para nidificação, peças de lego, roda em posição horizontal sem suporte que possibilitasse a corrida (Figura 9). Esses objetos eram trocados duas vezes por semana, onde dois objetos permaneciam na caixa e dois objetos eram trocados. Os animais foram expostos por 39 dias consecutivos aos respectivos ambientes (DPN 21 até o DPN 60).

Figura 9 – Exemplos de AE

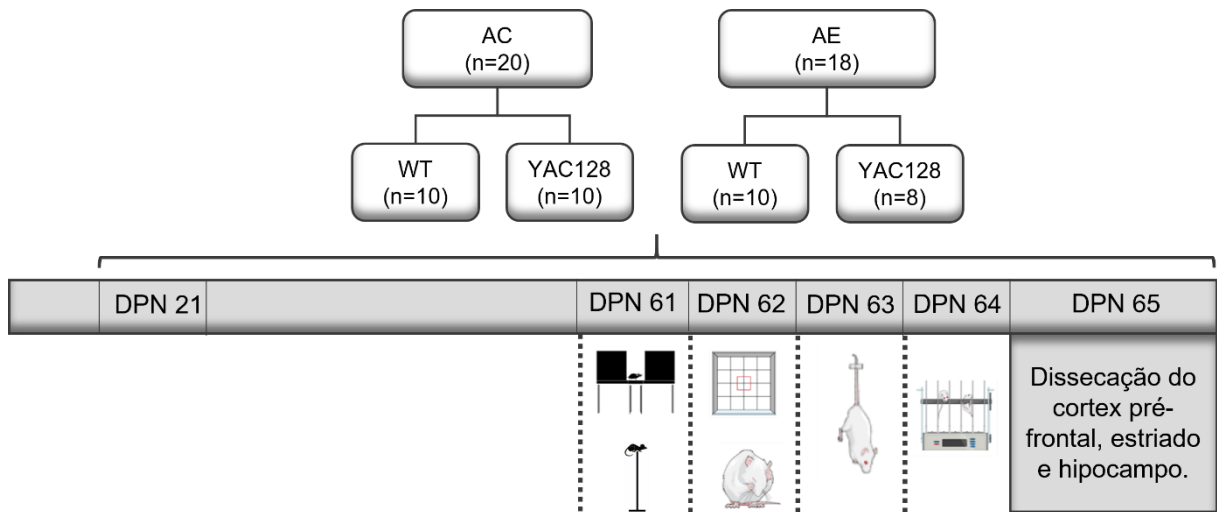


Legenda: Exemplos de objetos utilizados para fornecer um AE. Na imagem é possível visualizar tubos de plástico e de papelão, peças de lego, rede produzida a partir de máscara cirúrgica, toca de plástico e roda em posição horizontal.

Fonte: a autora.

No primeiro protocolo experimental (Figura 10), uma bateria de testes comportamentais foi aplicada por quatro dias consecutivos quando os animais completaram 2 meses de idade. 24 horas após o último teste comportamental, os camundongos foram pesados e então eutanasiados por deslocamento cervical. Os encéfalos dos camundongos foram removidos e o hipocampo, o córtex pré-frontal e o estriado dissecados para posterior mensuração dos níveis de monoaminas (Figura 10).

Figura 10 – Desenho Experimental 1



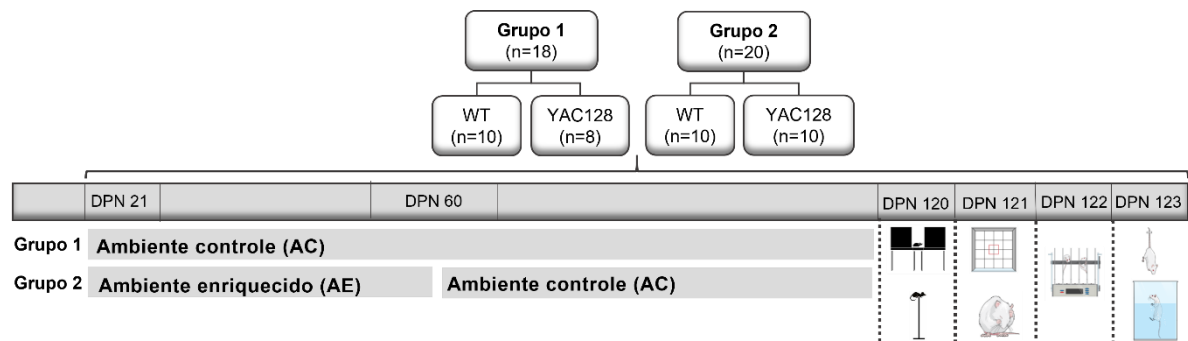
Legenda: Camundongos WT e YAC128, fêmeas e machos, com 21 dias de idade foram alojados em AC ou AE por 39 dias. A partir do DPN 61 uma bateria de testes comportamentais foi aplicada na seguinte sequência: DPN 61: teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e pole teste (PT); DPN 62: teste do campo aberto (TCA) e da borrifada com solução de sacarose (TBS); DPN 63: teste da suspensão pela cauda (TSC); DPN 64: teste de aceleração da barra giratória (rotarod). No DPN 65, os camundongos foram eutanasiados. O córtex pré-frontal, estriado e hipocampo foram dissecados para determinar os níveis de monoaminas por HPLC.

DPN = dia pós-natal; AC = ambiente controle; AE = ambiente enriquecido; DPN = dia pós-natal; WT = tipo selvagem; YAC128 = modelo de camundongos transgênicos para DH.

Fonte: a autora. Imagem produzida com o auxílio da ferramenta mindthegraph.com

Com o objetivo de verificar a persistência dos possíveis efeitos do AE, um segundo protocolo foi realizado (Figura 11). Neste protocolo, no DPN 60, os camundongos que estavam no AE foram reintroduzidos ao AC (esse grupo será apresentado nas figuras de resultados como AE-AC) onde permaneceram até os quatro meses de idade, quando uma bateria de testes comportamentais foi realizada por quatro dias consecutivos novamente (DPN 120 - DPN 123) (Figura 11).

Figura 11 – Desenho Experimental 2



Legenda: Camundongos WT e YAC128, fêmeas e machos, com 21 dias de idade foram alojados no AC ou AE. No DPN 60 os camundongos que estavam no AE retornaram para as gaiolas do AC (Grupo 2). A partir do DPN 120 uma bateria de testes comportamentais foi aplicada na seguinte sequência: DPN 120: LCE e PT; DPN 121: TCA e TBS; DPN 122: rotarod; DPN 123: TSC e teste do nado forçado (TNF).

DPN = dia pós-natal; WT = tipo selvagem; YAC128 = modelo de camundongos transgênicos para DH.

Fonte: a autora. Imagem produzida com o auxílio da ferramenta mindthegraph.com

2.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Uma bateria de testes comportamentais para avaliar comportamentos relevantes à depressão, ansiedade e atividade locomotora foi realizada com o objetivo de avaliar os efeitos do genótipo e da exposição ao ambiente.

Para o protocolo experimental 1, os testes comportamentais foram aplicados na seguinte sequência: DPN 61: teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e pole teste (PT); DPN 62: teste do campo aberto (TCA) e da borrifada com solução de sacarose (TBS); DPN 63: teste da suspensão pela cauda (TSC); e no DPN 64: teste de aceleração da barra giratória (rotarod). Para o protocolo experimental 2, os testes comportamentais foram aplicados na seguinte sequência: DPN 120: LCE e PT; DPN 121: TCA e TBS; DPN 122: teste do rotarod; e no DPN 123: TSC e teste do nado forçado (TNF).

Os camundongos foram habituados por pelo menos 1h antes do início dos testes que foram realizados sob luz de baixa intensidade (12 lx). Todos os testes comportamentais foram realizados no período das 9h – 17h e gravados por uma câmera de vídeo (HD Pro Webcam C920 Logitech, CA, USA) posicionada acima dos aparelhos e pontuados pelo avaliador em uma sala de observação com exceção do TCA, analisado pelo software ANY-maze® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA), e do TNF analisado posteriormente a partir dos vídeos obtidos. Os aparelhos foram limpos com etanol 10% entre os animais para evitar pistas de odor.

2.4.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O teste do LCE é bem estabelecido para a avaliação do comportamento do tipo-ansioso (WALF; FRYE, 2007). O aparelho do teste possui uma forma cruzada com dois braços abertos perpendiculares a dois braços fechados. Devido ao medo incondicionado de altura/espacos abertos que os roedores apresentam, eles tendem a passar menos tempo nos braços abertos (WALF; FRYE, 2007). Os animais foram colocados na junção dos braços abertos e fechados, de frente para o braço fechado, e o comportamento foi registrado por 5 minutos. A porcentagem de tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos foram utilizadas (contadas quando todas as quatro patas do roedor estavam no braço aberto) como uma medida de comportamento do tipo-ansioso.

2.4.2 Pole Teste (PT)

A agilidade motora foi avaliada pelo PT conforme previamente descrito (OGAWA et al., 1985) com algumas modificações. O aparato deste teste consiste em uma vareta vertical de madeira com superfície áspera (medidas: 54 cm de altura por 1 cm de diâmetro) onde o camundongo foi posicionado no topo. O tempo entre o animal orientar-se para baixo e descer até o chão (tempo de descida) foi registrado. Se o camundongo não conseguiu virar totalmente para baixo, caiu ou escorregou, o valor padrão de 120s foi registrado (120s é o tempo máximo permitido para cada tentativa). Cada animal completou cinco tentativas. Para a análise estatística, o melhor desempenho foi utilizado.

2.4.3 Teste do Campo Aberto (TCA)

A atividade locomotora foi avaliada utilizando o aparato campo aberto (CA) que consistiu em uma caixa de madeira medindo $40 \times 60 \times 52$ cm. O piso do aparato foi dividido nas regiões central ($13,5 \times 30$ cm) e periférica, onde a atividade no centro foi utilizada para medir o comportamento do tipo-ansioso (BAILEY; CRAWLEY; BAILEY, 2009). A distância total percorrida e o tempo gasto no centro da arena foram registrados durante 6 minutos. Os

parâmetros foram analisados pelo sistema de rastreamento de vídeo ANY-maze® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

2.4.4 Teste da Borrifada com solução de Sacarose (TBS)

O TBS foi realizado de forma semelhante ao protocolo previamente descrito (DUCOTTET; BELZUNG, 2004) com algumas modificações. Os animais foram colocados individualmente em um cilindro transparente por 5 minutos para aclimatação ao aparato. Após esse período, uma solução de sacarose a 10% foi borrifada na região dorsal do camundongo. Devido a viscosidade e sabor palatável da sacarose, esse procedimento geralmente induz comportamentos de limpeza. Depois de aplicado a solução, a latência para o início do comportamento de autolimpeza e o tempo total de autolimpeza foram registrados por um período de 5 minutos e tomados como um índice de anedonia.

2.4.5 Teste da Suspensão pela Cauda (TSC)

O TSC foi proposto inicialmente por Steru et al (1985), e é baseado na avaliação da imobilidade em uma situação de "desespero comportamental" (STERU et al., 1985). Resumidamente, os camundongos foram suspensos cerca de 50 cm acima do chão por fita adesiva. Os camundongos foram considerados imóveis apenas quando pendurados passivamente e completamente imóveis. O tempo de imobilidade foi avaliado durante um período de 6 min para cada camundongo e interpretado como comportamento do tipo-depressivo.

2.4.6 Teste do Nado Forçado (TNF)

O comportamento do tipo-depressivo também foi avaliado por meio do TNF, conforme descrito anteriormente (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977). Resumidamente, os animais foram colocados individualmente em um cilindro de plástico (10cm de diâmetro por 25cm de altura) preenchido por água à temperatura ambiente. O comportamento foi registrado e o tempo de imobilidade dentro de um período de 6 min foi contabilizado a partir da análise dos vídeos. A imobilidade foi definida como a falta de movimento do corpo inteiro, consistindo apenas de pequenos movimentos necessários para manter a cabeça do animal acima da água.

2.4.7 Teste de aceleração da barra giratória (Rotarod)

O desempenho motor no rotarod (Insight®, São Paulo, Brasil) foi avaliado conforme previamente descrito (CARTER; MORTON; DUNNETT, 2001; DUNHAM; MIYA, 1957) com algumas modificações. Os camundongos foram previamente aclimatados ao aparelho por 120 segundos, a uma velocidade constante de 5 RPM. Após um intervalo de descanso de 120 minutos, cada animal foi testado por 4 sessões. Cada sessão durava 5 minutos e a velocidade aumentava de forma progressiva de 5 até 37 RPM dentro de cada sessão. O intervalo entre cada sessão foi de 60 minutos. O tempo que cada animal permaneceu na barra antes de cair (o tempo de latência para a primeira queda) e o número de quedas foram registrados. Os resultados foram expressos como a média das quatro sessões.

2.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MONOAMINAS CEREBRAIS

Para determinar os níveis de monoaminas, o hipocampo, o estriado e o córtex pré-frontal foram dissecados em gelo e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos coletados permaneceram a - 80°C até a análise. Os níveis de norepinefrina (NE), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) foram determinados por HPLC por detecção fluorométrica de acordo com o que foi descrito por de Benedetto e colaboradores (2014).

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em gelo em microtubos contendo ácido perclórico 0,2 M com cisteína 3 mM a 1:6 (p/v). O homogenato foi centrifugado (12.000×g, 10min, 4°C) e o sobrenadante resultante (20µl) foi injetado no HPLC.

Uma curva padrão foi realizada com concentrações variando de 0,016 a 2,50 ng/µl para estimar os níveis de DA, 5-HT e NE. A análise foi realizada com um Sistema Jasco LC-2000 Plus usando uma coluna ACE® C18 Ultra-Inert, a uma taxa de fluxo de 0,6 ml/min e mantida a uma temperatura de 35 °C. As monoaminas foram eluídas numa solução isocrática de acetato (ácido acético 12 mM, ácido etilenodiamina tetraacético 0,26 mM)/solução de metanol (86:14, v/v). A fluorescência foi monitorada usando excitação a 279 nm e emissão a 320 nm. Os picos dos analitos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos respectivos padrões. As áreas dos picos foram integradas para quantificar as amostras por

regressão linear da curva de calibração dos padrões. Os valores obtidos foram expressos em pg/ μ l.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o software estatístico Statistica 13.5 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Os gráficos e a análise de correlação foram obtidos pelo GraphPad Prism versão 7.00 para Windows (La Jolla, Califórnia, EUA). Outliers foram identificados pelo teste de Grubbs (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>) e removidos das análises. Os dados apresentaram distribuição normal e foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de três fatores para o protocolo 1 (sendo os fatores: sexo, genótipo e ambiente). Quando nenhum efeito significativo do sexo foi obtido ($p > 0,05$), os dados de machos e fêmeas foram agrupados e, em seguida, foi realizada uma ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. Para o protocolo 2, foi aplicado diretamente a ANOVA de duas vias pela falta de representantes de ambos os sexos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Para a análise de correlação, os dados dos camundongos YAC128 foram analisados em conjunto (AC e AE) por meio da Correlação de Spearman (r) já que agrupados não apresentaram distribuição normal. Para todas as análises, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO

3.1.1 Peso corporal

A ANOVA de três vias revelou efeitos significativos do sexo [F(1,30)=11,99; p<0,01], genótipo [F(1,30)=6,33; p<0,05] e interação ambiente x genótipo [F(1,30)=5,14; p<0,05] no peso dos animais. Aos dois meses de idade, apenas camundongos YAC128 machos exibiram um ganho de peso significativo em comparação com os camundongos WT de mesma idade e ambiente (AC). O AE foi capaz de prevenir o ganho de peso nos machos (Tabela 1).

Tabela 1 – Peso corporal dos camundongos aos 2 meses de idade

Peso corporal (g)	Ambiente Controle		Ambiente Enriquecido	
	WT	YAC128	WT	YAC128
Fêmeas (n)	21,6 ± 0,75 (5)	23,6 ± 1,36 & (5)	21,8 ± 0,80 (5)	22,3 ± 0,88 (3)
Machos (n)	23,0 ± 0,45 (5)	27,4 ± 1,21 ** (5)	24,2 ± 0,80 (5)	24,0 ± 1,73 # (5)

Legenda: Os dados representam a média ± EPM. **p<0.01 *versus* WT machos do grupo AC. #p<0.05 *versus* YAC128, machos, grupo AC. &p<0.05 *versus* YAC128, machos, grupo AC.

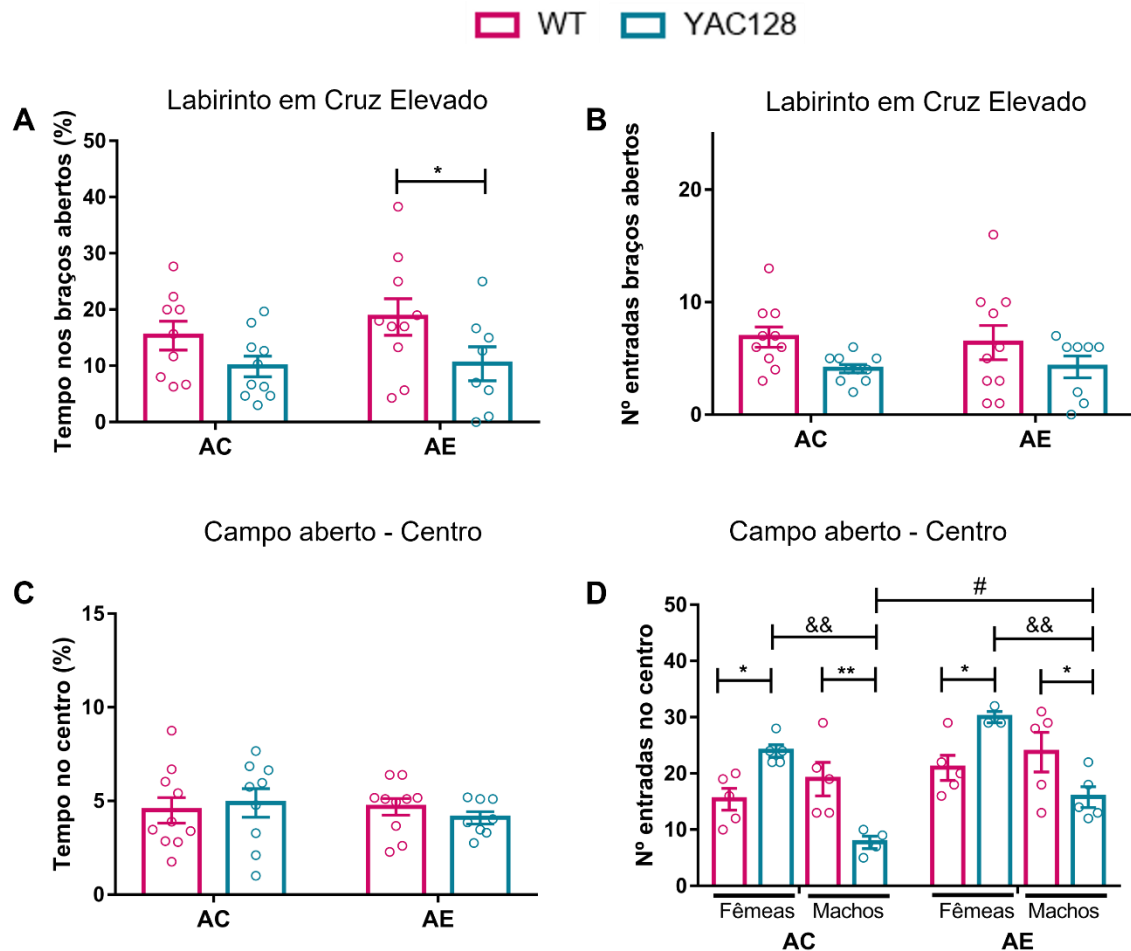
3.1.2 Comportamentos do tipo-ansioso e depressivo

O comportamento do tipo-ansioso foi analisado utilizando os aparatos LCE e CA. Uma diminuição da circulação nos braços abertos do LCE ou no centro do CA geralmente refletem um aumento do comportamento do tipo-ansioso (BAILEY; CRAWLEY; BAILEY, 2009; WALF; FRYE, 2007).

Em relação aos camundongos analisados aos 2 meses de idade, a ANOVA de 3 vias não revelou efeito do sexo no tempo [$F(1,29)=0,467$; $p=0,50$] ou no número de entradas nos braços abertos [$F(1,30)=0,058$; $p=0,81$] do LCE. Portanto, uma ANOVA de duas vias foi realizada. Em relação ao tempo gasto nos braços abertos, apenas o efeito do genótipo [$F(1,33)=6,462$; $p<0,05$] foi encontrado. O teste *post hoc* revelou que os camundongos WT passaram mais tempo do que os camundongos YAC128 nos braços abertos no AE (Figura 12A). O efeito do genótipo também foi encontrado em relação ao número de entradas nos braços abertos [$F(1,34)=5,605$; $p<0,05$] no entanto o teste *post hoc* não encontrou diferenças (Figura 12B).

O efeito do sexo não foi encontrado no tempo em que os animais circularam no centro do CA pela ANOVA de três vias [$F(1,29)=0,528$; $p=0,47$]. A ANOVA de duas vias também não encontrou nenhum efeito {genótipo [$F(1,33)=0,025$; $p=0,87$]; ambiente [$F(1,33)=0,264$; $p=0,61$]; interação genótipo x ambiente [$F(1,33)=0,660$; $p=0,42$]} (Figura 12C). No entanto, a análise do número de entradas no centro do CA revelou efeitos do sexo [$F(1,29)=13,219$; $p=0,001$], ambiente [$F(1,29)=13,662$; $p<0,001$] e interação genótipo x sexo [$F(1,29) = 31,034$; $p <0,001$]. Diferenças genótípicas (WT x YAC128) foram encontradas entre machos e fêmeas, mas, curiosamente, de maneiras opostas. No AC, os machos YAC128 realizaram menos entradas no centro em relação aos machos WT. Com as fêmeas o resultado foi oposto: fêmeas YAC128 realizaram mais entradas no centro do CA do que as fêmeas WT. O mesmo perfil foi mantido no AE apesar da melhora que ocorreu nos machos YAC128 pelo AE. Além disso, fêmeas e machos YAC128 foram significativamente diferentes em ambos os ambientes (Figura 12D).

Figura 12 – Comportamento do tipo-ansioso aos 2 meses de idade.

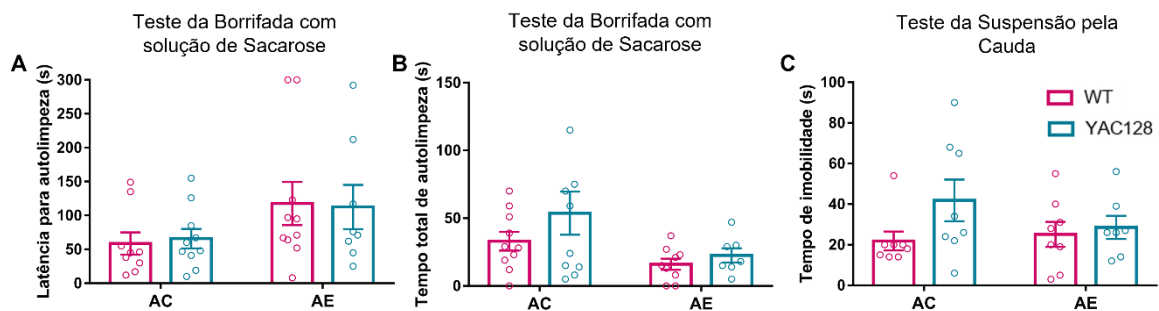


Legenda: Tempo (A) e entrada (B) de braços abertos no LCE. Tempo (C) e entrada (D) no centro do CA.
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ representando diferenças WT x YAC128 no mesmo ambiente.
 # $p < 0,05$ representando diferenças AC x AE dentro do mesmo genótipo.
 && $p < 0,01$ representando diferenças fêmeas x machos dentro do mesmo ambiente e genótipo.
 Os dados representam a média \pm E.P.M.

Aos 2 meses de idade, o comportamento anedônico e do tipo-depressivo foi avaliado pelos testes TBS (Figura 13A, B) e TSC (Fig. 13C) respectivamente. O sexo não foi um fator com efeito no TBS conforme revelado pela ANOVA de três vias, tanto para o parâmetro latência [$F(1,29)=0,784$; $p=0,38$] quanto para o tempo gasto com a autolimpeza [$F(1,28)=3,117$; $p=0,09$]. Portanto, a ANOVA de duas vias foi realizada revelando efeito do ambiente para a latência [$F(1,33)=4,474$; $p < 0,05$] e o tempo total gasto com autolimpeza [$F(1,32)=5,586$; $p < 0,05$]. Apesar do efeito do ambiente, o teste *post hoc* não revelou diferenças significativas entre os grupos (Figura 13A, B).

Em relação ao TSC, não foi encontrado efeito do sexo [F(1,23)=0,403; p=0,53]. A ANOVA de duas vias realizada em seguida também não detectou nenhum efeito no tempo de imobilidade no TSC {genótipo [F(1,27)=2,715; p=0,11]; ambiente [F(1,27)=0,499; p=0,48]; interação ambiente x genótipo [F(1,27)=1,353; p=0,25]} (Figura 13C).

Figura 13 – Comportamento do tipo-depressivo aos 2 meses de idade



Legenda: Latência (A) e tempo total (B) de autolimpeza no TBS. Tempo de imobilidade no TSC (C). Os dados são apresentados como média \pm E.P.M.

3.1.3 Avaliação motora

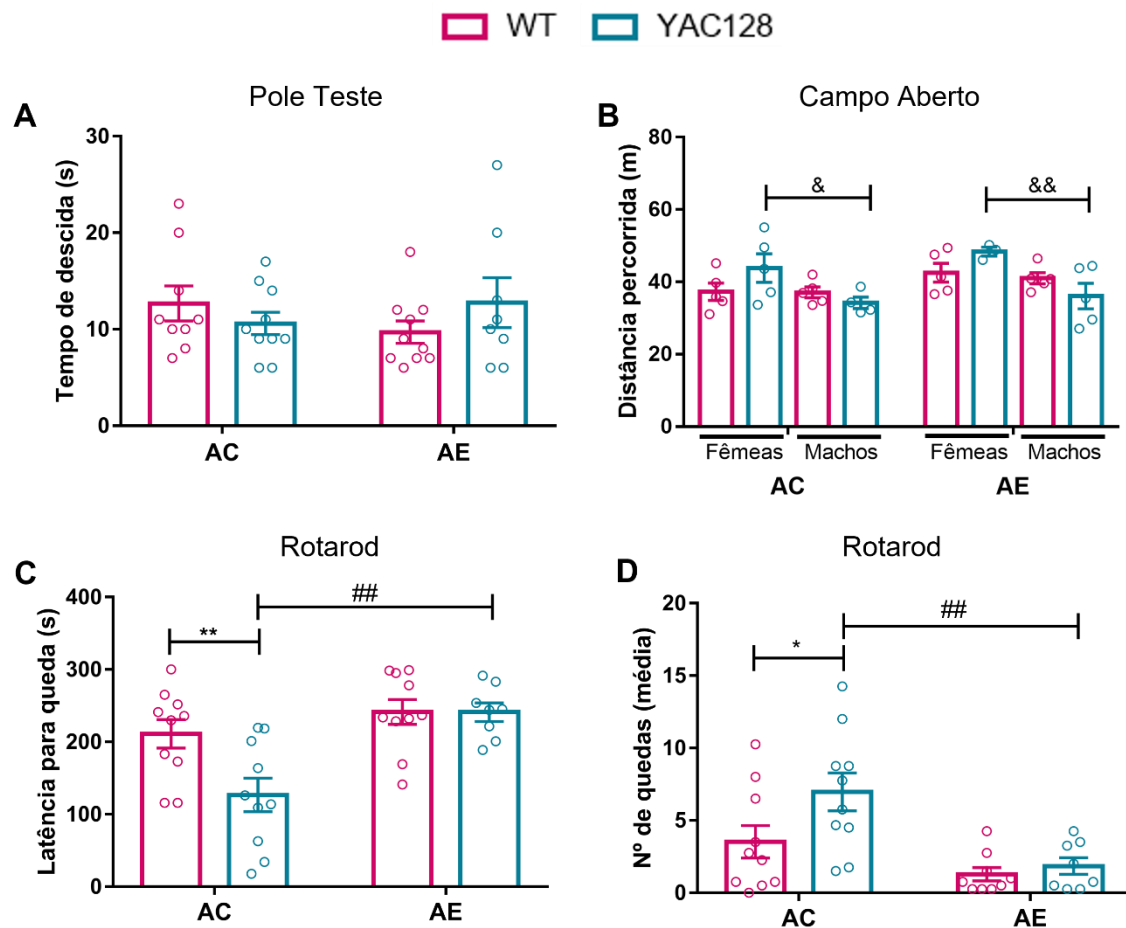
Diferentes aspectos da função motora foram analisados utilizando PT, TCA e rotarod (Figura 14). A agilidade motora foi avaliada pelo PT e a ANOVA de três vias não revelou diferenças significativas para o fator sexo [F(1,29)=1,458; p=0,24]. A ANOVA de duas vias realizada em seguida não revelou nenhum efeito {genótipo [F(1,33)=0,080; p=0,78], ambiente [F(1,33)=0,966; p=0,33]; interação ambiente x genótipo [F(1,33)=0,090; p=0,77]} (Figura 14A).

A distância total percorrida foi avaliada pelo TCA e analisada pela ANOVA de três vias. Efeitos nos seguintes fatores foram encontrados: sexo [F(1,29)=9,711; p<0,01], ambiente [F(1,29)=4,191; p<0,05] e interação genótipo x ambiente [F(1,29)=7,062; p<0,05]. O teste *post hoc* encontrou diferenças entre fêmeas YAC128 e machos YAC128 no AC e AE, mostrando que as fêmeas apresentam hiperlocomoção em relação aos machos do mesmo genótipo em ambos os ambientes (Figura 14B).

O desempenho do motor também foi analisado pelo teste de aceleração do rotarod. Nenhum efeito do sexo foi encontrado tanto na latência para queda [F(1,30)=0,685; p=0,41] quanto no número de quedas [F(1,29)=2,083; p=0,16]. A ANOVA de duas vias foi executada para a análise da latência para queda mostrou efeito significativo do genótipo [F(1,34)=4,792;

$p < 0,05$], ambiente [$F(1,34)=14,037$; $p < 0,001$] e interação genótipo x ambiente [$F(1,34)=4,758$; $p < 0,05$]. A análise do número de quedas revelou efeitos para os fatores genótipo [$F(1,33)=4,020$; $p=0,05$] e ambiente [$F(1,33)=13,593$; $p < 0,001$]. O teste *post hoc* mostrou que os camundongos YAC128 tiveram tempo de latência para a primeira queda reduzido (Figura 14C) e maior número de quedas (Figura 14D) em comparação aos camundongos WT alojados no AC. O AE foi capaz de prevenir essa condição, aumentando a latência para queda e diminuindo o número de quedas nos camundongos YAC128 (Figura 14C, D).

Figura 14 – Performance motora aos 2 meses de idade



Legenda: agilidade motora avaliada pelo tempo de descida no PT (A). Distância percorrida no TCA (B). Latência para queda (C) número de quedas (D) no teste do rotarod.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ representando diferenças WT x YAC128 no mesmo ambiente.

$p < 0,01$ representando diferenças AC x AE dentro do mesmo genótipo.

& $p < 0,05$, && $p < 0,01$ representando diferenças fêmea x macho dentro do mesmo ambiente e genótipo.

Os dados são apresentados como média \pm E.P.M.

3.1.4 Níveis de monoaminas

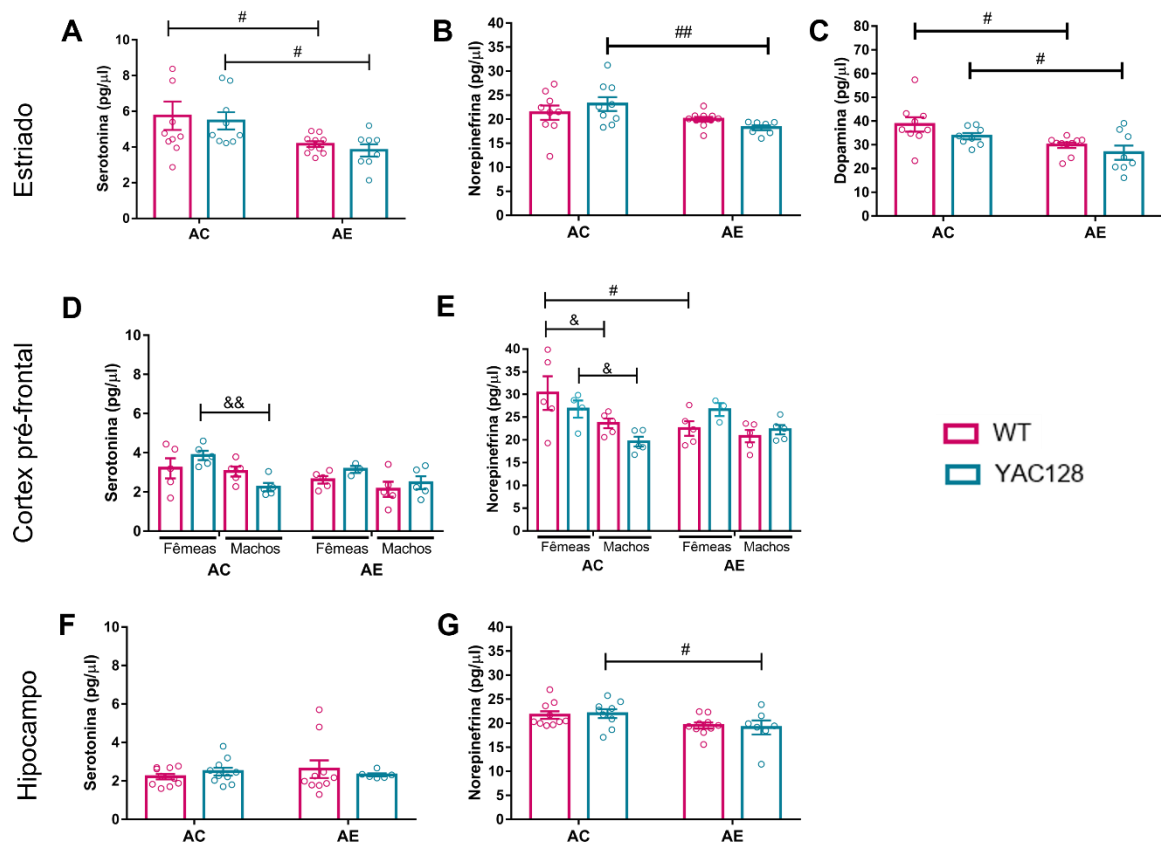
Os efeitos do AE nos níveis de monoaminas no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal foram mensurados por HPLC nos camundongos avaliados aos 2 meses de idade.

A ANOVA de três vias não revelou efeito do sexo para as monoaminas mensuradas no estriado {5-HT: [F(1,29)=0,893; p=0,35]; NE: [F(1,27)=0,843; p=0,37]; DA: [F(1,27)=0,173; p=0,68]}. Portanto, a ANOVA de duas vias foi realizada e encontrou efeito apenas do ambiente para a 5-HT [F(1,33)=9,688; p<0,01], NE [F(1,31)=7,788; p<0,01] e DA [F(1,31)=11,826; p<0,01] no estriado. O AE foi capaz de diminuir os níveis de 5-HT (Figura 15A) e DA (Figura 15C) em ambos os genótipos (WT e YAC128). Os níveis de NE foram diminuídos apenas nos camundongos YAC128 (Figura 15B).

A ANOVA de três vias realizada para os níveis de monoaminas no córtex pré-frontal, revelou efeito do sexo tanto para 5-HT [F(1,30)=10,297; p<0,01] quanto para NE [F(1,29)=13,404; p<0,001] além da interação ambiente x genótipo para NE [F(1,29)=5,794; p<0,05]. No AC, os camundongos YAC128 diferiram nos níveis de monoamina dependendo do sexo: as fêmeas YAC128 revelaram maiores níveis de 5-HT (Figura 15D) e NE (Figura 15E) em relação aos machos YAC128. Isso também ocorreu com fêmeas WT, mas apenas para os níveis de NE (Figura 15E).

No hipocampo, o efeito do sexo não foi encontrado pela ANOVA de três vias {5HT: [F(1,28)=3,332; p=0,08]; NE: [F(1,28)=0,206; p=0,65]}. Em seguida, a ANOVA de duas vias foi realizada e apenas o efeito do ambiente foi encontrado nos níveis de NE [F(1,32)=7,449; p=0,01] e o teste *post hoc* encontrou uma diminuição nos níveis de NE no hipocampo de camundongos YAC128 pelo AE (Figura 15G).

Figura 15 – Níveis de monoaminas nos camundongos aos 2 meses de idade



Legenda: No estriado, foram analisados os níveis de 5-HT (A), NE (B) e DA (C). No córtex, apenas os níveis de 5-HT (D) e NE (E) foram detectados. Os níveis de 5-HT (F) e NE (G) também foram mensurados no hipocampo. Os níveis de DA não foram detectados no córtex e hipocampo. Os valores são apresentados como tecido pg/ul \pm E.P.M. # p < 0,05, ## p < 0,01, representando diferenças CE x EE dentro do mesmo genótipo. & p < 0,05, && p < 0,01, representando diferenças fêmeas x machos dentro do mesmo ambiente e genótipo.

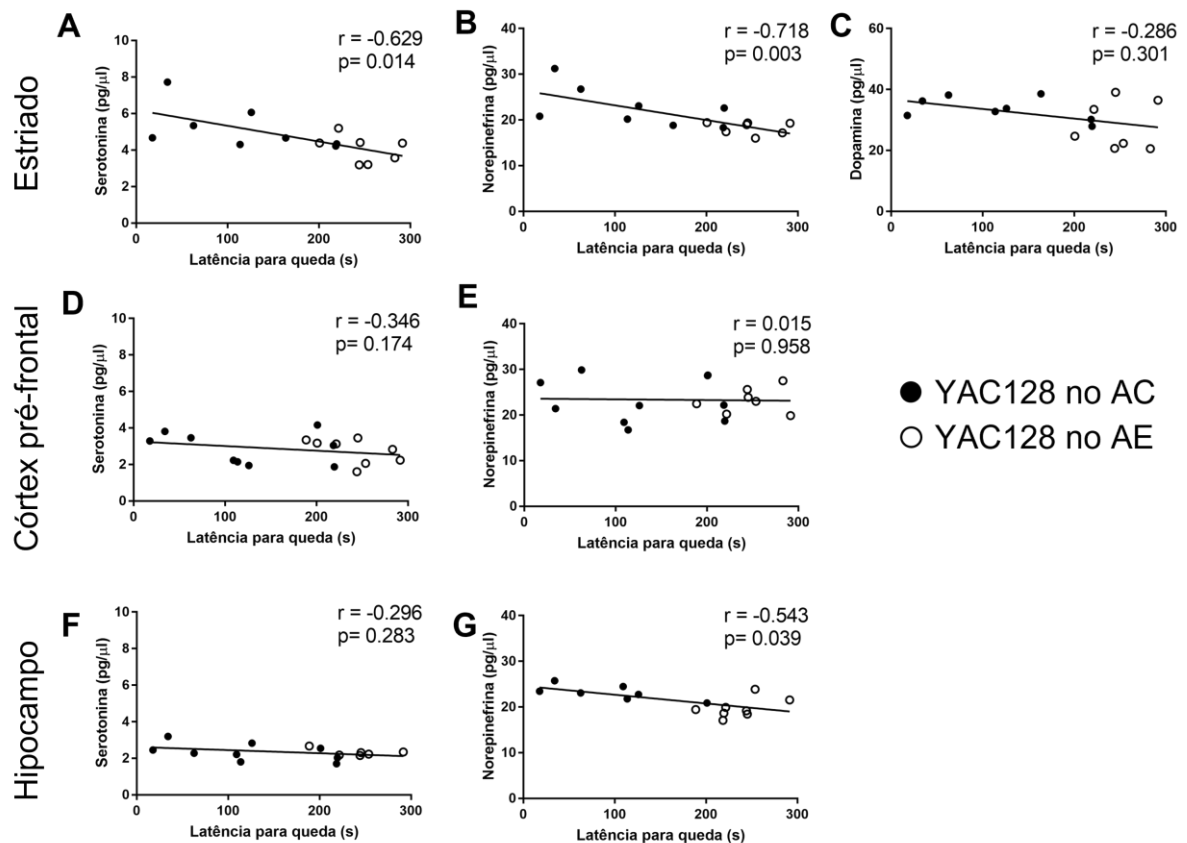
3.1.5 Análise de Correlações

As análises de correlação envolveram os camundongos YAC128 em ambos os ambientes. Quando os dados do AC e AE foram agrupados não seguiram uma distribuição normal e, portanto, foram avaliados pela correlação de Spearman.

A análise de correlação entre a tarefa do rotarod e os níveis de monoaminas revelou uma correlação significativa e negativa entre a latência para queda e os níveis de 5-HT no estriado (Figura 16A). Uma correlação negativa significativa também foi encontrada entre a

latência para queda e os níveis de NE no estriado (Figura 16B) e no hipocampo (Figura 16G). Portanto, os resultados indicam uma possível associação entre níveis mais baixos de monoaminas nessas regiões e um melhor desempenho motor.

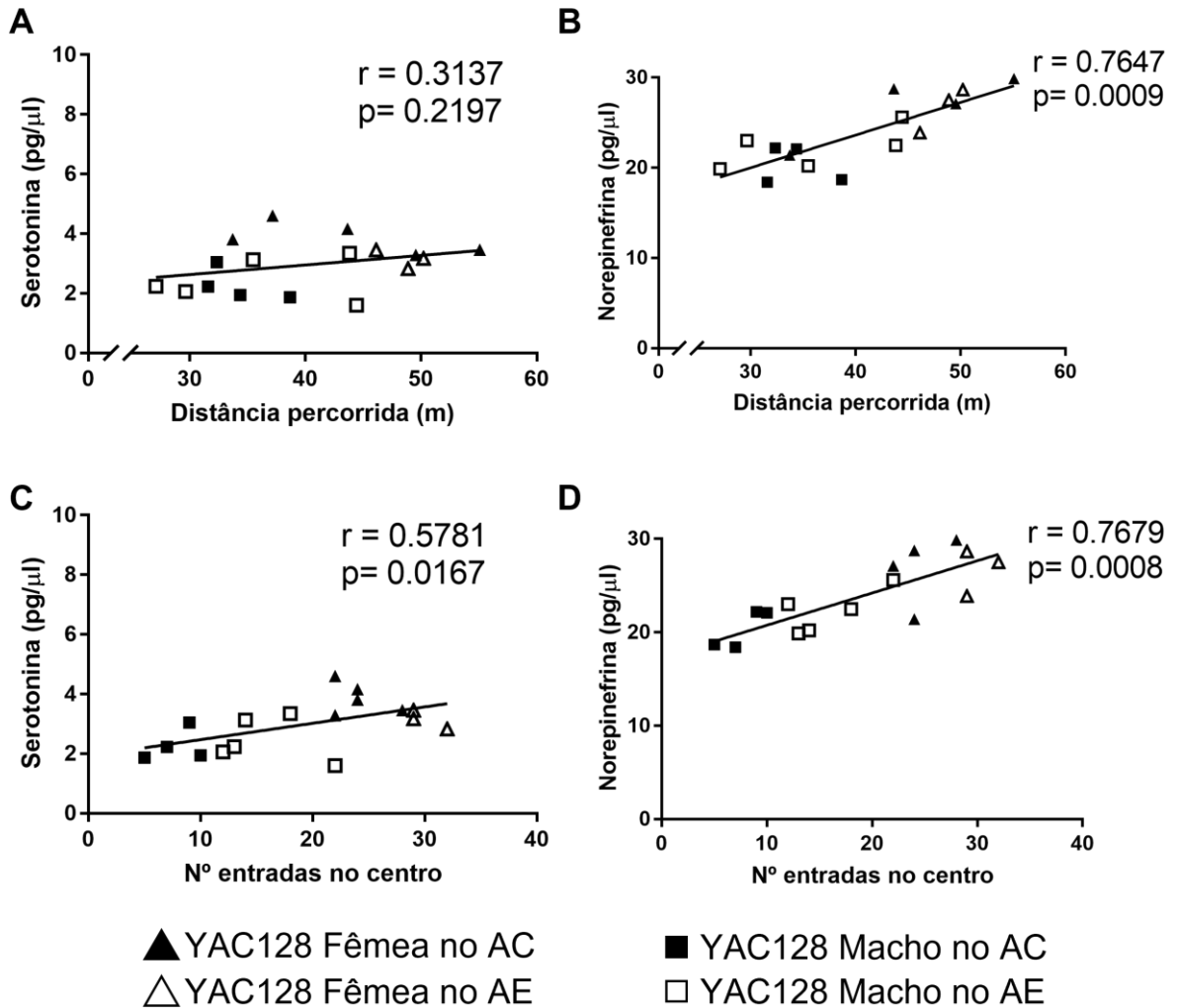
Figura 16 – Correlação entre níveis de monoaminas e latência para queda no rotarod



Legenda: a correlação de Spearman foi realizada para verificar possíveis associações entre a latência para queda e níveis de 5-HT (A, D, F), NE (B, E, G) e DA (C) no estriado (A, B, C), no córtex pré-frontal (D, E) e no hipocampo (F, G). AC = Ambiente Controle; AE = Ambiente Enriquecido.

Nos chamou a atenção as diferenças entre machos e fêmeas YAC128 encontradas na distância percorrida no CA (Figura 14B), no número de entradas no centro do CA (Figura 12D) e nos níveis de 5-HT e NE no córtex pré-frontal (Figura 14D, E). Portanto, hipotetizamos que essas variáveis poderiam estar correlacionadas. O teste de correlação de Spearman encontrou uma correlação significativa e positiva onde níveis mais altos de NE no córtex pré-frontal estavam correlacionados a maior a distância percorrida no CA pelos camundongos YAC128 (Figura 17B). O número de entradas no centro do CA também se correlacionou positivamente com os níveis de 5-HT (Figura 17C) e NE (Figura 17D) no córtex pré-frontal.

Figura 17 – Correlação entre níveis de monoaminas no córtex pré-frontal e performance no CA



Legenda: a correlação de Spearman foi realizada para verificar possíveis associações os níveis de 5-HT (A, C) e NE (B, D) no córtex pré-frontal com a distância percorrida no CA (A, B) e nº de entradas no centro do CA (C, D). AC = Ambiente Controle; AE = Ambiente Enriquecido.

O estriado e o hipocampo também foram avaliados quanto a sua correlação com a distância percorrida (Tabela 2) e com o número de entradas no centro do CA (Tabela 3). Novamente o teste de correlação de Spearman foi realizado, no entanto, nenhuma correlação foi encontrada (Tabela 2 e 3).

Tabela 2 – Correlação de Spearman entre níveis de monoaminas no estriado e hipocampo *versus* distância percorrida no CA

Tecido/monoamina	R de Spearman	Valor de p
Estriado		
Serotonina	-0,0706	0,80
Norepinefrina	0,1750	0,53
Dopamina	-0,100	0,72
Hipocampo		
Serotonina	0,0750	0,79
Norepinefrina	-0,3214	0,24

Legenda: o teste de correlação de Spearman foi realizado entre as monoaminas no estriado e hipocampo e a distância percorrida no CA. No entanto, nenhuma correlação foi encontrada ($p>0,05$).

Tabela 3 - Correlação de Spearman entre níveis de monoaminas no estriado e hipocampo *versus* número de entradas no centro do CA

Tecido/monoamina	R de Spearman	Valor de p
Estriado		
Serotonina	-0,0251	0,93
Norepinefrina	-0,0484	0,86
Dopamina	0,1040	0,71
Hipocampo		
Serotonina	0,4502	0,09
Norepinefrina	-0,1431	0,61

Legenda: o teste de correlação de Spearman foi realizado entre as monoaminas no estriado e hipocampo e o número de entradas no centro do CA. No entanto, nenhuma correlação foi encontrada ($p>0,05$).

3.2 PERSISTÊNCIA DOS EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO

Para investigar se os efeitos de 39 dias de alojamento no AE persistem após um período de 2 meses, um grupo de camundongos WT e YAC128 foi retirado do AE aos 2 meses e expostos ao AC até completarem 4 meses de idade quando foram avaliados.

3.2.1 Peso corporal

Aos 4 meses de idade, nenhum efeito no peso corporal foi revelado pela ANOVA de duas vias {genótipo [F(1,34)=0,032; p=0,85]; ambiente [F(1,34)=0,004; p=0,95]; interação ambiente x genótipo [F(1,34)=1,307; p=0,26]} (tabela 4).

Tabela 4 - Peso corporal dos camundongos aos 4 meses de idade

Peso corporal (g)	Ambiente Controle		Ambiente Enriquecido	
	WT	YAC128	WT	YAC128
Fêmeas e Machos	26,3 ± 0,76	25,5 ± 0,76	25,4 ± 0,79	26,5 ± 0,95
(n)	(10: 5F + 5M)	(8: 7F + 1M)	(10: 5F + 5M)	(10: 5F + 5M)

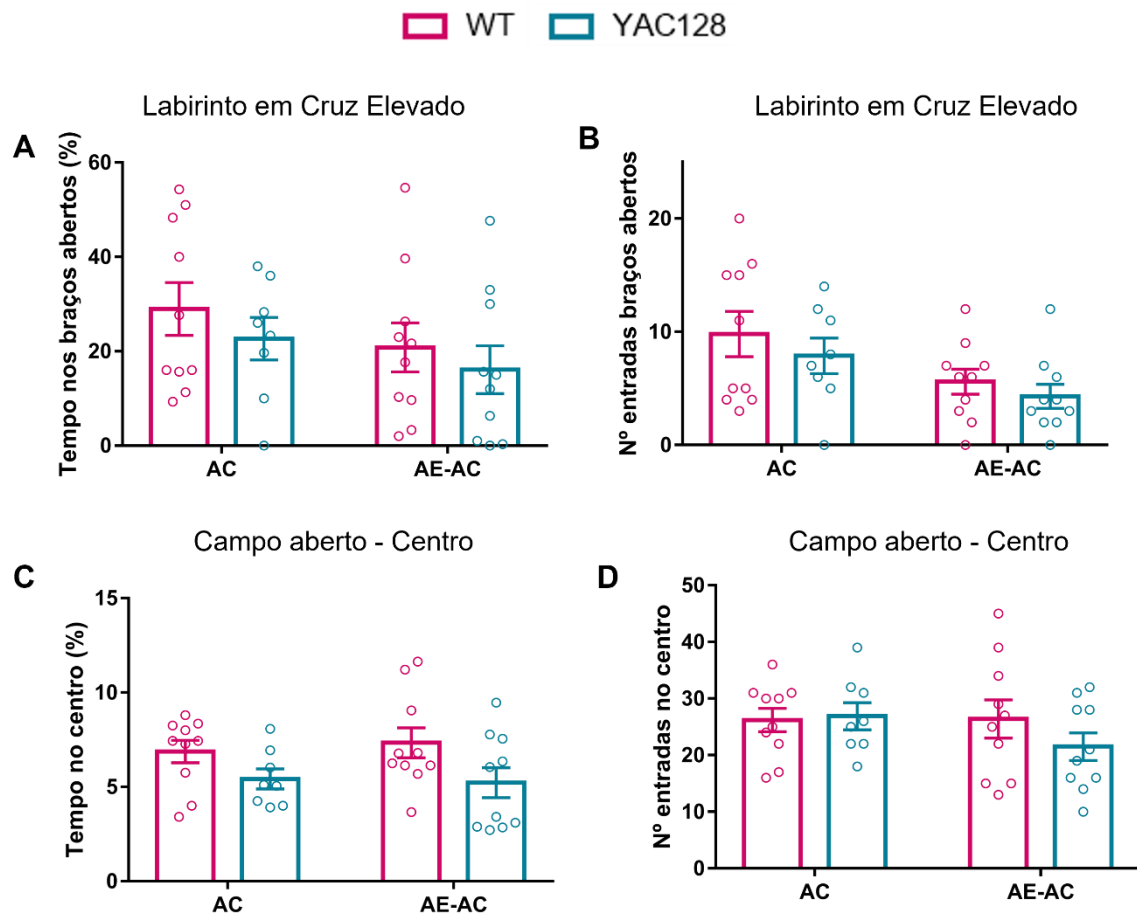
Legenda: São representados a média do peso corporal de cada grupo bem como o n amostral por grupo (n total: n fêmeas + n machos). Os dados representam a média ± EPM.

3.2.2 Comportamentos do tipo-ansioso e tipo-depressivo

Para os camundongos analisados aos 4 meses de idade, a ANOVA de duas vias não revelou nenhum efeito no tempo de permanência nos braços abertos do LCE {genótipo [F(1,34)=1,114; p=0,30]; ambiente [F(1,34)=1,977; p=0,17]; interação genótipo x ambiente [F(1,34)=0,022; p=0,88]} (Figura 18A). Por outro lado, a ANOVA de duas vias revelou efeito do ambiente no número de entradas nos braços abertos [F(1,34)=6,821; p<0,05], mas o *post hoc* não revelou diferença entre os grupos (Figura 18B).

Para o TCA, a ANOVA de duas vias encontrou apenas o efeito do genótipo no tempo do centro [F(1,34)=6,309; p<0,05], no entanto, o *post hoc* não encontrou diferenças entre os grupos (Figura 18C). Para o número de entradas no centro do CA, a ANOVA de duas vias não detectou diferenças {genótipo [F(1,34)=0,6276; p=0,43]; ambiente [F(1,34)=0,9416; p=0,34]; interação genótipo x ambiente [F(1,34)=1,093; p=0,30]} (Figura 18D).

Figura 18 - Comportamento do tipo-ansioso aos 4 meses de idade



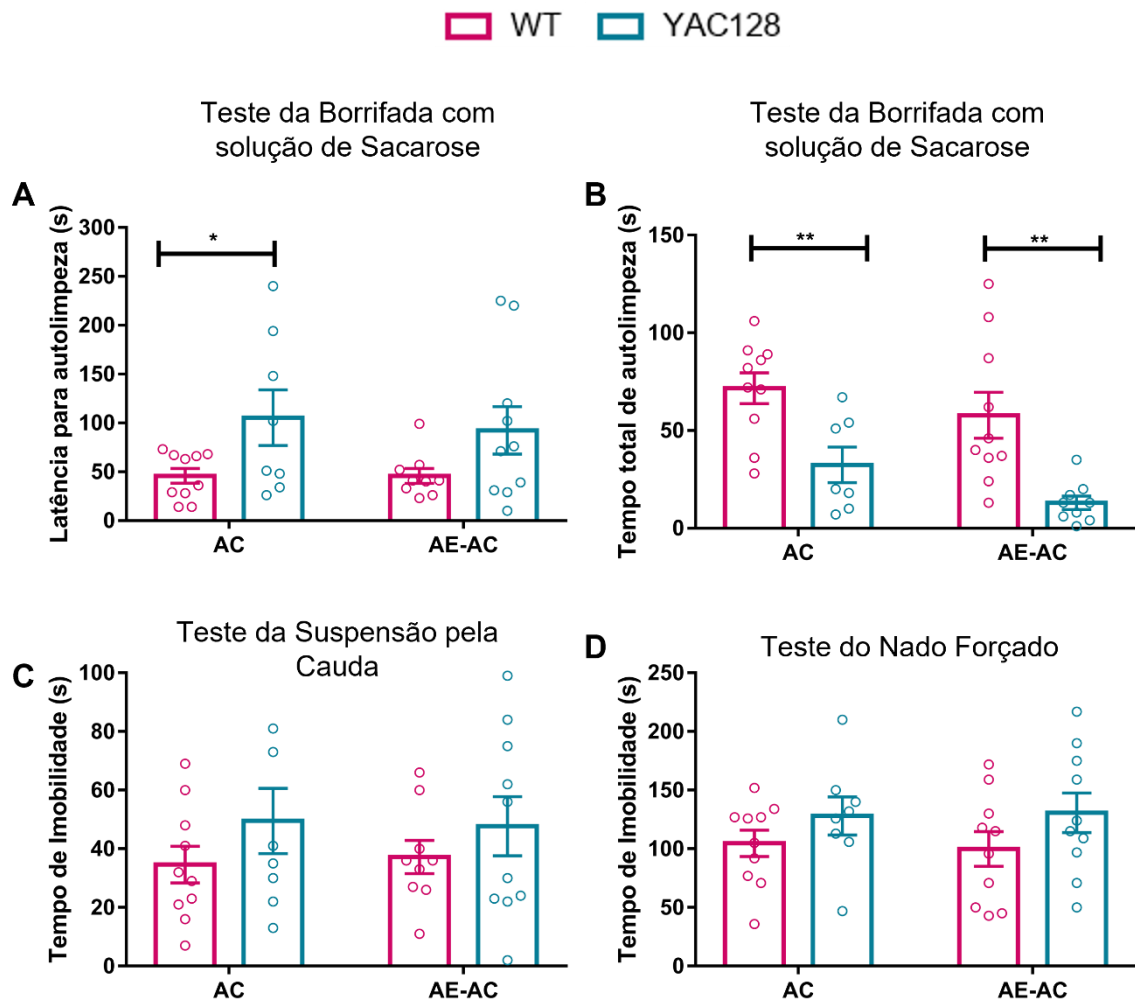
Legenda: Tempo (A) e entrada (B) de braços abertos no LCE. Tempo (C) e entrada (D) no centro do CA. Os dados são apresentados como média ± E.P.M.

O comportamento do tipo-depressivo e anedônico também foram analisados aos 4 meses de idade pelos testes: TBS; TSC e TNF. Em relação ao TBS, apenas o efeito do genótipo foi revelado pela ANOVA de duas vias na latência para autolimpeza [$F(1,33)=7,918$; $p<0,01$]. O *post hoc* mostrou diferença genotípicas apenas no AC (Figura 19A), mostrando que houve uma reversão parcial pelo AE-AC neste parâmetro (Figura 19A). No segundo parâmetro avaliado pelo TBS, o tempo total de autolimpeza, a ANOVA de duas vias novamente revelou efeito do genótipo [$F(1,32)=22,226$; $p<0,001$]. O *post hoc* mostrou que as diferenças genotípicas ocorreram em ambos os ambientes (Figura 19B).

No TSC, nenhum efeito foi detectado pela ANOVA de duas vias {genótipo [$F(1,33)=2,219$, $p=0,15$; ambiente [$F(1,33)=0,002$, $p=0,96$]; interação genótipo x ambiente [$F(1,33)=0,067$; $p=0,80$]} (Figura 19C). Assim como o TSC, a ANOVA de duas vias para o TNF também não encontrou efeito em nenhum fator {genótipo [$F(1,34)=3,279$; $p=0,08$;

ambiente [$F(1,34)=0,005$; $p=0,94$]; interação genótipo x ambiente [$F(1,34)=0,063$; $p=0,80$] (Figura 19D).

Figura 19 - Comportamento do tipo-depressivo aos 4 meses de idade



Legenda: Latência (A) e tempo total (B) de autolimpeza no TBS. Tempo de imobilidade no TSC (C). Tempo de imobilidade no TNF (D).

Os dados são apresentados como média \pm E.P.M.

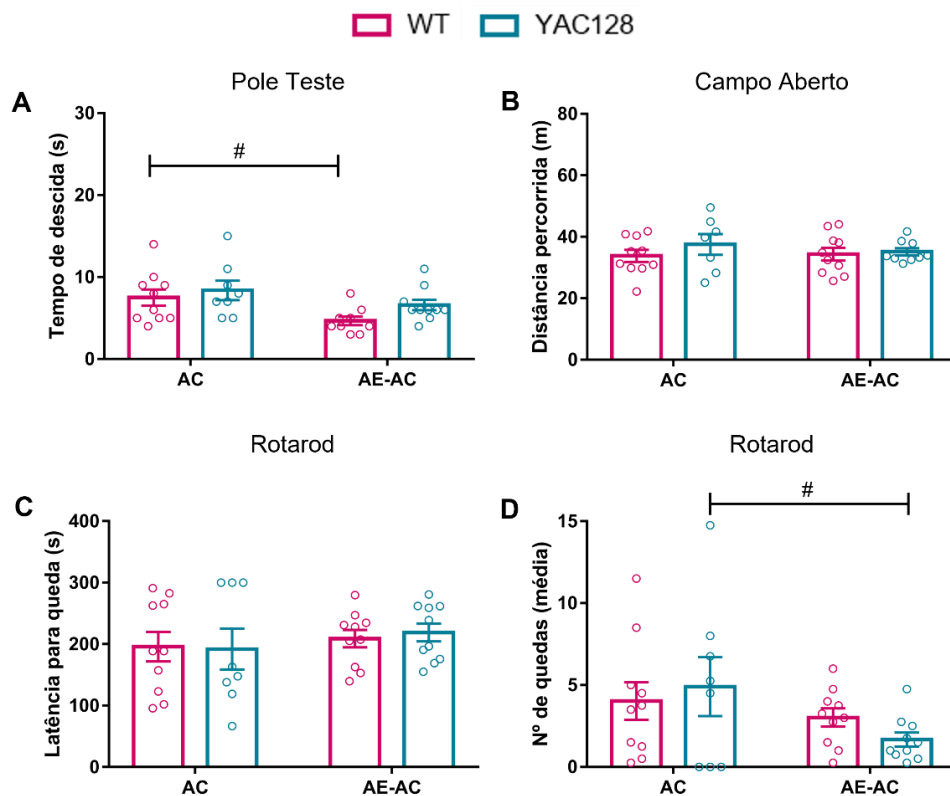
3.2.3 Avaliação Motora

No PT, apenas o efeito do ambiente foi revelado pela ANOVA de duas vias [$F(1,33)=7,279$; $p<0,05$]. Os animais WT do grupo AE-AC obtiveram uma performance melhor

no teste (Figura 20A). Em relação ao TCA, a ANOVA de duas vias não detectou nenhum efeito {genótipo [F(1,32)=1,084; p=0,30]; ambiente [F(1,32)=0,1816; p=0,67]; interação genótipo x ambiente [F(1,32)=0,4731; p=0,50]} (Figura 20B).

No teste do rotarod, a ANOVA de duas vias não revelou nenhum efeito na latência para queda {genótipo [F(1,34)=0,020; p=0,89]; ambiente [F(1,34)=0,862; p=0,36]; interação genótipo x ambiente [F(1,34)=0,103; p=0,75]} (Figura 20C). No entanto, para o número de quedas o efeito do ambiente foi revelado [F(1,34)=4,156; p<0,05] e o *post hoc* revelou que o AE, mesmo que intermitente, foi capaz de melhorar a performance motora nos camundongos YAC128 diminuindo o número de quedas (Figura 20D).

Figura 20 – Performance motora aos 4 meses de idade



Legenda: agilidade motora avaliada pelo tempo de descida no PT (A). Distância percorrida no TCA (B). Latência para queda (C) número de quedas (D) no teste do rotarod.

p<0,05 representando diferenças AC x AE dentro do mesmo genótipo.

Os dados são apresentados como média ± E.P.M.

4 DISCUSSÃO

A DH é uma condição hereditária classicamente associada a alterações no movimento (ROOS, 2010), mas que também apresenta outras alterações de grande impacto na vida dos pacientes e familiares (GLIDDEN et al., 2020). Por isso, devido aos diferentes aspectos que compõe a manifestação da DH, diferentes avaliações foram realizadas nos camundongos transgênicos YAC128 e serão discutidas a seguir.

A perda de peso é uma característica bastante marcante na DH e é relatada em estágios iniciais e avançados (DJOUSSÉ et al., 2002). Em modelos animais, essa alteração ocorre em direções contrárias a depender do modelo. Alguns modelos como R6 perdem (SJÖGREN et al., 2019), enquanto outros como YAC128 e BACHD mostram ganho de peso corporal (POULADI et al., 2010). Os achados deste estudo concordam com a literatura onde o ganho de peso corporal foi relatado aos 2 meses de idade para os camundongos YAC128 (VAN RAAMSDONK; WARBY; HAYDEN, 2007), embora no presente estudo esse resultado tenha sido encontrado apenas nos machos. Interessantemente, outro estudo, mas com camundongos R6/1, também demonstrou alteração no peso corporal apenas nos machos com 11 e 12 semanas de idade (KONG et al., 2018). No entanto, é possível que a alteração do peso nas fêmeas não tenha sido encontrada devido a um n amostral pequeno (n=5). Já é descrito na literatura que o AE é capaz de reduzir o peso corporal em camundongos (ZOCHER et al., 2019), e de acordo, os camundongos machos YAC128 alojados no AE apresentaram peso corporal menor em relação aqueles alojados no AC, prevenindo assim esse fenótipo.

Em contraste, o peso dos animais aos 4 meses de idade não foi alterado pelo genótipo. Talvez isso tenha ocorrido porque o grupo YAC128 alojado em condições padrão era composto predominantemente por fêmeas (7 fêmeas e 1 macho) e a diferença do resultado anterior se deu nos machos. Cabe notar também, que em um estudo por Pouladi e colaboradores (2008) não houve diferença no peso corporal dos camundongos YAC128 aos 3 meses de idade (um mês anterior a nossa segunda avaliação).

Para os camundongos YAC128, uma possível explicação para esse fenótipo que frequentemente se apresenta vem de um importante regulador do peso corporal com efeito anabólico bem estabelecido. Os camundongos YAC128 apresentam aumento no fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) no plasma. Portanto, parece que pelo menos neste

modelo, Htt influencia o peso corporal através da modulação sinalização de IGF-1 (POULADI et al., 2010).

Além da avaliação periférica, um importante componente da tétrade são os sintomas psiquiátricos. Sabe-se que estes podem ter um impacto bastante expressivo na vida dos pacientes e seus familiares, impactando suas vidas mesmo anos antes do diagnóstico clínico motor (DUFF et al., 2007; GLIDDEN et al., 2020). Um parâmetro psiquiátrico relevante para a DH é a ansiedade. Em relação aos camundongos YAC128, o comportamento do tipo-ansioso já foi reportado na literatura aos 2 meses de idade pela análise do tempo gasto no centro do CA (DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO et al., 2018). Apesar de não termos encontrado diferença genotípica no parâmetro tempo, encontramos no número de entradas no centro do CA. No entanto, apenas os machos YAC128 realizaram menor número de entradas no centro. Interessantemente, outro trabalho também encontrou menor número de entradas no centro apenas nos machos do modelo *knock-in Hdh^{Q111}* (ORVOEN et al., 2012). Nossos resultados mostram que o AE foi capaz de aumentar o número de entradas no centro do aparato, um efeito do AE já relatado na literatura (OPENDAK; GOULD, 2015). No entanto, essa melhora não foi suficiente para anular a diferença genotípica que persistiu no AE.

Outro resultado interessante também ocorreu no TCA. Ao contrário dos machos YAC128 que apresentaram diminuição no número de entradas no centro, as fêmeas YAC128 obtiveram um resultado oposto, obtendo maior número de entradas em relação as fêmeas WT. Uma vez que o aumento da exploração no centro do CA por roedores pode também ser interpretado como comportamento de risco (VALVASSORI; VARELA; QUEVEDO, 2017), talvez o maior número de entradas no centro possa ser o reflexo deste comportamento. O comportamento de risco é um fator que também pode estar presente na DH e tem uma correlação negativa com a idade sendo encontrado especialmente em adultos jovens (MCDONELL et al., 2020). Interessantemente, nossos animais tinham apenas 2 meses de idade quando foram avaliados, o que corresponde a idade com maior risco para a apresentação de comportamentos de risco. O perfil de idade que se apresenta para a DH, também é presente na população onde há uma propensão maior para comportamentos de risco na adolescência seguido por uma diminuição a partir da fase adulta. Uma possível explicação biológica para esse perfil vem do remodelamento do sistema dopaminérgico que ocorre na adolescência especialmente no córtex pré-frontal e em suas conexões com outras regiões encefálicas (STEINBERG, 2008). A impulsividade, um comportamento de risco específico, já tinha sido relatado no modelo BACHD em uma tarefa mais específica para a avaliação desse fenótipo.

Aos 3 meses de idade, esses animais mostraram altos níveis de impulsividade, o que foi avaliado por uma tarefa de recompensa onde os BACHD escolhiam recompensas menores e mais rápidas em vez de recompensas maiores e mais tardias (MANFRÉ et al., 2016). Conforme a expectativa do envolvimento do córtex pré-frontal com o comportamento de risco, encontramos que o número de entradas no centro do CA se correlacionou positivamente com os níveis de 5-HT e NE especificamente nessa região encefálica.

Além da utilização do CA para avaliar o comportamento do tipo-ansioso, a análise deste comportamento também ocorreu pelo teste do LCE. Aos 2 meses de idade, as diferenças genóticas foram encontradas no AE, mas não no AC. É provável que a diferença tenha ocorrido apenas no AE porque houve um aumento no tempo em que os camundongos WT permaneceram nos braços abertos, mesmo que não estatisticamente. O aumento em apenas um dos genótipos (WT) foi suficiente para ampliar as diferenças entre os camundongos WT e YAC128 que então foi revelada estatisticamente no AE.

Os testes do CA e LCE também foram realizados aos 4 meses, no entanto nenhuma diferença foi encontrada. O resultado do TCA vai de encontro ao que foi previamente relatado na literatura, onde apesar da diminuição no tempo gasto no centro do CA ter sido apresentada aos 2 meses, a diferença não persistiu aos 4 meses de idade (DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO et al., 2018).

Outro parâmetro psiquiátrico bastante relevante no contexto da DH é a depressão. Nos camundongos YAC128, o comportamento do tipo-depressivo já foi relatado por meio de alguns testes como TSC, TNF e teste do consumo de sacarose, este tomado como uma medida de anedonia (DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO et al., 2018; POULADI et al., 2008). No entanto, os achados do comportamento do tipo-depressivo neste estudo divergem da literatura. Aos 2 meses de idade, o comportamento do tipo-depressivo não foi revelado pelo TSC nem pelo TBS. Esse resultado diverge do que foi encontrado por de Paula Nascimento-Castro e colaboradores (2018), onde aos 2 meses de idade o TST foi aplicado e a diferença entre os genótipos foi encontrada. No entanto, comparando os resultados dos dois estudos, podemos perceber que mesmo os camundongos WT parecem estar se apresentando com um fenótipo um pouco diferente. Enquanto a média do tempo de imobilidade para WT naquele estudo é de cerca de 50 segundos (DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO et al., 2018), aqui encontramos uma média de apenas 22 segundos ($\pm 4,69$), portanto, as diferentes coortes de animais (e mesmo os

camundongos WT) diferiram no tempo de imobilidade por algum motivo. Talvez o motivo da menor imobilidade seja o reflexo da maior locomoção para essa coorte de animais. Podemos hipotetizar que o comportamento do tipo-depressivo, que é medido por um parâmetro locomotor, talvez não tenha sido encontrado devido ao fato de nossa coorte de animais apresentar um aumento da locomoção: a média da distância percorrida no CA foi de cerca de $37 \pm 1,33\text{m}$ em comparação com a locomoção naquela coorte de animais onde a média foi de 30m para os camundongos WT (DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO et al., 2018).

Em relação aos animais de 4 meses de idade, novamente não encontramos diferença do genótipo no TSC divergindo do estudo que encontrou essas diferenças aos 2, 4 e 6 meses de idade (DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO et al., 2018). No entanto, outro estudo não encontrou essa diferença no TSC aos 5 meses de idade (1 mês após a nossa idade de avaliação) (GARCIA-MIRALLES et al., 2016). O TNF também foi aplicado aos 4 meses de idade e assim como TST nenhuma diferença genotípica foi revelada. Novamente, esse resultado diverge da literatura (DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO et al., 2018). Nota-se mais uma vez que o grupo controle (WT) se apresentou de maneira distinta aqui. Os camundongos WT apresentaram um tempo maior de imobilidade do que geralmente é reportada na literatura (DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO et al., 2018; POULADI et al., 2008) o que talvez tenha ocorrido devido a sequência de 2 testes de desespero comportamental realizados de maneira consecutiva (TSC e TNF na sequência no mesmo dia). O maior tempo destes animais imóveis no TNF nos leva a pensar na hipótese de que talvez tenha ocorrido um comportamento semelhante ao “desamparo aprendido”. O desamparo aprendido refere-se à exposição do animal a um primeiro evento aversivo inescapável e a exposição a um segundo evento aversivo no qual é verificado a desistência da tentativa de escape mesmo com essa possibilidade porque aprenderam com a primeira exposição que os resultados eram independentes de suas tentativas (MAIER; SELIGMAN, 2016). Em nosso caso, o primeiro evento refere-se ao TST, no qual os animais lutaram para tentar escapar verificado pelo baixo tempo de imobilidade, e o segundo evento refere-se ao TNF em que possivelmente o aprendizado anterior prejudicou a tentativa de fuga e os animais desistiram de tentar escapar, o que foi verificado pelo alto tempo de imobilidade.

Em relação ao comportamento de anedonia - componente importante da depressão – este já havia sido descrito na literatura para modelos de DH aos 4 meses por meio do teste da preferência e consumo da sacarose (POULADI et al., 2008). Aqui, também encontramos o comportamento anedônico, mas por meio do TBS. Os efeitos do AE aplicados no início da vida

(dos 21 dias aos 2 meses) persistiram apenas parcialmente. Não houve uma reversão, mas a diferença genotípica deixou de existir no parâmetro latência para autolimpeza no grupo AE-AC. O resultado pode sinalizar que, apesar de um efeito benéfico ser experimentado por um AE mesmo que descontinuado, provavelmente os benefícios seriam maiores se o AE fosse aplicado ao longo de toda a vida. No entanto, no parâmetro tempo total de autolimpeza a diferença genotípica continuou existindo o que também nos leva a pensar que talvez a própria transferência dos animais do AE para o AC tenha causado os efeitos anedônicos encontrados no grupo AE-AC aos 4 meses. Em relação ao teste aqui utilizado para avaliar a anedonia, o TBS, este também tem sido utilizado como um parâmetro para a avaliação da apatia (BECKER, PINHASOV, ORNOY, 2021). A apatia, tradicionalmente associada a falta de motivação (CHONG, 2020), é relatada nos pacientes com DH inclusive em estágio prodromal (SOUSA et al., 2017; MISIURA et al., 2019).

Apesar dos diversos fatores relevantes para o quadro que se manifesta na DH, são os déficits motores que dão o diagnóstico clínico desta condição e são tidos como marcadores para idade “inicial” da DH. Um teste frequentemente utilizado para acessar os déficits motores em modelos animais para DH é o teste da barra giratória (rotarod) que possui diferentes protocolos. O desempenho motor no rotarod pode ser influenciado por vários fatores, como coordenação motora, equilíbrio, aprendizagem motora e fadiga (BOCCA; RESENDE; KO, 2012; BROOKS; DUNNETT, 2009; MCFADYEN et al., 2003; SHIOTSUKI et al., 2010) e todas essas características são relevantes nesta condição (BATES et al., 2015; GLIDDEN et al., 2020; HEINDEL; BUTTERS; SALMON, 1988; VUONG et al., 2018). O protocolo de aceleração aplicado neste estudo buscou analisar os vários fatores envolvidos em conjunto e um prejuízo na tarefa de aceleração do rotarod foi encontrado aos 2 meses de idade. O AE foi capaz de prevenir o déficit motor levando os camundongos YAC128 a apresentarem um desempenho igual aos dos camundongos WT.

Os estudos que avaliaram os camundongos YAC128 aos 2 meses de idade, também encontraram diferenças genotípicas no teste do rotarod, porém utilizando um protocolo diferente. Esses estudos permitiram um treinamento em velocidade fixa antes do dia do teste e, apenas no teste, a aceleração era aplicada. Como resultado, estes estudos mostraram que, embora no dia do teste, os camundongos YAC128 apresentassem um desempenho igual ao dos camundongos WT, no treinamento (especialmente nas primeiras tentativas) o desempenho dos

camundongos YAC128 foi pior do que os camundongos WT. Em outras palavras, embora ambos os genótipos, WT e YAC128, tenham aprendido a tarefa do rotarod, os camundongos YAC128 precisaram de mais treinamento para atingir o mesmo nível de desempenho que os camundongos WT aos 2 meses de idade (POULADI et al., 2012; VAN RAAMSDONK et al., 2005b). Em relação ao teste com aceleração, um desempenho prejudicado é relatado na literatura a partir dos 3 meses de idade (POULADI et al., 2008), embora esse pior desempenho não tenha sido encontrado em outro estudo com a mesma idade (SLOW et al., 2003). Curiosamente, os déficits motores que haviam sido revelados na tarefa do rotarod aos 2 meses, não foram encontrados aos 4 meses de idade. Talvez esse resultado reflita um comportamento com padrão bifásico já que outro estudo também encontrou esse perfil mostrando um comprometimento inicial (aos 4 meses) seguido de uma normalidade em idade posterior (aos 6 meses) (DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO et al., 2018). No entanto, tradicionalmente a partir do momento em que o déficit no rotarod é encontrado ele persiste em idades posteriores (SLOW et al., 2003; POULADI et al., 2012). No presente estudo, mesmo sem comprometimento aos 4 meses, o AE intermitente foi capaz de melhorar a performance motora dos camundongos YAC128 diminuindo o número de quedas.

Apesar da presença de movimentos involuntários, principalmente compostos pela coreia, o comprometimento dos movimentos voluntários também é encontrado e pode incluir bradicinesia, acinesia e rigidez muscular em graus mais avançados na DH. Portanto, pode-se notar que há uma mudança no estágio de hipercinesia para hipocinesia conforme a doença progride (REINER; DENG, 2018; ROSS et al., 2014). Assim como nos pacientes, os camundongos YAC128 também exibem um padrão bifásico de atividade locomotora com hiperlocomoção aos 3 meses de idade seguida por hipolocomoção detectada aos 12 meses de idade (SLOW et al., 2003). Neste trabalho, não encontramos hiperlocomoção aos 2 meses de idade avaliada pelo TCA, o que está de acordo com os achados na literatura (DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO et al., 2018; SLOW et al., 2003). Apesar da diferença genotípica não ter sido encontrada, encontramos uma diferença entre o sexo, onde as fêmeas YAC128 tiveram hiperlocomoção em relação aos machos YAC128.

Outro teste utilizado para avaliar a condição motora desses animais foi o PT e nenhuma diferença genotípica foi encontrada aos 2 meses de idade. Embora não seja tão comum a aplicação deste teste em comparação ao rotarod em modelos para DH, a aplicação do PT pode ser relevante, uma vez que o PT original foi desenvolvido para avaliar a bradicinesia em modelos de Parkinson (OGAWA et al., 1985) e a bradicinesia também é um sintoma presente

em estágios específicos da DH, incluindo bradicinesia leve em estágio pré-manifesto (REINER; DENG, 2018). Aos 4 meses de idade, embora a diferença genotípica também não tenha sido encontrada, o AE, mesmo que intermitente, foi capaz de melhorar o desempenho dos animais WT.

Como muitos sintomas aparecem antes de neurodegeneração significativa (VONSATTEL et al., 1985), possivelmente a explicação vem de outras causas além do comprometimento causado pela perda celular. O mesmo ocorre para o modelo YAC128 da DH. Enquanto os camundongos YAC128 apresentam alterações físicas, cognitivas, psiquiátricas e motoras antes dos 4 meses de idade, a neurodegeneração não surge até idades mais avançadas (CALLAHAN; ABERCROMBIE, 2011; SLOW et al., 2003; VAN RAAMSDONK; WARBY; HAYDEN, 2007). Muitos estudos procuram identificar as diferentes alterações que ocorrem nos camundongos YAC128. No presente estudo, propomos analisar os níveis de monoaminas em três importantes regiões encefálicas afetadas pela DH.

As monoaminas 5-HT, NE e DA foram mensuradas nas regiões do estriado, córtex pré-frontal e hipocampo. No entanto, a DA foi detectada apenas no estriado. Sabe-se que os níveis de DA no hipocampo são baixos e, portanto, nem sempre detectados pela técnica de HPLC (SANTOS et al., 2020). Já no córtex pré-frontal, a DA é normalmente detectada (SANTOS et al., 2020), no entanto, não detectamos no presente estudo. Nossa hipótese para a não detecção no córtex pré-frontal é de que o ácido perclórico não estava com a qualidade suficiente para evitar a degradação da DA que provavelmente já estava em quantidades mais baixas devido ao tamanho do tecido bem menor em relação ao estriado onde a DA foi detectada. Apostamos neste reagente específico pois ele é utilizado com a finalidade de proteger monoaminas da degradação (UNGERSTEDT, 1991; BOIX; WØIEN; SAGVOLDEN, 1997).

Embora alterações genotípicas nos níveis de monoaminas não tenham sido encontradas aos 2 meses de idade, a literatura apresenta algumas alterações que ocorrem nos camundongos YAC128 em idades mais avançadas. Por exemplo, aos 5 meses de idade, os camundongos YAC128 mostraram redução nos níveis de NE e DA no estriado (GARCIA-MIRALLES et al., 2016). Além disso, aos 10 meses de idade, os níveis de mRNA dos receptores estriatais D1 e D2 foram reduzidos em camundongos YAC128 (POULADI et al., 2012). Além da avaliação no estriado, evidências de desregulação de neurotransmissores liberados no hipocampo, avaliadas por medidas eletrofisiológicas, também foram relatadas (GHILAN et al., 2014). Os

achados deste último estudo mostraram reduções na depressão por pulso pareado aos 3 e 6 meses de idade e um aumento da potenciação pós-tetânica e potenciação de curto prazo após uma estimulação de alta frequência. Essas condições fisiológicas alteradas podem refletir em liberação elevada de neurotransmissores em resposta à estimulação sináptica no início do curso da DH (GHILAN et al., 2014).

Apesar de alterações nos níveis de monoaminas nos camundongos YAC128 aos 2 meses de idade não tenham sido encontradas, verificamos que o AE foi capaz de diminuir os níveis de monoaminas, convergindo para o propósito dos fármacos utilizados no tratamento da coreia. Para avaliar se a diminuição proporcionada pelo AE estava de fato relacionado ao desempenho motor no rotarod, realizamos um teste de correlação, onde encontramos que uma correlação entre a diminuição de NE e 5-HT no estriado com melhor desempenho no rotarod. Curiosamente, o melhor desempenho no rotarod também foi correlacionado com níveis mais baixos de NE no hipocampo. Embora classicamente não considera-se que o hipocampo esteja diretamente relacionado ao componente motor da tarefa do rotarod e nem mesmo à aprendizagem motora (BUREAU et al., 2010; GOULD et al., 2002; SCHOLZ et al., 2015), um estudo encontrou correlação entre um melhor desempenho no rotarod associado a maior anisotropia fracionada derivada da difusão por ressonância magnética no hipocampo, sugerindo uma possibilidade da participação desta região (SCHOLZ et al., 2015).

Um resultado que nos chamou a atenção e nos levou a realização de mais um teste de correlação foram os resultados da distância percorrida no TCA e dos níveis de monoaminas no córtex pré-frontal. Apesar de nenhuma diferença genotípica nesses resultados, percebemos que as fêmeas YAC128 apresentaram hiperlocomoção e aumento nos níveis de monoaminas no córtex pré-frontal em relação aos machos YAC128. O teste de correlação mostrou que de fato houve uma correlação ($r = 0,76$), indicando que níveis mais altos de NE estavam relacionados a um aumento na locomoção no CA. O teste de correlação também foi estendido para as demais regiões encefálicas e, interessantemente, as monoaminas mensuradas na região do estriado - região classicamente relacionado aos estados de hiper e hipolocomoção na DH - não foram correlacionadas com a locomoção no CA.

Apesar de na DH, a hipótese para a origem da hiperatividade e hipoatividade concentrar-se na morte dos neurônios estriatais (REINER; DENG, 2018), outra hipótese leva em consideração as alterações dos neurotransmissores, onde um aumento da DA seria responsável pela coreia enquanto sua diminuição seria responsável pela hipocinesia. Essas observações ganharam força a partir das observações de que a administração de L-DOPA era

capaz de induzir discinesia, um estado de hiperkinesia, nos pacientes com Parkinson (BUNNER; REBEC, 2016).

Em relação a região encefálica, embora a origem da hiper e hipolocomoção esteja relacionada ao estriado, pelo menos na DH, a literatura também mostra algumas evidências do envolvimento do córtex pré-frontal com a hiperlocomoção, o que poderia justificar nossos resultados. Um estudo por exemplo, mostrou que lesões bilaterais no córtex pré-frontal medial de ratos Sprague-Dawley aumentam a atividade locomotora (JASKIW et al., 1990). Além do estriado e córtex pré-frontal, parece que a etiologia das regiões encefálicas envolvidas no aumento da atividade locomotora pode envolver pelo menos 12 regiões encefálicas distintas (VIGGIANO, 2008). Por exemplo, estudos envolvendo lesões na área tegmental ventral (ATV), uma região do mesencéfalo que projeta suas fibras para o córtex frontal, também induzem uma síndrome comportamental caracterizada por hiperatividade locomotora permanente em ratos (TASSIN et al., 1978). Assim, levando em consideração o possível envolvimento do córtex pré-frontal na hiperlocomoção e seu comprometimento na DH, parece plausível que essa forte correlação encontrada corresponda de fato a uma associação entre essas variáveis.

Como já relatado, além do envolvimento do córtex pré-frontal com a locomoção, os níveis de 5-HT e NE no córtex pré-frontal também se correlacionaram positivamente com um possível comportamento de risco. Como o comportamento de risco foi avaliado por uma atividade locomotora (número de entradas no centro do CA), pode haver uma confusão entre esses fatores. Além disso, a interpretação dessas correlações deve ser analisada cuidadosamente, pois apesar das correlações significativas e da plausibilidade suportada pela literatura, elas não necessariamente confirmam uma associação entre as variáveis.

De qualquer forma, os resultados indicam a importância do córtex pré-frontal na participação do fenótipo que se apresenta nessa condição. A literatura apresenta importantes disfunções nessa região e na projeção cortico-estriatal. O estriado recebe input excitatório glutamatérgico de todo o córtex cerebral (ANDRÉ; CEPEDA; LEVINE, 2010; BUNNER; REBEC, 2016) e existe a hipótese de que tanto uma toxicidade causada pelo aumento de DA quanto um excitotoxicidade glutamatérgica na projeção cortico-estriatal seria responsável pela perda dos neurônios estriatais (GIL; REGO, 2008). Neste trabalho encontramos diminuição dos níveis de DA pelo AE, o que apesar de não ter sido correlacionado com melhor performance motora, segundo a hipótese da toxicidade por DA, essa diminuição preveniria a morte dos

neurônios estriatais. Apesar de DA estriatal não ter se relacionado com melhor performance motora, a NE obteve correlação. Ressalta-se a relação entre essas duas monoaminas; a NE é sintetizada a partir da DA pela dopamina β -hidroxilase e há evidências de que DA e NE podem atuar de maneira sobreposta (RANJBAR-SLAMLOO; FAZLALI, 2020; SPOKES, 1981).

Além disso, as alterações no córtex pré-frontal nos levam a pensar numa outra estrutura, o tronco encefálico, que contém vários núcleos importantes para a produção e distribuição de monoaminas para o córtex pré-frontal e para outras regiões. A ATV e a substância negra localizadas no mesencéfalo são importantes na produção e distribuição de DA e apresentam alterações na DH (HUGUET et al., 2019; LEITÃO et al., 2020). O *locus coeruleus*, localizado na ponte e importante para no fornecimento de NE, apresenta contagem mais baixa de neurônios e comprimento reduzido (distância rostro-caudal do *locus coeruleus*) em tecidos *post-mortem* (ZWEIG et al., 1992). Além disso, uma população de células serotoninérgicas também foi encontrada em número reduzido tanto em ratos transgênicos quanto em pacientes no núcleo da rafe (JAHANSHAHI et al., 2013), região do tronco encefálico importante na produção de 5-HT (SHIBATA et al., 2012). Portanto, visto as alterações de neurotransmissores que ocorrem na DH e a disfunção no córtex pré-frontal, seria interessante também investigar em futuros trabalhos o tronco cerebral que contém importantes núcleos responsáveis pela produção de monoaminas.

Em relação ao tratamento não-farmacológico aplicado neste trabalho, não é a primeira vez que um paradigma baseado no enriquecimento é aplicado para o modelo YAC128. No entanto, o único enriquecimento anteriormente aplicado neste modelo foi um "enriquecimento cognitivo" que, curiosamente, não melhorou o desempenho cognitivo, mas sim o desempenho motor (STEVENTON et al., 2015). Além disso, não foi a primeira vez que os níveis de monoaminas foram avaliados em camundongos YAC128. Os níveis de monoaminas já haviam sido analisados, no entanto, em idades mais avançadas (5 meses) onde diferenças genótípicas foram encontradas (GARCIA-MIRALLES et al., 2016). Contudo, esta parece ser a primeira vez, até onde temos conhecimento, em que o efeito do AE foi avaliado especificamente nos níveis de monoaminas em um modelo para DH. No comportamento, nossos resultados mostraram efeitos neutros ou positivos do AE. Os resultados indicaram que o AE é capaz de prevenir déficits motores provavelmente pela modulação que ocorreu nos níveis de monoaminas no encéfalo. Em conjunto, os resultados mostram que apesar do AE atuar no mesmo alvo que os tratamentos atuais utilizados para coreia, difere deles porque o AE não afetou negativamente o humor. Nas tabelas abaixo, resumimos as principais diferenças genótípicas encontradas e

efeito do AE sobre estes comprometimentos (Tabela 5) e ainda as diferenças entre machos e fêmeas YAC128 encontradas no presente trabalho (Tabela 6).

Tabela 5 – Resumo dos comprometimentos encontrados nos camundongos YAC128

Avaliação (WT x YAC128)	Sexo	Resultado YAC128	Prevenção pelo AE
2 meses			
Peso corporal	Machos	↑	Total
Comportamento do tipo-ansioso (LCE)	SD	↑	Ausente
Nº entradas no centro do CA	Machos	↓	Parcial
Nº entradas no centro do CA	Fêmeas	↑	Ausente
Comprometimento motor (Rotarod)	SD	↑	Total
4 meses			
Comportamento do tipo-anedônico (TBS)	SD	↑	Parcial

Legenda: SD = sem distinção entre os sexos; LCE = Labirinto em Cruz Elevado; CA = Campo Aberto; TBS = Teste da Borrifada com Solução de Sacarose.

Tabela 6 – Resumo das diferenças entre machos e fêmeas YAC128

Machos x Fêmeas YAC128	Sexo	Resultado
2 meses		
Peso	Machos	↑
Locomoção (CA)	Fêmeas	↑
Nº entradas no centro do CA	Fêmeas	↑
5-HT e NE no córtex pré-frontal	Fêmeas	↑

Legenda: CA = Campo Aberto; 5-HT = Serotonina; NE = Norepinefrina.

Infelizmente, apesar das evidências que se apresentam neste trabalho e na literatura mostrando que o estilo de vida pode ser um modificador eficaz para a DH, ainda não existem muitos estudos propondo uma intervenção efetiva. Os estudos que apresentam proposta de intervenção, baseiam-se apenas em exercício físico em pacientes com DH já manifesta e com intervenções que duraram no máximo 6 meses. As evidências gerais parecem apoiar um efeito positivo, no entanto os efeitos do treinamento sobre a cognição, a função motora e a composição

corporal são menos consistentes (MUELLER; PETERSEN; JUNG, 2019). Atualmente existem dois ensaios clínicos que também propõe uma intervenção com exercício físico em um período de um ano (NCT03344601) e uma intervenção de um mês (NCT04917133). Infelizmente, intervenções que abrangem também outros domínios do estilo de vida e que sejam específicos para pessoas em risco de desenvolver a DH ainda não foram propostas. Contudo existem alguns trabalhos interessantes e ensaios clínicos ativos, como o NCT04616794 e NCT03579342, que buscam avaliar aplicativos para promover e incentivar intervenções em diversos domínios no estilo de vida atuando em sentido preventivo mas não específicos para DH (WESSELMAN et al., 2019).

Em suma, embora a causa genética da DH esteja definida desde 1993 (MACDONALD et al., 1993), infelizmente ainda não existem tratamentos disponíveis eficientes para atrasar sua progressão. Apesar de ser uma condição genética em que as abordagens farmacológicas direcionadas ao DNA e RNA parecem ser as interferências terapêuticas mais racionais, ainda existem desafios que precisam ser superados por essas técnicas (SHANNON, 2020). Adicionando o presente estudo aos achados prévios da literatura que mostram que o AE em modelos animais e o estilo de vida em pacientes são capazes de atrasar o início e progressão da doença (MO; HANNAN; RENOIR, 2015; STEVENTON et al., 2015; TREMBATH et al., 2010; VAN DELLEN et al., 2000), acreditamos que as intervenções ambientais forneçam abordagens viáveis e eficazes para o tratamento enquanto a terapia genética e outras abordagens farmacológicas ainda superam desafios.

5 CONCLUSÃO

Em relação ao tratamento não-farmacológico aqui proposto, observamos que o AE foi capaz de prevenir o ganho de peso nos machos e os déficits motores, e melhorou parcialmente o comportamento do tipo-ansioso e anedônico. O AE também foi capaz de modular os níveis de monoaminas, diminuindo os níveis de 5-HT, NE e DA no estriado e de NE no córtex pré-frontal e hipocampo. Uma correlação entre melhor performance motora e menores níveis de monoaminas foi encontrada, indicando um possível mecanismo fisiológico pelo qual o AE atua para promover os benefícios observados. Interessantemente, os fármacos utilizados para o tratamento da coreia na DH, tetrabenazina e deutetabenazina, também atuam diminuindo as monoaminas que são liberadas na fenda sináptica. No entanto, diferente dos tratamentos atuais que pioram os sintomas depressivos, aqui o AE não prejudicou os aspectos relacionados ao humor.

5.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos e das observações realizadas, seguem sugestões e perspectivas para futuros trabalhos. Uma vez que diferentes resultados podem ser encontrados a depender do sexo utilizado, sugerimos que trabalhos futuros também levem em consideração este fator. Sugerimos ainda que futuros trabalhos analisem o comportamento de risco por um teste mais específico que não envolva a locomoção, visto que os camundongos YAC128 apresentam hiperlocomoção ou hipolocomoção dependendo da fase avaliada. Visto que a desregulação nos níveis de monoaminas parece ser um importante contribuinte para o comprometimento do fenótipo observado, sugere-se que também outras regiões sejam analisadas como o tronco encefálico que possui vários núcleos responsáveis pela produção e distribuição desses neurotransmissores. Visto que o AE ofertado no início da vida foi capaz de trazer importantes benefícios e sem a presença de efeitos colaterais, segue nossa sugestão mais relevante. Sugerimos que futuros trabalhos possam propor maneiras eficientes de promover intervenções no estilo de vida daquelas pessoas com a possibilidade de desenvolver a DH (ou que já apresentam a DH manifesta) para que tenham a melhor qualidade de vida possível.

REFERÊNCIAS

- AJITKUMAR, A.; JESUS, O. DE. Huntington Disease. **Medizinische Genetik**, v. 30, n. 2, p. 246–251, 2021.
- ALTLNER, Ş.; ARDIC, S.; ÇEBİ, A. H. Extending the Phenotypic Spectrum of Huntington Disease: Hypothermia. **Molecular Syndromology**, v. 11, n. 1, p. 56–58, 2020.
- ANDRÉ, V. M.; CEPEDA, C.; LEVINE, M. S. Dopamine and glutamate in huntington's disease: a balancing act. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, 2010.
- ANDREW, S. E. et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. v. 4, n. august, p. 398–403, 1993.
- ANDRICH, J. E. et al. Upper gastrointestinal findings in Huntington's disease: Patients suffer but do not complain. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, n. 12, p. 1607–1611, 2009.
- ARRASATE, M. et al. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. **Nature**, v. 431, n. 7010, p. 805–810, 2004.
- AZIZ, N. A. et al. Normal and mutant HTT interact to affect clinical severity and progression in Huntington disease. **Neurology**, v. 73, n. 16, p. 1280–1285, 2009.
- AZIZ, N. A. et al. Autonomic symptoms in patients and pre-manifest mutation carriers of Huntington's disease. **European Journal of Neurology**, v. 17, n. 8, p. 1068–1074, 2010.
- BAILEY, K. R.; CRAWLEY, J. N.; BAILEY, K. R. Behaviors in Mice. In: **Analysis**. CRC Press/Taylor & Francis, p. 77–101, 2009.
- BARKHUIZEN, M. et al. Perinatal insults and neurodevelopmental disorders may impact Huntington's disease age of diagnosis. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 55, n. April, p. 55–60, 2018.
- BATES, G. P. et al. Huntington disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. April, p. 1–21, 2015.
- BECKER, M.; PINHASOV, A.; ORNOY, A. Animal Models of Depression: what can they teach us about the human disease? **Diagnostics**, v. 11, n. 1, p. 1-31, 2021.
- BENN, C. L. et al. Environmental enrichment reduces neuronal intranuclear inclusion load but has no effect on messenger rna expression in a mouse model of huntington disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 69, n. 8, p. 817–827, 2010.
- BENNETT, E. J. et al. Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. **Molecular Cell**, v. 17, n. 3, p. 351–365, 2005.
- BERNHEIMER, H. et al. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington

Clinical, morphological and neurochemical correlations. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 20, n. 4, p. 415–455, 1973.

BOCCA, W.; RESENDE, V. DE; KO, G. M. Teste De Rotarod : Contribuições No Estudo Das Doenças Neuromusculares , Das Síndromes Extrapiramidais E Das. n. i, 2012.

BOIX, F.; WØIEN, G.; SAGVOLDEN, T. Short term storage of samples containing monoamines: ascorbic acid and glutathione give better protection against degradation than perchloric acid. **Journal Of Neuroscience Methods**, v. 75, n. 1, p. 69-73,1997.

BROOKS, S. P.; DUNNETT, S. B. Tests to assess motor phenotype in mice: A user's guide. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 519–529, 2009.

BUNNER, K. D.; REBEC, G. V. Corticostriatal dysfunction in Huntington's disease: The basics. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 10, p. 1–12, 2016.

BUREAU, G. et al. Intrastratial inhibition of extracellular signal-regulated kinases impaired the consolidation phase of motor skill learning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 1, p. 107–115, 2010.

CALLAHAN, J. W.; ABERCROMBIE, E. D. In vivo dopamine efflux is decreased in striatum of both fragment (R6/2) and full-length (YAC128) transgenic mouse models of Huntington's disease. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 5, n. JULY 2011, p. 1–10, 2011.

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, 15 dez. 2005.

CEPEDA, C. et al. The Role of Dopamine in Huntington ' s Disease Striatal DA Innervation in the HD Postmortem Brain. n. 310, p. 1–15, 2018.

CHEN, J. Y. et al. Dopamine imbalance in Huntington's disease: A mechanism for the lack of behavioral flexibility. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, n. 7 JUL, p. 1–14, 2013.

CHEN, M.; WOLYNES, P. G. Aggregation landscapes of Huntingtin exon 1 protein fragments and the critical repeat length for the onset of Huntington's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 17, p. 4406–4411, 2017.

CHONG, Trevor T-J. Definition: apathy. **Cortex**, v. 128, p. 326-327, 2020.

COYLE, J. T.; SCHWARCZ, R. Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. **Nature**, v. 263, n. 5574, p. 244–246, 1976.

CUI, L. et al. Transcriptional Repression of PGC-1 α by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. **Cell**, v. 127, n. 1, p. 59–69, 2006.

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.; VAN DUIJN, E. Anxiety in Huntington's disease. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 27, n. 4, p. 262–271, 2015.

DALLEY, J. W.; ERSCHKE, K. D. Neural circuitry and mechanisms of waiting impulsivity: relevance to addiction. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 374, n. 1766, p. 20180145, 2019.

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 BENEDETTO, G. E. et al. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, p. 266–270, 2014.

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.

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

DIFIGLIA, M. et al. Aggregation of Huntingtin in Neuronal Intranuclear Inclusions and Dystrophic Neurites in Brain Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2893894> REFERENCES Linked references are available o. v. 277, n. 5334, p. 1990–1993, 1997.

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

DJOUSSÉ, L. et al. Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. **American Journal of Medical Genetics**, v. 119 A, n. 3, p. 279–282, 2003.

DU, G. et al. Altered Gut Microbiota Related to Inflammatory Responses in Patients With Huntington's Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1–12, 2021.

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.

- DUCOTTET, C.; BELZUNG, C. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. **Physiology and Behavior**, v. 81, n. 3, p. 417–426, 2004.
- DUFF, K. et al. Psychiatric Symptoms in Huntington's Disease before Diagnosis: The Predict-HD Study. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 12, p. 1341–1346, 2007.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)**, v. 46, n. 3, p. 208–209, 1957.
- DUYAO, M. et al. Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. **Science**, v. 269, n. 5222, p. 407–410, 1995.
- FARRER, L. A. Suicide and attempted suicide in Huntington disease: Implications for preclinical testing of persons at risk. **American Journal of Medical Genetics**, v. 24, n. 2, p. 305–311, 1986.
- FDA. Xenazine (tetrabenazine). **Food and Drug Administration**, p. 1–63, 2008. Disponível em <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/021894lbl.pdf>
- FDA. Austedo (deutetrabenazine). **Food and Drug Administration**, p. 1–17, 2017. Disponível em <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208082s000lbl.pdf>
- FIELDS, E. et al. Gene targeting techniques for Huntington's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 70, p. 101385, 2021.
- GALTS, C.P.C. et al. Depression in neurodegenerative diseases: common mechanisms and current treatment options. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 102, p. 56-84, 2019.
- GARCIA-MIRALLES, M. et al. Treatment with the MAO-A inhibitor clorgyline elevates monoamine neurotransmitter levels and improves affective phenotypes in a mouse model of Huntington disease. **Experimental Neurology**, v. 278, p. 4–10, 2016.
- 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.
- GARRETT, M. C.; SOARES-DA-SILVA, P. Increased Cerebrospinal Fluid Dopamine and 3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid Levels in Huntington's Disease: Evidence for an Overactive Dopaminergic Brain Transmission. **Journal of Neurochemistry**, v. 58, n. 1, p. 101–106, 1992.
- GATTO, E. M. et al. Huntington disease: Advances in the understanding of its mechanisms. **Clinical Parkinsonism & Related Disorders**, v. 3, p. 100056, 2020.
- GAUTHIER, L. R et al. Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by

Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. **Cell**, v. 118, n. 1, p. 127-138, 2004.

GHILAN, M. et al. YAC128 Huntington's disease transgenic mice show enhanced short-term hippocampal synaptic plasticity early in the course of the disease. **Brain Research**, v. 1581, p. 117–128, 2014.

GIL, J. M.; REGO, A. C. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2803–2820, 2008.

GILBERT, G. J. Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number. **Neurology**, v. 73, n. 7, p. 572, 2009.

GLIDDEN, A. M. et al. Patient-reported impact of symptoms in Huntington disease: PRISM-HD. **Neurology**, v. 94, n. 19, p. e2045–e2053, 2020.

GOULD, T. J. et al. Effects of hippocampal lesions on patterned motor learning in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 58, n. 6, p. 581–586, 2002.

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

GROUP, H. S. Unified Huntington's disease rating scale: Reliability and consistency. **Movement Disorders**, v. 11, n. 2, p. 136–142, 1996.

GUSELLA, J. F. et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. **Nature**, v. 306, n. 5940, p. 234–238, 1983.

GUSELLA, J. F.; MACDONALD, M. E. Huntington's disease: the case for genetic modifiers. **Genome Medicine**, v. 1, n. 8, p. 80, 2009.

HAYDEN, M. R. et al. Tetrabenazine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 17–18, 2009.

HEEMSKERK, A.-W.; ROOS, R. A. C. Aspiration pneumonia and death in Huntington's disease. **PLoS Currents**, v. 4, p. RRN1293, 2012.

HEINDEL, W. C.; BUTTERS, N.; SALMON, D. P. Impaired Learning of a Motor Skill in Patients With Huntington's Disease. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, n. 1, p. 141–147, 1988.

HERMANN, A.; WALKER, R. H. Diagnosis and Treatment of Chorea Syndromes. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 15, n. 2, 2015.

HOCKLY, E. et al. Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. **Annals of Neurology**, v. 51, n. 2, p. 235–242, 2002.

HOGARTH, P. et al. Interrater Agreement in the Assessment of Motor Manifestations of Huntington's Disease. v. 20, n. 3, p. 293–297, 2005.

- HONRATH, P. et al. Risk factors of suicidal ideation in Huntington's disease: literature review and data from Enroll-HD. **Journal of Neurology**, v. 265, n. 11, p. 2548–2561, 2018.
- HUGUET, G. et al. Altered expression of dopaminergic cell fate regulating genes prior to manifestation of symptoms in a transgenic rat model of Huntington's disease. **Brain Research**, v. 1712, p. 101–108, 2019.
- HUNTINGTON, G. On Chorea. **The Medical and Surgical Reporter**, v. 15, p. 317–321, 1872.
- HUNTINGTON STUDY GROUP et al. Effect of Deutetrabenazine on Chorea Among Patients With Huntington Disease. **JAMA**, v. 316, n. 1, p. 40, 2016.
- JAHANSHAHI, A. et al. Changes in brainstem serotonergic and dopaminergic cell populations in experimental and clinical Huntington's disease. **Neuroscience**, v. 238, p. 71–81, 2013.
- JASKIW, G. E. et al. Effect of ibotenic acid lesions of the medial prefrontal cortex on amphetamine-induced locomotion and regional brain catecholamine concentrations in the rat. **Brain Research**, v. 534, n. 1–2, p. 263–272, 1990.
- JOHRI, A.; CHANDRA, A.; BEAL, M. F. **PGC-1 α , mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease** *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 2013.
- KEMPERMANN, G. Environmental enrichment , new neurons and the neurobiology of individuality. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, p. 235–245, 2019.
- KIM, A. et al. New Avenues for the Treatment of Huntington's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8363, 2021.
- KISH, S. J.; SHANNAK, K.; HORNYKIEWICZ, O. Elevated serotonin and reduced dopamine in subregionally divided Huntington's disease striatum. **Annals of Neurology**, v. 22, n. 3, p. 386–389, 1987.
- KONG, G. et al. Microbiome profiling reveals gut dysbiosis in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 135, p. 104268, 2018.
- KOPITO, R. R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 12, p. 524–530, 2000.
- KUMAR, A.; GARG, V. A Review on Huntington's Disease. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2016.
- LACCONE, F. et al. DNA analysis of Huntington's disease: Five years of experience in Germany, Austria, and Switzerland. **Neurology**, v. 53, n. 4, p. 801–806, 1999.
- LAKKE, J. W. F. Classification of extrapyramidal disorders. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 51, n. 2, p. 311–327, 1981.

- LANGBEHN, D. R. et al. Association of CAG Repeats with Long-term Progression in Huntington Disease. **JAMA Neurology**, v. 76, n. 11, p. 1375–1385, 2019.
- LEE, J. M. et al. CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. **Neurology**, v. 78, n. 10, p. 690–695, 2012.
- LEITÃO, R. et al. Neuromelanin Magnetic Resonance Imaging of the Substantia Nigra in Huntington's Disease. **Journal of Huntington's Disease**, v. 9, n. 2, p. 143–148, 2020.
- LI, S. H.; LI, X. J. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 3, p. 146–154, 2004.
- LIU, J. P.; ZEITLIN, S. O. Is huntingtin dispensable in the adult brain? **Journal of Huntington's Disease**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 2017.
- MACDONALD, M. E. et al. Recombination events suggest potential sites for the Huntington's disease gene. v. 3, p. 183–190, 1989.
- MACDONALD, M. E. et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell**, v. 72, n. 6, p. 971–983, 1993.
- MAIER, S. F.; SELIGMAN, M. E. P. Learned helplessness at fifty: insights from neuroscience. **Psychological Review**, v. 123, n. 4, p. 349–367, 2016.
- MANFRÉ, G. et al. Impulsivity trait in the early symptomatic BACHD transgenic rat model of Huntington disease. v. 299, p. 6–10, 2016.
- MANGIARINI, L. et al. Exon 1 of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice. **Cell**, v. 87, n. 3, p. 493–506, 1996.
- MARQUES SOUSA, C.; HUMBERT, S. Huntingtin: Here, there, everywhere! **Journal of Huntington's Disease**, v. 2, n. 4, p. 395–403, 2013.
- MARTIN, D. D. O. et al. Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. **Trends in Neurosciences**, v. 38, n. 1, p. 26–35, 2015.
- MAYEUX, R. et al. Correlates of early disability in Huntington's disease. **Annals of Neurology**, v. 20, n. 6, p. 727–731, 1986.
- MCCUSKER, E. A. et al. Unawareness of motor phenoconversion in Huntington disease. **Neurology**, v. 81, n. 13, p. 1141–1147, 2013.
- MCDONELL, K. E. et al. Risk-Taking Behaviors in Huntington's Disease. **Journal of Huntington's Disease**, v. 9, n. 4, p. 359–369, 2020.
- MCFADYEN, M. P. et al. Differences among eight inbred strains of mice in motor ability and motor learning on a rotorod. **Genes, Brain and Behavior**, v. 2, n. 4, p. 214–219, 2003.

- MELKANI, G. Huntington's Disease-Induced Cardiac Disorders Affect Multiple Cellular Pathways. **Reactive Oxygen Species**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2016.
- MISIURA, M. B. et al. Apathy Is Related to Cognitive Control and Striatum Volumes in Prodromal Huntington's Disease. **Journal of The International Neuropsychological Society**, v. 25, n. 05, p. 462-469, 2019.
- 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.
- MO, C.; RENOIR, T.; HANNAN, A. J. What's wrong with my mouse cage? Methodological considerations for modeling lifestyle factors and gene-environment interactions in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 265, p. 99–108, 2016.
- MORTON, A. J. et al. Paradoxical delay in the onset of disease caused by super-long CAG repeat expansions in R6/2 mice. **Neurobiology of Disease**, v. 33, n. 3, p. 331–341, 2009.
- MUELLER, S. M.; PETERSEN, J. A.; JUNG, H. H. Exercise in huntington's disease: Current state and clinical significance. **Tremor and Other Hyperkinetic Movements**, v. 9, p. 1–10, 2019.
- NANCE, M. A. Huntington disease: Clinical, genetic, and social aspects. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 11, n. 2, p. 61–70, 1998.
- NASCIMENTO-CASTRO, C. DE P. **Aspectos comportamentais e morfofuncionais do estriado e hipocampo no modelo animal YAC128 da Doença de Huntington: investigação do efeito neuroprotetor do probucol**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.
- NITHIANANTHARAJAH, J. et al. Modeling brain reserve: Experience-dependent neuronal plasticity in healthy and huntington^gTMs disease transgenic mice. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 17, n. 3, p. 196–209, 2009.
- OGAWA, N. et al. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 435–441, 1985.
- OLIVERI, S. et al. A Systematic Review of the Psychological Implications of Genetic Testing: A Comparative Analysis Among Cardiovascular, Neurodegenerative and Cancer Diseases. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. December, p. 1–21, 2018.
- OPENDAK, M.; GOULD, E. Adult neurogenesis: A substrate for experience-dependent change. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 19, n. 3, p. 151–161, 2015.
- ORVOEN, S. et al. Huntington's disease knock-in male mice show specific anxiety-like behaviour and altered neuronal maturation. **Neuroscience Letters**, v. 507, n. 2, p. 127–132,

2012.

OTTE, C. et al. Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 16065, 2016.

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

PAPP, K. V.; KAPLAN, R. F.; SNYDER, P. J. Biological markers of cognition in prodromal Huntington's disease: A review. **Brain and Cognition**, v. 77, n. 2, p. 280–291, 2011.

PARENT, M.; BÉDARD, C.; POURCHER, E. Dopaminergic innervation of the human subventricular zone: A comparison between Huntington's chorea and Parkinson's disease. **American Journal of Neurodegenerative Diseases**, v. 2, n. 3, p. 221–227, 2013.

PAULSEN, J. S. et al. Critical periods of suicide risk in Huntington's disease. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 4, p. 725–731, 2005.

PAULSEN, J. S. et al. Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: The Predict-HD study. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 79, n. 8, p. 874–880, 2008.

PAULSEN, J. S. et al. Cognitive and behavioral changes in Huntington disease before diagnosis. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 144, p. 69–91, 2017.

PLÁCIDO, E. et al. Linking Huntington disease, brain-derived neurotrophic factor, and depressive-like behaviors. In: **The Neuroscience of Depression**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 161–177.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 229, n. 2, p. 327–36, 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, 2008.

POULADI, M. A. et al. Full-length huntingtin levels modulate body weight by influencing insulin-like growth factor 1 expression. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 8, p. 1528–1538, 2010.

POULADI, M. A. et al. Marked differences in neurochemistry and aggregates despite similar behavioural and neuropathological features of Huntington disease in the full-length BACHD and YAC128 mice. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 10, p. 2219–2232, 2012.

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.

PUIGSERVER, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 829–839, 1998.

RANJBAR-SLAMLOO, Y.; FAZLALI, Z. Dopamine and Noradrenaline in the Brain; Overlapping or Dissociate Functions? **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12., p. 1–8, 2020.

RAWLINS, M. D. et al. The prevalence of huntington’s disease. **Neuroepidemiology**, v. 46, n. 2, p. 144–153, 2016.

REBEC, G. V. Dysregulation of corticostriatal ascorbate release and glutamate uptake in transgenic models of huntington’s disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 19, n. 17, p. 2115–2128, 2013.

REGO, A. C.; DE ALMEIDA, L. P. Molecular targets and therapeutic strategies in Huntington’s Disease. **Current Drug Targets: CNS and Neurological Disorders**, v. 4, n. 4, p. 361–381, 2005.

REINER, A.; DENG, Y. P. Disrupted striatal neuron inputs and outputs in Huntington’s disease. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 24, n. 4, p. 250–280, 2018.

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

RINALDI, C.; WOOD, M. J. A. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 1, p. 9–21, 1 jan. 2018.

ROOS, R. A. C. Huntington’s disease: A clinical review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2010.

ROSAS, H. D. et al. A systems-level “misunderstanding”: the plasma metabolome in Huntington’s disease. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 2, n. 7, p. 756–768, 2015.

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

ROSS, C. A.; TABRIZI, S. J. Huntington’s disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 1, p. 83–98, 2011.

RUBINSZTEIN, D. C. et al. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. **American Journal of Human Genetics**, v. 59, n. 1, p. 16–22, 1996.

RUOCCO, H. H. et al. Clinical presentation of juvenile Huntington disease. **Arquivos de**

Neuro-Psiquiatria, v. 64, n. 1, p. 5–9, 2006.

SANTOS, B. et al. Fructose Intake Impairs Cortical Antioxidant Defenses Allied to Hyperlocomotion in Middle-Aged C57BL/6 Female Mice. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 12, p. 2868-2883, 2020.

SAUDOU, F. et al. Huntingtin Acts in the Nucleus to Induce Apoptosis but Death Does Not Correlate with the Formation of Intranuclear Inclusions. **Cell**, v. 95, n. 1, p. 55–66, 1998.

SAUDOU, F.; HUMBERT, S. The Biology of Huntingtin. **Neuron**, v. 89, n. 5, p. 910–926, 2016.

SCHOLZ, J. et al. Rotarod training in mice is associated with changes in brain structure observable with multimodal MRI. **NeuroImage**, v. 107, p. 182–189, 2015.

SHANNON, K. M. Recent Advances in the Treatment of Huntington’s Disease: Targeting DNA and RNA. **CNS Drugs**, v. 34, n. 3, p. 219–228, 2020.

SHIBATA, M. et al. Nuclei of the human raphe. **Okajimas Folia Anatomica Japonica**, v. 89, n. 1, p. 15–22, 2012.

SHIOTSUKI, H. et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 189, n. 2, p. 180–185, 2010.

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.

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, n. February, p. 104560, 2019.

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

SMITH-DIJAK, A. I.; SEPERS, M. D.; RAYMOND, L. A. Alterations in synaptic function and plasticity in Huntington disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 150, n. 4, p. 346–365, 2019.

SMITH, M. M. et al. Depressive symptom severity is related to poorer cognitive performance in prodromal Huntington disease. **Neuropsychology**, v. 26, n. 5, p. 664–669, 2012.

SOUSA, M; et al. Apathy Profile in Parkinson’s and Huntington’s Disease: a comparative cross-sectional study. **European Neurology**, v. 79, n. 1-2, p. 13-20, 2017.

SPOKES, E. G. S. Neurochemical alterations in huntington’s chorea: A study of post-mortem brain tissue. **Brain**, v. 103, n. 1, p. 179–210, 1980.

SPOKES, E. G. S. The neurochemistry of Huntington’s chorea. **Trends in Neurosciences**, v. 4, n. C, p. 115–118, 1981.

SQUITIERI, F. et al. Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. **Brain**, v. 126, n. 4, p. 946–955, 2003.

STEINBERG, L. A social neuroscience perspective on adolescent risk-taking. v. 28, p. 78–106, 2008.

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

STEVENTON, J. J. et al. In Vivo MRI Evidence that Neuropathology is Attenuated by Cognitive Enrichment in the Yac128 Huntington's Disease Mouse Model. **Journal of Huntington's Disease**, v. 4, n. 2, p. 149–160, 2015.

STRONG, T. V et al. Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. **Nature Genetics**, v. 5, n. 3, p. 259–265. 1993.

TABRIZI, S. J. et al. Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 10, p. 529–546, 2020.

TASSIN, J. P. et al. Relationship between the locomotor hyperactivity induced by A10 lesions and the destruction of the frontocortical dopaminergic innervation in the rat. **Brain Research**, v. 141, n. 2, p. 267–281, 1978.

TREMBATH, M. K. et al. A retrospective study of the impact of lifestyle on age at onset of huntington disease. **Movement Disorders**, v. 25, n. 10, p. 1444–1450, 2010.

TRONCOSO-ESCUADERO, P et al. On the Right Track to Treat Movement Disorders: promising therapeutic approaches for Parkinson's and Huntington's disease. **Frontiers In Aging Neuroscience**, v.12, p. 1-28, 2020.

UNGERSTEDT, U. Introduction to cerebral microdialysis. In Robinson TE, Justice JB, editors. Microdialysis in the neurosciences. **Journal of International Medicine**, v.230, p. 365-373, 1991.

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

VALVASSORI, S. S.; VARELA, R. B.; QUEVEDO, J. **Animal Models of Mood Disorders : Focus on Bipolar Disorder and Depression**. Second ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

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

VAN DER BURG, J. M.; BJÖRKQVIST, M.; BRUNDIN, P. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 8, p. 765–774, 2009.

VAN DER BURG, J. M. M. et al. Body weight is a robust predictor of clinical progression in Huntington disease. **Annals of Neurology**, v. 82, n. 3, p. 479–483, 2017.

VAN DER PLAS, E.; SCHULTZ, J. L.; NOPOULOS, P. C. The Neurodevelopmental Hypothesis of Huntington's Disease. **Journal of Huntington's Disease**, v. 9, n. 3, p. 217–229, 2020.

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

VAN RAAMSDONK, J. M. et al. Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 24, p. 3823–3835, 2005b.

VAN RAAMSDONK, J. M.; WARBY, S. C.; HAYDEN, M. R. Selective degeneration in YAC mouse models of Huntington disease. **Brain Research Bulletin**, v. 72, n. 2- 3 SPEC. ISS., p. 124–131, 2007.

VIGGIANO, D. The hyperactive syndrome: Metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. **Behavioural Brain Research**, v. 194, n. 1, p. 1–14, 2008.

VONSATTEL, J. et al. Neuropathological Classification of Huntington's Disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 44, n. 6, p. 559–577, 1985.

VONSATTEL, J. P. G.; DIFIGLIA, M. Huntington Disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 57, n. 5, p. 369–384, 1998.

VUONG, K. et al. **Gait, balance, and falls in Huntington disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., v. 159, 2018

WALDVOGEL, H. J. et al. The Neuropathology of Huntington's Disease. In: **Curr Topics Behav Neurosci.**, v. 22, p. 33–80, 2014.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007.

WASSER, C. I. et al. Gut dysbiosis in Huntington's disease: associations among gut microbiota, cognitive performance and clinical outcomes. **Brain Communications**, v. 2, n.2, p. 1–13, 2020.

WESSELMAN, L. M. et al. Web-Based Multidomain Lifestyle Programs for Brain Health: Comprehensive Overview and Meta-Analysis. **JMIR Mental Health**, v. 6, n. 4, 2019.

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

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

WEYDT, P. et al. The gene coding for PGC-1 α modifies age at onset in Huntington's Disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 4, n. 1, p. 3, 2009.

WEYDT, P.; DUPUIS, L.; PETERSEN, Å. Thermoregulatory disorders in Huntington disease. In: **Handbook of Clinical Neurology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 157p. 761–775.

WHEELER, V. C. et al. Factors associated with HD CAG repeat instability in Huntington disease. **Journal of Medical Genetics**, v. 44, n. 11, p. 695–701, 2007.

WIATR, K. et al. Huntington Disease as a Neurodevelopmental Disorder and Early Signs of the Disease in Stem Cells. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 4, p. 3351–3371, 2018.

WU, L. L. Y.; ZHOU, X. F. Huntingtin associated protein 1 and its functions. **Cell Adhesion and Migration**, v. 3, n. 1, p. 71–76, 2009.

WYANT, K. J.; RIDDER, A. J.; DAYALU, P. Huntington's Disease—Update on Treatments. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 17, n. 4, 2017.

YI TEO, R. T. et al. Structural and molecular myelination deficits occur prior to neuronal loss in the YAC128 and BACHD models of Huntington disease. **Human Molecular Genetics**, v. 25, n. 13, p. 2621–2632, 2016.

ZIELONKA, D. et al. The influence of gender on phenotype and disease progression in patients with Huntington's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 19, n. 2, p. 192–197, 2013.

ZIELONKA, D. et al. Skeletal muscle pathology in Huntington's disease. **Frontiers in Physiology**, v. 5, n. OCT, p. 1–5, 2014.

ZIELONKA, D. C.; MIELCAREK, M. Cardiac Dysfunction in Huntington's Disease. **Exp Clin Cardiol**, v. 20, n. 8, p. 2547–2554, 2014.

ZOCHER, S. et al. Early-life environmental enrichment generates persistent individualized behavior in mice. **bioRxiv**, 2019.

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.

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

ZWEIG, R. M. et al. Locus Coeruleus Involvement in Huntington's Disease. **Archives of Neurology**, v. 49, n. 2, p. 152–156, 1992.