



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Enriquecimento ambiental como uma possível estratégia no tratamento da hiperhomocisteinemia crônica severa em roedores**

Marcus Barbosa do Carmo

Orientadora: Profa. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre

2022

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Enriquecimento ambiental como uma possível estratégia no tratamento da hiper-homocisteinemia crônica severa em roedores**

Marcus Barbosa do Carmo

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Terezinha de Souza Wyse

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre

2022

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Wyse, pela oportunidade, incentivo, compreensão e dedicação com que orientou esse trabalho. Muito obrigado por tudo!

Aos meus queridos colegas de laboratório: Cassiana, Júnior, Fernanda, Felipe, Bruna, Josiane. Em especial ao Tiago, pela dedicação e pelo incansável apoio de sempre.

Aos colegas dos laboratórios 36, em especial ao Eduardo Sanches.

Aos meus pais, Olga e Ivan, sempre acreditem em mim.

Aos meus queridos irmãos, Denise, Ilton Alexandre, Irani, José Antônio, pela torcida e carinho de sempre.

À minha esposa Andréia pelo amor, carinho e pelo incentivo constante, por ter me apoiado tanto em mais esta etapa.

Aos meus sogros Eriberto e Tânia, por todo apoio e torcida.

Ao Departamento de Bioquímica e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela possibilidade de realizar esse trabalho de pesquisa.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS,

Ao CNPQ, pelo auxílio financeiro.

“Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho.” (Mahatma Gandhi).

## RESUMO

A Homocistinúria clássica é uma doença genética causada pela deficiência parcial ou total da atividade da enzima cistationina- $\beta$  sintase (C $\beta$ S). Bioquimicamente, ela é caracterizada por distúrbios no metabolismo dos aminoácidos sulfurados, com elevação plasmática de homocisteína e metionina e redução de cistationina e cisteína. Esse distúrbio metabólico afeta principalmente os sistemas cardiovascular, muscular e nervoso central. Retardo mental, deficiência cognitiva, prejuízos na memória, crises convulsivas, atrofia cerebral e doença aterosclerótica precoce são as manifestações clínicas mais comuns em pacientes homocistinúricos. A prevalência da homocistinúria é de cerca de 1/300.000 nascimentos em todo o mundo. Atualmente o tratamento consiste na redução dos níveis de homocisteína através de dietas pobres em metionina e suplementação com piridoxina (cofator da C $\beta$ S), betaína, ácido fólico e vitamina B12, mas nem todos os pacientes respondem ao tratamento. Diversos estudos têm sugerido o enriquecimento ambiental como alternativa não farmacológica à terapêutica dos prejuízos cognitivos e neuromotores causados pelos processos neurodegenerativos. Desta forma, o objetivo principal desse trabalho foi investigar os possíveis efeitos benéficos causados pela exposição ao ambiente enriquecido sobre as alterações do comportamento e da motricidade (spatial memory) causados pela hiper-homocisteinemia induzida quimicamente em roedores. Utilizamos um modelo experimental de hiper-homocisteinemia severa crônica em ratos Wistar desenvolvido em nosso laboratório. Nesse modelo, os animais foram submetidos ao tratamento com homocisteína administrada por via subcutânea com intervalos de 12 horas entre cada administração, do 6º ao 28º dia de vida, após esse período, os animais foram expostos ao ambiente enriquecido por 30 dias, posteriormente foi avaliado a performance dos animais em testes de comportamento. Os animais do grupo hiper-homocisteinemia apresentaram prejuízo no aprendizado na tarefa do labirinto aquático de Morris. A hiper-homocisteinemia não alterou a locomoção no campo aberto nem na tarefa da escada horizontal e a tarefa de reconhecimento de novo objeto. O enriquecimento ambiental foi capaz de reverter os danos observados na memória espacial, avaliada pelo labirinto aquático de Morris, e de melhorar o desempenho dos animais no teste da caminhada sobre a escada horizontal, melhorando qualidade de passo e reduzindo os erros de travessia e melhorando a memória de reconhecimento. Considerando que o enriquecimento ambiental é um tratamento não invasivo, nossos achados sugerem que o enriquecimento ambiental possa ser utilizado como uma terapia alternativa para tratar os prejuízos de memória e motricidade encontrados em pacientes homocistinúricos.

**Palavras-chaves:** Homocistinúria; hiper-homocisteinemia; enriquecimento ambiental; memória.

## ABSTRACT

Classical homocystinuria is a genetic disease caused by partial or total deficiency of cystathionine- $\beta$  synthase (C $\beta$ S) enzyme activity. Biochemically, it is characterized by disturbances in the metabolism of sulfur amino acids, with plasma elevation of homocysteine and methionine and reduction of cystathionine and cysteine. This metabolic disorder primarily affects the cardiovascular, muscular, and central nervous systems. Mental retardation, cognitive impairment, memory impairment, seizures, brain atrophy and early atherosclerotic disease are the most common clinical manifestations in homocystinuric patients. The prevalence of homocystinuria is about 1/300,000 births worldwide. Currently, treatment consists of reducing homocysteine levels through diets low in methionine and supplementation with pyridoxine (C $\beta$ S cofactor), betaine, folic acid and vitamin B12, but not all patients respond to treatment. Several studies have suggested environmental enrichment as a non-pharmacological alternative to the treatment of cognitive and neuromotor impairments caused by neurodegenerative processes. Thus, the main objective of this work was to investigate the possible beneficial effects caused by exposure to the enriched environment on behavioral and motor changes (spatial memory) caused by chemically induced hyperhomocysteinemia in rodents. We used an experimental model of chronic severe hyperhomocysteinemia in Wistar rats developed in our laboratory. In this model, the animals were subjected to treatment with homocysteine administered subcutaneously with intervals of 12 hours between each administration, from the 6th to the 28th day of life, after this period, the animals were exposed to the enriched environment for 30 days, later it was evaluated the performance of animals in behavior tests. The animals in the hyperhomocysteinemia group showed impaired learning in the Morris water maze task. Hyperhomocysteinemia did not change locomotion in the open field or the horizontal ladder task and the new object recognition task. Environmental enrichment was able to reverse the damage in spatial memory, evaluated by the Morris water maze, and to improve the performance of animals in the horizontal ladder walking test, improving step quality and reducing crossing errors and improving memory of recognition. Considering that environmental enrichment is a non-invasive treatment, our findings suggest that environmental enrichment may be used as an alternative therapy to improve memory and motricity impairments found in homocystinuric patients.

**Keywords:** Homocystinuria; hyperhomocysteinemia; environmental enrichment; memory.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ado – Adenosina

AdoHcy – S-adenosil-homocisteína

AdoMet – S-adenosil-metionina

AP – Ambiente Padrão

B12 – Vitamina B12

BHMT – Betaina Homocisteína Metiltransferase

CAT – Catalase

CBS – Cistationina  $\beta$ -sintase

DCF – 2'7'- diclorofluoresceína

EA – Enriquecimento Ambiental

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

HCU – Homocistinúria

HCY – Homocisteína

HHCY – Hiper-homocisteinemia

MAT – Metionina adenosil transferase

Met – Metionina

MS – Metionina Sintase

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato Redutase

SAHH – Adenosil homocisteina hidrolase

SOD – Superóxido Dismutase

THF – Tetrahidrofolato



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas do Metabolismo da Homocisteína .....	13
Figura 2. Delineamento Experimental .....	19
Figura 3. Labirinto Aquático de Morris - A .....	24
Figura 4. Labirinto Aquático de Morris- B .....	26
Figura 5. Campo Aberto.....	28
Figura 6. Reconhecimento de Objetos .....	30
Figura 7. Caminhada na Escada Horizontal - A.....	31
Figura 8. Caminhada na Escada Horizontal- B.....	32
Figura 9. Ganho de Peso Corporal .....	33

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO .....	11
1.2 METABOLISMO DA HOMOCISTEINA .....	12
1.3 HOMOCISTINÚRIA .....	14
1.4 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL .....	15
1.5 MEMÓRIA .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3. HIPÓTESE</b> .....	<b>18</b>
<b>4. MATERIAIS E METODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1 ANIMAIS .....	18
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL .....	19
4.3 HIPER-HOMOCISTEINEMIA SEVERA CRÔNICA .....	19
4.4 TESTES BIOQUÍMICOS .....	20
4.4.1 <i>Estresse oxidativo (anexo 1)</i> .....	20
4.5 ESTUDO COMPORTAMENTAL .....	20
4.5.1 <i>Enriquecimento ambiental</i> .....	20
4.5.2 <i>Campo aberto</i> .....	20
4.5.3 <i>Reconhecimento de objetos</i> .....	21
4.5.4 <i>Teste da escada horizontal</i> .....	21
4.5.5 <i>Labirinto aquático de morris</i> .....	22
4.5.6 <i>Análise estatísticas</i> .....	22
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
5.1 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS .....	23
5.2 CAMPO ABERTO .....	27
5.3 RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	28
5.4 CAMINHADA NA ESCADA HORIZONTAL .....	30
5.5 GANHO DE PESO CORPORAL .....	33
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>39</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>39</b>
<b>9. ANEXO</b> .....	<b>40</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças raras caracterizadas por distúrbios genéticos de herança autossômica recessiva que em sua grande maioria, tem como causa uma deficiência grave em determinada via metabólica, resultando na capacidade reduzida de síntese ou degradação de um composto essencial e conseqüentemente um acúmulo de substratos ou intermediários metabólicos potencialmente citotóxico (FERREIRA; VAN KARNEBEEK, 2019). De acordo com a classificação proposta por Saudubray e Garcia-Cazorla (2018), os EIMs podem ser divididos em duas categorias: a primeira categoria abrange uma série de distúrbios que comprometem a função de um determinado órgão (como o intestino, túbulos renais, eritrócitos ou tecido conjuntivo) ou sistema (como o sistema endócrino, sistema imunológico ou fatores de coagulação). A segunda categoria envolve doenças, cuja alteração bioquímica afeta uma determinada via metabólica comprometendo a função de diversas células ou órgãos, podendo também estar restrito a um único órgão, porém com conseqüências sistêmicas ou humorais. As doenças relacionadas nesta categoria podem ser divididas em 3 grupos: O grupo 1 compreende os distúrbios do metabolismo intermediário que afetam as reações bioquímicas de degradação, síntese e reciclagem de carboidratos, lipídeos e proteínas nos distúrbios de intoxicação como acidemias orgânicas, distúrbios do ciclo da uréia, defeitos no metabolismo de galactose e frutose e porfirias; o grupo 2 inclui distúrbios envolvendo principalmente deficiência do metabolismo energético no fígado, miocárdio, músculo, cérebro e outros tecidos e o grupo 3 inclui distúrbios que envolvem a síntese, processamento, controle e catabolismo de moléculas de processos complexos das mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, como ocorrem nas doenças de depósito lisossomal, distúrbios peroxissomais, erros inatos da purina e pirimidina, síntese do colesterol, distúrbios dos triglicerídeos, glicoesfingolipídeos e fosfolipídeos, entre outros (SAUDUBRAY; GARCIA-CAZORLA, 2018).

As aminoacidopatias fazem parte do grupo I dos erros inatos do metabolismo intermediário que culminam no acúmulo de metabolitos tóxicos gerando intoxicação crônica.

## 1.2 METABOLISMO DA HOMOCISTEINA

A Homocisteína (HCY) é um aminoácido sulfurado não proteico sintetizado a partir de reações de transmetilação do aminoácido essencial metionina (Met) (BONETTI; BROMBO; ZULIANI, 2016). A Met provinda da dieta ou da degradação de proteínas endógenas é condensada a um grupo adenosil do trifosfato de adenosina (ATP) e é convertida em S-adenosilmetionina (AdoMet ou SAM) através de uma reação catalisada pela enzima metionina adenosiltransferase (MAT), doando o seu grupo metila a outros compostos para formar S-adenosilhomocisteína (AdoHcy ou SAH) que posteriormente é hidrolisada para formar HCY e adenosina (Ado), através da enzima adenosil homocisteína hidrolase (SAHH). A HCY formada pode ser metabolizada pela via da remetilação dependente do ciclo dos folatos, onde o ácido fólico é reduzido a diidrofolato (DHF) pela enzima diidrofolato-redutase. (DHFR) e em seguida a tetraidrofolato (THF). O THF sob a ação da serina hidroximetiltransferase forma o N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-metilenotetraidrofolato (5,10-MTHF), que logo é reduzido a N<sup>5</sup>-metilenotetraidrofolato (5-MTHF) através da enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), principal forma encontrada no sangue. O N<sup>5</sup>-metil-TFH doa um grupo metil para a HCY através de uma reação catalisada pela enzima metionina sintase (MS), para formar Met novamente. A HCY também pode ser remetilada pela transferência de um grupo metil da betaína, por meio da desmetilação da betaína em dimetilglicina (DMG), cuja reação é catalisada pela betaína homocisteína metiltransferase (BHMT), ambas reações utilizam cobalamina (B12) como cofator. Alternativamente a HCY pode ser metabolizada através da via de transulfuração, onde ocorre uma reação irreversível da HCY com a serina, cuja reação é catalisada pela enzima cistationina β-sintase (CBS) utilizando como cofator o fosfato piridoxal (B<sub>6</sub>), dando origem a cistationina, a qual é clivada pela enzima cistationina γ-liase, formando cisteína e α -cetobutirato. Quando ocorre uma sobrecarga de Met e conseqüentemente aumento dos níveis de AdoMet, a CBS é ativada inibindo alostericamente as enzimas MTHFR e BHMT, resultando na redução da síntese de N<sup>5</sup>-metil-TFH e redução da atividade da MAT e indiretamente a inibição da síntese de Met a partir de HCY (MARTÍNEZ et al., 2017; MUDD, 2011; ŠKOVIEROVÁ et al., 2016; ZHANG; ZHENG, 2016).

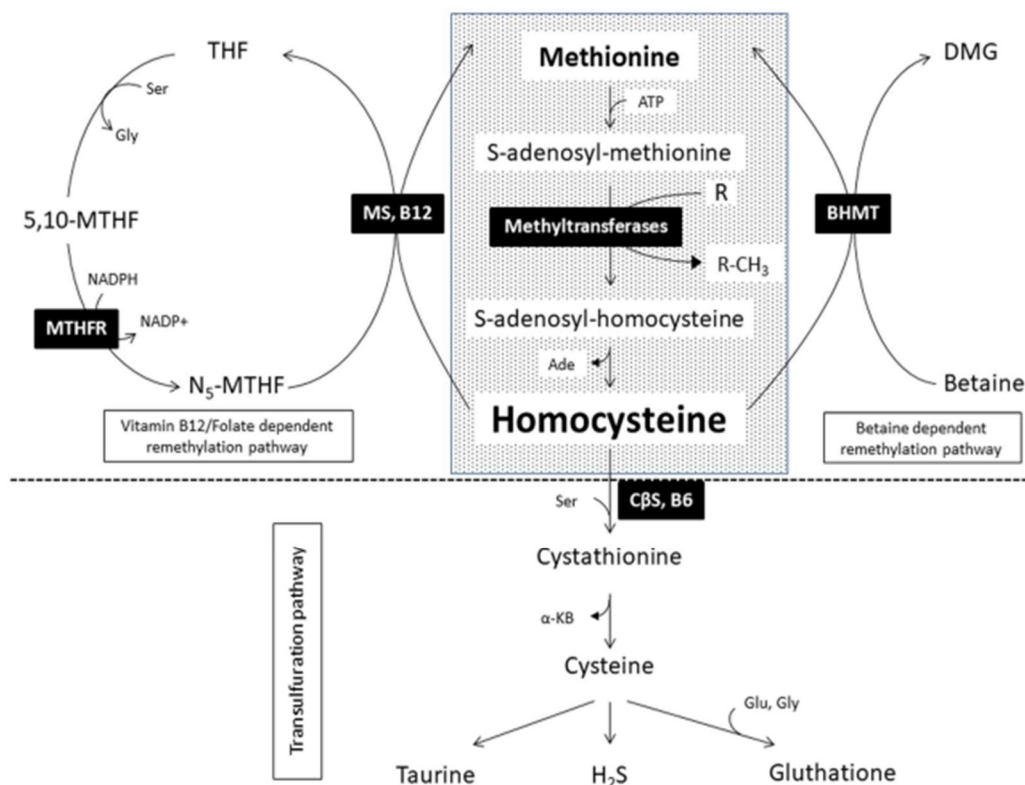


Figura 1. Rotas do Metabolismo da Homocisteína

**MAT:** metionina adenosiltransferase; **AdoMet:** S-adenosilmetionina; **AdoHcy:** S-adenosilhomocisteína; **THF:** tetrahydrofolato; **Ser:** serina; **Gli:** glicina; **MTHFR:** 5,10 metilenotetrahydrofolato redutase; **SHMT:** serina hidroximetiltransferase; **MS:** metionina sintase; **BHMT:** betaina:homocisteína metiltransferase; **CBS:** cistationina β-sintase. **CGL:** cistationina gama-liase. Fonte: (WYSE et al., 2021).

A hiper-homocisteinemia (HHCY) é caracterizada pelo aumento das concentrações plasmática de HCY. As principais causas da HHCY podem ser de etiologia genética por mutações dos genes que codificam as enzimas das vias de transulfuração e remetilação (CBS, MTHFR e MS); ambiental (exposição a determinados agentes tóxicos ou drogas); metabólicas com base em fatores nutricionais (deficiência de folato, vitaminas B12, B2 e B6). Podendo também ser estar associada a diversas doenças (KIM et al., 2018; VEYRAT-DUREBEX et al., 2013). O aumento da concentração plasmática de HCY acima dos níveis observados em indivíduos saudáveis (5 e 15 μmol/L), podendo sofrer pequenas variações de acordo com idade e sexo, é definido como HHCY, que pode ser classificada como, leve (níveis de HCY entre 16 e 30 μmol/L), moderada (níveis de HCY entre 31 e 100 μmol/L) e severa (níveis de HCY

acima de 100  $\mu\text{mol/L}$ ) (WYSE et al., 2019). Neste trabalho abordamos especificamente a HHCY severa, que caracteriza o erro inato do metabolismo denominada homocistinúria clássica (HCU) (KIM et al., 2018).

### 1.3 HOMOCISTINÚRIA

A Homocistinúria é uma doença rara de natureza genética e de hereditariedade autossômica recessiva, classificada como um erro inato do metabolismo. Embora seja considerada uma doença rara, estima-se que sua prevalência no mundo seja de 1 / 300.000 nascimentos (GUS et al., 2018). A HCU ocorre devido a alterações funcionais e/ou estruturais da enzima cistationina  $\beta$ -sintase (CBS), resultando na deficiência da atividade desta enzima, o que implica no acúmulo de Met e HCY e redução da cistationina. A CBS é responsável pela catalise da conversão da HCY em cistationina pela via da transulfuração.

Na HCU os níveis plasmáticos de HCY podem atingir uma concentração de 500  $\mu\text{mol/L}$ . Essa patologia é caracterizada por manifestações clínicas como deficiência cognitiva, déficit de memória, atrofia cerebral, crises convulsivas e doença aterosclerótica precoce; como consequência à essa alteração enzimática ocorre a elevação plasmática de HCY e Met e redução de cistationina e cisteína (DIAZ-ARRASTIA, 2000). O curso dessa doença é marcado por degeneração celular e alterações vasculares cardíaca e cerebral morte, sendo que as crianças afetadas pela doença e não tratadas precocemente com dieta restrita em aminoácidos e/ou com cofatores morrem precocemente de isquemia cerebral e cardíaca (WYSE et al., 2021).

Quanto as demais HHCYs, leves e moderadas, elas estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças neurodegenerativas, tais como doenças de Parkinson, Alzheimer, Huntington, esclerose amiotrófica lateral e isquemia cerebral (MCCULLY, 2016; MUDD, 2011).

Neste projeto, utilizaremos um modelo experimental de HHCY severa crônica desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, a fim de induzir quimicamente os níveis plasmáticos de HCY semelhante a concentrações encontradas em pacientes homocistinúricos. Nesse modelo, os animais são submetidos ao tratamento com HCY, administrada por via subcutânea com intervalos de 12 horas entre cada administração, do 6º ao 28º dia de vida (STRECK et al., 2003). Essa fase de vida pós-natal compreende um período de rápido desenvolvimento cerebral nos ratos, que em humanos corresponde

a, aproximadamente, do nascimento aos 8 anos de idade (GHASEMI, A., 2021; PICUT et al., 2015; SENGUPTA, 2013). Usando este modelo experimental nosso grupo mostrou que a HHCY severa crônica diminui o metabolismo energético (produção de CO<sub>2</sub> e absorção de glicose), as atividades das enzimas da cadeia respiratória [succinato desidrogenase (SDH) e citocromo c oxidase] (STRECK et al., 2003), a atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (Wyse et al., 2000) e a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) em hipocampo de ratos (MACHADO et al., 2011). Também observamos alterações dos parâmetros inflamatórios (CUNHA, 2010). Ainda, os animais submetidos ao modelo de HHCY severa apresentaram comprometimento das memórias de curta e longa duração além da diminuição do nível de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo (MATTE et al., 2009).

#### 1.4 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

O psicólogo canadense Donald O. Hebb, em 1947, foi o primeiro pesquisador a propor o enriquecimento ambiental (EA) experimentalmente. Após observar roedores expostos ao EA, o pesquisador concluiu que a estimulação era capaz de melhorar o desempenho de ratos adultos em tarefas cognitivas quando comparados a animais que não haviam sido estimulados (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). Bennet e Rosenzweig descreveram o EA como uma ferramenta científica para estudo do desenvolvimento cerebral (ROSENZWEIG et al., 1962). Estudos sugerem que a exposição continuada a estas possibilidades de aprendizagem e exercício físico, juntamente com a interação social com outros animais pode alterar a estrutura e função do encéfalo de roedores (BEN-SADOUN et al., 2015).

O EA tem sido amplamente utilizado em modelos animais para tratar e prevenir o desenvolvimento de diversas doenças. O EA propõe um ambiente interativo, capaz de promover novos desafios, ofertando a oportunidade de escolha ao animal a entornos complexos capazes de produzir alterações funcionais e estruturais no sistema nervoso central, por meio de estímulos sensório-motores, sensoriais, sociais e cognitivos (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). O enriquecimento ambiental e a prática de exercícios físicos podem ser capazes de desencadear uma série de benefícios para a saúde, melhorando as complicações causadas por processos neurodegenerativos (BEN-SADOUN et al., 2015; NILSSON; PEKNY, 2007).

Em estudos com animais submetidos a dano encefálico, a exposição ao EA desempenhou um importante papel na plasticidade neuronal hipocampal, bem como, melhorou o processo de aprendizado (AHMADALIPOUR et al., 2015; RAHMEIER et al., 2016). Outros autores demonstraram uma diminuição da perda celular encefálica e maior tempo para início dos sintomas motores em modelos experimentais para estudo de doenças neurodegenerativas como esclerose lateral amiotrófica (STAM et al., 2008), doença de Parkinson (JADAVJI; KOLB; METZ, 2006) e doença de Alzheimer (BONETTI; BROMBO; ZULIANI, 2016; JANKOWSKY et al., 2005), além de modelos de ratos transgênicos para doença de Huntington (VAN DELLEN et al., 2000) quando os animais foram expostos ao ambiente enriquecido.

Diversos estudos envolvendo roedores normais submetidos ao EA têm evidenciado alteração em vários parâmetros de plasticidade como, aumento da neurogênese (DUFFY; RIMMER; CZEISLER, 2001), da gliogênese (NAKAMURA et al., 1999), da plasticidade neuronal hipocampal, da ativação do crescimento dendrítico e arborização dendrítica hipocampal (BIERNASKIE; CORBETT, 2001), aumento de peso do encéfalo (ISO; SIMODA; MATSUYAMA, 2007). Além de alteração nos níveis dos fatores neurotróficos como, fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), neurotrofina 3 (NT-3), fator de crescimento neuronal (NGF) (YOUNG et al., 1999), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e da expressão gênica (DUFFAU, 2008). Evidenciou-se também que o EA melhorou o desempenho dos animais nas tarefas de aprendizado e memória, provavelmente de forma secundária às alterações previamente descritas (PEREIRA et al., 2007). Estudos comparando o desempenho de animais estimulados com o EA e animais não estimulados com EA, comprovaram que no labirinto aquático de Morris, os primeiros apresentaram menor trajeto e menor tempo para encontrar a plataforma em relação aos últimos (ECKERT et al., 2010; MESHII et al., 2006). Em outro estudo avaliando a atividade exploratória dos roedores na tarefa de reconhecimento de objetos, os animais estimulados com o EA, passaram mais tempo explorando o objeto novo, enquanto os animais não estimulados com EA, exploraram os objetos (novo e antigo) igualmente (LEGER et al., 2012).

## 1.5 MEMÓRIA

A memória pode ser definida como a capacidade de adquirir, armazenar e evocar informações. Este processo compreende três diferentes fases. A primeira delas,



denominada como aquisição, refere-se ao período em que a informação é adquirida, também chamada de aprendizagem. A segunda fase, chamada de consolidação, é o momento em que a informação adquirida é armazenada. A terceira é a evocação que corresponde ao momento no qual informação armazenada pode ser recordada (IZQUIERDO, 1989; MCGAUGH, 2000; SQUIRE, 2004)

A memória é classificada conforme a distinção de alguns aspectos como: conteúdo, função e o tempo de duração (IZQUIERDO, 2018). De acordo com o conteúdo, a memória pode ser classificada como declarativa (explícita) ou não declarativa (implícita). As memórias declarativas são aquelas que podem ser declaradas facilmente, podendo ser subdividida em episódica, que permite recordar fatos e experiências vividas; e as semânticas, também chamada de genérica, que corresponde a memória de conhecimentos baseado em significados e conceitos (DICKERSON; EICHENBAUM, 2010). A memória não declarativa, também chamada de memória de procedimento, é o tipo de memória formada a partir de um aprendizado motor, como exemplo, atividades rotineiras como andar de bicicleta, dirigir automóveis e fazer atividades físicas (RIEDEL; BLOKLAND, 2015).

De acordo com a função, podemos citar a memória de trabalho, também chamada de operacional e a memória propriamente dita, a qual é abordada nas demais classificações. A memória de trabalho é extremamente breve, mantendo a informação que está sendo processada no momento, somente durante o período da aquisição e por mais alguns segundos ou minutos, ou seja, ela permite avaliar a necessidade de formar ou não uma nova memória ou se a informação adquirida já foi processada anteriormente (BARROS et al., 2002). A peculiaridade principal dessa memória é que ela não deixa traços, ou seja, não deixa arquivos (DASH et al., 2007).

De acordo com o tempo de duração, as memórias podem ser divididas em memória de curta, longa duração e memória remota. A memória de curta duração é responsável pela manutenção da informação durante o tempo em que a memória de longa duração está sendo formada, com tempo de duração entre 1 e 6 horas, com duração e quantidade limitada (UNSWORTH; ENGLE, 2007). Já a memória de longa duração pode durar horas, dias ou até mesmo meses, com duração e quantidade ilimitada. Em contrapartida as memórias de longa duração que permanecem por longos meses ou anos são chamadas de memórias remotas (IZQUIERDO, 2018).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre as alterações comportamentais e de memória em ratos Wistar submetidos ao modelo de HHCY severa crônica.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre o teste de exploração do campo aberto em ratos submetidos ao modelo de HHCY severa;
2. Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre a tarefa do reconhecimento de novo objeto em ratos submetidos ao modelo de HHCY severa;
3. Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre o teste da caminhada em escada horizontal em ratos submetidos ao modelo de HHCY severa;
4. Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre o teste do labirinto aquático de Morris em ratos submetidos ao modelo de HHCY severa.

## **3. HIPÓTESE**

A nossa hipótese é que o enriquecimento ambiental possa reverter os danos comportamentais causados pela hiper-homocisteinemia severa.

## **4. MATERIAIS E METODOS**

### **4.1 ANIMAIS**

Foram utilizados ratos machos Wistar com 06 dias de vida, provenientes do Biotério Central do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram alojados em sala de colônia, com ciclo de iluminação claro escuro 12/12, em temperatura de  $(22 \pm 1 \text{ } ^\circ \text{C})$  e livre acesso a água e ração comercial. Para a realização deste experimento foram seguidas regulamentações para o uso de animais em pesquisa experimental no Brasil, Lei Arouca, (Lei Brasileira nº 11794/2008) e as diretrizes do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal, no Brasil (CONCEA). Foram feitos todos os esforços a fim de minimizar o

número de animais usados e seu sofrimento em nosso experimento. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil CEUA/UFRGS (nº 37811).

#### 4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram aleatoriamente divididos nos 4 grupos, previamente definidos SALINA+AP (ambiente padrão), HCY+AP, SALINA+EA e HCY+EA. Ratos que receberam solução salina e permaneceram em ambiente padrão (SALINA+AP), ratos que receberam HCY e permaneceram em ambiente padrão (HCY+AP), ratos que receberam solução salina e foram expostos ao enriquecimento ambiental (SALINA+EA) e ratos que receberam HCY e foram expostos ao enriquecimento ambiental (HCY+EA). Os grupos (SALINA+AP) e (HCY+AP) permaneceram em ambiente padrão durante todo o experimento, enquanto os grupos (SALINA+EA) e (HCY+EA), a partir do 29º dia de vida, foram alojados em gaiolas de dimensões (80 X 60 X 60 cm), em ambiente enriquecido, por um período de 30 dias. Após esse período, todos os animais foram avaliados através dos testes de comportamento: campo aberto, reconhecimento de objetos, caminhada em escada horizontal e labirinto aquático de Morris e eutanasiados 12 horas após os testes para dissecação, separação e criopreservação das amostras, as quais serão testadas futuramente.

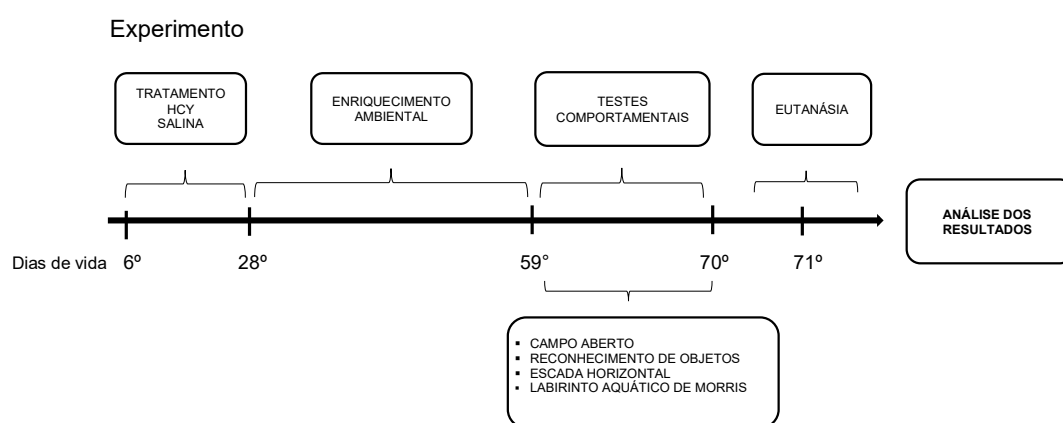


Figura 2. Delineamento Experimental

#### 4.3 HIPER-HOMOCISTEINEMIA SEVERA CRÔNICA

Os animais foram submetidos ao tratamento crônico severo com HCY mediante a administração de HCY de 12/12 horas, pela via subcutânea, do 6º ao 28º dia de vida.

Os animais dos grupos HCY receberam na primeira semana de tratamento uma dose correspondente a 0,3  $\mu\text{mol}$  HCY/g peso corporal, segunda semana a dose de 0,4  $\mu\text{mol}$  HCY/g peso corporal e na última semana a dose de 0,6  $\mu\text{mol}$  HCY/g peso corporal. Conforme o padronizado por (STRECK et al., 2002), para atingir as concentrações acima descritas, cada animal recebeu 1 mL de solução HCY por 100g de peso corporal, aplicadas no dorso ou na nuca. Os animais do grupo controle receberam NaCl 0,9% (salina) em volume semelhante aos do grupo HCY, durante o mesmo período (STRECK et al., 2003).

#### 4.4 TESTES BIOQUÍMICOS

##### 4.4.1 Estresse oxidativo (anexo 1).

#### 4.5 ESTUDO COMPORTAMENTAL

##### 4.5.1 Enriquecimento ambiental

O ambiente enriquecido foi composto por gaiolas de três andares conectados por rampas, de dimensões (80 X 60 X 60 cm), enriquecida com elementos capazes de estimular funções sensoriais, cognitivas e motoras (objetos de cores, formas, dimensões e texturas variadas), assim como estruturas que proporcionam ao animal a prática de exercício físico (escadas, túneis, rodas, argolas, bolas, canos, chocalhos, cubos, tocas, borrachas e balanços) (PRADO LIMA et al., 2018). Os objetos e estruturas do EA foram substituídos com a frequência de 2 vezes por semana para garantir o estímulo exploratório e mecanismos envolvidos com o aprendizado e a memória (DINIZ et al., 2016; HERRING et al., 2009).

##### 4.5.2 Campo aberto

A teste do campo aberto é constituído de uma caixa de madeira (55 × 40 × 50 cm) com um piso cinza escuro dividido em 12 áreas delineadas. A caixa foi colocada em uma sala própria para testes de comportamento, sob controle de sons, ruídos e com baixa luminosidade. Os ratos foram colocados em um canto no quadrado superior esquerdo da caixa e a latência para deixar este primeiro quadrado foi registrada. Cruzamentos subsequentes e os bolos fecais foram gravados e analisados através do

software Any-maze. Os animais foram observados individualmente durante um período de 5 min (NETTO; DIAS; IZQUIERDO, 1985).

#### 4.5.3 Reconhecimento de objetos

A tarefa de reconhecimento de objeto foi realizada numa caixa de madeira (55 × 40 × 50 cm), onde cada animal foi confrontado com dois objetos idênticos (Objetos 1A e 1B) dispostos na arena. O tempo de exploração de cada objeto foi registrado durante 5 min. Após esta fase, o animal retornou para a caixa de origem. A arena e os objetos foram higienizados com solução etanol 30%, entre cada sessão. A memória de longa duração foi realizada 24 horas após o treino, onde o animal foi exposto a um dos objetos utilizado na primeira fase (objeto 1 ou objeto familiar) e a um objeto novo (objeto 2 ou objeto novo). Os animais tiveram 5 minutos para explorar estes objetos. O tempo de exploração correspondente a cada animal foi utilizado como parâmetro para esta tarefa. O índice de discriminação entre os objetos foi calculado através da seguinte equação: diferença do tempo gasto explorando o objeto novo (2) e o familiar (1), dividido pela soma do tempo gasto explorando o objeto novo (2) e o familiar (1), dividido por 100 ( $[(T \text{ novo} - T \text{ familiar}) / (T \text{ novo} + T \text{ familiar})] / 100$ ). Os animais foram filmados e os dados registrados pelo software Any-maze.

#### 4.5.4 Teste da escada horizontal

Os animais foram testados na tarefa da Caminhada na escada horizontal para a avaliação da coordenação sensório-motora do animal, quanto a função dos membros anteriores e posteriores, conforme o protocolo descrito previamente por (WHISHAW et al., 2003). O aparato é constituído de uma escada horizontal de degraus metálicos de (3 mm de diâmetro), removíveis e de espaçamento mínimo de (1 cm) entre degraus, guarnições laterais de acrílico transparente de (1m de comprimento x 19 cm largura) a partir do nível dos degraus, com uma gaiola no ponto de partida e outra no final do trajeto, a largura entre as guarnições do aparato será ajustada para o tamanho de cada animal, de forma que sobre (1 cm), a fim de minimizar a possibilidade do animal retornar ao ponto de partida durante o trajeto. O aparato é instalado com elevação de (30 cm) de altura do solo, em uma sala com baixa luminosidade, sob controle de sons e ruídos. Os degraus foram posicionados em dois padrões: padrão regular, com espaçamento de 2 cm entre degraus, utilizado no período de aclimatação, e o padrão irregular, com espaçamento de 2 a 5 cm, em 5 modelos diferentes de variação entre

degraus, empregados na avaliação. Todos os animais foram treinados a percorrer o trajeto em 3 ensaios no dia que antecede o dia do teste. Nas sessões de avaliação serão empregados os modelos de posicionamento do padrão irregular, onde a posição dos degraus foi modificada a cada cruzamento do animal pelo trajeto, com a finalidade de inibir a compensação de uma deficiência pelo aprendizado, o teste será registrado por imagens de vídeo para posterior análise. Para o resultado foi aplicada uma escala quantitativa de 0 a 6 pontos para avaliar a qualidade dos passos através da (média de pontos da qualidade de passos da soma de pontos / n de passos de cada trial), onde a pontuação 0, 1, e 2, foram quantificados como erro através da fórmula (média do n de erros / n passos \* 100 de cada trial) (WHISHAW et al., 2003).

#### 4.5.5 Labirinto aquático de Morris

Os animais foram testados na tarefa do Labirinto Aquático de Morris para o estudo da memória e aprendizagem espacial com o protocolo de memória de referência previamente descrito por Deniz et al (2013a). A tarefa foi executada em um tanque redondo com fundo preto de 200 cm de diâmetro e 100 cm de altura, com uma plataforma submersa a 2 cm na água, preenchido com água até uma altura de 50 cm em temperatura constante de 22°C. O tanque possui uma divisão teórica em quatro quadrantes iguais para análise. Foram posicionadas, nas paredes da sala, algumas referências visuais de orientação. Todos os animais receberam quatro ensaios/dia, em 5 dias consecutivos, com um intervalo intertrial de 10 min. A posição da plataforma permaneceu no mesmo local durante todo o período de treinamento. As posições de início dos animais foram designadas a partir de N (norte), S (sul), O (oeste) ou L (leste). Durante os 5 dias, os ratos foram colocados na piscina posicionados de frente para a parede e a cada dia de treino foi modificado a ordem do ponto de partida. A latência para encontrar a plataforma durante cada ensaio foi medida como um indicador de aprendizagem. Um teste de sonda sem plataforma foi realizado no 6º dia e os seguintes parâmetros foram avaliados: latência para atravessar a zona da plataforma, tempo gasto no quadrante da plataforma, tempo gasto no quadrante da plataforma oposta e distância total percorrida (Deniz et al., 2013).

#### 4.5.6 Análise estatísticas

A análise estatística foi realizada pelos métodos estatísticos ANOVA de duas vias, seguida pelo post-test de Tukey ou Sidak, conforme recomendação do teste

estatístico para de identificar possíveis diferenças entre os grupos amostrados. Todas as análises foram realizadas através do software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, LA Jolla, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas em \*  $p < 0,05$  e os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (DP).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

A ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou que os tratamentos HHCY e EA alteraram o aprendizado na fase de aquisição (**Fig. 3**) do Labirinto Aquático de Morris [ $F(3, 61) = 10,06$   $p < 0,0001$ ], houve alteração no aprendizado entre os dias 1 e 5, na fase de aquisição [ $F(4,028, 245,7) = 21,19$   $p < 0,0001$ ]. Contudo, não houve interação entre os grupos tratados e os dias de aprendizado, na fase de aquisição [ $F(15, 305) = 1,159$ ,  $p > 0,05$ ]. Na fase de aquisição, o post-test de Tukey mostrou que o grupo SALINA+EA apresentou melhor desempenho que os o grupo SALINA+AP (médias de tempo para encontrar a plataforma: 38,17 e 26,43, respectivamente;  $q = 7,226$ ,  $DF = 182,0$ ,  $p < 0,0001$ ). O grupo SALINA+AP e o grupo HHCY+AP não apresentaram diferença no aprendizado ao longo dos dias na fase de aquisição (médias de tempo para encontrar a plataforma: 38,17 e 41,76, respectivamente;  $p > 0,05$ ). O grupo HHCY+EA apresentou melhor desempenho que o grupo SALINA+AP (médias de tempo para encontrar a plataforma: 38,17 e 29,63, respectivamente;  $q = 5,105$ ,  $DF = 183,7$ ,  $p < 0,0001$ ). O grupo SALINA+EA apresentou melhor desempenho que o grupo HHCY+AP (médias de tempo para encontrar a plataforma: 26,43 e 41,76, respectivamente  $q = 9,991$ ,  $DF = 200,0$ ,  $p < 0,0001$ ). O grupo SALINA+EA e o grupo HHCY+EA não apresentaram diferença no aprendizado ao longo dos dias na fase de aquisição (médias de tempo para encontrar a plataforma: 26,43 e 29,63, respectivamente;  $p > 0,05$ ). O grupo HHCY+EA apresentou melhor desempenho na fase de aquisição que o grupo HHCY+AP (médias de tempo para encontrar a plataforma: 41,76 e 29,63, respectivamente  $q = 7,652$ ,  $DF = 196,9$ ,  $p < 0,0001$ ). Embora os animais HHCY apresentem um maior tempo para encontrar a plataforma que os animais do grupo SALINA essa diferença não foi estatisticamente significativa. Contudo, os nossos dados mostram que o EA melhora o desempenho tanto dos animais submetidos à administração de SALINA quanto dos submetidos à HHCY, na fase de aquisição no teste do Labirinto Aquático de Morris.

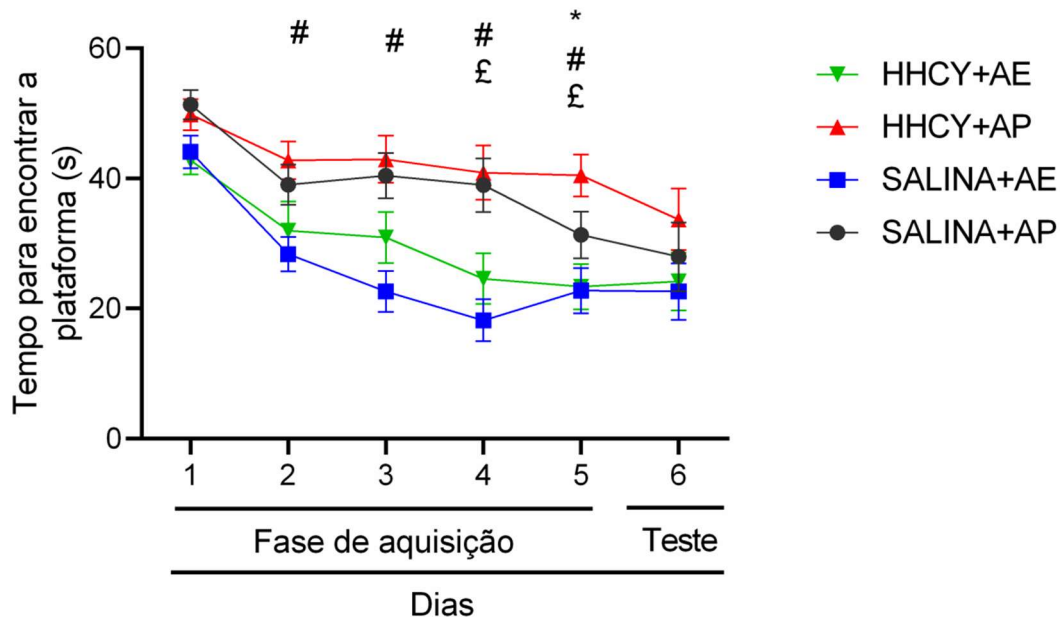


Figura 3. Labirinto Aquático de Morris - A

Efeito da hiper-homocisteinemia severa (HHCY) e enriquecimento ambiental (EA) sobre a memória espacial na fase de aquisição (dias 1 a 5) e no dia do teste no Labirinto Aquático de Morris. O gráfico mostra o tempo médio gasto para encontrar a plataforma nos dias de treino e as diferenças para comparações do grupo SALINA+AP entre os dias 1 a 5 na fase de aquisição (\*), as diferenças para comparações do grupo SALINA+EA entre os dias 1 a 5 na fase de aquisição (#) e as diferenças para comparações do grupo HHCY+EA entre os dias 1 a 5 na fase de aquisição (£). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão para 15-18 animais por grupo. \*  $p < 0,05$ , #  $p < 0,05$  e £  $p < 0,05$ .

Comparações entre os grupos mostraram que o grupo HHCY+AP apresentou pior desempenho na fase de aquisição no teste Labirinto Aquático de Morris em relação aos grupos SALINA+AP, SALINA+EA e HHCY+EA. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos SALINA+AP, SALINA+EA e HHCY+EA na fase de aquisição (dias 1-5) no Labirinto Aquático de Morris.

No dia do teste (dia 6) do Labirinto Aquático de Morris (**Fig. 4**), a latência para deixar o quadrante oposto (**Fig. 4A**, quadrante de início do teste) não foi alterada nem pelo tratamento com HHCY [ $F(1, 32) = 2,435$ ,  $p > 0,05$ ] nem pelo EA [ $F(1, 32) =$



2,579e-00,  $p > 0,05$ ], não sendo observado efeito de interação entre os tratamentos [F (1, 32) = 0,09005,  $p > 0,05$ ]. O tempo total de permanência no quadrante oposto (**Fig. 4B**) foi semelhante entre os grupos, não sendo alterado nem pelo tratamento com HHCY [F (1, 61) = 0,1184,  $p > 0,05$ ] nem pelo EA [F (1, 61) = 0,4316,  $p > 0,05$ ]. Não foi observada interação [F (1, 61) = 0,6504,  $p > 0,05$ ] entre os tratamentos no tempo de permanência no quadrante oposto no dia do teste.

A latência de entrada no quadrante alvo (**Fig. 4C**) não foi alterada nem pelo tratamento com HHCY [F (1, 32) = 2,435,  $p > 0,05$ ], nem pelo EA [F (1, 32) = 2,579e-005,  $p > 0,05$ ]. Não foi observada interação entre os tratamentos na latência de entrada no quadrante alvo [F (1, 32) = 0,09005,  $p > 0,05$ ]. O tempo total de permanência no quadrante alvo (**Fig. 4D**) não foi alterado nem pelo tratamento com HHCY [F (1, 61) = 0,3393,  $p > 0,05$ ] nem pelo EA [F (1, 61) = 2,661,  $p > 0,05$ ]. Não foi observada interação [F (1, 61) = 2,624,  $p > 0,05$ ] entre os tratamentos no tempo de permanência no quadrante alvo no dia do teste.

A distância de nado (**Fig. 4E**) no dia do teste não foi alterada nem pelo tratamento com HHCY [F (1, 32) = 1,837,  $p > 0,05$ ], nem pelo EA [F (1, 32) = 3,095,  $p > 0,05$ ]. Não foi observada interação entre os tratamentos na distância total de nado dos animais [F (1, 32) = 0,01830,  $p > 0,05$ ]. A velocidade média de nado (**Fig. 4F**) no dia do teste não foi alterada nem pelo tratamento com HHCY [F (1, 32) = 0,01661,  $p > 0,05$ ], nem pelo EA [F (1, 32) = 3,071,  $p > 0,05$ ]. Não foi observada interação entre os tratamentos na distância total de nado dos animais [F (1, 32) = 1,825,  $p > 0,05$ ].

A latência para primeira entrada na zona da plataforma (**Fig. 4G**) não foi alterada nem pelo tratamento com HHCY [F (1, 32) = 0,849,  $p > 0,05$ ], nem pelo EA [F (1, 32) = 0,0470,  $p > 0,05$ ]. Não foi observada interação entre os tratamentos na latência para primeira entrada na zona da plataforma [F (1, 32) = 0,2513,  $p > 0,05$ ]. O tempo gasto próximo a zona da plataforma (**Fig. 4H**) não foi alterado pelos tratamentos com HHCY [F (1, 32) = 0,1628,  $p > 0,05$ ] e EA [F (1, 32) = 0,03011,  $p > 0,05$ ], não foi observada interação entre eles [F (1, 32) = 0,4081,  $p > 0,05$ ].

Os parâmetros utilizados para avaliar a memória espacial dos ratos no dia do teste não foram alterados pelos tratamentos.

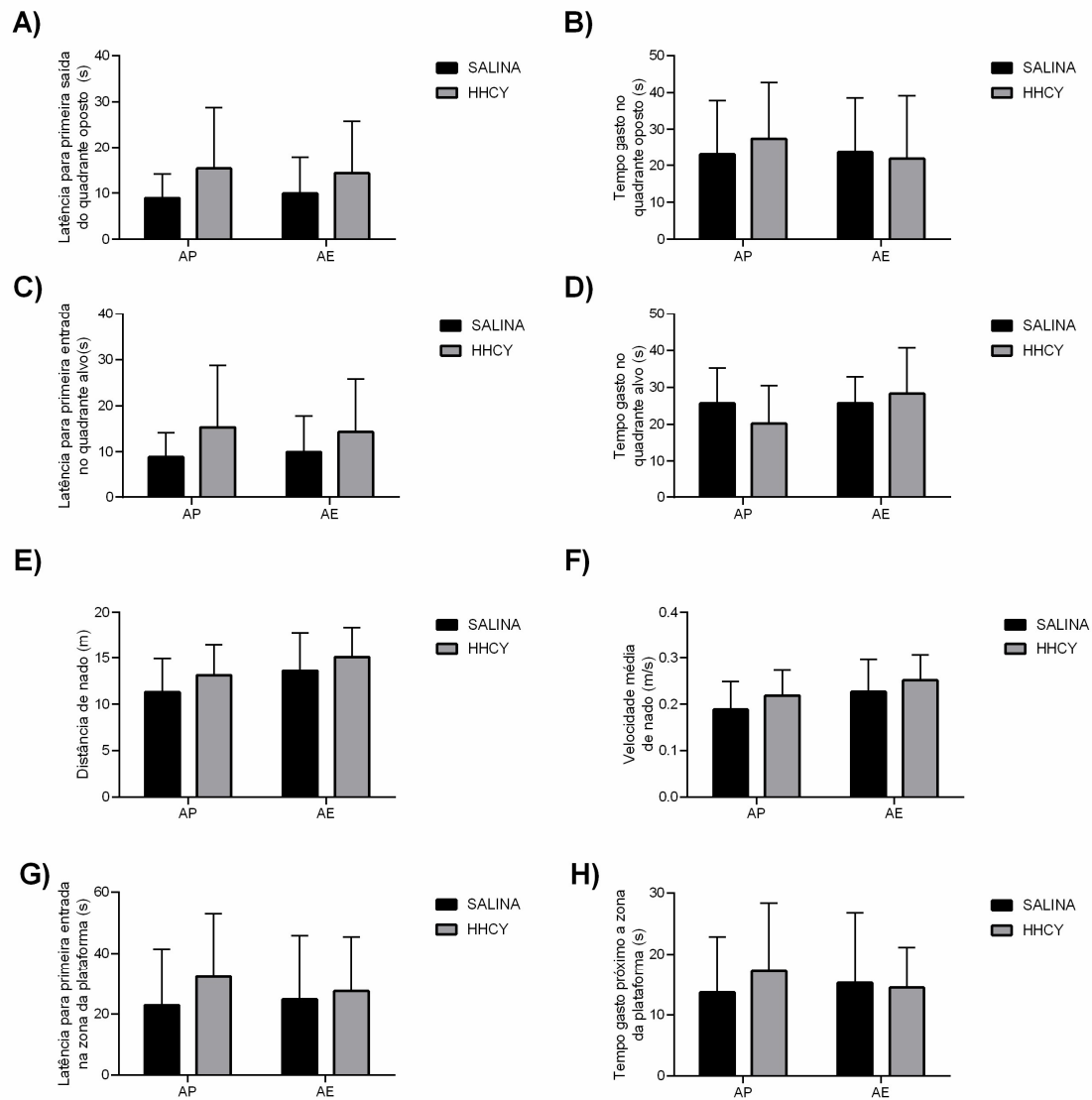


Figura 4. Labirinto Aquático de Morris - B

Efeito da hiper-homocisteinemia severa (HHCY) e enriquecimento ambiental (EA) sobre a memória espacial de ratos no dia do teste (dia 6) no Labirinto Aquático de Morris. Latência para primeira saída do quadrante oposto (A), tempo total gasto no quadrante oposto (B), latência para primeira entrada no quadrante alvo (C), tempo total gasto no quadrante alvo (D), distância total nadada (E) e velocidade de nado (F), latência para primeira entrada na zona da plataforma (G), tempo gasto próximo a zona da plataforma (H) no dia do teste no Labirinto Aquático de Morris. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para 8-11 animais por grupo.  $p > 0,05$ .

## 5.2 CAMPO ABERTO

A HHCY não alterou nenhum dos tratamentos, no entanto, o EA por si só alterou alguns parâmetros animais no teste do campo aberto (**Fig. 5**).

A ANOVA de duas vias não apontou diferenças na distância total percorrida (**Fig. 5A**) pelos animais submetidos ao tratamento com HHCY [ $F(1, 61) = 0,1523, p > 0,05$ ] nem o EA [ $F(1, 61) = 0,2407, p > 0,05$ ], não houve interação entre eles [ $F(1, 61) = 1,920, p > 0,05$ ]. Não houve diferença no tempo total de imobilidade (**Fig. 5B**) dos animais nos grupos HHCY [ $F(1, 61) = 0,4458, p > 0,05$ ] e EA [ $F(1, 61) = 0,5873, p > 0,05$ ], assim como interação entre eles [ $F(1, 61) = 0,7862, p > 0,05$ ]. O tratamento com HHCY não alterou [ $F(1, 61) = 0,5040, p > 0,05$ ] o número total de linhas de cruzamento (**Fig. 5C**) no teste, contudo, o tratamento com EA diminuiu [ $F(1, 61) = 4,473, p < 0,05$ ] o número de linhas de cruzamento no teste. Não houve interação entre os tratamentos no número de linhas de cruzamento [ $F(1, 61) = 0,2163, p > 0,05$ ]. A latência para o primeiro episódio móvel (**Fig. 5D**) não foi alterada pelos tratamentos com HHCY [ $F(1, 32) = 2,087, p > 0,05$ ] e EA [ $F(1, 32) = 0,1298, p > 0,05$ ]. Não houve interação entre os tratamentos na latência para o primeiro episódio móvel [ $F(1, 32) = 0,1906, p > 0,05$ ].

O tratamento com HHCY não alterou o tempo no centro do aparato (**Fig. 5E**) [ $F(1, 61) = 0,04583, p > 0,05$ ]. Os animais dos grupos submetidos ao EA apresentaram menor tempo de permanência na zona central do aparato em comparação aos grupos do AP [ $F(1, 61) = 9,081, p < 0,01$ ]. Não houve interação entre os tratamentos no tempo de permanência na zona central do aparato [ $F(1, 61) = 2,571, p > 0,05$ ]. O número de entradas na zona central do aparato (**Fig. 5F**) não foi alterado nem pelo tratamento com HHCY [ $F(1, 32) = 1,119, p > 0,05$ ] nem pelo EA [ $F(1, 32) = 3,100, p > 0,05$ ]. Não houve interação entre os tratamentos no número de entradas na zona central [ $F(1, 32) = 2,330, p > 0,05$ ].

A ANOVA de duas vias mostrou que o tratamento com HHCY alterou o número de bolos fecais (**Fig. 5G**) [ $F(1, 25) = 6,184, p < 0,05$ ]. O EA não alterou o número de bolos fecais [ $F(1, 25) = 2,523, p > 0,05$ ], assim como não houve interação entre os tratamentos [ $F(1, 25) = 2,523, p > 0,05$ ]. O post-test de Tukey para múltiplas comparações mostrou que os grupos SALINA+AP e HHCY+EA apresentam diferenças na produção de bolos fecais, assim como os grupos SALINA+EA e HHCY+EA (ambos  $p < 0,05$ ).

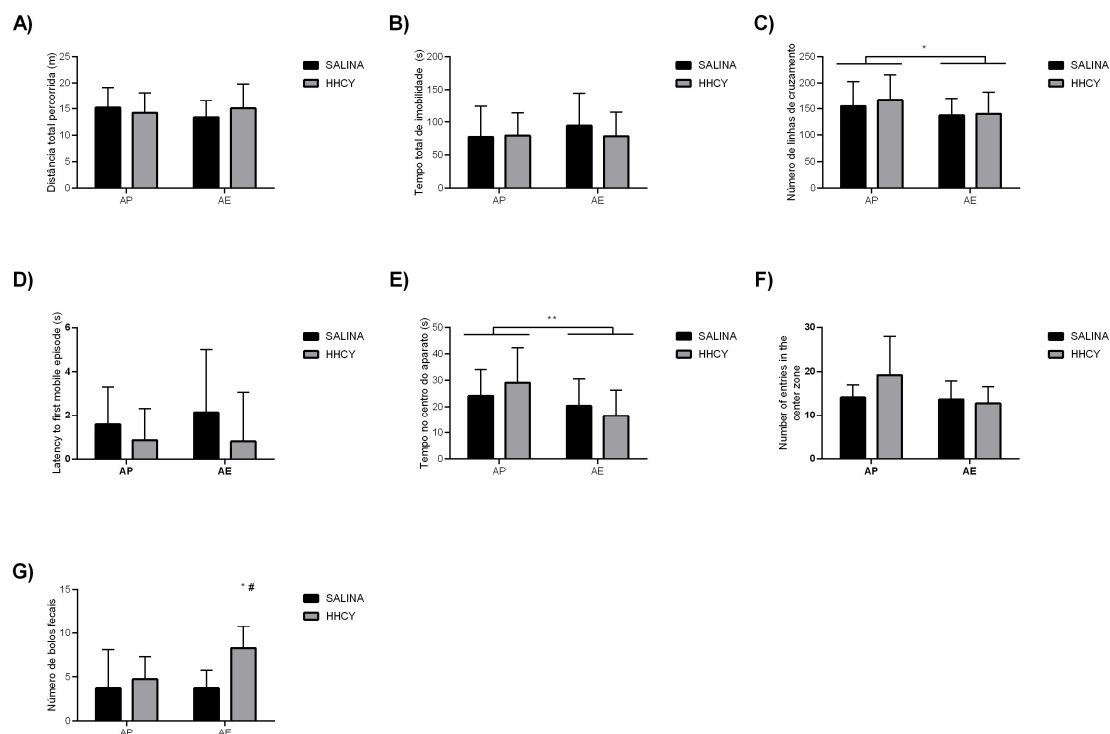


Figura 5. Campo Aberto

Efeito da hiper-homocisteinemia severa (HHCY) e enriquecimento ambiental (EA) no teste de campo aberto sobre a distância total percorrida (A), total de imobilidade (B), número total de linhas de cruzamento (C), latência para o primeiro episódio móvel (D), tempo no centro do aparato (E), número de entradas na zona central (F) e número de bolos fecais (G). Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para 8-11 animais por grupo. Diferença para \* Salina+AP ( $p < 0,05$ ) e para # Salina+EA ( $p < 0,05$ ). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

### 5.3 RECONHECIMENTO DE OBJETOS

A memória não declarativa avaliada pelo teste do reconhecimento de novo objeto foi alterada pelos tratamentos (Fig. 6).

A ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferença no tempo total de exploração dos dois objetos (1A e 1B) na primeira fase do teste (Fig. 6) pelos animais submetidos aos tratamentos com HHCY [ $F(1, 61) = 0,3873$ ,  $p > 0,05$ ] e EA [ $F(1, 61) = 0,1774$ ,  $p > 0,05$ ], mostrando que o tempo total de exploração dos grupos foi igual. Não

houve interação entre os tratamentos [ $F(1, 61) = 0,3301, p > 0,05$ ] na exploração dos objetos iguais (1A e 1B).

A ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferença no tempo de exploração de cada objeto 1 e 2 (**Fig. 6B**) entre os grupos HHCY [ $F(1, 122) = 0,6131, p > 0,05$ ] e EA [ $F(3, 122) = 0,5136, p > 0,05$ ], e que não houve interação entre os tratamentos no tempo de exploração de cada objeto [ $F(3, 122) = 1,700, p > 0,05$ ].

A ANOVA de duas vias mostrou que houve uma interação dos tratamentos no percentual de tempo de exploração de cada objeto (1 e 2) (**Fig. 6C**) [ $F(3, 122) = 6,476, p < 0,001$ ]. O post-test de Sidak para múltiplas comparações mostrou que há diferença no tempo percentual de exploração entre os objetos 1 e 2 nos grupos SALINA+AP ( $t = 2,660, DF = 122,0$ ) e SALINA+EA ( $t = 2,861, DF = 122,0$ ). No entanto, nos grupos HHCY+AP e HHCY+EA não há diferença estatística no percentual de tempo explorando cada um dos objetos 1 e 2 (ambos  $p > 0,05$ ). Contudo os valores estatísticos mostram que o grupo HHCY+EA tende a explorar de forma diferente os objetos 1 e 2 ( $t = 2,511, DF = 122,0, p = 0,0523$ ).

A ANOVA de duas vias mostrou que o índice de reconhecimento (**Fig. 6D**) foi aumentado nos grupos EA [ $F(1, 61) = 8,023, p < 0,01$ ], no entanto não foi observada alteração no índice de reconhecimento pelo tratamento com HHCY [ $F(1, 61) = 0,6966, p > 0,05$ ] nem interação [ $F(1, 61) = 1,456, p > 0,05$ ] entre os tratamentos.

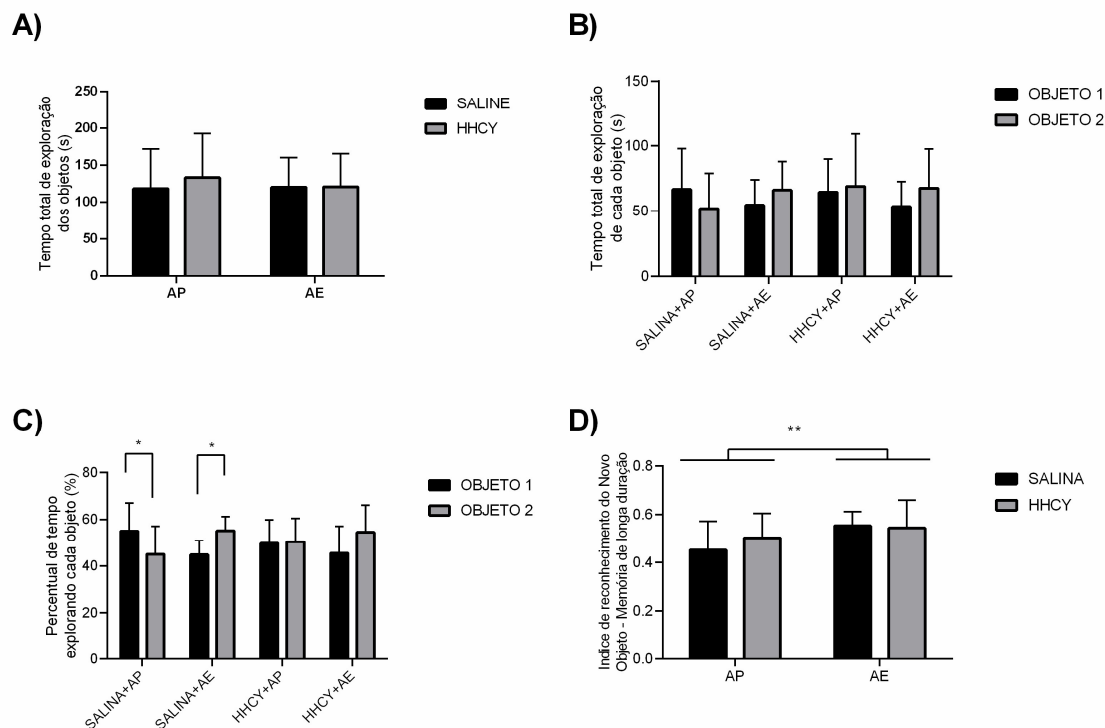


Figura 6. Reconhecimento de Objetos

Efeito da hiper-homocisteinemia severa (HHCY) e enriquecimento ambiental (EA) no teste do reconhecimento do novo objeto sobre o tempo de exploração total dos dois objetos iguais (A), tempo total de exploração de cada objeto 1 (familiar) e 2 (novo) (B), percentual de tempo explorando cada objeto 1 e 2 (C) e índice de reconhecimento do objeto 2 (novo objeto) (D). Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para 15-18 animais por grupo. Diferença para comparação entre o percentual de tempo explorando cada objeto 1 e 2 nos grupos \* Salina+AP ( $p < 0,05$ ) e para \* Salina+EA ( $p < 0,05$ ). Diferença entre os grupos de EA e AP \*\*  $p < 0,01$ .

#### 5.4 CAMINHADA NA ESCADA HORIZONTAL

O EA melhora a caminhada sobre a escada horizontal, melhorando a coordenação motora fina dos animais.

A ANOVA de duas vias mostrou que o EA melhora a qualidade do passo do membro anterior direito [Fig. 7A,  $F(1, 24) = 6,140$ ,  $p < 0,05$ ]. Não houve efeito do tratamento com HHCY [ $F(1, 24) = 0,4312$ ,  $p > 0,05$ ] ou interação dos tratamentos [ $F(1, 24) = 0,08188$ ,  $p > 0,05$ ] sobre a passada do membro anterior direito dos animais. A qualidade da passada do membro anterior esquerdo (Fig. 7B) foi igualmente melhorada

pelo EA [ $F(1, 24) = 6,578, p < 0,05$ ], sem, no entanto, ser alterada pelo tratamento com HHCY [ $F(1, 24) = 0,8008, p > 0,05$ ] e ou foi observada interação entre os tratamentos [ $F(1, 24) = 1,165, p > 0,05$ ].

A ANOVA de duas vias mostrou que o EA reduz o percentual de erros causados pelos membros anteriores direito [Fig. 7C,  $F(1, 24) = 6,042, p < 0,05$ ] e esquerdo [Fig. 7D  $F(1, 24) = 5,158, p < 0,05$ ]. Não foram observados efeitos do tratamento com HHCY ou interação entre os tratamentos para o percentual de erros causados pelos membros anteriores direito [Fig. 7C, HHCY:  $F(1, 24) = 0,4589$ ; interação:  $F(1, 24) = 0,6116$ ; ambos  $p > 0,05$ ] e esquerdo [Fig. 7D, HHCY:  $F(1, 24) = 0,1649$ ; interação:  $F(1, 24) = 0,01983$ ; ambos  $p > 0,05$ ].

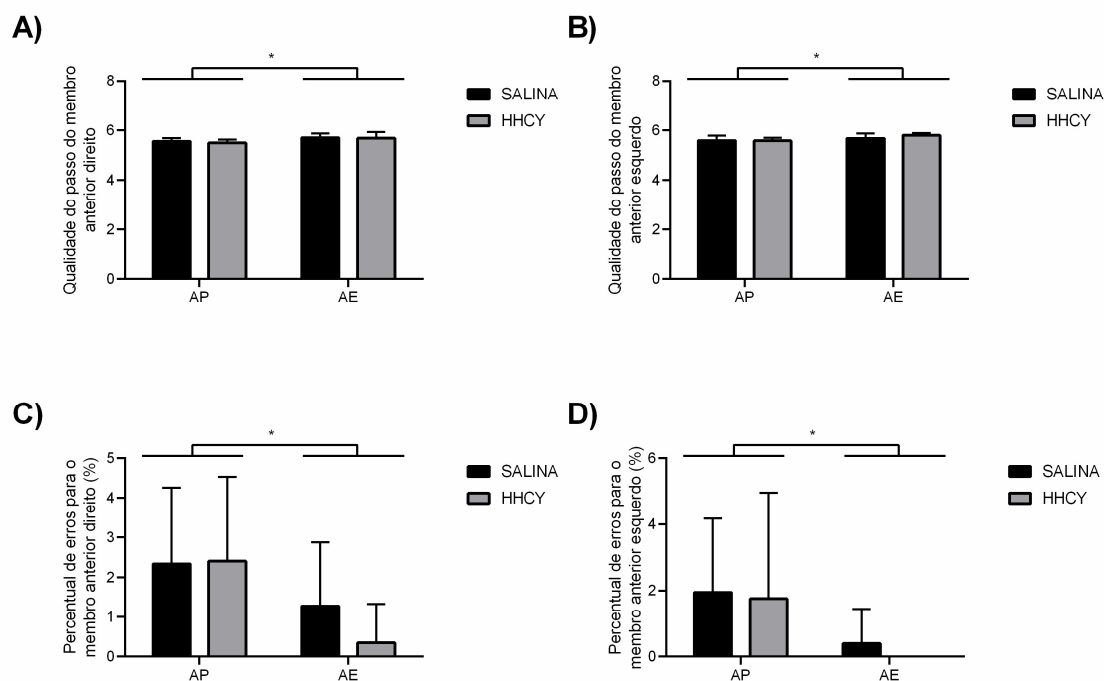


Figura 7. Caminhada na Escada Horizontal - A

Efeito da hiper-homocisteinemia severa (HHCY) e enriquecimento ambiental (EA) no teste da caminhada em escada horizontal sobre a qualidade do passo dos membros anteriores direito (A) e esquerdo (B), e o percentual de erros cometidos pelos membros anteriores direito (C) e esquerdo (D). Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para 7-8 animais por grupo. \*  $p < 0,05$ .

A ANOVA de duas vias mostrou que o EA melhora a qualidade do passo do membro posterior direito [Fig. 8A,  $F(1, 24) = 17,37, p < 0,001$ ]. Não houve efeito do tratamento com HHCY [ $F(1, 24) = 0,3832, p > 0,05$ ] ou interação dos tratamentos [ $F(1, 24) = 0,01488, p > 0,05$ ] sobre a passada do membro anterior direito dos animais. A qualidade da passada do membro posterior esquerdo (Fig. 8B) foi igualmente melhorada pelo EA [ $F(1, 24) = 50,73, p < 0,001$ ], sem, no entanto, ser alterada pelo tratamento com HHCY [ $F(1, 24) = 0,8444, p > 0,05$ ] e ou foi observada interação entre os tratamentos [ $F(1, 24) = 1,694, p > 0,05$ ].

A ANOVA de duas vias mostrou que o EA reduz o percentual de erros causados pelos membros posteriores direito [Fig. 8C,  $F(1, 24) = 26,54, p < 0,001$ ] e esquerdo [Fig. 8D,  $F(1, 24) = 30,41, p < 0,0015$ ]. Não foram observados efeitos do tratamento com HHCY ou interação entre os tratamentos para o percentual de erros causados pelos membros posteriores direito [Fig. 8C, HHCY:  $F(1, 24) = 0,8784$ ; interação:  $F(1, 24) = 2,408$ ; ambos  $p > 0,05$ ] e esquerdo [Fig. 8D, HHCY:  $F(1, 24) = 0,4050$ ; interação:  $F(1, 24) = 1,184$ ; ambos  $p > 0,05$ ].

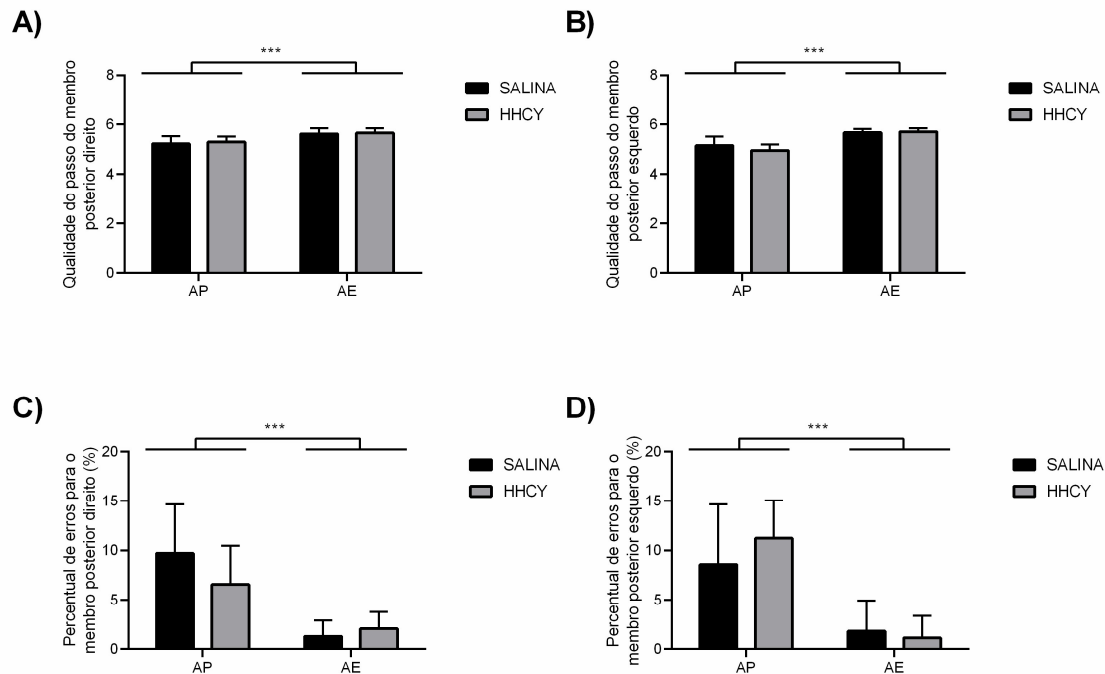


Figura 8. Caminhada na Escada Horizontal- B

Efeito da hiper-homocisteinemia severa (HHCY) e enriquecimento ambiental (EA) no teste da caminhada em escada horizontal sobre a qualidade do passo dos membros



posteriores direito (A) e esquerdo (B), e o percentual de erros cometidos pelos membros posteriores direito (C) e esquerdo (D). Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para 7-8 animais por grupo. \*  $p < 0,001$ .

### 5.5 GANHO DE PESO CORPORAL

O EA ambiental *por si* ou em conjunto com a administração de HHCY diminuiu o peso corporal dos animais (**Fig. 9**), contudo o tratamento com HHCY não alterou o peso corporal dos animais. A ANOVA de 2 vias de medidas repedidas mostrou que houve interação entre os dias de vida e os grupos [F (6, 50) = 77,13,  $p < 0,0001$ ]. Ainda, houve diferença no peso corporal dos animais ao logo do tempo [F (2, 50) = 2897,  $p < 0,0001$ ], conforme o esperado. A ANOVA detectou um efeito dos grupos sobre o peso corporal dos animais ao longo dos experimentos (F (3, 25) = 26,49,  $p < 0,0001$ ). O post-test de Sidak mostrou que aos 7 (início dos experimentos) e aos 29 (término das administrações de HHCY) dias de vida o peso dos animais era semelhante entre os grupos de estudo (ambos  $p > 0,05$ ). Aos 59 dias de vida, após o término do período de EA, os animais dos grupos EA apresentaram menor peso corporal que os demais grupos (diferença para SALINA+AP vs SALINA+EA, SALINA+AP vs HHCY+EA, SALINE+EA vs HHCY+AP e HHCY+AP vs HHCY+EA), ambos  $p < 0,0001$ .

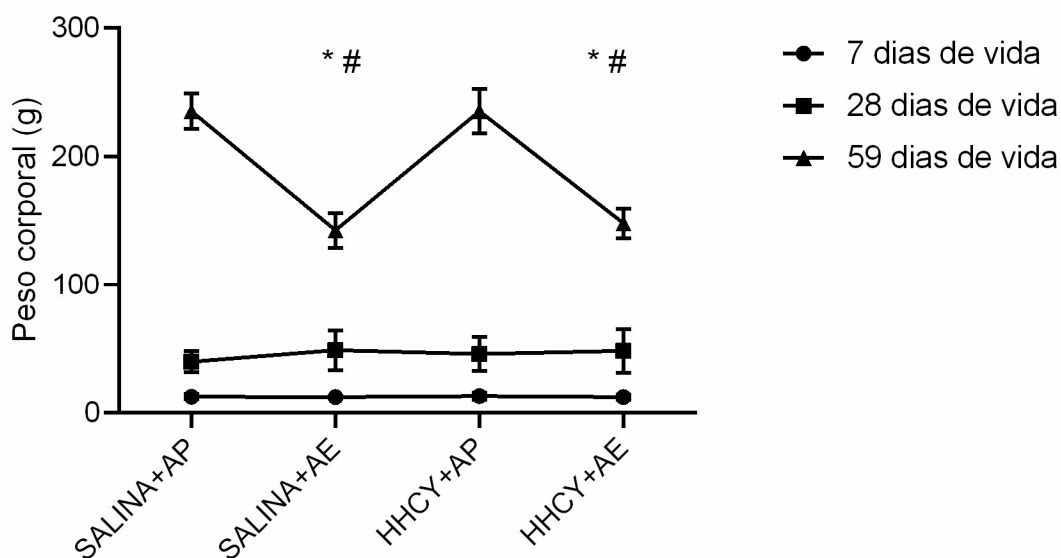


Figura 9. Ganho de Peso Corporal

Efeito da hiper-homocisteinemia severa (HHCY) e enriquecimento ambiental (EA) sobre o peso corporal dos animais aos 7, 29 e 59 dias de vida. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para 7-8 animais por grupo. Diferença para comparação entre \* SALINA+AP vs SALINA+EA ou HHCY+EA e # HHCY+AP vs SALINA+EA ou HHCY+EA ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A HHCY severa tem sido reportada por causar uma série de alterações metabólicas em estruturas cerebrais, como córtex e hipocampo de ratos, que culminam com o comprometimento de diversas vias bioquímicas, como por exemplo, o comprometimento da via glutamatérgica, da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e a geração de estresse oxidativo (DA CUNHA et al., 2012; MACHADO et al., 2011; MATTÉ et al., 2010; STRECK et al., 2002). Essas alterações bioquímicas estão relacionadas com o comprometimento das funções cognitivas, aprendizado e memória em modelos com roedores (NETTO et al., 1993; WYSE et al., 2004; YAKOVLEVA et al., 2020) e tem sido utilizado também em ratos submetidos à HHCY severa (JADAVJI et al., 2012; KOLLING et al., 2017; MATTE et al., 2009). Nesse sentido, o enriquecimento ambiental, tem sido utilizado para proteger/adaptar o encéfalo para danos bioquímicos que culminam com alterações metabólicas e levam a prejuízos no aprendizado e memória (ROJAS et al., 2015; SAMPEDRO-PIQUERO et al., 2013; ZEENI et al., 2015). As memórias podem ser divididas e classificadas, dentre outras formas, como memórias declarativas ou memórias explícitas, nas quais armazenamos as memórias que podem ser evocadas de forma consciente, que podem ser pensadas e estão relacionadas a fatos ou coisas que aprendemos conscientemente, e como memórias não declarativas ou memórias procedurais, nas quais armazenamos procedimentos relacionados às habilidades de dirigir, andar de bicicleta ou fazer as tarefas mais rotineiras como mexer no computador. Nesse sentido, o estudo destas memórias em roedores pode ser desenvolvido por tarefas específicas, como por exemplo, a tarefa do Labirinto Aquático de Morris, que avalia a memória espacial declarativa dependente do hipocampo, e por testes que avaliam as memórias não declarativas, como por exemplo, a tarefa de campo aberto, da caminhada sobre a escada horizontal e a tarefa do reconhecimento de objetos.

Nossos resultados mostraram que a HHCY severa comprometeu o aprendizado no Labirinto Aquático de Morris, pontuado pelo maior tempo para encontrar a

plataforma no período de aquisição e teste da tarefa e que o enriquecimento ambiental por si só, e quando realizado no período imediatamente posterior à submissão ao modelo de HHCY severa foi capaz de proteger a memória espacial dos animais, pontuada pela redução no tempo gasto para encontrar a plataforma. No entanto, no dia do teste (dia da probe) no Labirinto Aquático de Morris, não observamos alterações pelos tratamentos nos parâmetros mensurados. O enriquecimento ambiental em estágios iniciais do neurodesenvolvimento foi utilizado para atenuar os danos comportamentais, histológicos e celulares induzidos pela isquemia cerebral (DURÁN-CARABALI et al., 2021; ROJAS et al., 2015; SANCHES et al., 2021). A exposição ao enriquecimento ambiental nos períodos pré-natal e pós-natal precoce do desenvolvimento foi utilizado para melhorar o desempenho de ratos submetidos à isquemia cerebral na tarefa de memória espacial do Labirinto Aquático de Morris, enquanto, ratas submetidas à isquemia cerebral foram mais beneficiadas com a estimulação pós-natal precoce. Além disso, o enriquecimento ambiental tem sido reportado para reduzir o comportamento semelhante à ansiedade em ratos e ratas submetidos à hipóxia-isquemia, auxiliando na redução da hiperlocomoção das ratas submetidas à hipóxia-isquemia (DURÁN-CARABALI et al., 2019a). Mostrando que o enriquecimento ambiental pode ser um importante aliado no tratamento/prevenção de déficits comportamentais e de memória em ratos, onde estimulação a ambientes dinâmicos, interativos e complexos pode proporcionar um aumento de “desafios” físicos e mentais estimulando-os. Ainda, o enriquecimento ambiental foi reportado para melhorar os sintomas cognitivos e danos patológicos em modelo focal de dano cortical que leva a esclerose múltipla (SILVA et al., 2020) e modular fatores neurodegenerativos em camundongos submetidos ao modelo da doença de Huntington (MO; HANNAN; RENOIR, 2015). O enriquecimento ambiental foi utilizado para melhorar a memória de ratos obesos submetidos a dietas ricas em gorduras (PRABHU; K G RAO; RAI, 2021) e prevenir o declínio cognitivo induzido pelo processo oxidativo induzido pela dieta com restrição de folato e vitamina E contendo ferro como pró-oxidante (LEE et al., 2012).

A estimulação com ambientes enriquecidos pode atrasar o aparecimento de déficits de memória e reduzir as características neuropatológicas da doença de Alzheimer, demonstrado em modelo de neurodegeneração em roedores (BERARDI et al., 2007) além de melhorar fatores bioquímicos (regula positivamente o mRNA de NMDA) relacionados à neurodegeneração em hipocampo de ratos (ANDIN et al., 2007). Nesse sentido, a modulação positiva do sistema glutamatérgico, ou de seus

componentes, pelo enriquecimento ambiental pode ser um importante aliado na prevenção do desenvolvimento de déficits de memória associado à neurodegeneração promovida por doenças incapacitantes, como a doença de Alzheimer.

Demonstramos que a HHCY severa isolada e ou em conjunto com o enriquecimento ambiental não alteram o comportamento exploratório e locomotor dos animais avaliados pelas tarefas de campo aberto, considerando os parâmetros mensurados nessa tarefa. Na tarefa da escada horizontal não observamos dificuldades/prejuízos na travessia da escada pelos grupos HHCY severa, no entanto, observamos que todos os grupos submetidos ao enriquecimento ambiental apresentaram melhora significativa para o desenvolvimento da tarefa, mostrando que o enriquecimento ambiental melhora por si e frente a outros tratamentos o desempenho em habilidades complexas e com alto grau de dificuldade. Nesse sentido, todos os grupos, nos quais o enriquecimento ambiental foi aplicado, foram beneficiados com redução do percentual de erros, melhora da marcha e da qualidade dos passos em todos os membros, tanto nos membros anteriores quanto nos posteriores, culminando numa melhor coordenação motora dos animais. Alterações locomotoras são expressamente observadas em situações onde há um comprometimento severo do encéfalo e de suas conexões (DURÁN-CARABALI et al., 2019b; LOPES; LOPES; VANNUCCHI, 2010; SANCHES et al., 2013). É reportado que o sistema sensorio-motor é de extrema importância para o desenvolvimento e adaptação ao ambiente e já foi descrito que em roedores mesmo quando existem danos severos no encéfalo o desenvolvimento pode se processar e as habilidades e os reflexos das funções motoras, necessárias à sobrevivência, serem mantidos (BARTHAS; KWAN, 2017; PAZAITI et al., 2008; SARADJIAN, 2015). No modelo de HHCY severa e considerando o tempo de tratamento não observamos alterações motoras. No entanto, não podemos descartar possíveis alterações motoras a longo prazo, uma vez que, foi anteriormente demonstrado que esse modelo de HHCY severa está relacionado a diversas disfunções cerebrais e metabólicas que são diretamente relacionadas à formação e manutenção das memórias e ao correto funcionamento cerebral (ZOCCOLELLA et al., 2006), assim como a neurodegeneração (SHARMA et al., 2015). Foi demonstrado que animais submetidos à HHCY severa e expostos a tarefa campo aberto, uma tarefa não aversiva e não associativa, não tiveram a atividade locomotora alterada, no entanto, esses mesmos animais quando submetidos à tarefa de esquiva inibitória, uma tarefa aversiva associativa e não declarativa, que avalia a memória aversiva dos animais, apresentaram

pior desempenho no desenvolvimento do teste, demonstrando um prejuízo na memória (KOLLING et al., 2017; MATTÉ et al., 2009).

Durán-Carabali et al. (2019) demonstraram que o enriquecimento ambiental durante a lactação pode reduzir o comprometimento motor, avaliado por testes de domínios de força, assimetria e coordenação, sendo uma importante ferramenta na promoção da recuperação e reorganização funcional de ratos submetidos a lesão cerebral por hipóxia-isquemia cerebral (DURÁN-CARABALI et al., 2019b). A exposição precoce ao enriquecimento ambiental pode proteger ratos machos contra o desenvolvimento de dor neuropática após lesão nervosa (KIMURA et al., 2020). Mais uma vez demonstrando que tarefas enriquecidas podem ser importantes aliadas para recuperação e melhora do movimento após insultos cerebrais graves em neonatos. Estimamos que um maior tempo de insultos causados pelo modelo de HHCY severa associado aos danos bioquímicos/metabólicos reportados na literatura para esse modelo (DA CUNHA; FERREIRA; WYSE, 2010; DA CUNHA et al., 2012; MACHADO et al., 2011) possam levar ao comprometimento das funções motoras e do desenvolvimento associado à memória executiva não declarativa, a locomoção. A intervenção terapêutica baseada no enriquecimento ambiental pode ser uma importante aliada para melhorar a plasticidade sináptica cerebral reduzindo os danos causados quando os níveis de homocisteína estão extremamente elevados.

Nossos resultados mostraram que a memória não declarativa mensurada pelo teste do reconhecimento de novo objeto foi alterada pelos tratamentos. A exploração total dos dois objetos (1 e 2) no treino não foi alterada em nenhum dos grupos, mostrando que os objetos utilizados no treino eram iguais e que não havia preferência por um ou outro objeto ou por um ou outro lado do aparato nesta fase da tarefa. Quando os objetos foram diferentes, fase dois da tarefa, os animais dos grupos SALINA+AP e SALINA+EA apresentaram diferenças na exploração dos objetos novo e antigo. O grupo SALINA+AP demonstrou maior interesse pelo objeto antigo e o grupo SALINA+EA demonstrou maior interesse pelo objeto novo (comportamento esperado). No entanto, o grupo HHCY+AP não apresentou diferença no tempo explorando os objetos diferentes, mostrando que eles não reconheciam o objeto novo evidenciando o déficit na memória de reconhecimento, e o grupo HHCY+EA embora não tenha apresentado uma maior preferência significativa para explorar o objeto novo, tendeu a apresentar um comportamento semelhante ao grupo SALINA+EA para explorar os objetos diferentes. Observamos que o enriquecimento ambiental por si e após o

tratamento com HHCY severa aumentou o índice de reconhecimento do novo objeto, melhorando a memória de reconhecimento dos animais. A tarefa de reconhecimento de novo objeto é baseada na tendência natural dos roedores em explorar novos objetos ao invés de objetos conhecidos, onde a maior exploração do objeto novo é um indicativo de melhor função cognitiva. Foi descrito que a HHCY severa pode reduzir em até 44% a exploração do novo objeto no teste do reconhecimento do novo objeto, assim como pode diminuir o tempo de permanência sobre a plataforma no teste de esquiava inibitória nos tempos de 3h e perdurando por até 7 dias, prejudicando a memória aversiva avaliada (KOLLING et al., 2017). Foi demonstrado que o enriquecimento ambiental protege dos efeitos ansiosos e do déficit cognitivo e de memória, avaliado pelo teste do reconhecimento do novo objeto, assim como das alterações em neurotrofinas hipocampais (como o BDNF) causados pela privação de sono em roedores em desenvolvimento (GHAHERI et al., 2021). O enriquecimento ambiental aumenta a atividade física e a estimulação sensorial e por esse motivo é postulado para modular positivamente diversas funções fisiológicas, aumentando a atividade neuronal, a demanda por oxigênio e favorecendo a plasticidade sináptica cerebral, diretamente relacionada ao aprendizado e a memória. Bindra et al. (2021) demonstraram que o enriquecimento ambiental foi capaz de melhorar a memória de reconhecimento de camundongos submetidos a hipóxia crônica, assim como as suas performances no teste do labirinto em Y (BINDRA; LAMANNA; XU, 2021).

Observamos que a HHCY severa não prejudica o ganho de peso corporal, no entanto, observamos que o EA tanto per se como após o tratamento com HHCY severa promove uma redução do peso corporal dos animais. Essa redução de peso pode estar relacionada a maior movimentação observada nos animais do grupo EA, que tem uma maior estimulação a exploração de novos ambientes e desta forma consomem maior quantidade de energia. No entanto, uma melhor análise poderia ser realizada ao se analisar a ingestão calórica e o gasto calórico destes animais, a fim de avaliar se os animais do grupo EA tem algum gasto calórico pronunciado em detrimento do ambiente enriquecido.

O processo de desenvolvimento adequado é de extrema importância para a sobrevivência e chegada a vida adulta, das mais diversas espécies, nesse sentido, mesmo frente às intempéries encontradas ao longo do desenvolvimento os sistemas fisiológicos se orquestram da melhor forma a atingir a fase adulta e manter a proliferação das espécies. Danos expressivos podem comprometer o desenvolvimento e chegada à vida

adulta, contudo, danos menores podem ser benéficos e em muitos casos a sucessão de pequenos danos pode levar ao comprometimento futuro de outras habilidades e ao desenvolvimento de outras doenças associadas como a neurodegeneração e o comprometimento intelectual e de autocuidado. Fatores de risco biológico, como no caso da HHCY severa, podem prejudicar e comprometer a chegada à vida adulta e as condições de vida na fase adulta. Nesse sentido, a introdução de ações preventivas ou de melhoria da qualidade de vida e da redução de danos sobre os sistemas biológicos e sobre os mais diversos processos do desenvolvimento, como a estimulação precoce em ambientes enriquecidos pode auxiliar o alcance e a manutenção do desenvolvimento neurológico e psicomotor satisfatórios à sobrevivência.

## **7. CONCLUSÕES**

Os nossos resultados mostram que a HHCY severa crônica em roedores prejudica o aprendizado, comprometendo a memória espacial (avaliado pelo labirinto aquático de Morris) sem comprometer a memória declarativa (avaliada pelo teste do reconhecimento do novo objeto) e a motricidade (avaliada pelo teste da escada e campo aberto). O EA melhora o aprendizado e a memória espacial em animais controle e tratados com HHCY severa. O EA melhora, ainda, a motricidade e a memória de reconhecimento do novo objeto tanto em controles quanto em ratos submetidos a HHCY severa. A HHCY severa não altera o ganho de peso corporal, contudo o EA reduz o ganho de peso corporal, tanto em animais controle quanto em animais tratados com HHCY severa.

## **8. PERSPECTIVAS**

Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre as alterações bioquímicas em cérebro total e hipocampo de ratos Wistar submetidos ao modelo de HHCY severa, sobre:

1. Imunoconteúdo Sinapsina;
2. Conteúdo proteico do BDNF;
3. Morfologia do encéfalo e imunohistoquímica.

## 9. ANEXO

Foram avaliados também parâmetros bioquímicos (estresse oxidativo) no hipocampo de ratos submetidos à HHCY severa e ao EA.

### 9.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 9.1.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar com 06 dias de vida, provenientes do Biotério Central do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Os animais foram alojados em sala de colônia, com ciclo de iluminação claro escuro 12/12, em temperatura de  $(22 \pm 1 \text{ }^\circ \text{C})$  e livre acesso à água e ração comercial. Para a realização deste experimento foram seguidas regulamentações para o uso de animais em pesquisa experimental no Brasil, Lei Arouca, (Lei Brasileira nº 11794/2008) e as diretrizes do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal, no Brasil (CONCEA). Foram feitos todos os esforços a fim de minimizar o número de animais usados e seu sofrimento em nosso experimento. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil CEUA/UFRGS (nº 37811).

#### 9.1.2 Desenho experimental

Os animais foram aleatoriamente divididos nos 4 grupos, previamente definidos SALINA+AP, HCY+AP, SALINA+EA e HCY+EA. Ratos que receberam solução salina e permaneceram em ambiente padrão (SALINA+AP), ratos que receberam HCY e permaneceram em ambiente padrão (HCY+AP), ratos que receberam solução salina e foram expostos ao enriquecimento ambiental (SALINA+EA) e ratos que receberam HCY e foram expostos ao enriquecimento ambiental (HCY+EA). Os grupos (SALINA+AP) e (HCY+AP) permaneceram em ambiente padrão durante todo o experimento, enquanto os grupos (SALINA+EA) e (HCY+EA), a partir do 29º dia de vida, foram alojados em gaiolas de dimensões (80 X 60 X 60 cm), em ambiente enriquecido, por um período de 30 dias. Após esse período, todos os animais foram eutanasiados para dissecação, separação e criopreservação das amostras para a realização dos testes bioquímicos (estresse oxidativo).



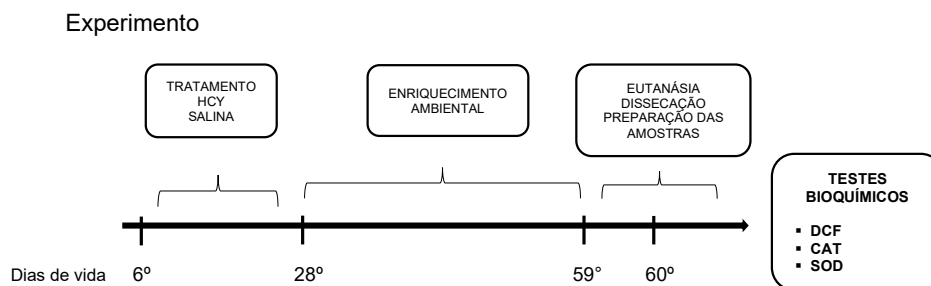


FIGURA 1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

### 9.1.3 Hiper-homocisteinemia severa crônica

Os animais foram submetidos ao tratamento crônico severo com homocisteína mediante a administração de HCY de 12/12 horas (respeitando um intervalo mínimo de 8 horas entre as administrações), pela via subcutânea, do 6º ao 28º dia de vida. Os animais dos grupos HCY receberam na primeira semana de tratamento uma dose correspondente a 0,3  $\mu\text{mol}$  HCY/g peso corporal, segunda semana a dose de 0,4  $\mu\text{mol}$  HCY/g peso corporal e na última semana a dose de 0,6  $\mu\text{mol}$  HCY/g peso corporal. Conforme o padronizado por (STRECK et al., 2002), para atingir as concentrações acima descritas, cada animal recebeu 1 mL de solução HCY por 100g de peso corporal, aplicadas no dorso ou na nuca. Os animais do grupo controle receberam NaCl 0,9% (salina) em volume semelhante aos do grupo HCY, durante o mesmo período (STRECK et al., 2003).

### 9.1.4 Preparação das amostras

Para determinar os parâmetros de estresse oxidativo, o hipocampo foi homogeneizado em 10 volumes (1:10, p/v) de 20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,4 contendo 140 mM KCl. Os homogenatos foram centrifugados a 3000  $\times$  RPM por 10 min a 4°C, para descartar o núcleo e os detritos celulares. O pellet foi descartado e o sobrenadante retirado para os ensaios bioquímicos. Os homogeneizados foram usados de animais individuais, e eles nunca foram agrupados.

### 9.1.5 Determinação dos níveis de espécies reativas - DCFH

A produção de espécies reativas foi medida de acordo com Lebel e colaboradores (LeBel et al., 1992), método baseado na oxidação do reagente 2'7'- diclorofluoresceína (DCFH). As amostras (60 $\mu\text{L}$ ) foram incubadas por 30 min a 37°C, no escuro, com 240 $\mu\text{L}$  de solução de diacetato de 2'7'- diclorofluoresceína (DCFDA) 100 $\mu\text{M}$  em placa

de 96 poços. O DCFDA é clivado por esterases celulares e o DCFH eventualmente resultante é oxidado por espécies reativas presentes nas amostras. A última reação produz o composto fluorescente DCF que foi medido em 488 nm de excitação e 525 nm de emissão e os resultados foram representados por nmol DCF/mg proteínas. A calibração da curva foi realizada com padrão de DCF purificado.

#### 9.1.6 Enzimas antioxidantes

##### a) Determinação da atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Marklund (1984). Esse método é baseado na capacidade de auto-oxidação do pirogalol, um processo altamente dependente de  $O_2^-$ , que é substrato para a SOD. A inibição da auto-oxidação desse composto ocorre na presença da SOD, cuja atividade pode ser indiretamente medida em espectrofotômetro a 412nm. Uma inibição de 50% da auto-oxidação do pirogalol é definida como uma unidade de SOD e a atividade específica é representada como unidades de SOD/mg de proteína (MARKLUND; HÄGGLÖF, 1984).

##### b) Determinação da atividade da catalase

A atividade da CAT foi determinada de acordo com Aebi (1984). Esse método é baseado no desaparecimento de  $H_2O_2$  a 240nm. Uma unidade de CAT é definida como um mmol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT/mg de proteína (AEBI, 1987).

#### 9.1.7 Determinação protéica

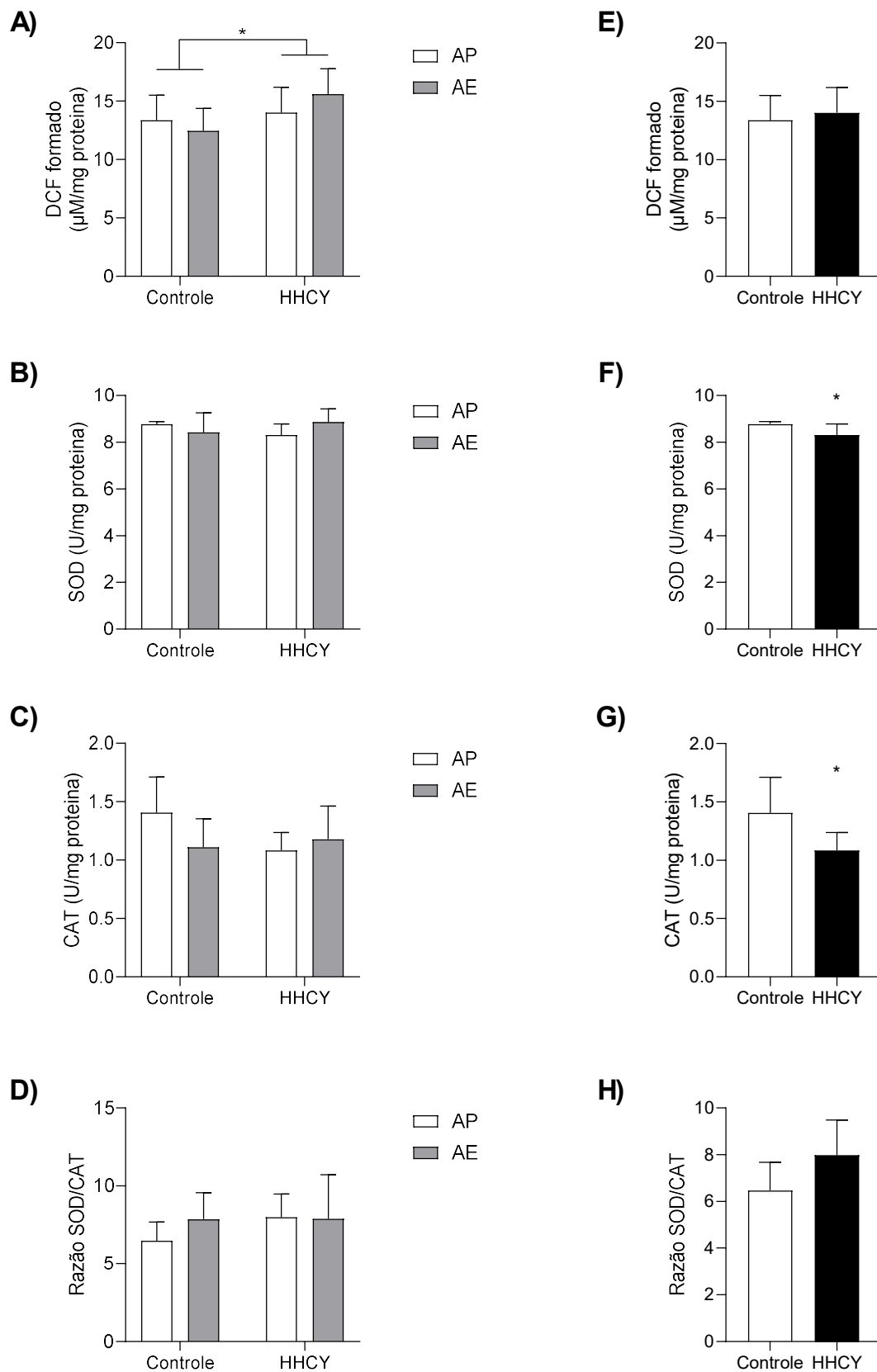
A determinação das proteínas totais foi realizada através do método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), de Lowry et al. (Lowry et al., 1951) ou de Peterson (Peterson, 1977), utilizando albumina bovina como padrão.

#### 9.1.8 Análise estatísticas

A análise estatística foi realizada pelos métodos estatísticos ANOVA de duas vias, seguida pelo teste múltiplo de Tukey, com a finalidade de identificar possíveis diferenças entre os grupos amostrados. Todas as análises foram realizadas através do software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, LA Jolla, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas em  $* p < 0,05$  e os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (DP).

## 9.2 RESULTADOS

De forma complementar e preliminar foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo de ratos submetidos à HHCY severa e ao EA. Os parâmetros mensurados foram a produção de DCF (pelo DCF formado), que mensura a quantidade de espécies reativas presentes na amostra, as atividades da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT), que são enzimas celulares que controlam a produção de espécies reativas relacionadas ao oxigênio, e a razão SOD/CAT como um indicativo de efetividade enzimática frente às possíveis alterações no ambiente redox do hipocampo dos ratos.



**Figura 2.** Efeito da hiper-homocisteinemia (HHCY) severa e do enriquecimento ambiental (EA) sobre o DCF formado (A), as atividades da superóxido dismutase (SOD; B) e catalase (CAT; C) e sobre a razão SOD/CAT (D) em hipocampo de ratos. AP – Ambiente padrão, \*  $p < 0,05$ .

A ANOVA de duas vias mostrou que a HHCY severa aumentou os níveis de DCF formado (**Figura 2A**) no hipocampo de ratos [ $F(1, 22) = 5,249$ ,  $p < 0,05$ ], e que, o EA *per se* [ $F(1, 22) = 0,1646$ ,  $p > 0,05$ ] ou após a HHCY severa [ $F(1, 22) = 2,263$ ,  $p > 0,05$ ] não alterou os níveis de DCF formado no hipocampo de ratos.

Quando avaliado em separado, o efeito da HHCY severa sobre os níveis de DCF formado (**Figura 2E**), o teste *t* de Student não demonstrou alteração nesse parâmetro em hipocampo de ratos ( $t=0,5234$ ,  $df=10$ ,  $p > 0,05$ ).

A ANOVA de duas vias mostrou que a HHCY severa não alterou a atividade da superóxido dismutase (SOD, **Figura 2B**) no hipocampo de ratos [ $F(1, 20) = 0,001836$ ,  $p > 0,05$ ], e que, o EA *per se* [ $F(1, 20) = 0,1796$ ,  $p > 0,05$ ] ou após a HHCY severa [ $F(1, 20) = 3,668$ ,  $p = 0,07$ ] não alterou a atividade da SOD no hipocampo de ratos.

Quando avaliado em separado, o efeito da HHCY severa sobre a atividade da SOD (**Figura 2F**), o teste *t* de Student demonstrou redução nesse parâmetro em hipocampo de ratos ( $t=2,371$ ,  $df=9$ ,  $p < 0,05$ ).

A ANOVA de duas vias mostrou que a HHCY severa não alterou a atividade da catalase (CAT, **Figura 2C**) no hipocampo de ratos [ $F(1, 22) = 1,591$ ,  $p > 0,05$ ], e que, o EA *per se* [ $F(1, 22) = 1,022$ ,  $p > 0,05$ ] ou após a HHCY severa [ $F(1, 22) = 3,853$ ,  $p = 0,06$ ] não alterou a atividade da SOD no hipocampo de ratos.

Quando avaliado em separado, o efeito da HHCY severa sobre a atividade da CAT (**Figura 2G**), o teste *t* de Student demonstrou redução nesse parâmetro em hipocampo de ratos ( $t=2,314$ ,  $df=10$ ,  $p < 0,05$ ).

A ANOVA de duas vias mostrou que a HHCY severa não alterou a razão SOD/CAT (**Figura 2D**) no hipocampo de ratos [ $F(1, 22) = 0,9875$ ,  $p > 0,05$ ], e que, o EA *per se* [ $F(1, 22) = 0,7116$ ,  $p > 0,05$ ] ou após a HHCY severa [ $F(1, 22) = 0,9347$ ,  $p > 0,05$ ] não alteraram a atividade da SOD no hipocampo de ratos.

Quando avaliado em separado, o efeito da HHCY severa sobre a razão SOD/CAT (**Figura 2H**), o teste *t* de Student demonstrou não haver alteração nesse parâmetro em hipocampo de ratos ( $t=1905$ ,  $df=10$ ,  $p = 0,08$ ).

Os dados mostram que a HHCY severa aumenta o estresse oxidativo, apontado pelo aumento dos níveis de DCF e não manutenção das atividades enzimáticas no hipocampo de ratos (**Figuras 2A, 2B, 2C e 2D**). Aliado a isso, nossos resultados para a HHCY, avaliados de forma isolada, corroboram com dados anteriores que mostram que a HHCY aumenta estresse oxidativo, onde há uma redução de atividade das enzimas SOD e CAT no hipocampo de ratos, sem, no entanto, haver alteração nos níveis de DCF formado, mostrando estar ocorrendo um desbalanço oxidativo no hipocampo destes ratos (**Figuras 2E, 2F, 2G e 2H**). Contudo, o EA não alterou parâmetros oxidativos no hipocampo e não se mostrou efetivo em proteger o hipocampo das alterações causadas pela HHCY severa.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADALIPOUR, A. et al. Effects of environmental enrichment on behavioral deficits and alterations in hippocampal BDNF induced by prenatal exposure to morphine in juvenile rats. **Neuroscience**, v. 305, n. August, p. 372–383, 2015.
- ANDIN, J. et al. Influence of environmental enrichment on steady-state mRNA levels for EAAC1, AMPA1 and NMDA2A receptor subunits in rat hippocampus. **Brain research**, v. 1174, p. 18–27, out. 2007.
- BARROS, D. M. et al. Modulation of working memory and of long- but not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala. **Behavioural Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 163–167, 2002.
- BARTHAS, F.; KWAN, A. C. Secondary Motor Cortex: Where ‘Sensory’ Meets ‘Motor’ in the Rodent Frontal Cortex. **Trends in Neurosciences**, v. 40, n. 3, p. 181–193, 2017.
- BEN-SADOUN, G. et al. Activité aérobie et environnement enrichi: Perspectives pour le patient Alzheimer. **Science and Sports**, v. 30, n. 1, p. 1–12, 2015.
- BERARDI, N. et al. Environmental enrichment delays the onset of memory deficits and reduces neuropathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer-like neurodegeneration. **Journal of Alzheimer’s disease : JAD**, v. 11, n. 3, p. 359–370, jun. 2007.
- BIERNASKIE, J.; CORBETT, D. Biernaskie Corbett\_J Neurosc 2001\_Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function. v. 21, n. 14, p. 5272–5280, 2001.
- BINDRA, S.; LAMANNA, J. C.; XU, K. Environmental Enrichment Improved Cognitive Performance in Mice under Normoxia and Hypoxia. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1269, p. 329–333, 2021.
- BONETTI, F.; BROMBO, G.; ZULIANI, G. The relationship between hyperhomocysteinemia and neurodegeneration. **Neurodegenerative disease management**, v. 6, n. 2, p. 133–145, 2016.
- DA CUNHA, A. A.; FERREIRA, A. G. K.; WYSE, A. T. S. Increased inflammatory markers in brain and blood of rats subjected to acute homocysteine administration.

- Metabolic Brain Disease**, v. 25, n. 2, p. 199–206, 2010.
- DA CUNHA, M. J. et al. Physical exercise reverses glutamate uptake and oxidative stress effects of chronic homocysteine administration in the rat. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, p. 69–74, 2012.
- DASH, P. K. et al. Molecular activity underlying working memory. **Learning and Memory**, v. 14, n. 8, p. 554–563, 2007.
- DIAZ-ARRASTIA, R. Homocysteine and neurologic disease. **Archives of Neurology**, v. 57, n. 10, p. 1422–1428, 2000.
- DICKERSON, B. C.; EICHENBAUM, H. The episodic memory system: Neurocircuitry and disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 86–104, 2010.
- DINIZ, D. G. et al. Age, environment, object recognition and morphological diversity of GFAP-immunolabeled astrocytes. **Behavioral and Brain Functions**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2016.
- DUFFAU, H. Brain plasticity and tumors. p. 3–33, 2008.
- DUFFY, J. F.; RIMMER, D. W.; CZEISLER, C. A. Association of intrinsic circadian period with morningness-eveningness, usual wake time, and circadian phase. **Behavioral Neuroscience**, v. 115, n. 4, p. 895–899, 2001.
- DURÁN-CARABALI, L. E. et al. Preventive and therapeutic effects of environmental enrichment in Wistar rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p. 485–497, 2019a.
- DURÁN-CARABALI, L. E. et al. Enriched experience during pregnancy and lactation protects against motor impairments induced by neonatal hypoxia-ischemia. **Behavioural Brain Research**, v. 367, p. 189–193, 2019b.
- DURÁN-CARABALI, L. E. et al. Pre- and early postnatal enriched environmental experiences prevent neonatal hypoxia-ischemia late neurodegeneration via metabolic and neuroplastic mechanisms. **Journal of neurochemistry**, v. 157, n. 6, p. 1911–1929, jun. 2021.
- ECKERT, K. et al. The Pih1-Tah1 cochaperone complex inhibits Hsp90 molecular chaperone ATPase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 41, p. 31304–



31312, 2010.

FERREIRA, C. R.; VAN KARNEBEEK, C. D. M. **Inborn errors of metabolism**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2019. v. 162

GHAHERI, S. et al. Adolescent enriched environment exposure alleviates cognitive impairments in sleep-deprived male rats: Role of hippocampal brain-derived neurotrophic factor. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, dez. 2021.

GHASEMI, A., et al. The laboratory rat: Age and body weight matter. **EXCLI J**, v. 6, p. 624–630, 2021.

GUS, P. I. et al. Classic homocystinuria and keratoconus: A case report. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 81, n. 4, p. 336–338, 2018.

HERRING, A. et al. Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. **Experimental Neurology**, v. 216, n. 1, p. 184–192, 2009.

ISO, H.; SIMODA, S.; MATSUYAMA, T. Environmental change during postnatal development alters behaviour, cognitions and neurogenesis of mice. **Behavioural Brain Research**, v. 179, n. 1, p. 90–98, 2007.

IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. **Behavioral and Neural Biology**, v. 51, n. 2, p. 171–202, 1989.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2018.

JADAVJI, N. M. et al. Severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in mice results in behavioral anomalies with morphological and biochemical changes in hippocampus. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 106, n. 2, p. 149–159, 2012.

JADAVJI, N. M.; KOLB, B.; METZ, G. A. Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats. **Neuroscience**, v. 140, n. 4, p. 1127–1138, 2006.

JANKOWSKY, J. L. et al. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience : the official**

**Journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 21, p. 5217–24, 2005.

KIM, J. et al. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance.

**Archives of Pharmacal Research**, v. 41, n. 4, p. 372–383, 2018.

KIMURA, L. F. et al. Early exposure to environmental enrichment protects male rats against neuropathic pain development after nerve injury. **Experimental neurology**, v. 332, p. 113390, out. 2020.

KOLLING, J. et al. Severe Hyperhomocysteinemia Decreases Creatine Kinase Activity and Causes Memory Impairment: Neuroprotective Role of Creatine. **Neurotoxicity Research**, v. 32, n. 4, 2017.

LEE, S. et al. Environmental enrichment can prevent cognitive decline induced by dietary oxidative challenge. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 28, n. 3, p. 497–501, 2012.

LEGER, M. et al. Environmental Enrichment Enhances Episodic-Like Memory in Association with a Modified Neuronal Activation Profile in Adult Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

LOPES, S. L. B.; LOPES, H. H. M. C.; VANNUCCHI, H. A hiperhomocisteinemia como fator de risco cardiovascular: perspectivas atuais. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 1, p. 1–11, 2010.

MACHADO, F. R. et al. Homocysteine alters glutamate uptake and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and oxidative status in rats hippocampus: Protection by vitamin C. **Metabolic Brain Disease**, v. 26, n. 1, p. 61–67, 2011.

MARTÍNEZ, Y. et al. The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. **Amino Acids**, v. 49, n. 12, p. 2091–2098, 2017.

MATTE, C. et al. Acute homocysteine administration impairs memory consolidation on inhibitory avoidance task and decreases hippocampal brain-derived neurotrophic factor immunocontent: prevention by folic acid treatment. **Neuroscience**, v. 163, n. 4, p. 1039–1045, nov. 2009.

MATTÉ, C. et al. Acute homocysteine administration impairs memory consolidation on inhibitory avoidance task and decreases hippocampal brain-derived neurotrophic factor immunocontent: Prevention by folic acid treatment. **Neuroscience**, v. 163, n. 4, p.

1039–1045, 2009.

MATTÉ, C. et al. Hyperhomocysteinemia reduces glutamate uptake in parietal cortex of rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 183–187, 2010.

MCCULLY, K. S. Homocysteine metabolism, atherosclerosis, and diseases of aging. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 1, p. 471–505, 2016.

MCGAUGH, J. L. Memory - A century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

MESHI, D. et al. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 6, p. 729–731, 2006.

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, maio 2015.

MUDD, S. H. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: A review. **American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 157, n. 1, p. 3–32, 2011.

NAKAMURA, H. et al. Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. **Journal of Neuroscience Research**, v. 56, n. 3, p. 307–315, 1999.

NETTO, C. A. et al. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. **Neuroscience**, v. 54, n. 1, p. 69–92, 1993.

NETTO, C. A.; DIAS, R. D.; IZQUIERDO, I. Interaction between consecutive learnings: inhibitory avoidance and habituation. **Behavioral and Neural Biology**, v. 44, n. 3, p. 515–520, 1985.

NILSSON, M.; PEKNY, M. Enriched environment and astrocytes in central nervous system regeneration. **Journal of rehabilitation medicine**, v. 39, n. 5, p. 345–52, 2007.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews**

**Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 697–709, 2006.

PAZAITI, A. et al. Evaluation of long-lasting sensorimotor consequences following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats: The neuroprotective role of MgSO<sub>4</sub>. **Neonatology**, v. 95, n. 1, p. 33–40, 2008.

PEREIRA, L. O. et al. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 1, p. 101–108, 2007.

PICUT, C. A. et al. Postnatal Ovary Development in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 3, p. 343–353, 2015.

PRABHU, G. S.; K G RAO, M.; RAI, K. S. Hippocampal neural cell degeneration and memory deficit in high-fat diet-induced postnatal obese rats- exploring the comparable benefits of choline and DHA or environmental enrichment. **The International journal of neuroscience**, v. 131, n. 11, p. 1066–1077, nov. 2021.

PRADO LIMA, M. G. et al. Environmental enrichment and exercise are better than social enrichment to reduce memory deficits in amyloid beta neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 1, p. 201718435, 2018.

RAHMEIER, F. L. et al. The effect of taurine and enriched environment on behaviour, memory and hippocampus of diabetic rats. **Neuroscience Letters**, v. 630, p. 84–92, 2016.

RIEDEL, W. J.; BLOKLAND, A. Declarative Memory. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 228, p. 215–236, 2015.

ROJAS, J. J. et al. Environmental stimulation improves performance in the ox-maze task and recovers Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus of hypoxic-ischemic rats. **Neuroscience**, v. 291, 2015.

ROSENZWEIG, M. R. et al. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: A replication and extension. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 55, n. 4, p. 429–437, 1962.

SAMPEDRO-PIQUERO, P. et al. Effects of environmental enrichment on anxiety responses, spatial memory and cytochrome c oxidase activity in adult rats. **Brain**

**Research Bulletin**, v. 98, p. 1–9, 2013.

SANCHES, E. F. et al. Are the consequences of neonatal hypoxia-ischemia dependent on animals' sex and brain lateralization? **Brain Research**, v. 1507, p. 105–114, 2013.

SANCHES, E. F. et al. Pregnancy swimming prevents early brain mitochondrial dysfunction and causes sex-related long-term neuroprotection following neonatal hypoxia-ischemia in rats. **Experimental Neurology**, v. 339, p. 113623, jan. 2021.

SARADJIAN, A. H. Sensory modulation of movement, posture and locomotion. **Neurophysiologie Clinique**, v. 45, n. 4–5, p. 255–267, 2015.

SAUDUBRAY, J. M.; GARCIA-CAZORLA, À. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. **Pediatric Clinics of North America**, v. 65, n. 2, p. 179–208, 2018.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, p. 624–630, 2013.

SHARMA, G. S. et al. Protein N-homocysteinylation: From cellular toxicity to neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1850, n. 11, p. 2239–2245, 2015.

SILVA, B. A. et al. Environmental enrichment improves cognitive symptoms and pathological features in a focal model of cortical damage of multiple sclerosis. **Brain research**, v. 1727, p. 146520, jan. 2020.

ŠKOVIEROVÁ, H. et al. The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1–18, 2016.

SQUIRE, L. R. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 82, n. 3, p. 171–177, 2004.

STAM, N. C. et al. Sex-specific behavioural effects of environmental enrichment in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 4, p. 717–723, 2008.

STRECK, E. L. et al. Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by the metabolites accumulating in homocystinuria. **Metabolic Brain Disease**, v. 17, n. 2, p. 83–91, 2002.

- STRECK, E. L. et al. Impairment of energy metabolism in hippocampus of rats subjected to chemically-induced hyperhomocysteinemia. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1637, n. 3, p. 187–192, 2003.
- UNSWORTH, N.; ENGLE, R. W. On the Division of Short-Term and Working Memory: An Examination of Simple and Complex Span and Their Relation to Higher Order Abilities. **Psychological Bulletin**, v. 133, n. 6, p. 1038–1066, 2007.
- VAN DELLEN, A. et al. Delaying the onset of Huntington's in mice. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 721–722, 2000.
- VEYRAT-DUREBEX, C. et al. Exploration d'une hyperhomocystéinémie. **Annales de Biologie Clinique**, v. 71, n. 5, p. 517–525, 2013.
- WHISHAW, I. Q. et al. Distinct forelimb and hind limb stepping impairments in unilateral dopamine-depleted rats: Use of the rotorod as a method for the qualitative analysis of skilled walking. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 126, n. 1, p. 13–23, 2003.
- WYSE, A. T. S. et al. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus. **Physiology & Behavior**, v. 80, p. 475–479, 2004.
- WYSE, A. T. S. et al. The Role of Oxidative Stress and Bioenergetic Dysfunction in Sulfite Oxidase Deficiency: Insights from Animal Models. **Neurotoxicity Research**, v. 35, n. 2, p. 484–494, 2019.
- WYSE, A. T. S. et al. Homocysteine and Gliotoxicity. **Neurotoxicity Research**, n. 3, p. 966–974, 2021.
- YAKOVLEVA, O. et al. Hydrogen Sulfide Alleviates Anxiety, Motor, and Cognitive Dysfunctions in Rats with Maternal Hyperhomocysteinemia via Mitigation of Oxidative Stress. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, jul. 2020.
- YOUNG, D. et al. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. **Nature Medicine**, v. 5, n. 4, p. 448–453, 1999.
- ZEENI, N. et al. Environmental enrichment and cafeteria diet attenuate the response to chronic variable stress in rats. **Physiology and Behavior**, v. 139, p. 41–49, 2015.
- ZHANG, J.; ZHENG, Y. G. SAM/SAH Analogs as Versatile Tools for SAM-Dependent Methyltransferases. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 3, p. 583–597, 2016.
- ZOCOLELLA, S. et al. Hyperhomocysteinemia in movement disorders: Current evidence and hypotheses. **Current vascular pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 237–243, jul. 2006.