

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Jéssica Neves Andrade

Avaliação histológica e ultra estrutural de regiões encefálicas em um modelo murinho da Doença de Huntington tratado com uma droga potencialmente neuroprotetora, CDPPB

Belo Horizonte

Dezembro 2016

Jéssica Neves Andrade

Avaliação histológica e ultra estrutural de regiões encefálicas em um modelo murinho da Doença de Huntington tratado com uma droga potencialmente neuroprotetora, CDPPB

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientação: Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca

Co-orientação: Profa. Dra. Fabiola Mara Ribeiro

Belo Horizonte

Dezembro de 2016

APOIO INSTITUCIONAL

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios: Laboratório de Biologia da Neurotransmissão localizado no Departamento de Morfologia e no Laboratório de Neuroquímica (Profa. Fabíola Mara Ribeiro) localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia. Contamos ainda com o apoio do Centro de Microscopia da UFMG e Laboratório de Farmacologia, do Departamento de Farmacologia, sob supervisão da Profa. Dra. Luciene Bruno Vieira. Os laboratórios aqui citados encontram-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Este trabalho foi realizado sob orientação da Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca (Departamento de Morfologia) e co-orientação da Profa. Dra. Fabíola Mara Ribeiro (Departamento de Bioquímica e Imunologia). Essa pesquisa contou com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus. Obrigada Pai por ter me sustentado até aqui, por ter me feito levantar e continuar quando as dificuldades pareciam ser grandes demais. Meu Deus, obrigada.

À professora Cristina, por ter aberto as portas do laboratório quando eu ainda estava na faculdade. Obrigada pelos votos de confiança, me entregando inclusive esse projeto “potinho de ouro” (rs) quando eu ainda era IC. Obrigada por acreditar no meu potencial e me passar uma das técnicas mais laboriosas do lab no qual hoje sou apaixonada (MET) e que me deu a possibilidade de contribuir em quase todos os trabalhos do lab. Obrigada por ter topado comigo essa carga horária louca de plantão de noite e mestrado de dia, você teve paciente com meu tempo de adaptação e reconheceu meu esforço e trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, por ser a orientadora presente, que corrige, que cobra, que ensina, que exige qualidade em nossos trabalhos, e que dá condições de trabalho em um momento nada favorável para a pesquisa no país. Vou levar todo esse aprendizado que tive com você ao longo da carreira. Foram anos que vão ficar na memória. E esse agradecimento não poderia ser mais sincero: obrigada Cristina.

À professora Fabiola e sua aluna Juliana, pela oportunidade de contribuir com vocês neste tratamento com CDPPB que resultou no meu projeto de mestrado e no paper. Muito obrigada pela parceria e pela oportunidade.

Agradeço, a todos os colegas da Pós-graduação em Biologia Celular, a todos os professores da Pós-graduação em Biologia Celular, a coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e todos os funcionários das secretarias da Pós em nome da Rhuanna e do Kender.

Agradeço ao meu namorado Matheus, colega de profissão, de laboratório e de vida. Obrigada pelo apoio, incentivo, que fizeram que esse mestrado fosse mais leve e prazeroso. Esse trabalho tem vários toques seus e sou grata pela sua ajuda, paciência e cuidado. Meu amor, que bom que Deus colocou você no meu caminho profissional e na minha vida. TE AMO!

Aos meus pais. Mãe e pai, que me deram amor, carinho, que choraram junto comigo nos momentos em que achei que não fosse capaz e que me cobriram de tanto amor e coragem, que foi capaz de me fazer seguir em frente. Eu dedico a vocês esse trabalho. A tudo o que

fizeram e fazem para que eu conquiste meu lugar, com luta, fé e humildade. AMO VOCÊS.

Ao professor Robson Rossoni, hoje meu amigo e padrinho, um anjo em minha vida. Obrigada pela indicação a Cristina, pelo carinho e zelo com minha carreira.

Aos amigos e colegas do Laboratório da Rede Mater Dei de Saúde, em especial a Dra.Flávia, pelo incentivo, voto de confiança e por acreditar no meu trabalho desde o estágio. Tenho orgulho em fazer parte de um hospital que tanto acredita na ciência.

Aos colegas do CM, Roberta, Nati e Denis pelas horas de trabalho e risadas compartilhadas.

Ao Hermann, que teve o cuidado me passar minuciosamente a técnica de MET. Obrigada pelos ensinamentos. Foi tudo fundamental para os resultados deste trabalho. Obrigada pela amizade construída e momentos divertidos nesta jornada. Você é 10!!!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia da Neurotransmissão pelos vários momentos de diversão e de muito aprendizado. À Prica, madrinha rs, com seu jeito de querer fazer todos sorrirem, sou grata pelos seus sorrisos e conhecimento que dividimos. Babi e Ju, sempre bem-humoradas e dispostas a ajudar. As ICs que passaram pelo lab em especial Isadora e Rubens que tanto contribuíram com risadas, histórias divertidas e muito trabalho também. A Marina pelo seu jeito encantador de conviver. Enfim, a todos eu agradeço pelos anos de convivência e amizade.

Às minhas amigas(os) de Alvo da Mocidade pela parceria na caminhada pela fé, em especial Ale pela amizade e por estar presente em todos os momentos. Minha irmã na fé.

As minhas amigas Carol, Anna e Fe pelo carinho, risadas e palavras de conforto. Mais uma etapa vencida com vocês do meu lado.

Ao professor Zé Carlos, pelo carinho, dicas no trabalho e claro, amizade.

À UFMG e as agências de financiamento da pesquisa no Brasil, CNPq, CAPES e FAPEMIG.

A todos vocês, eu deixo aqui o meu Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ANEXOS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. A Doença de Huntington	16
1.2. A neurodegeneração na Doença de Huntington	21
1.3. A Neurotransmissão	22
1.4. Neurotransmissão Glutamatérgica.....	27
1.5 Excitotoxicidade glutamatérgica e a doença de Huntington	30
1.6 Tratamento com CDPPB em camundongos BACHDQ97	33
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 População e amostra	41
3.2 Administração da droga.....	42
3.3 Obtenção do material.....	42
3.4 Histologia de rotina	43
3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	44

3.6 Aquisição e análise das imagens	46
3.7 Análise estatística	47
4. RESULTADOS	49
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO.....	72
7. REFERÊNCIAS	74
8. ANEXOS	80

LISTA DE ABREVIATURAS

3-ciano-N-(1,3difetil-1H-pirazol-5-il)benzamida	CDPPB
Aminoácidos excitatórios	EAA
Animais selvagens	WT
Camundongo Transgênico para DH	BACHD
Citosina-adenina-guanina	CAG
Diacilglicerol	DAG
Dimetil-sulfoxido	DMSO
Doença de Alzheimer	DA
Doença de Huntington	DH
Fator neurotrófico derivado do cérebro	BDNF
Fosfatidilinositol	PI
Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato	PIP2
Fosfolipase C	PLC
Huntintina	Htt
Inositol 1,4,5-trifosfato	IP3
Íon cálcio	Ca ²⁺
Íon sódio	Na ⁺
Microscopia Eletrônica de Transmissão	MET
Moduladores Alostéricos Positivos	MAPs

N-[4-Chloro-2-[(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl]phenyl]-2-hydroxybenzamide	CPPHA
N-metil d-aspartato	NMDA
<i>Phosphate-buffered saline</i>	PBS
Proteína de 25 kDa associada ao sinaptosoma	SNAP-25
Proteína de membrana associada à vesícula	VAMP
Proteína cinase C	PKC
Proteína cinase serina/treonina	AKT
Cinase regulada por sinais extracelulares	ERK
Receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5	mGluR5
Receptor vesicular de glutamato	VGLUT
RNA mensageiro	mRNA
Sistema Nervoso Central	SNC
<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>	SNARE
<i>Target SNARE</i>	T-SNARE
<i>Vesicular SNARE</i>	V-SNARE
Zona Ativa	Z.A

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cérebro de indivíduos com DH.....	17
Figura 2: Representação ilustrativa das repetições poliglutamínicas na proteína htt, alvo da Doença de Huntington.....	18
Figura 3: Representação de uma sinapse axossomática e dos mecanismos de toxicidade na Doença de Huntington.....	20
Figura 4: Etapas básicas da Neurotransmissão.....	23
Figura 5: Representações de sinapses no SNC.....	24
Figura 6: Modelo didático que mostra a atuação das proteínas do complexo.....	26
Figura 7: Imagem representativa de uma sinapse química Glutamatérgica.....	28
Figura 8: O mGluR5 participa do processo de ativação da proteína AKT.....	29
Figura 9: Mecanismos propostos para ação da htt que interfere na sinalização de Ca ²⁺ e apoptose celular.....	31
Figura 10: Representação esquemática do modelo proposto para sinalização do mGluR5 e alterações na DH.....	32
Figura 11: Análise histológica do número de células no corpo estriado de camundongos BACHD tratados com CDPPB.....	35
Figura 12: O tratamento com CDPPB normaliza parcialmente o número de vesículas sinápticas na Z.A de camundongos BACHD.....	37
Figura 13: Imagem da implantação subcutânea de uma bomba micro-osmótica em um camundongo.....	43
Figura 14: Etapas da microtomia para MET.....	46
Figura 15: Representação da análise das imagens de MET.....	48
Figura 16: Tratamento crônico com CDPPB reverte parcialmente a morte celular no Córtex de animais BACHD.....	51

Figura 17: Tratamento com CDPPB tende a reverter a morte neuronal no giro denteado do Hipocampo de camundongos BACHD.....	53
Figura 18: Quantificação das células de Purkinje não mostra diferença entre BACHD SALINA, WT e BACHD CDPPB.....	55
Figura 19: Corpos celulares presentes de neurônios presentes no córtex cerebral de camundongos BACHD SALINA apresentam sinais de neurodegeneração em relação aos WT e o tratamento com CDPPB.....	57
Figura 20: Análise quantitativa das figuras de degeneração visualizadas nos corpos celulares do córtex cerebral dos 3 grupos experimentais avaliados.....	58
Figura 21: Eletromicrografias representativas que mostram sinapses presentes no córtex cerebral dos grupos de tratamento avaliados.....	60
Figura 22: Quantificação da análise ultraestrutural da área do terminal pré-sináptico, do número de vesículas/área e do número de vesículas a 200 nm da Z.A na região do córtex cerebral.....	61
Figura 23: Eletromicrografias representativas que mostram sinapses presentes no hipocampo dos grupos de tratamento avaliados.....	63
Figura 24: Quantificação da análise ultraestrutural da área do terminal pré-sináptico, do número de vesículas/área e do número de vesículas a 200 nm da Z.A no hipocampo.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos principais modelos de camundongos utilizados para estudos relacionados com a DH.....	41
Tabela 2: Resultado da análise da quantificação do número total de células no córtex cerebral dos três genótipos/tratamentos estudado	49
Tabela 3: Resultado da análise da quantificação do número total de células no giro denteado dos três genótipos/tratamentos estudados.	51
Tabela 4: Análise ultraestrutural das sinapses do córtex cerebral	58
Tabela 5: Análise ultraestrutural das sinapses do hipocampo	61

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1:

Protocolo CETEA.....	83
----------------------	----

ANEXO 2: Artigo: The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPPB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease. J.G. Doria, J.M. de Souza, <u>J.N. Andrade</u> , H.A. Rodrigues, I.M. Guimaraes, T.G. Carvalho, C. Guatimosim, T. Dobransky, F.M. Ribeiro.....	84
--	----

ANEXO 3: Artigo: Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease. P.A.C. Valadão, B.C. de Aragão, <u>J.N. Andrade</u> ; M.P.S.M Gomes, G. Foureaux, J. V. J. Santos; J.C. Nogueira, F.M. Ribeiro, J.C. Tapia, C. Guatimosim.....	95
---	----

RESUMO

A DH é uma desordem neurodegenerativa de caráter autossômico dominante causada por uma expansão poliglutamínica na proteína Huntingtina (Htt). Pacientes com DH exibem uma perda neuronal progressiva que leva a um déficit motor, perda da função cognitiva, distúrbios psiquiátricos e morte. Uma das principais contribuições para esta morte neuronal é a excitotoxicidade causada pelo glutamato. Estudos recentes mostraram que a classe dos receptores metabotrópicos de glutamato tipo 5 (mGluR5), quando modulados pela droga 3-ciano-N-(1,3difetil-1H-pirazol-5-il)benzamida (CDPPB), tem uma ação neuroprotetora. Uma vez que a morte neuronal é um fator chave para entender a DH, neste estudo nós avaliamos nas regiões do córtex, hipocampo e cerebelo a perda celular, bem como alterações presentes nos corpos celulares do córtex cerebral e sinapses desta região e do hipocampo. Foram utilizados para o estudo camundongos WT (wild-type), BACHD (transgênicos para a DH) e BACHD tratados com CDPPB por 18 semanas. Nossos resultados evidenciam redução no número de células do córtex cerebral e no giro denteado do hipocampo dos camundongos BACHD. O número de neurônios de Purkinje se mostrou semelhante em todos os grupos experimentais. As características ultraestruturais do córtex, que demonstra células em processo degenerativo (acúmulo de corpos elétrondensos de lipofuscina e invaginação nuclear), mostraram que nos animais BACHD o aparecimento dessas estruturas era superior em relação aos animais WT, sendo que o tratamento com CDPPB reduziu parcialmente esses achados. Por fim, nós analisamos um possível comprometimento das sinapses do córtex cerebral e do hipocampo. A análise evidenciou que na área pré-sináptica, o número de vesículas/área e o número de vesículas a 200nm das zonas ativas (Z.A) mostravam-se reduzidos nos animais BACHD em relação aos WT. No entanto, o tratamento se mostrou parcialmente eficaz apenas na recuperação do número de vesículas/área. Com relação às sinapses do hipocampo, não vimos diferenças nos parâmetros acima analisados. Dessa forma, nossos dados em conjunto demonstram o papel da mutação na proteína Htt na perda celular e nas alterações sinápticas, além disso, abre novas frentes investigativas acerca da eficácia do tratamento com CDPPB, principalmente na elaboração de novos tratamentos que utilizam os moduladores alostéricos positivos (MAPs).

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by a polyglutamine expansion at the Huntingtin protein. Patients with HD show progressive neuronal death which leads to motor deficit, loss of cognitive functions and psychiatric alterations. One of the main causes of the neuronal loss is the excitotoxicity caused by glutamate. Recent studies show that the mGluR5 upon CDPPB modulation are neuroprotective. Once the neuronal death is a key factor to understand HD development, in this study we evaluated in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum, the cell loss, as well as alterations in the cell bodies of the cerebral cortex. In addition, we have analyzed the ultrastructure of the synapses at the cerebral cortex and hippocampus. We used in this study WT, BACHD and BACHD mice treated with CDPPB for 18 weeks. Our results showed a reduction in the number of cells in the cerebral cortex and in the dentate gyrus of the hippocampus from BACHD mice. The total number of Purkinje neurons were similar in both experimental groups. The ultrastructural characteristics of the cerebral cortex that characterize cells under degenerative process (accumulation of lipofuscin bodies), showed an enhancement of these structures in the BACHD mice compared to WT. The treatment with CDPPB partially reduced these findings. At last, we have evaluated a possible impairment at the synapses of the cerebral cortex and hippocampus. We found that the pre-synaptic area, the number of vesicles per area and the number of vesicles at 200nm from the active zone (A.Z) were both reduced in BACHD mice compared to WT. However, the treatment only partially reverted the number of vesicles per area. The synapses from the hippocampus were not different when compared to control. Therefore, our data show the role of the mutated Htt in cell loss and synaptic alterations, furthermore our study opens new routes of investigation on the efficiency of the CDPPB treatment, especially in the creation of new treatments based on positive allosteric modulators (PAMs).

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Doença de Huntington (DH)

A DH é uma desordem neurodegenerativa, autossômica dominante, classicamente descrita como Coreia de Huntington (“khoreia” é a palavra grega para dança), cujo aparecimento dos primeiros sintomas surge, em sua grande maioria, na fase adulta, entre os 35 e 50 anos de idade, progredindo ao longo do tempo e tornando-se fatal 15 a 20 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas. (ROSS *et al.*, 2010). Lanska e colaboradores (1988), fizeram um estudo no qual mostrou-se que dentre as principais causas de morte na DH está a pneumonia, seguida de doença cardiovascular.

Sua prevalência é estimada em 5-10 casos por 100.000 indivíduos na Europa e América do Norte (SMITH; BRUNDIN; LY, 2005; VONSATTEL & DIFIGLIA, 1998). Dados recentes mostram que existem cerca de 100 mil indivíduos na população da América do Sul que já estão diagnosticados com a DH (HO *et al.*, 2001). Já no Brasil, cerca 13-19 mil indivíduos são acometidos pela DH (SMITH; BRUNDIN; LY, 2005).

A DH foi descrita no século XIX como “coréia hereditária” (HUNTINGTON, 1872). Ainda em 1872 não se fazia distinção entre a DH e outras condições que se apresentavam como coréia (HUNTINGTON, 1872). Nesta época, o médico norte-americano George Huntington, publicou o artigo intitulado “On Chorea” no “Philadelphia Medical and Surgical Reporter” no qual relatava as observações de seu pai, Abel Huntington e de seu avô George Lee Huntington e assim, descreveu e identificou características clínicas da doença bem como o seu provável padrão de transmissão familiar (BATES, 2005).

Por muitas décadas, o nome da doença manteve-se inalterado, até a década de oitenta quando, discutiu-se a respeito dos sintomas não motores, e o nome foi então mudado para a DH. No entanto, só em 1983 foi visto uma relação do cromossoma 4 com a doença e em 1993 o gene para a DH foi finalmente identificado (Huntington’s disease collaborative research group, 1993)

Na prática clínica, a DH é caracterizada por distúrbios motores que incluem por exemplo, movimentos involuntários que se iniciam nas mãos e nos pés bem como nos pequenos músculos da face (tipo de Coréia). Esses movimentos coreicos estão presentes em todo o tempo em que o paciente está acordado. O mais proeminente sintoma motor é o movimento de extensão dos músculos longos e conseqüentemente alterações na marcha

(WALLING; BALDASSARE; WESTFALL, 1998). De forma geral, em fase prolongada o paciente pode se tornar mudo, apresentar disartria, disfagia, bradicinesia e perda de coordenação motora de forma gradual. Dentre os distúrbios cognitivos apresentados pelos pacientes com a doença, podemos citar dificuldades em organizar e priorizar tarefas, impulsividade, dificuldade de aprendizagem e de guardar novas informações. Em relação aos distúrbios psiquiátricos, o mais frequente é a depressão, que possui diagnóstico difícil, uma vez que a perda de peso, apatia e inatividade também ocorrem na DH. Além disso, a insônia, tristeza, retraimento social, fadiga e perda de energia também são relatados nos pacientes com a doença (WALLING; BALDASSARE; WESTFALL, 1998).

A neuropatologia da DH é caracterizada pela perda progressiva de células neuronais dos núcleos putâmen e caudado, da região dos núcleos da base e de regiões neocorticais do cérebro (YOUNG, 2003; LI, 2004; FAIDEAU, *et al.*, 2010), levando a uma diminuição do volume cerebral (**Figura 1**) (HO *et al.*, 2003).

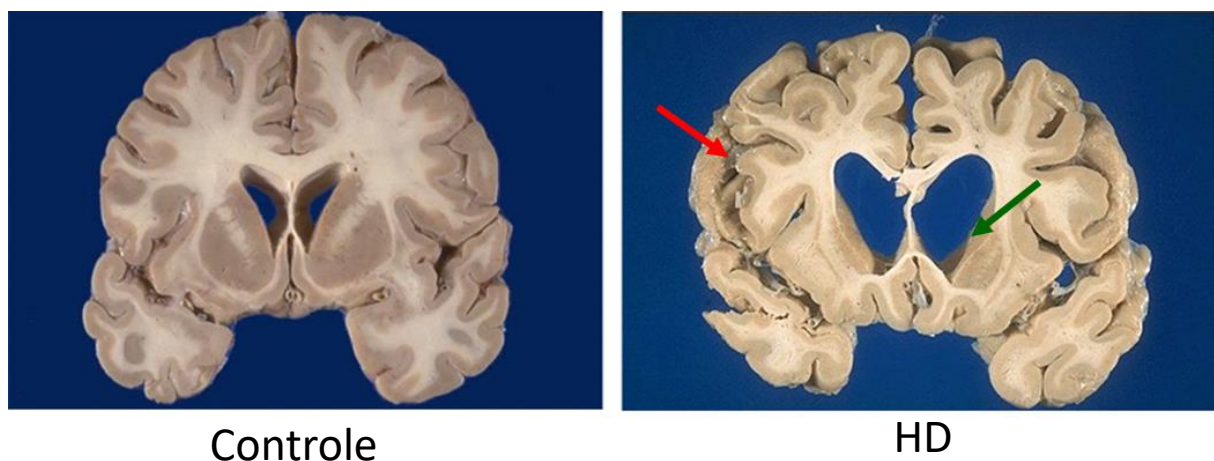


Figura 1. Cérebro de indivíduo com DH a direita e indivíduo saudável (controle) a esquerda. A figura à direita mostra a redução do volume dos núcleos putâmen e caudado (seta verde) e de regiões neocorticais do cérebro (seta vermelha) com DH. À esquerda, o cérebro de um indivíduo que não apresenta a DH com volume cerebral normal. Repare o alargamento dos ventrículos cerebrais na imagem à direita. Imagem de: <http://www.brc.cam.ac.uk/mission-of-the-john-van-geest-centre-for-brain-repair/>.

Acesso em: 20 de Julho de 2016

Diferentemente de outras desordens neurodegenerativas, a DH possui sua causa já estabelecida e bem definida. Ela é causada por uma expansão dos trinucleotídeos citosina-adenina-guanina (CAG) no exon-1 do gene que codifica a proteína htt. Este gene está localizado no braço curto do cromossomo 4 e sua mutação promove o acúmulo de repetidas unidades de glutaminas próximo à porção N-terminal da proteína htt (CHANG, *et al.*, 2015). BANO *et al.*, em 2011, relataram em seu trabalho que indivíduos normais possuem entre 6 e 35 repetições de CAG, indivíduos com 36 a 39 apresentam penetrância incompleta, enquanto pacientes com DH apresentam acima de 40 repetições dos trinucleotídeos (**Figura 2**).

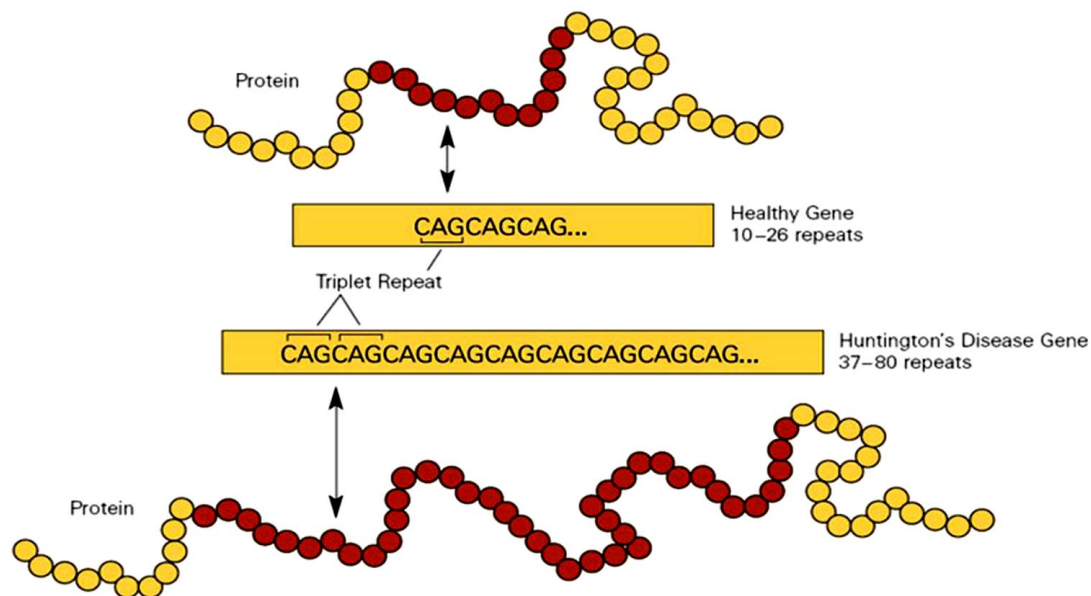


Figura 2: Representação ilustrativa das repetições poliglutamínicas na proteína htt, alvo da Doença de Huntington. A imagem demonstra que no gene saudável, a proteína htt apresenta-se com no máximo 26 repetições de CAG, diferentemente do gene para a DH, que apresenta acima de 37 repetições do trinucleotídeo, o que resulta em uma proteína de maior tamanho. Adaptado de: (<http://www.nist.gov/mml/bmd/srm-041211.cfm>). Acesso em: 20 de Julho de 2016.

A proteína htt foi descrita em 1993 (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Ela pode ser encontrada em diversos tipos de tecidos como o nervoso e muscular, além de estar presente em órgãos como coração, pulmão, placenta, fígado, pâncreas e testículos, sendo, portanto, amplamente distribuída no corpo. Além disso, ela pode estar associada a uma variedade de organelas celulares, incluindo o núcleo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias (MARQUES SOUSA E HUMBERT, 2013). Desta forma, entende-se que essa proteína é essencial para a sobrevivência da célula (LI, 2004). A htt também é importante no transporte vesicular e função sináptica, uma vez que interage com proteínas de vesículas sinápticas, proteínas que atuam no transporte axonal (SMITH; BRUNDIN; LY, 2005).

Embora seu papel ainda não esteja totalmente esclarecido, existem estudos mostrando que, em neurônios centrais, existe tanto um mecanismo de “ganho de função” da htt bem como mecanismos de “perda da sua função”, resultando em toxicidade que leva à disfunção neuronal e morte. Sendo assim, dados da literatura mostraram que a presença da htt mutada pode levar a diversas complicações a nível celular que envolvem distúrbios da atividade do sistema ubiquitina-proteassoma, interrupções na transcrição gênica, síntese de proteína, função mitocondrial e até em interações proteicas (**Figura 3**) (SMITH; BRUNDIN; LY, 2005).

A degeneração gradual que ocorre na DH causada pela atuação direta ou indireta da htt mutada com diversos alvos celulares é um fator chave para entender os sintomas e a progressão da doença.

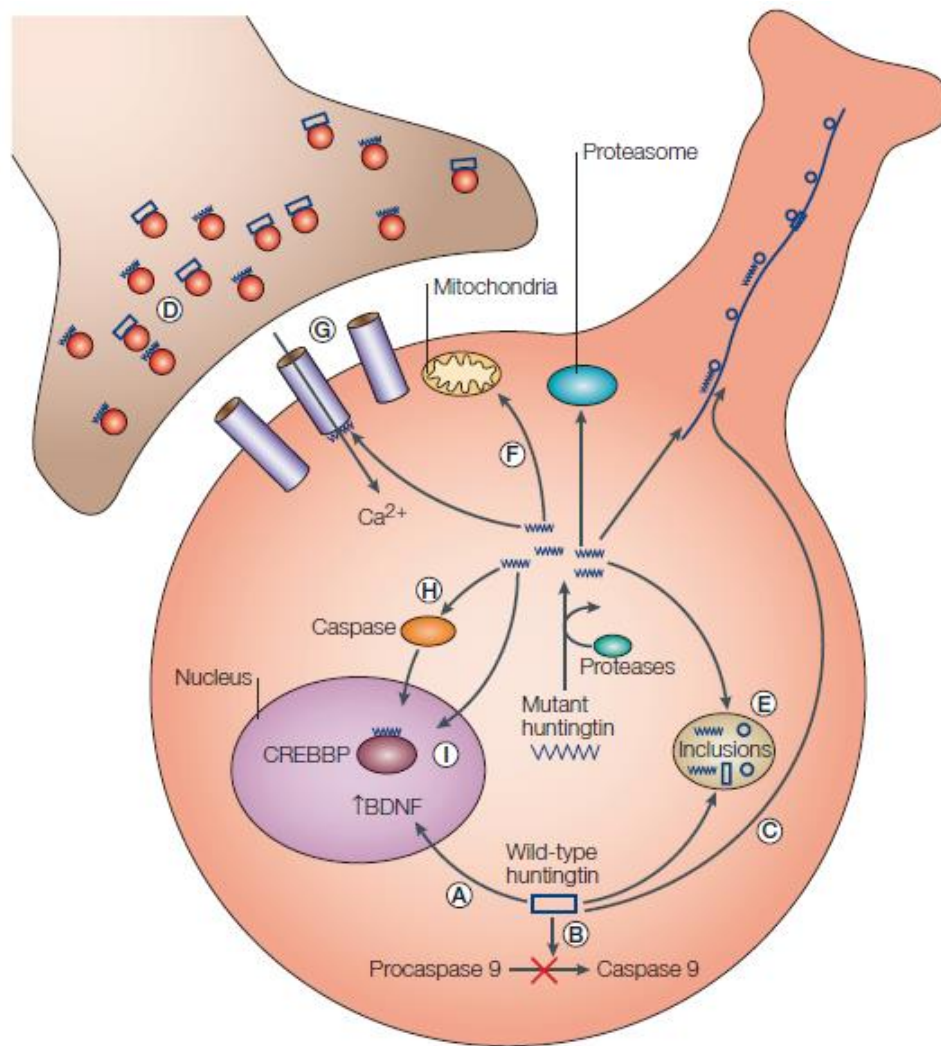


Figura 3: Representação de uma sinapse axossomática e dos mecanismos de toxicidade na Doença de Huntington. A htt do tipo selvagem é importante para o desenvolvimento normal da célula e tem sido proposto o seu envolvimento na regulação da transcrição do fator neurotrófico BDNF (A), na prevenção da apoptose (clivagem de procaspase-9) (B), no transporte axonal de vesículas (C) e na liberação de vesículas sinápticas (D). A htt mutante pode comprometer processos celulares por vários mecanismos: através do sequestro de proteínas (E), disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (F), liberação alterada de neurotransmissores e na função de receptores (G), através da ativação de caspases que iniciam a cascata apoptótica (H) e interações com fatores nucleares que resultam em desregulação transcrricional (I) (Di PROSPERO & FISCHBECK, 2005).

1.2. A neurodegeneração na Doença de Huntington

Em análises post-mortem de tecidos cerebrais de pacientes com DH, observou-se que a neurodegeneração progressiva que acontece na DH ocorre, principalmente, no encéfalo, na região do corpo estriado e se estende para outras regiões do cérebro à medida que progride (VONSATTEL *et al.*, 1988 e BANO *et al.*, 2011). Dentre essas outras regiões acometidas pela doença, inclui-se o córtex cerebral que pode apresentar-se com acúmulo de htt mutada no citoplasma e no núcleo dos neurônios. Além disso, há o aparecimento de dendritos dismórficos, que estão correlacionados com o surgimento dos déficits motores (LAFORET *et al.*, 2001). Além do córtex cerebral e do corpo estriado, o hipocampo de modelos de camundongos transgênicos para DH apresenta evidentes características de neurodegeneração que também incluem alterações citoplasmáticas e nucleares (IANNICOLA *et al.*, 2000). Além disso, Rub *et al.*, (2012), através de um estudo morfológico, observaram alterações em cerebelos humanos tais como a perda neuronal no córtex cerebelar, redução da camada de células de Purkinje de caráter leve até grave, relacionando essas alterações com distúrbios motores como marcha e equilíbrio.

Dentre os fatores discutidos como os responsáveis por desencadear o processo de neurodegeneração, estão a liberação excessiva e a recaptação ineficiente de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, o que promove a hiper-estimulação de seus receptores e, eventualmente, a morte neuronal (AARTS E TYMIANSKI, 2004; NICHOLLS, 2004).

1.3. A Neurotransmissão

As áreas de contato celular onde sinais são levados de um neurônio para outra célula são denominadas sinapses (Sir Charles Scott Sherrington). Em sinapses do tipo químicas, um sinal elétrico resultante da propagação de correntes iônicas é convertido em um sinal químico, representado pela liberação de neurotransmissores que irão atuar sobre a célula alvo (KATZ, *et al.*, 1966). A transmissão sináptica envolve a fusão de vesículas contendo neurotransmissores com a membrana plasmática seguida da ativação dos receptores pós-sinápticos. O processo de liberação do neurotransmissor pela exocitose das vesículas geralmente é repetido muitas vezes em um minuto e essa taxa é mantida durante toda a vida útil da sinapse (MURTHY; DE CAMILLI, 2003). Assim sendo, a transmissão sináptica é iniciada por potenciais de ação que são capazes de liberar os neurotransmissores na fenda sináptica (KATZ, 1969). Para isso, um potencial de ação irá induzir a abertura de canais para cálcio sensíveis a voltagem, resultando na exocitose de vesículas sinápticas (**Figura. 4**).

A zona ativa (Z.A) é a região na qual a membrana plasmática do terminal pré-sináptico está em contato íntimo com a membrana plasmática pós-sináptica, sendo caracterizada principalmente pelo aglomerado de vesículas e pela elétron densidade, ambos vistos no plano ultra estrutural (MURTHY; DE CAMILLI, 2003). Essas vesículas presentes na Z.A podem ser alocadas em três possíveis pools (ou aglomerados) de liberação: o pool prontamente liberável (Readily Releasable Pool - RRP), o pool de reciclagem (Recycling Pool - RP) e o pool de reserva (Resting Pool - RtP) (RIZZOLI & BETZ, 2005) (**Figura 5**).

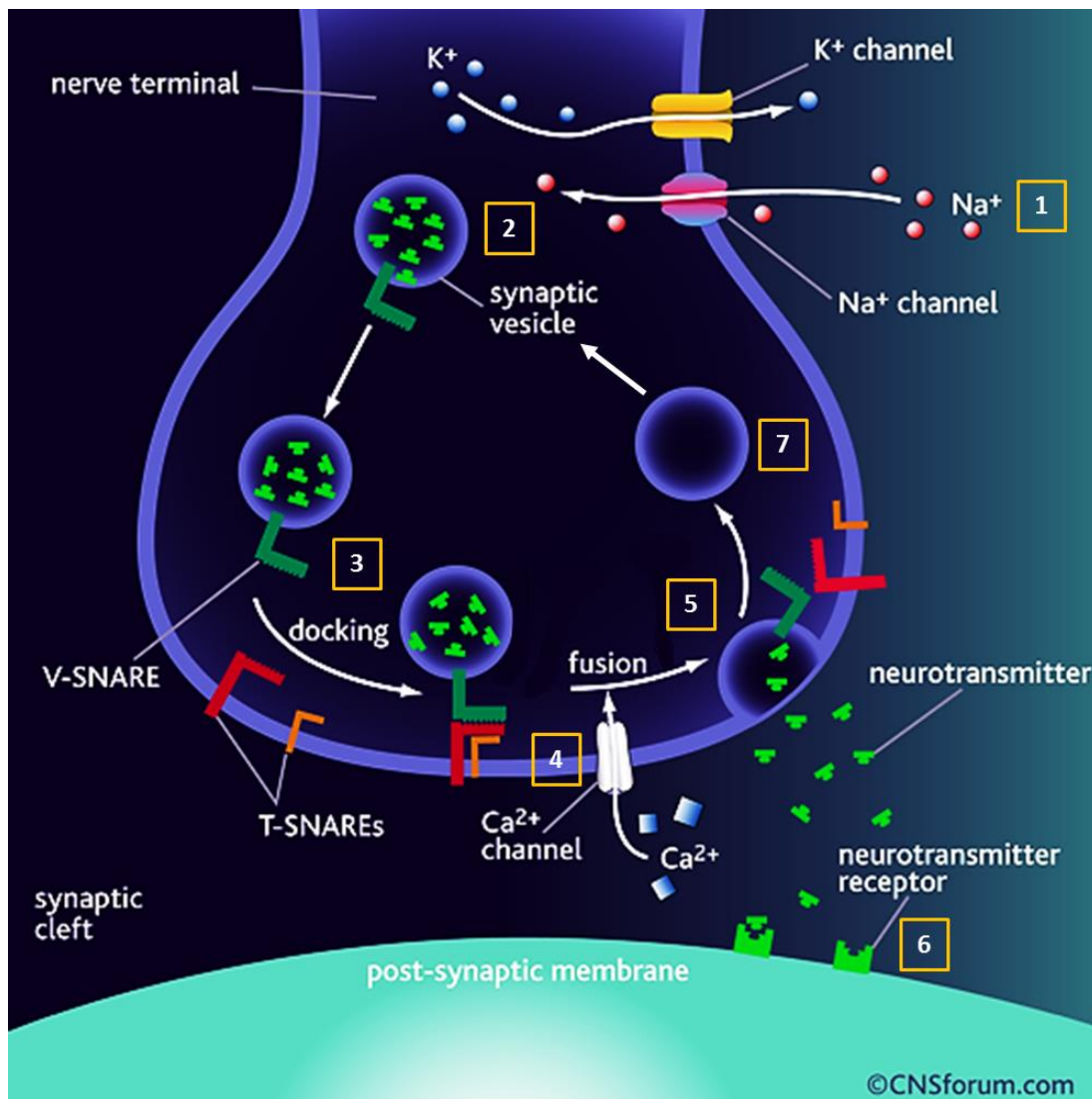


Figura 4: Etapas básicas da Neurotransmissão. 1. Despolarização da membrana da terminação nervosa, promovida pela abertura de canais para sódio sensíveis a voltagem; 2. mobilização de vesículas sinápticas contendo neurotransmissores; 3. vesículas sinápticas são direcionadas às Z.A, onde se ancoram (docking) e amadurecem (priming); 4. abertura de canais para cálcio sensíveis a voltagem com consequente aumento da concentração intraterminal desse íon; 5. fusão da membrana das vesículas com a membrana da terminação nervosa, o que ocasiona a exocitose das vesículas e liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica; 6. ligação das moléculas neurotransmissoras aos receptores específicos na membrana pós-sináptica; 7. endocitose compensatória das vesículas sinápticas, preenchimento com novas moléculas de neurotransmissores e início de um novo ciclo de exocitose/endocitose. Fonte: Figura adaptada de: CNS Forum.

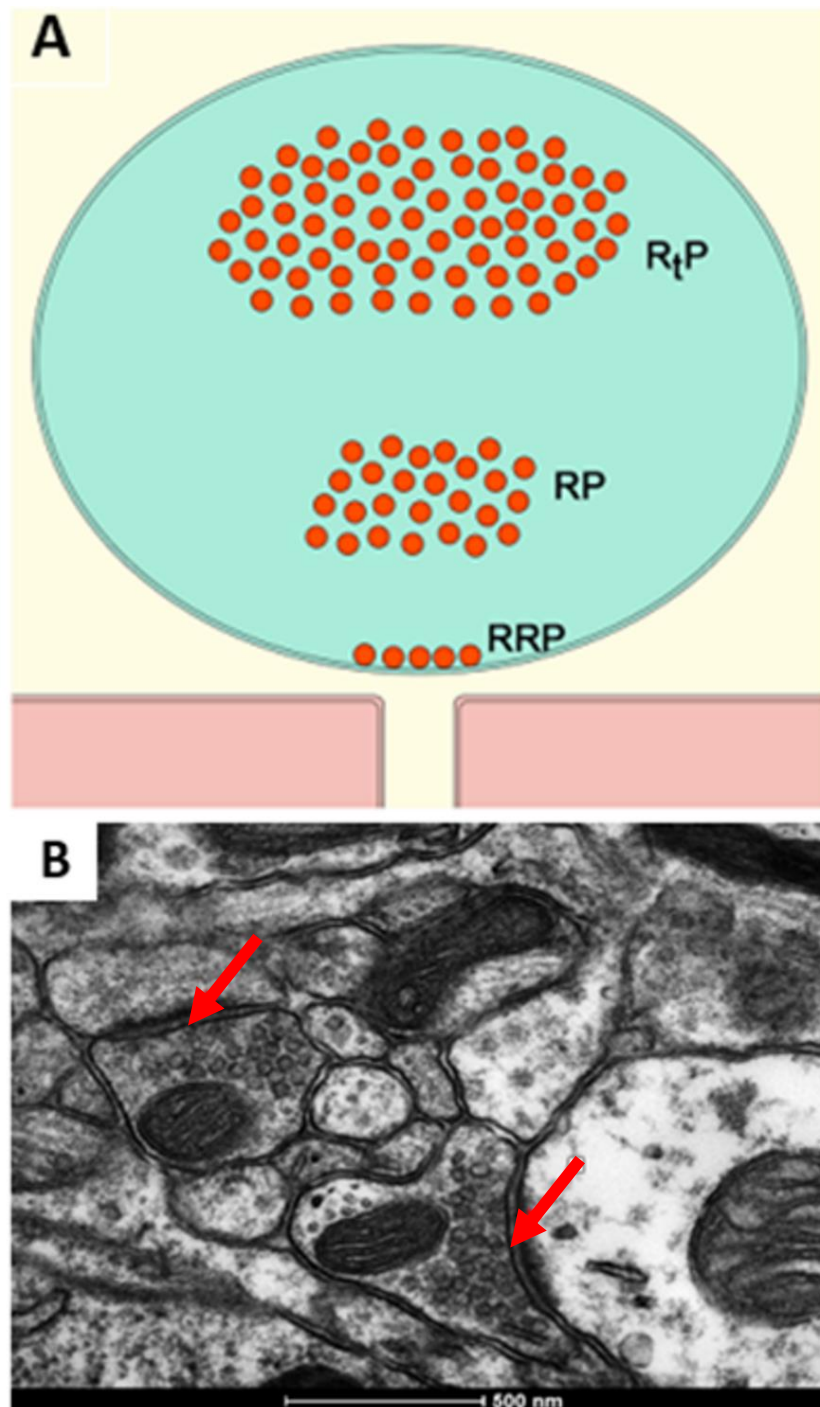


Figura 5: Representações de sinapses no SNC. A. Esquema representativo, mostrando os aglomerados de vesículas sinápticas (esferas de cor laranja) presentes no terminal nervoso (círculo verde) e suas disposições em relação à Z.A pré-sináptica (Adaptado de RIZZOLI AND BETZ, 2005) B. Micrografia eletrônica de sinapses mostrando o perfil de um terminal pré e pós-sináptico de camundongo, contendo numerosas vesículas, que não são anatomicamente separadas, conforme mostrado didaticamente em A. As setas em vermelho indicam a região denominada Z.A. (Jéssica Neves Andrade)

Todo esse processo de transmissão sináptica é realizado através de 5 eventos gerais importantes, que são: 1. Síntese e transporte dos neurotransmissores; 2. Aglomeração das vesículas sinápticas próximas a Z.A; 3. Ancoragem e exocitose das vesículas contendo os neurotransmissores; 4. Ligação dos neurotransmissores a receptores específicos na membrana pós-sináptica; 5. Um mecanismo para finalização da ação dos neurotransmissores (SÜDHOF, 2013). Diferentes tipos de transportadores específicos para cada neurotransmissor são responsáveis por realizar a captação do mesmo para dentro das vesículas. O glutamato, por exemplo, é captado por três: VGLUT-1 em (neurônios glutamatérgicos do hipocampo e córtex), VGLUT-2 em (neurônios glutamatérgicos do tálamo e tronco encefálico) e VGLUT-3 em (neurônios dispersos, frequentemente não associados com liberação de glutamato) (FREMEAU *et al.*, 2004 B; BLAKELY & EDWARDS, 2012).

Já é bem estabelecido que para ocorrer uma fusão eficiente das vesículas com a membrana, é necessária a interação de proteínas de membrana chamadas SNAREs (SOLLNER ET AL., 1993). As principais proteínas do complexo SNARE que atuam no processo de exocitose de vesículas são: Sinaptobrevina/VAMP 1 e 2 (v-SNAREs- vesicular SNAREs), Syntaxina e SNAP-25 (t-SNAREs- target SNAREs) (SÜDHOF, 2013). Embora muitas outras proteínas pareçam ter um papel crucial na exocitose de vesículas sinápticas, já está comprovado que as SNAREs representam a maquinaria mínima para a fusão (revisto por SÜDHOF, 2013).

A sinaptobrevina está presente na membrana da vesícula sináptica, já a syntaxina e SNAP-25 na membrana plasmática do terminal pré-sináptico. Outra proteína importante neste processo é a Sinaptotagmina I presente na membrana da vesícula sináptica (SOLLNER *et al.*, 1993). Apenas durante a maturação da vesícula, as proteínas SNAREs e Sinaptotagmina I iniciam suas interações. Assim, a sinaptotagmina I, quando na presença do íon cálcio (Ca^{2+}), sofre uma alteração conformacional, interagindo de maneira mais forte com proteínas do complexo SNARE, promovendo, dessa forma a abertura de um poro de fusão e liberação dos neurotransmissores (CHAPMAN, 2002) (**Figura 6**)

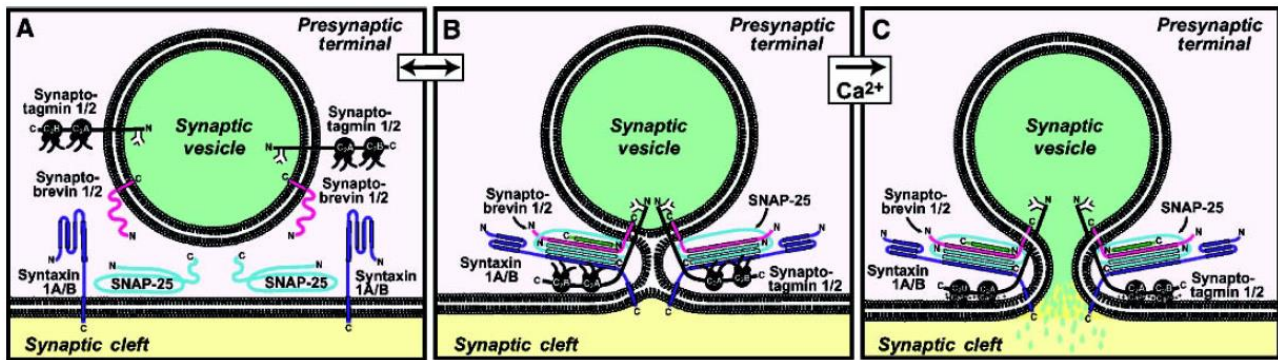


Figura 6: Esquema que mostra a atuação das proteínas do complexo SNAREs na exocitose de vesículas sinápticas. A. Sinaptotagmina I e Sinaptobrevina não interagem diretamente com SNAPs-25 e Sinataxinas. B. Durante a maturação da vesícula sináptica, formam-se complexos montados pela interação entre SNAREs e fosfolípidos da membrana. C. Ao ocorrer um aumento de Ca^{2+} intracelular, ocorre a abertura de um poro de fusão e consequente liberação dos neurotransmissores (Figura adaptada de SÜDHOF, 2004).

Ao finalizar a liberação do neurotransmissor, as vesículas sofrerão o processo de endocitose compensatória, sendo recicladas e então, novos neurotransmissores a preencherão iniciando um novo ciclo endo/exocitose. (WO *et al.*, 2014)

1.4. Neurotransmissão Glutamatérgica

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos e o seu papel neurotóxico é postulado como um fator importante na morte celular que ocorre na DH (YOUNG, 2003; LI & LI, 2004, DORIA, *et al*, 2013).

O potencial neurotóxico do glutamato é atenuado pelo mecanismo da sua recaptação, responsável por removê-lo da fenda sináptica. Após a ligação aos seus receptores, o glutamato é captado por transportadores de alta afinidade presentes nos astrócitos adjacentes à sinapse, evitando sua permanência no espaço extracelular (AARTS E TYMIANSKI, 2004). Ainda no astrócito, o glutamato é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintase. Então, as moléculas de glutamina são liberadas para o meio extracelular e transferidas por transportadores específicos para o terminal pré-sináptico, onde são re-convertidas em glutamato pela enzima glutaminase. Portanto, o ciclo glutamato-glutamina é o principal mecanismo de finalização da neurotransmissão glutamatérgica bem como fonte de manutenção dos níveis de glutamato, exercendo um efeito neuroprotetor (**Figura 7**) (JUN SHEN, 2013).

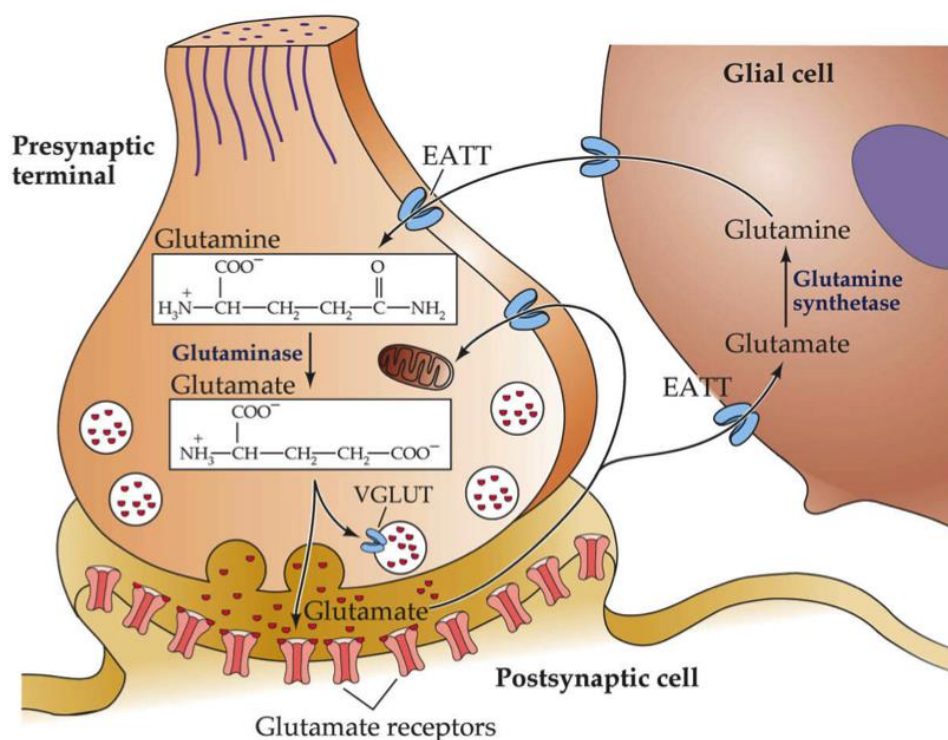
Atualmente, existem descritos dois tipos de receptores de glutamato: os ionotrópicos e os metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos NMDA, são canais iônicos, que se abrem com a ligação do glutamato, permitindo o influxo dos íons Ca^{2+} e sódio (Na^{2+}) (MASU *et al.*, 1991), já os mGluRs são receptores acoplados à proteína G (O'BRIEN, *et al.*, 2003).

O glutamato, quando se liga aos receptores metabotrópicos, possui ação modulatória, que pode ser tanto excitatória quanto inibitória (MASU *et al.*, 1991). Os receptores metabotrópicos de glutamato podem ainda ser subdivididos em três subgrupos (I, II e III), cada grupo com características próprias (O'BRIEN *et al.*, 2003; ANBORGH *et al.*, 2005).

Os mGluRs do grupo I (mGluR1 e 5) são acoplados à proteína $\text{G}\alpha_q$, promovendo ativação da fosfolipase C (PLC) (O'BRIEN *et al.*, 2003). Estes receptores estão presentes na região pós-sináptica, e sua ativação é acoplada à via do fosfatidilinositol (PI). A ligação do glutamato ao mGluR ativa a proteína $\text{G}\alpha_q$. Esta, ao ser ativada, sua subunidade α ativa a PLC que catalisa a hidrólise do lipídeo fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) (MASU *et al.*, 1991, RIBEIRO *et al.*, 2010; DORIA, J.G, 2013). O recrutamento da proteína quinase C (PKC) é feito pela

presença do DAG na membrana plasmática. O IP3, então, fica livre para se ligar aos receptores no retículo endoplasmático (RE) promovendo a liberação de Ca^{2+} para o citoplasma, e este atuará na ativação da PKC e de outras proteínas (MASU *et al.*, 1991 e RIBEIRO *et al.*, 2010).

Os receptores mGluR1/5 ao serem ativados, além da via supracitada, podem ativar vias fundamentais para andamento de processos importantes como proliferação e sobrevivência celular através da ativação de outras vias de proteínas como as quinases serina/treonina (AKT) e proteínas quinase reguladas por sinais extracelulares (ERK) (**Figura 8**) (MASU *et al.*, 1991; O'BRIEN *et al.*, 2003). A ativação do mGluR5 portanto, leva a formação de um complexo que através de uma cascata de reações fosforila a proteína AKT (MAO *et al.*, 2005).



NEUROSCIENCE, Third Edition, Figure 6.6 © 2004 Sinauer Associates, Inc.

Figura 7: Imagem representativa de uma sinapse química Glutamatérgica. O glutamato que é liberado na fenda sináptica pode sofrer receptação através de transportadores específicos em neurônios e em células gliais. A glutamina ao ser liberada por células gliais é recaptada pelos neurônios e convertido em glutamato. A glutamina é transportada para dentro dos neurônios através de transportadores para aminoácitos excitatórios (EATT) e armazenado em vesículas por transportadores VGLUTs.

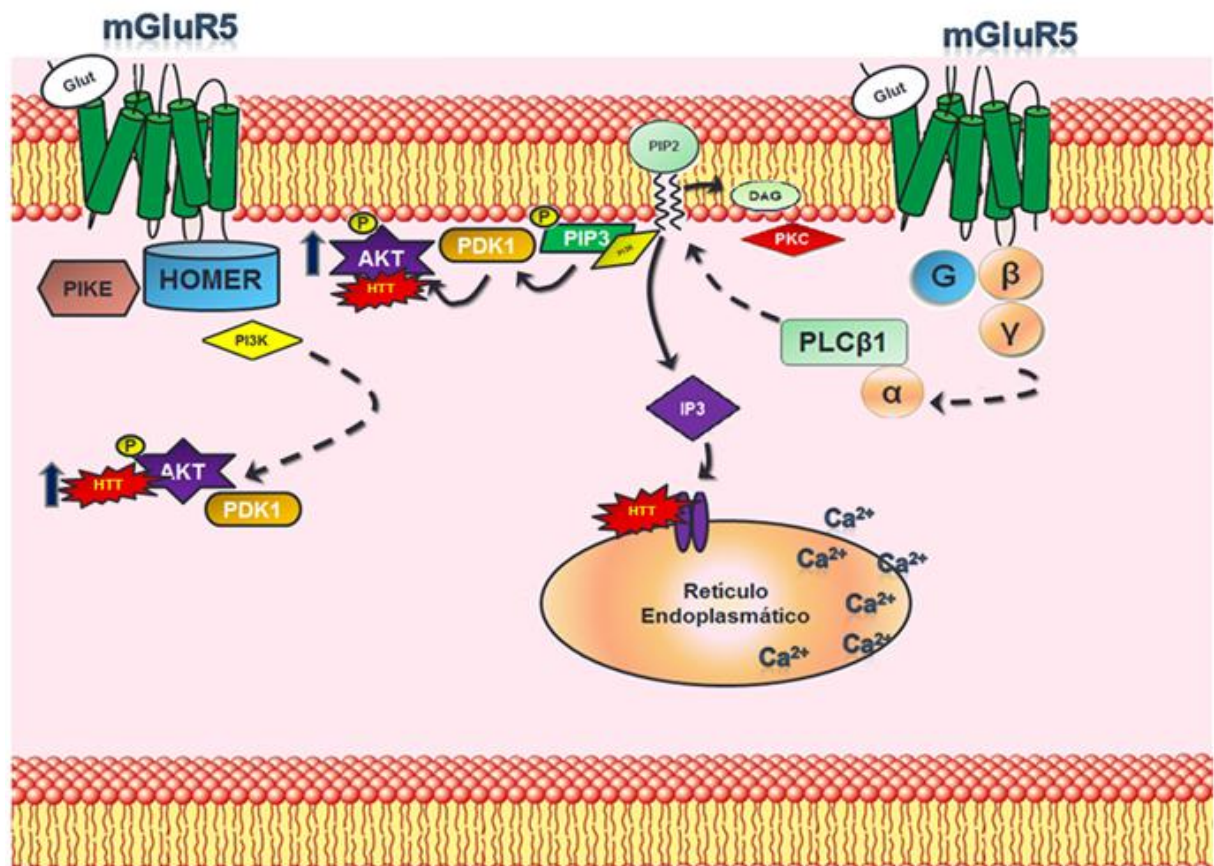


Figura 8: O mGluR5 participa do processo de ativação da proteína AKT. O neurotransmissor glutamato promove a ativação da proteína Gαq ao se ligar ao seu receptor mGluR/5, essa ligação leva a ativação da PLC. A PLC hidrolisa o PIP2 em DAG e IP3. A PKC por sua vez, é recrutada pela DAG da membrana. Após a ativação de PKC, o IP3 irá então se difundir e se ligar a seus receptores presentes na membrana do retículo endoplasmático. Além disso, a fosforilação da proteína AKT ocorre pela interação do mGluR5 com a proteína HOMER (DORIA, J.G, 2013)

1.5 Excitotoxicidade glutamatérgica e a doença de Huntington

Excitotoxicidade consiste no processo pelo qual aminoácidos excitatórios (EAAs) levam a neurodegeneração, sendo assim o mecanismo primário de muitas doenças agudas e crônicas que envolvem o SNC. A liberação excessiva e problemas no processo de recepção dos neurotransmissores excitatórios irão promover a hiperexcitabilidade dos seus respectivos receptores levando à morte neuronal (AARTS & TYMIANSKI, 2004; NICHOLLS, 2004).

Existem duas hipóteses principais que discutem como a htt mutada poderá levar à morte neuronal na DH. Uma delas é a formação de agregados intranucleares e outra a excitotoxicidade (TANG *et al*, 2005). Baseados em estudos, Tang e colaboradores (2005), mostraram que a htt mutada é capaz de promover uma sensibilização dos receptores NMDA aumentando o influxo de Ca^{2+} citosólico. Além disto, a htt também interage com o receptor IP3 presente no retículo endoplasmático contribuindo para liberação de Ca^{2+} dessa organela. A htt também se liga a mitocôndria, diminuindo a capacidade dessa organela de armazenar o Ca^{2+} citosólico (TANG *et al*, 2005). Assim sendo, ocorre a liberação de citocromo-c para o citosol levando a ativação de vias apoptóticas como vias de caspases. Esse processo mostra que pelo menos em parte, a morte dos neurônios na DH resulta da perda da capacidade de armazenamento de Ca^{2+} pelas mitocôndrias (**Figura 9**) (TANG *et al*, 2005)

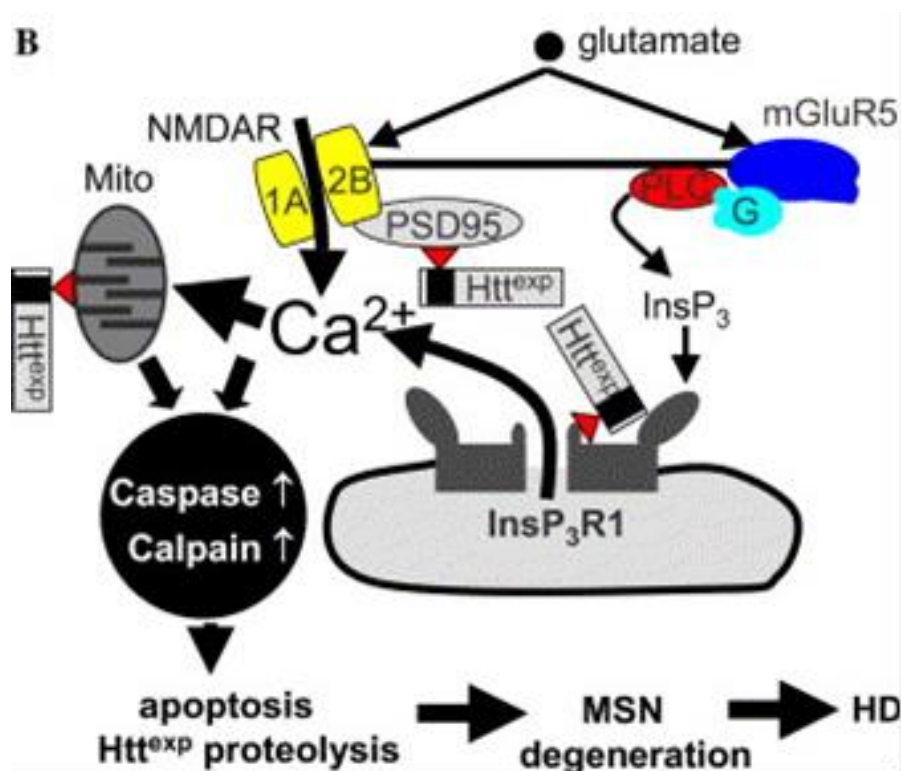


Figura 9: Mecanismos propostos para ação da htt que interfere na sinalização de Ca^{2+} e apoptose celular. A htt interage com receptores NMDA, sensibiliza receptores IP3 presentes na membrana do retículo endoplasmático, interfere na ação de tamponamento dos íons Ca^{2+} pelas mitocôndrias, levando a ativação de vias apoptóticas, como caspase e calpaína e consequentemente morte celular (TANG *et al*, 2005)

A estimulação do mGluR5 leva a formação de IP3 e consequente liberação de Ca^{2+} intracelular. A htt mutada tem capacidade de atuar nessa via de sinalização, levando a níveis tóxicos de Ca^{2+} intracelular. No entanto, a estimulação do mGluR5 também é capaz de promover a ativação de vias de sinalização envolvendo proteínas como ERK e AKT que consequentemente aumentam a sobrevivência celular (**Figura 10**) (RIBEIRO *et al*, 2010 e DORIA *et al*, 2013).

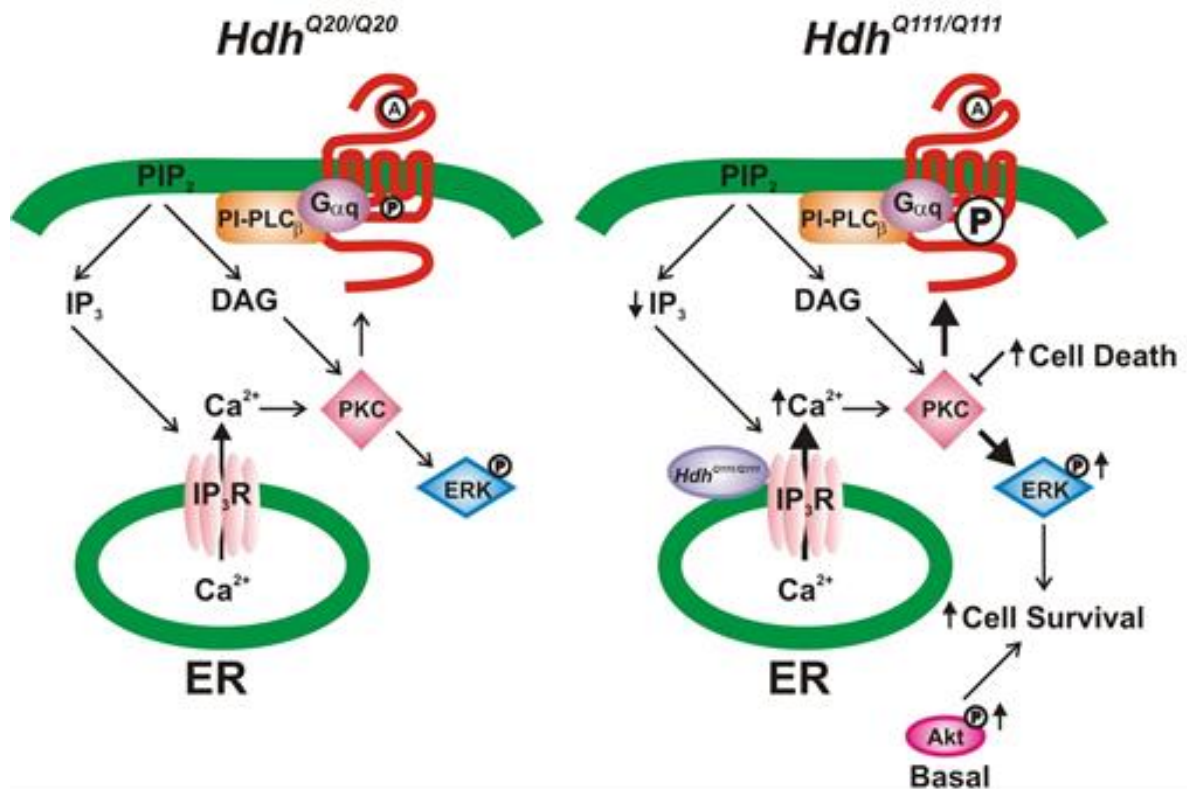


Figura 10: Representação esquemática do modelo proposto para sinalização do mGluR5 e alterações na DH. Os receptores mGluR5 estão acoplados a proteínas Gαq e sua ativação leva a formação de DAG e IP₃ resultando na liberação de Ca²⁺ intracelular e ativação de PKC, bem como de ERK e AKT. No modelo de camundongo Hdh Q111-Q111, a formação de IP₃ é reduzida pela dessensibilização dos receptores de mGluR5, mediada por PKC. Camundongos Q111 / Q111, quando comparados aos camundongos normais Hdh Q20 / Q20, apesar da diminuição da formação de IP₃, a liberação de Ca²⁺ está aumentada, juntamente com o aumento das vias de sinalização que promovem a sobrevivência celular, como ERK e AKT (RIBEIRO *et al*, 2010).

1.6 CDPPB,

De Paulis e colaboradores, (2008) demonstraram que Moduladores Alostéricos Positivos (MAPs) de mGluR5 como CDPPB podem privilegiar a ativação de uma via de sinalização em detrimento da outra.

Em 2005, Kinney e colaboradores descreveram o CDPPB como MAP para o mGluR5. CDPPB foi desenvolvido com base na droga N-[4-Chloro-2-[(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl]phenyl]-2-hydroxybenzamide (CPPHA). No entanto, o perfil de solubilidade de CPPHA não foi adequado para realização de estudos *in vivo*. Dentre os diversos estudos realizados nesse trabalho de 2005, Kinney mostrou que CDPPB é permeável no cérebro de camundongos, sendo testado em pesquisas comportamentais que avaliaram a eficácia da administração sistêmica de CDPPB em dois sistemas pré-clínicos sensíveis ao tratamento com medicamentos antipsicóticos. Esses estudos forneceram a primeira evidência *in vivo* que a modulação alostérica positiva desse receptor, resulta, de maneira consistente em eficácia no comportamento de roedores.

Afim de se investigar de forma mais aprofundada acerca dos efeitos desses MAPs sobre os modelos da DH, em 2013, DORIA e colaboradores avaliaram a capacidade da droga CDPPB em proteger os neurônios contra a morte induzida por glutamato. Southwell *et al.*, (2009) demonstraram que os camundongos BACHD possuíam comprometimento cognitivo, dessa forma, Doria *et al* (2015) avaliaram o desempenho dos camundongos BACHD, em testes de reconhecimento de objetos, que foram submetidos a um tratamento subcrônico com CDPPB. O resultado mostrou que após o tratamento com CDPPB o desempenho dos camundongos BACHD se equiparava ao desempenho dos camundongos WT. Isso mostra que CDPPB era capaz de reverter parcialmente o dano cognitivo causado pela *htt* mutada.

Em 2013, Doria e colaboradores investigaram, através de um ensaio de morte celular, a eficácia do CDPPB em reduzir a morte neuronal (neuroproteção) induzida por um insulto glutamatérgico (excitotoxicidade glutamatérgica). Este mesmo experimento, posteriormente, foi realizado a fim de avaliar a concentração ótima de CDPPB para o tratamento *in vivo*. Realizou-se, portanto, uma curva dose-resposta usando CDPPB e descobriu-se que este modulador alostérico para os mGluR5 (CDPPB) é uma droga

potencialmente neuroprotetora pois foi capaz de proteger os neurônios contra o insulto de glutamato mesmo em baixas concentrações (DORIA *et al.*, 2015). Desta forma estabeleceu-se a concentração para o tratamento *in vivo*.

Como já mencionado, as regiões corticais, estriatais e hipotalâmicas do cérebro estão entre as mais atingidas e estudadas na DH. Sendo assim, também se investigou nessas três regiões, se a administração crônica de CDPPB, nos camundongos BACHD, seria capaz de induzir um aumento nos níveis do mRNA para o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e também, aumentar as vias de sinalização que promovem sobrevivência celular, ERK e AKT. O tratamento crônico com CDPPB, foi capaz de aumentar os níveis de BDNF apenas no córtex, no entanto, a expressão ERK e AKT foi aumentada no córtex e hipocampo e um aumento de AKT foi também observado no corpo estriado. Dessa forma, verifica-se que a modulação no mGluR5 é capaz de promover maior sobrevivência neuronal (DORIA, *et al.*, 2015).

Uma vez demonstrado que o tratamento crônico com CDPPB, aumenta a expressão do BDNF, juntamente com uma maior ativação das vias de sobrevivência celular, ERK e AKT, se investigou se esses resultados refletiriam em uma real sobrevivência celular. Para tanto, foi realizada uma análise histológica do corpo estriado, buscando identificar se o tratamento com CDPPB levaria a uma maior proteção das células dessa importante região do encéfalo. Assim, mostrou-se que camundongos BACHD tratados com veículo (salina) exibiram um número de células reduzidos no estriado em comparação com os camundongos WT. No entanto o número de células do corpo estriado de camundongos BACHD tratados com CDPPB, apesar de não mostrar diferença em relação aos BACHD salina, não foi diferente dos WT, indicando que realmente o CDPPB, exerce uma neuroproteção nessa região (**Figura 11**).

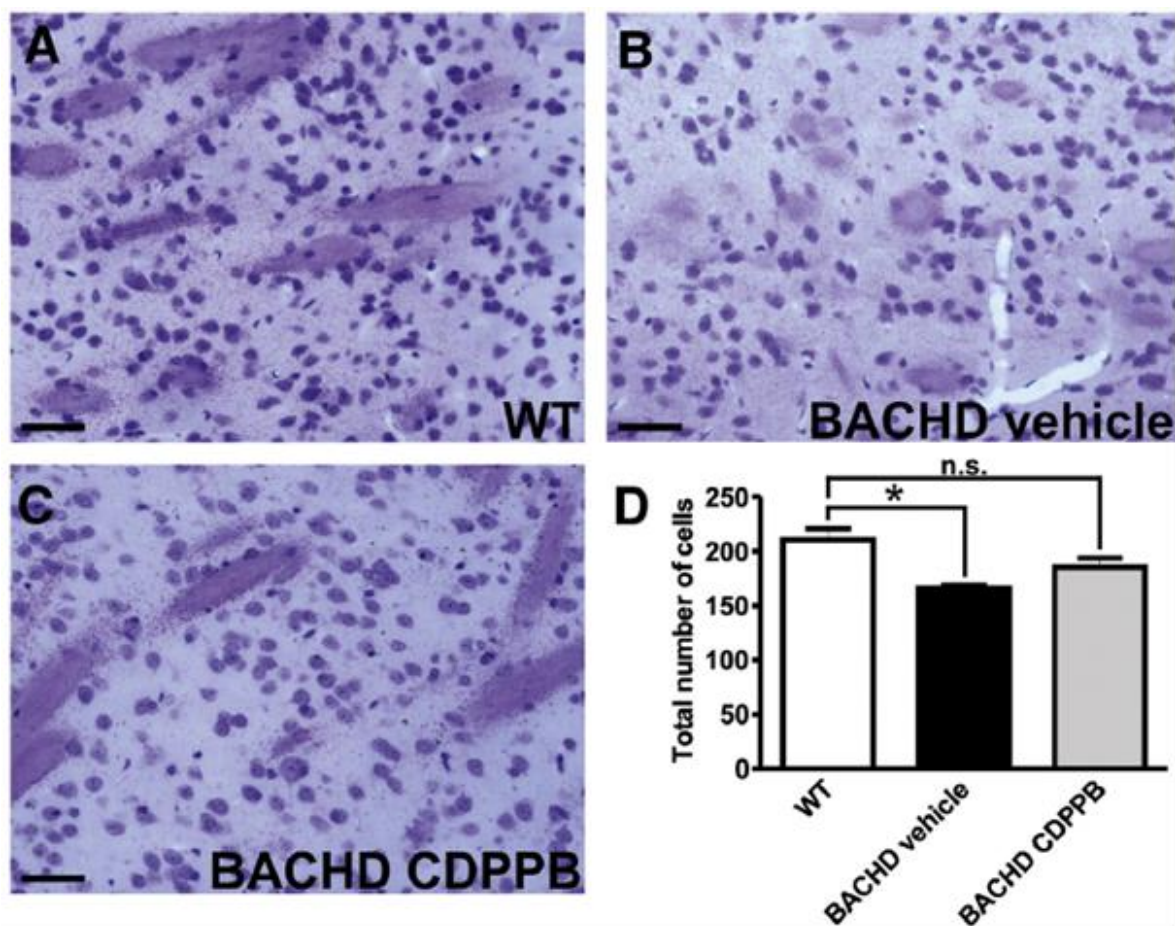


Figura 11: Análise histológica do número de células no corpo estriado de camundongos BACHD tratados com CDPPB. Imagens representativas do estriado de camundongos WT (A), BACHD tratados com salina (B) e BACHD tratados com CDPPB (C). (D). Gráfico que mostra a quantificação do número total de células encontradas no corpo estriado de WT, BACHD salina e tratamento com veículo e BACHD tratado com CDPPB. "N.s." indica que não há diferença significativa comparada com WT e * indica diferença significativa comparada com WT. (Jéssica Neves Andrade - em colaboração ao trabalho de DORIA *et al.*, 2015 – ANEXO 2).

Assim sendo, afim de se realizar uma análise mais detalhada da morfologia das sinapses, a região do corpo estriado do cérebro de camundongos WT, BACHD tratado com salina e BACHD tratado com CDPPB foram submetidas, ao processamento para a técnica de MET. A análise geral da ultraestrutura indicou que não havia uma diferença drástica na morfologia neuronal entre os grupos experimentais no que se refere a neurópila, contatos pré e pós-sinápticos e organelas.

Em relação ao número total de vesículas presentes dentro do terminal, também não houve diferença, embora os resultados destas análises indicarem que camundongos

BACHD possuem uma tendência para diminuição no número de vesículas em relação aos WT. O número de vesículas na Z.A é outro parâmetro importante que foi mensurado, devido a sua capacidade de influenciar diretamente a liberação de neurotransmissores. Camundongos BACHD tratados com salina exibiram uma redução no número de vesículas sinápticas na Z.A quando comparados com camundongos WT. No entanto, o tratamento com CDPPB parece ser capaz de parcialmente reverter esse déficit, uma vez que o número de vesículas na Z.A de camundongos BACHD tratados com CDPPB não foi diferente dos WT (**Figura 12**) (DORIA *et al.*, 2015).

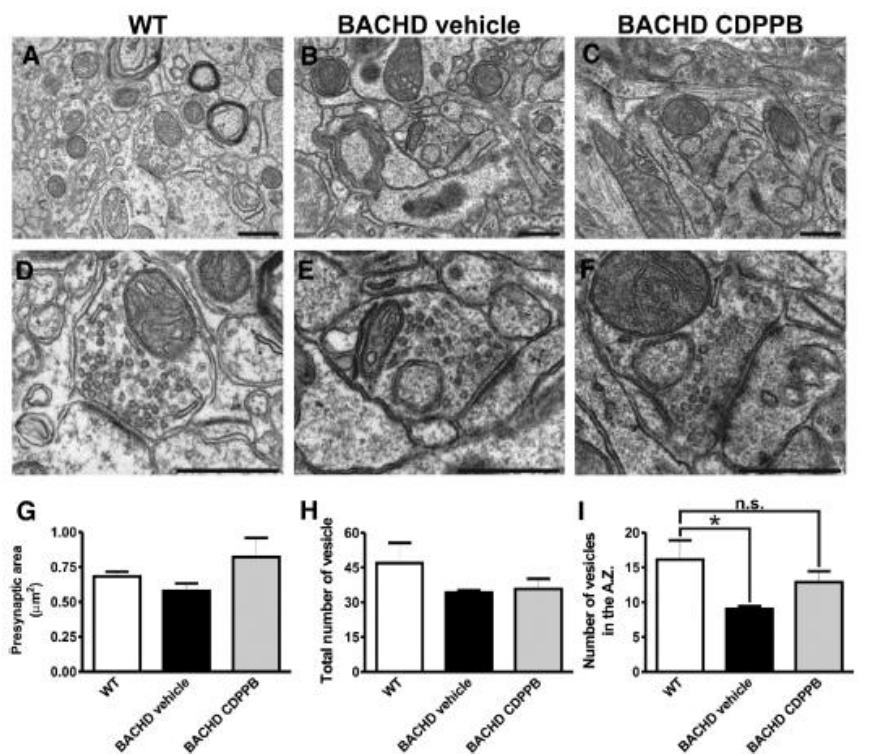


Figura 12: O tratamento com CDPPB normaliza parcialmente o número de vesículas sinápticas na Z.A de camundongos BACHD. A. Micrografias panorâmicas do estriado de camundongos WT, B. camundongos tratados com salina e C. camundongos tratados com CDPPB. Em D, E e F, respectivamente, a ampliação em 50.000x dos terminais pré-sinápticos dos animais WT, BACHD tratado com salina e BACHD tratado com CDPPB. Gráficos mostrando a quantificação da área da secção transversal de terminais pré-sinápticos (G), o número total de vesículas por terminal pré-sináptico (H) e "N.s." indica que não há diferença significativa comparada com WT e * indica diferença significativa comparada com WT. (Jéssica Neves Andrade - em colaboração ao trabalho de DORIA *et al.* (2015)- **ANEXO 2**)

Dessa forma, é importante ressaltar que o tratamento com CDPPB tem a capacidade de melhorar esse déficit, o que pode, por exemplo, ajudar a normalizar a liberação de BDNF no estriado, bem como a liberação de neurotransmissores importantes para processos de memória e cognição, por exemplo, (DORIA *et al.*, 2013).

Portanto, visto a importância e relevância do tratamento com CDPPB em camundongos transgênicos BACHD, este estudo dará continuidade as análises previamente iniciadas por Doria *et al.* (2015), realizando assim, avaliações morfométricas, utilizando as técnicas de histologia de rotina e MET, as quais serão aplicadas em outras regiões do SNC (córtex, hipocampo e cerebelo), onde avaliaremos os possíveis efeitos do tratamento crônico com CDPPB, nos camundongos BACHD tratados com salina em relação aos camundongos WT.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar nos planos óptico e ultraestrutural, as possíveis alterações induzidas pela htt mutada em regiões do SNC de camundongos BACHD (modelo transgênico para DH), tratados ou não com uma droga neuroprotetora (CDPPB).

2.2. Objetivos Específicos

1) Realizar análises histológicas qualitativas e quantitativas nas regiões do Córtex, Hipocampo e Cerebelo, comparando o grupo de WT, com o grupo de animais transgênicos para a DH tratado com salina (BACHD SALINA) e o grupo de animais transgênicos para a DH tratado com a droga CDPPB (BACHD CDPPB).

2) Avaliar qualitativamente através de microscopia eletrônica de transmissão, o padrão morfológico dos corpos celulares sobreviventes na região do Córtex nos grupos WT, BACHD SALINA e BACHD CDPPB.

3) Realizar análises ultraestruturais das sinapses nas regiões do Córtex, Hipocampo nos grupos WT, BACHD SALINA e BACHD CDPPB.

3. Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População e amostra

Um desafio principal no estudo da patogênese e tratamento da DH é o desenvolvimento de modelos de doenças que recapitulam ambos os aspectos, genéticos e fenotípicos da doença, permitindo assim, através de mutações genéticas compreender os mecanismos da doença e, finalmente, o desenvolvimento de terapias eficazes.

A **Tabela 1** exemplifica os modelos de camundongos gerados para estudos com a DH.

Constructo	R6/2	N171-82Q	Hdh111	CAG140	HdH(CAG)150	YAC128	BACHD
Tipos	Transgênico	Transgênico	Knockin	Knockin	Knockin	Transgênico	Transgênico
Promotor	HTT humana	Prion murino	HdH murino	HdH murino	HdH murino	HTT humana	HTT humana
Repet. PolyQ	150CAG	82CAG	111CAG	140CAG	150CAG	128CAG	97CAA/CAG
Estabilidade	Instável	Instável	Instável	N.D	N.D	N.D	Estável

Tabela 1: Descrição dos principais modelos de camundongos utilizados para estudos relacionados com a DH (Adaptado de YANG, GRAY, 2011)

Para realização deste trabalho, utilizamos um modelo animal, transgênico para a Doença de Huntington, os camundongos BACHD, os quais foram gerados utilizando como linhagem padrão os camundongos FVB/N-Tg, adquiridos no *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA). Sua geração foi através da injeção de um cromossoma bacteriano artificial que contém o comprimento total da htt humana modificada, totalizando 97 repetições de CAG. Camundongos BACHD reproduzem um padrão de agregação da htt que leva a um déficit motor progressivo e seletiva neuropatologia, apresentando modificações anatômicas e fisiológicas que se assemelham com o início da doença na idade adulta. Esse modelo é geneticamente estável, de forma que o número de repetições de CAG se mantém constante nas várias gerações, ou seja, não apresenta instabilidade em suas repetições. Assim, estes camundongos apresentam-se como uma nova e robusta ferramenta para o estudo de novas formas de tratamento para a DH (GRAY *et al.*, 2008).

A população foi constituída, portanto, pelos camundongos WT e BACHD que foram divididos em dois grupos de tratamentos: um grupo tratado com solução salina e outro com a droga CDPPB e camundongos WT. A amostra foi constituída por no mínimo,

três trincas de animais (n=3) (3 animais WT, 3 animais BACHD SALINA e 3 animais BACHD CDPPB).

3.2 Administração da droga

CDPPB foi dissolvido em dimetil-sulfoxido (DMSO) e continuamente liberado por um implante subcutâneo de uma bomba micro-osmótica (modelo 2006, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany), Alzet® (**Figura 13**). A velocidade de liberação da bomba foi de 0,15µl/h, sendo que a droga foi bombeada durante 6 semanas. Após esse período, as mesmas eram trocadas para continuação do tratamento. Tanto o veículo (DMSO) ou CDPPB entregaram continuamente aos animais 1,5mg/kg s.c. por dia num total de 18 semanas.

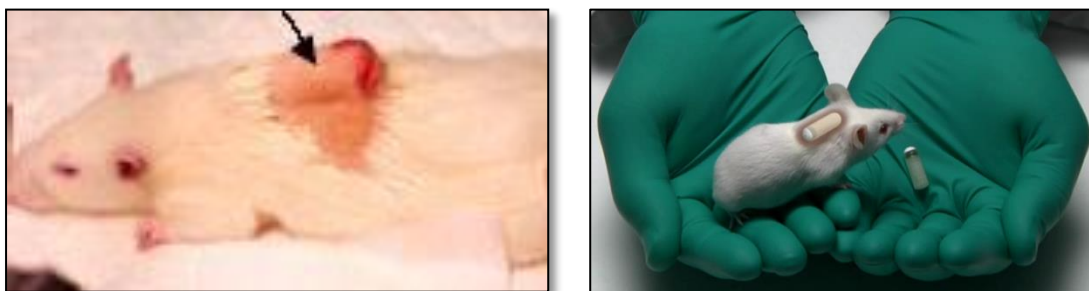


Figura 13: Imagem da implantação subcutânea de uma bomba micro-osmótica em um camundongo. Essa bomba possui a capacidade de liberar 0,15µl/h da droga, totalizando 1,5mg/Kg por dia. Repare a seta preta, indicando o local de inserção da bomba. Adaptado de: (http://www.alzet.com/products/ALZET_Pumps/index.html). Acesso em: 29 de Julho de 2016.

3.3 Obtenção do material

Para o desenvolvimento do estudo foram utilizadas as regiões do SNC a saber: Córtex, Hipocampo e Cerebelo, sendo o córtex uma das principais regiões acometidas pela doença. No entanto, todas as regiões que foram analisadas neste trabalho, são também extensivamente estudadas por diversos grupos de pesquisa que avaliam as doenças neurodegenerativas (GUAN *et al*, 2014). De acordo com a literatura sabe-se que os efeitos da htt mutante em neurônios corticais desempenha um papel crítico na disfunção neuronal no corpo estriado na doença de Huntington e no seu

comprometimento neurológico (LAFORET, *et al.*, 2001). Para a coleta das amostras, os camundongos foram anestesiados com ketamina/xilazina (70/10mg/kg) i.p. e perfundidos através do sistema cardiovascular, primeiramente com solução de tampão fosfato (PBS) seguido da solução de tampão de cacodilato de sódio 0.1M, contendo paraformaldeído 4,0% e glutaraldeído 2,5% (pH 7.4) (solução fixadora de Karnovsky modificada). Os cérebros perfundidos foram mantidos no fixador Karnovsky por no mínimo 24hs à 4°C. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do CETEA-UFMG e estão registrados sob o protocolo número 3/2011, (**ANEXO 1**).

3.4 Histologia de rotina

Após a fixação com solução de Karnovsky modificado (1963), as regiões de interesse do cérebro foram lavadas 3x em solução PBS (0,1M). Em seguida, foram submetidos à desidratação em série ascendente de álcool (álcool 70%, 80%, 95% e mais um banho em 95%, 30minutos cada). Após a desidratação, as amostras foram imersas em solução 1:1 de álcool 95% e resina glicol metacrilato (Leica Histoiresin) por 24 horas a 5°C. Em seguida, as amostras infiltradas em resina pura (Leica Histoiresin) para posterior inclusão. A inclusão foi feita utilizando-se a resina pura adicionando-se a solução polimerizante na proporção: 15mL de resina glicolmetacrilato para 1 mL da solução polimerizante. As regiões do cérebro foram orientadas nos moldes para permitir a secção transversal dos mesmos e em seguida embebidos na solução de inclusão. Para completa polimerização, os blocos permaneceram por, no mínimo, 24 horas em temperatura ambiente ou em estufa a 42°C. Após inclusão, os blocos foram colocados em suportes para micrótomo e cortados utilizando-se navalhas de vidro (Leica). As regiões de interesse foram cortadas a 5 µm de espessura utilizando um micrótomo (Leica Reichert-Jung®) localizado no laboratório de Neurobiologia (Professora Conceição Machado), no Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Os cortes foram distendidos em água destilada, na temperatura ambiente, e logo em seguida transferidos para lâminas de vidro. As lâminas contendo as secções eram colocadas em chapa quente a 70°C por 15minutos para secagem e adesão e distensão máxima dos cortes. Após essa etapa, os cortes foram corados com solução de Violeta de Cresil acética (Sigma-Aldrich) por uma hora. Os cortes foram então imersos 5x em álcool 95% para obtenção da intensidade de coloração desejada. Em seguida, as lâminas foram montadas com lamínulas utilizando meio de montagem Entellan Mounting Medium (Merck®). Em cada lâmina foram colocados até

5 cortes, e para análise escolhíamos 3 cortes por animal, considerando um mínimo de 3 animais por grupo experimental, gerando um total de no mínimo 9 cortes e um total de 54 imagens por grupo experimental.

3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após fixadas, as amostras foram recortadas em fragmentos com aproximadamente 4mm de comprimento de forma aleatória e foram pós fixadas em tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato 0.1M (pH7,4) por 90 minutos a 4°C. Foi adicionado à solução o ferrocianeto de potássio na concentração de 1,6% (solução de tetróxido de ósmio reduzido) que evidencia as membranas celulares. Assim, os tecidos foram lavados em tampão cacodilato 0.1M por três vezes em banhos de 10 minutos em temperatura ambiente. Após este tempo, as amostras foram submetidas a contrastação “em bloco” por imersão em acetato de uranila 2% *overnight* à 4° C. Após esse período, os tecidos foram lavados com água deionizada por 10 minutos em temperatura ambiente e desidratados em uma série ascendente de etanol (35, 50, 70, 85, 95 e 100%) e acetona absoluta à temperatura ambiente. Foi realizado uma pré-infiltração em resina epon diluída em acetona, nas respectivas proporções: 1:2, 1:1 e 2:1, na ausência do polimerizador. Por fim, os fragmentos foram infiltrados e incluídos em resina epon, contendo o polimerizador DMP-30, por no mínimo 2 horas à temperatura ambiente, 1 hora em estufa de 40° C e 48 horas em estufa de 60° C. Após a polimerização dos blocos de resina contendo os fragmentos do tecido foi realizada a ultramicrotomia com navalha de vidro (cortes semifinos de 300 nm) para seleção das áreas de interesse (**Figura 14 A**) e, em seguida, a ultramicrotomia com navalha de diamante (cortes ultrafinos de 50 nm) apenas da região selecionada. Os cortes foram montados em telas de cobre de 200 ou 300 mesh (**Figura 14 B**) e essas telas foram contrastadas com citrato de chumbo (solução de Reynolds) para posterior visualização (**Figura 14 C**).

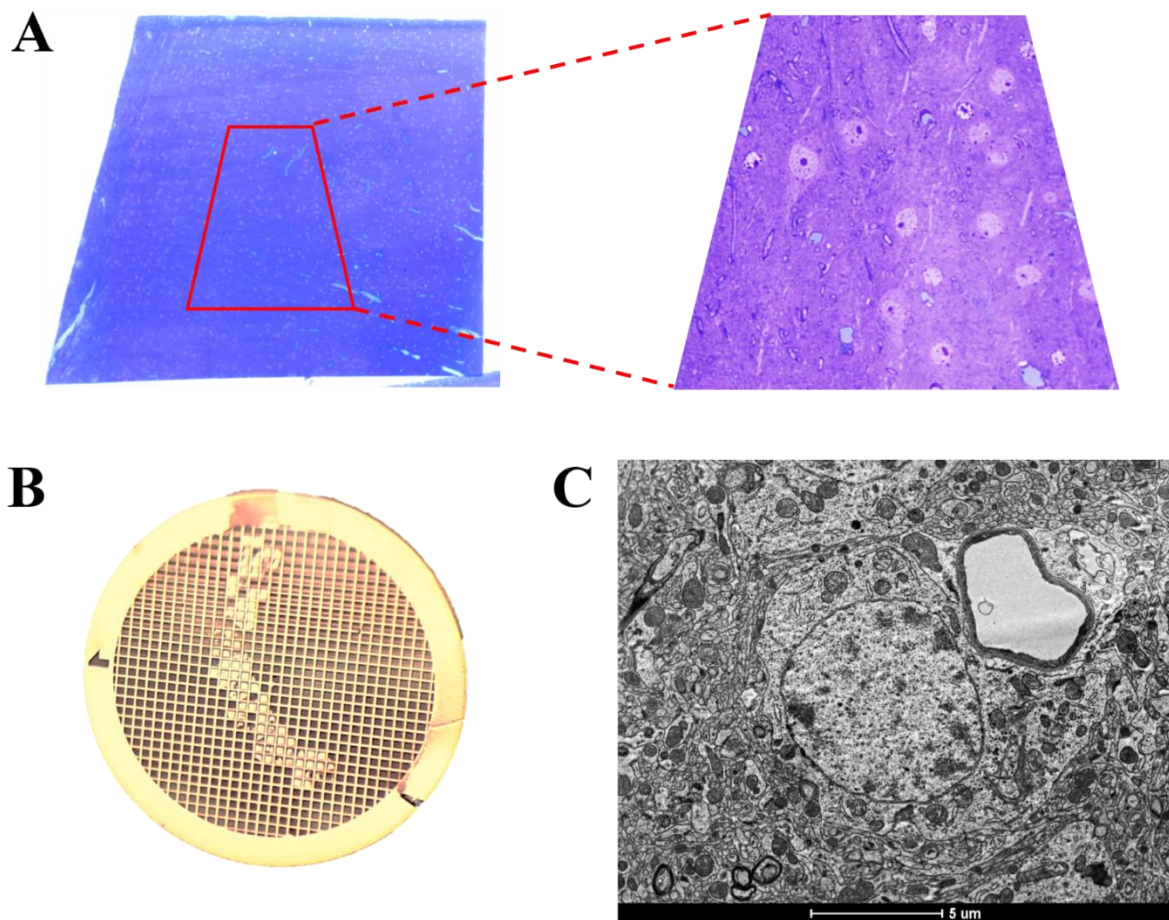


Figura 14: Etapas da microtomia para MET. A. Após a confecção das pirâmides nos blocos contendo o tecido, o mesmo foi cortado em secções semifinas de 300 nm (A). Esses cortes foram distendidos em lamínas de vidro e corados com azul de toluidina para seleção da área de interesse. Veja em destaque a área selecionada onde foi confeccionada a ultra pirâmide para realização dos cortes ultrafinos de 50 nm. Note a presença de vários corpos celulares. B. Os cortes ultrafinos foram montados em telas de cobre e foram contrastados em solução de citrato de chumbo. C. As telas contendo os cortes foram visualizadas no microscópio eletrônico de transmissão. Na imagem representativa observe a presença de um corpo celular, sinápses, vasos sanguíneos e bainha de mielina (Jéssica Neves Andrade)

3.6 Aquisição e análise das imagens

As imagens dos cortes de tecidos processados para histologia de rotina foram adquiridas utilizando um microscópio óptico Axioplan 2 Carl Zeiss (localizado no laboratório de Neurobiologia, Profa. Conceição Machado, no Departamento de Morfologia do ICB, UFMG). Os cortes foram fotografados utilizando objetivas de 20x e 40x dependendo do tipo de tecido para garantia de uma melhor identificação das estruturas de interesse. Considerando a utilização de 3 animais por grupo experimental, analisamos em torno de 54 imagens por grupo. Utilizamos software Image J® e os dados morfométricos obtidos foram em relação ao número de células no córtex e hipocampo além do número de células de Purkinge presentes no cerebelo. Os dados coletados foram armazenados no programa Excel® e convertidos em representações gráficas através do programa GraphPad Prisma.

A aquisição das elétron-micrografias digitais dos cortes ultrafinos foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai-G2-Spirit-FEI/Quanta, com voltagem de aceleração de 120 kV do Centro de Microscopia da UFMG. A análise das imagens de MET e a mensuração dos perfis sinápticos (área de secção transversal) bem como a quantificação das vesículas sinápticas, foram realizadas utilizando-se os programas Image J, AxioVision 4.8 (Carl Zeiss) e Microsoft Excel. A densidade total de vesículas sinápticas foi calculada pela relação do número de vesículas pela área de secção transversa dos perfis sinápticos e a densidade de vesículas localizadas nos perfis de Z.A foi determinada pelo número de vesículas localizadas dentro de uma área circunscrita, com raio de 200nm, tendo como centro a região de Z.A pré-sináptica (**Figura 15**) (BECHERER *et al.*, 2001; HAN *et al.*, 2011).

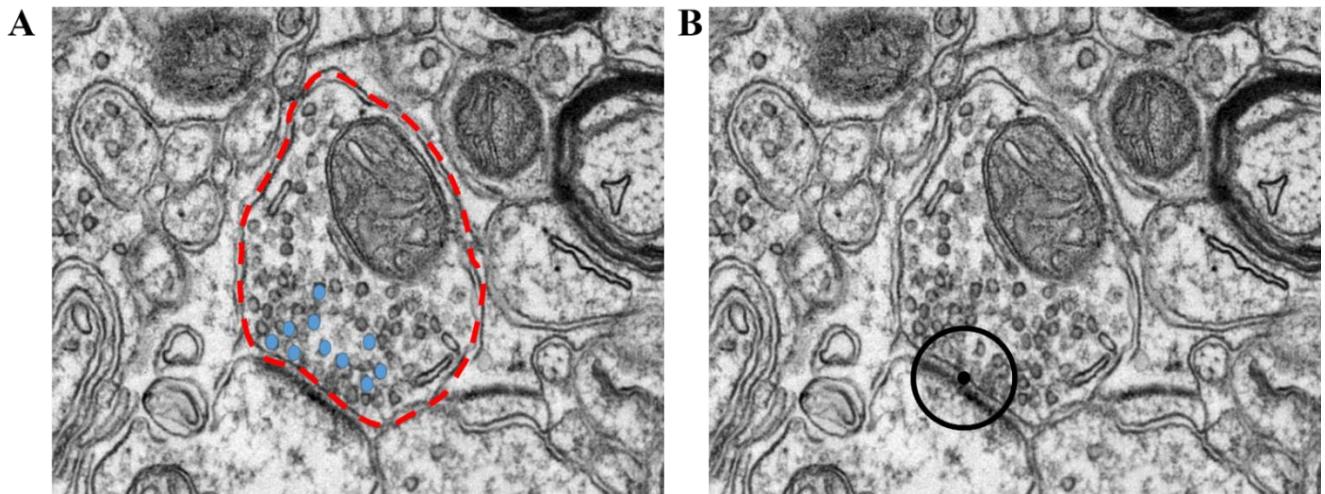


Figura 15: Representação da análise das imagens de MET. A. Análise da área do terminal pré-sináptico e da densidade de vesículas sinápticas por área. Em vermelho a delimitação da área pré-sináptica e em azul a representação da contagem total de algumas vesículas para estimação da densidade. B. Análise do número de vesículas a 200nm da Z.A. O círculo utilizado para análise possui o centro posicionado na Z.A do terminal pré-sináptico.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pela aplicação da análise de variância One-way ANOVA, seguida pela aplicação do teste de Tukey, como pós-teste para avaliar as diferenças entre os grupos. O teste Kruskal-Wallis também foi utilizado. Os valores foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 O número de corpos celulares na região do Córtex Cerebral dos animais BACHD estão reduzidos em relação aos animais WT e o tratamento dos animais BACHD com CDPPB mostra uma tendência a reverter esse quadro.

Sabe-se que o córtex cerebral está entre as regiões acometidas na DH, no qual já foi observado o acúmulo de htt no citoplasma e no núcleo das células, e se correlaciona com a morte neuronal vista nesta região (LAFORET, G.A., *et al.*, 2001). Portanto, com o objetivo de avaliar uma possível redução no número de células nos animais BACHD e o efeito do tratamento com CDPPB, nós realizamos análises qualitativas e quantitativas nesta região, tanto nos animais BACHD SALINA quanto nos animais BACHD CDPPB. Estas análises foram sempre comparadas ao grupo de camundongos controle (WT).

A **Figura 16 (A-D)** mostra imagens representativas da região do córtex cerebral dos três grupos experimentais avaliados. Através de uma análise qualitativa já podemos observar que o número de células dos animais BACHD SALINA está menor em relação ao controle WT, apresentando inclusive maior distribuição celular. Quando avaliamos qualitativamente as imagens do córtex dos camundongos BACHD CDPPB, aparentemente não vemos diferença em relação ao BACHD SALINA e WT. Ao quantificarmos essa análise, observamos uma redução estatisticamente significativa no número de células dos animais BACHD SALINA em relação ao grupo selvagem WT, confirmando o que foi visto na análise qualitativa. Além disso, nota-se que os animais tratados com a droga CDPPB apresentaram uma tendência de aumento no número de células quando comparado aos animais BACHD SALINA. A Tabela 2 sumariza esses achados.

GENÓTIPO/TRATAMENTO	QUANTIFICAÇÃO (MÉDIA ± E.P.M)
WT	279,1 ± 14,35
BACHD SAL	232,9 ± 4,53 ^a
BACHD CDPPB	255,3 ± 2,12

Tabela 2: Resultado da análise da quantificação do número total de células nos três genótipos/tratamentos estudados. ^a (p=0,027) diferença significativa em relação ao WT.

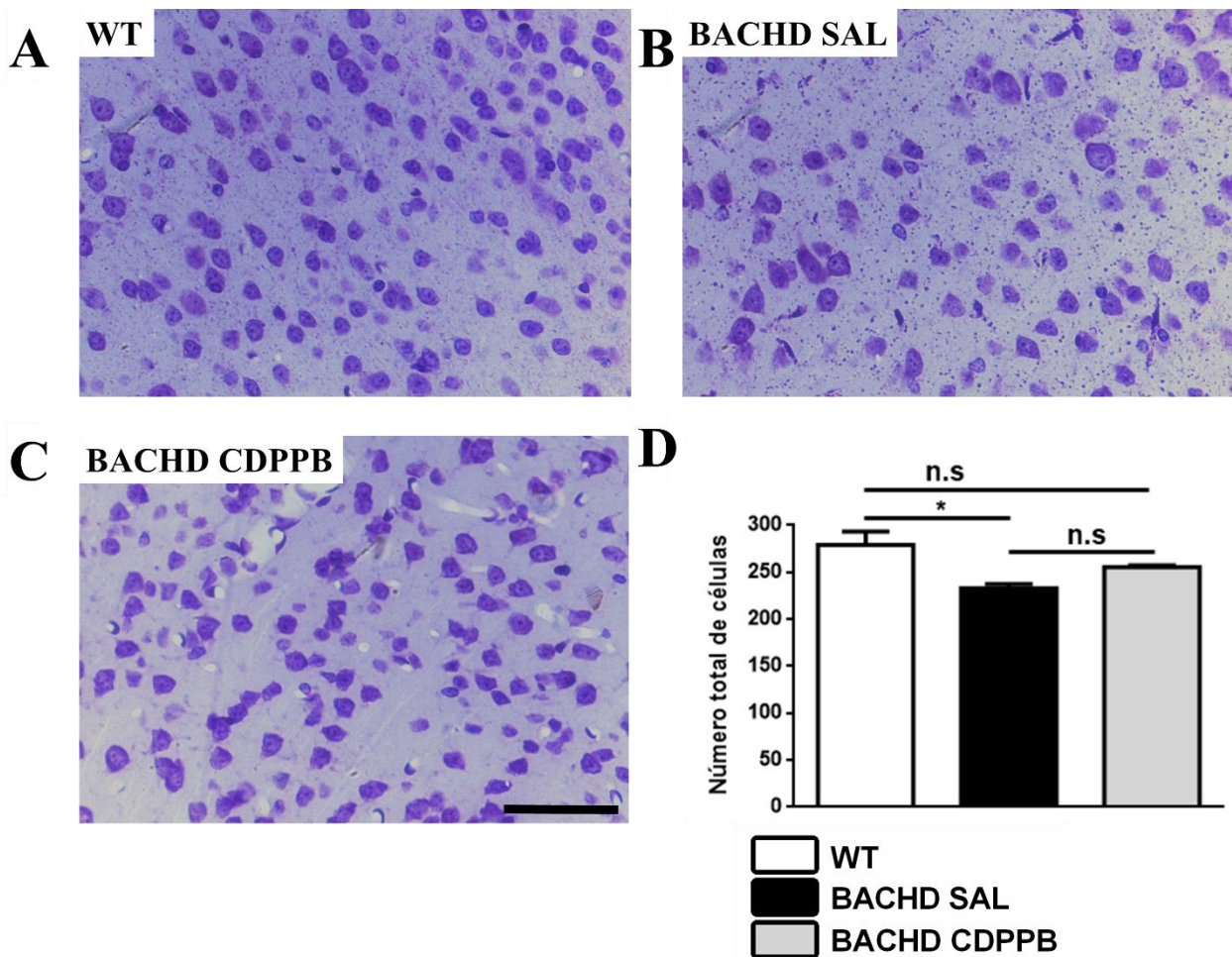


Figura 16: Tratamento crônico com CDPPB reverte parcialmente a morte celular no Córtex de animais BACHD. A-C. Imagens representativas do Córtex cerebral dos animais WT (A), BACHD SALINA (B) e BACHD CDPPB (C). D. A análise quantitativa do número de células presentes nesta região mostrou uma diferença significativa quando comparamos os animais WT com BACHD SALINA o que comprova uma morte neuronal nos animais transgênicos para a DH. Observa-se também uma tendência dos animais BACHD CDPPB reverterem esta morte neuronal. Os dados representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$. Foram analisadas 54 imagens para cada grupo experimental em 3 cortes não consecutivos ($n=3$ para cada tratamento). Barra de escala = 50 μ m. Imagens fotografadas e analisadas com objetiva de 40x.

4.2 A região do giro denteado do hipocampo de camundongos BACHD apresentou uma redução no número de células/neurônios quando comparado aos camundongos controle WT.

Uma vez que mostramos no item 4.1 que a presença da expansão poliglutâmica dos trinucleotídeos CAG nos camundongos BACHD é capaz de alterar o número de células na região cortical do cérebro em relação aos animais WT, nosso próximo passo foi realizar a análise do número de células no giro denteado, uma região especializada na discriminação espacial e controle temporal. Sabe-se que alterações nessas funções já foram vistas em testes comportamentais neste mesmo modelo animal (DORIA, *et al*, 2015).

Em relação à análise qualitativa, já podemos perceber que o número de células presentes no giro denteado do hipocampo de camundongos BACHD é aparentemente menor comparado ao controle WT (**Figura 17**). No entanto, é perceptível qualitativamente um ligeiro aumento do número de células nos animais BACHD CDPPB em relação aos BACHD SALINA. Quando realizamos a quantificação do número de células nesta região, confirma-se a análise qualitativa no qual não se vê diferença estatisticamente significativa entre os camundongos tratados com CDPPB e os BACHD tratados com salina, mas sim uma tendência a reverter o quadro. No entanto, de forma estatisticamente significativa, viu-se que o giro denteado de camundongos BACHD apresenta um menor número de células/neurônios quando comparado aos animais WT. A tabela 3 sumariza essas observações.

GENÓTIPO/TRATAMENTO	QUANTIFICAÇÃO (MÉDIA ± E.P.M)
WT	3090 ± 110,8
BACHD SAL	2565 ± 138,1 ^a
BACHD CDPPB	2737 ± 106,7

Tabela 3: Resultado da análise da quantificação do número total de células nos três genótipos/tratamentos estudados. ^a(p=0,052) diferença significativa em relação ao WT.

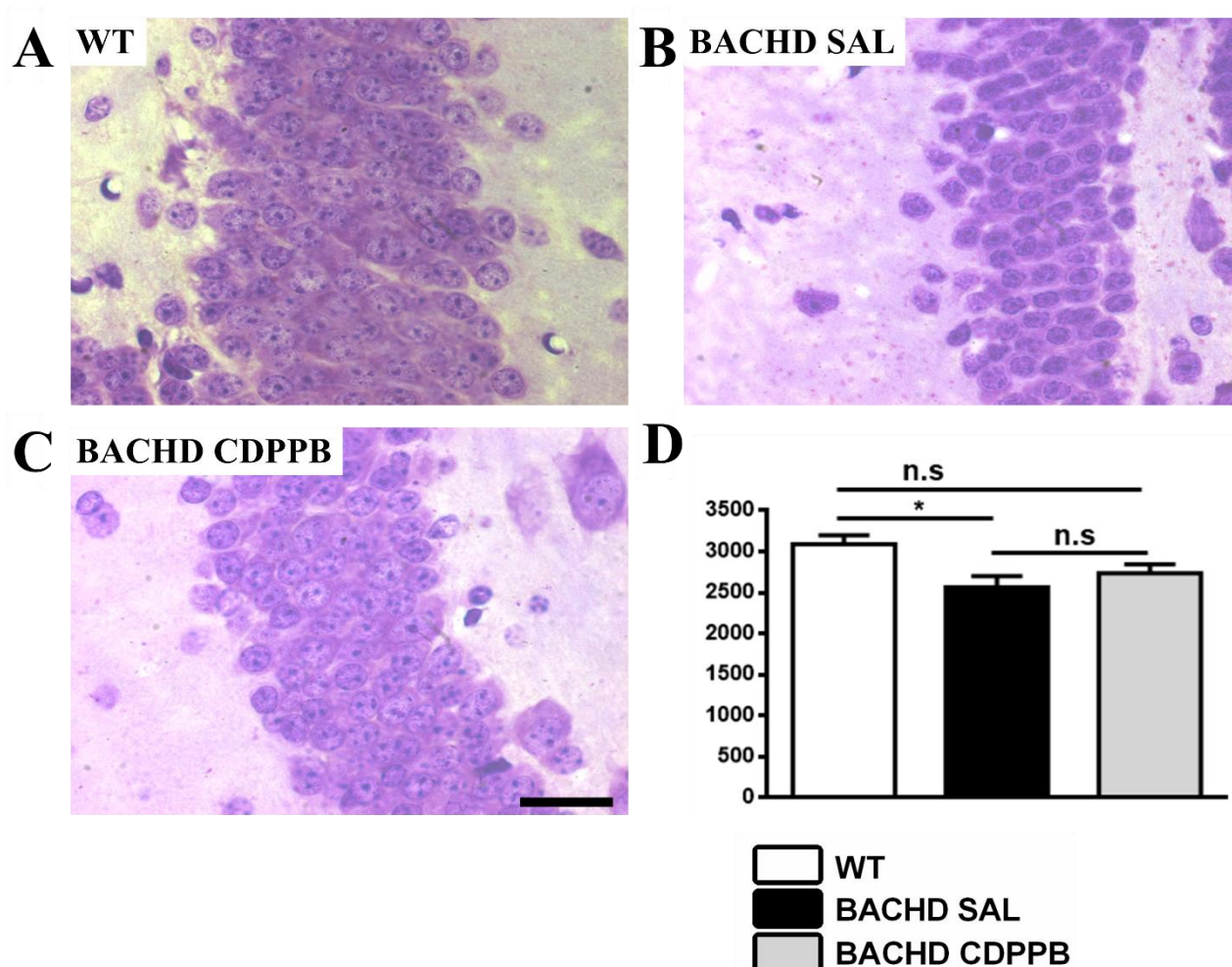


Figura 17: Tratamento com CDPPB tende a reverter a morte neuronal no giro denteado do Hipocampo de camundongos BACHD. A-C. Imagens representativas de regiões do giro denteado do Hipocampo de camundongos WT (A), BACHD SALINA (B) e BACHD CDPPB (C), no qual já se pode perceber uma redução no número de células no BACHD SALINA quando comparado ao WT e uma semelhança entre o número de células presente no giro denteado dos camundongos BACHD CDPPB com os animais WT. D. A quantificação das observações relatadas, mostra que houve uma redução estatisticamente significativa no número de neurônios presente no giro denteado dos animais BACHD SALINA em comparação com WT e observa-se uma leve tendência do tratamento CDPPB aumentar o número de células sobreviventes nesta região. Os dados representam a média±EPM. * $p < 0,05$. Foram analisadas 105 imagens para cada grupo experimental (n=3 animais por tratamento). Barra de escala = 50 μ m. Imagens fotografadas e analisadas com objetiva de 40x.

4.3. Avaliação de possíveis alterações em relação ao número de células de Purkinje presentes nas folhas cerebelares de camundongos BACHD em relação aos animais controle WT e BACHD submetidos ao tratamento com CDPPB

As análises histológicas que foram realizadas no Cerebelo, tiveram por objetivo observar possíveis alterações em relação ao número de células de Purkinje presentes nas folhas cerebelares, uma vez que está diretamente relacionada com o controle motor. Além disso, lançando mão da droga CDPPB, verificamos se o tratamento prévio induziria uma maior sobrevivência dessas células, uma vez que se trata de uma droga com caráter neuroprotetor. Sendo assim, nossos resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao número de células de Purkinje nas folhas cerebelares entre os três grupos experimentais analisados, mostrando que neurônios desta região não são diretamente afetados pela htt mutada (**Figura 18**).

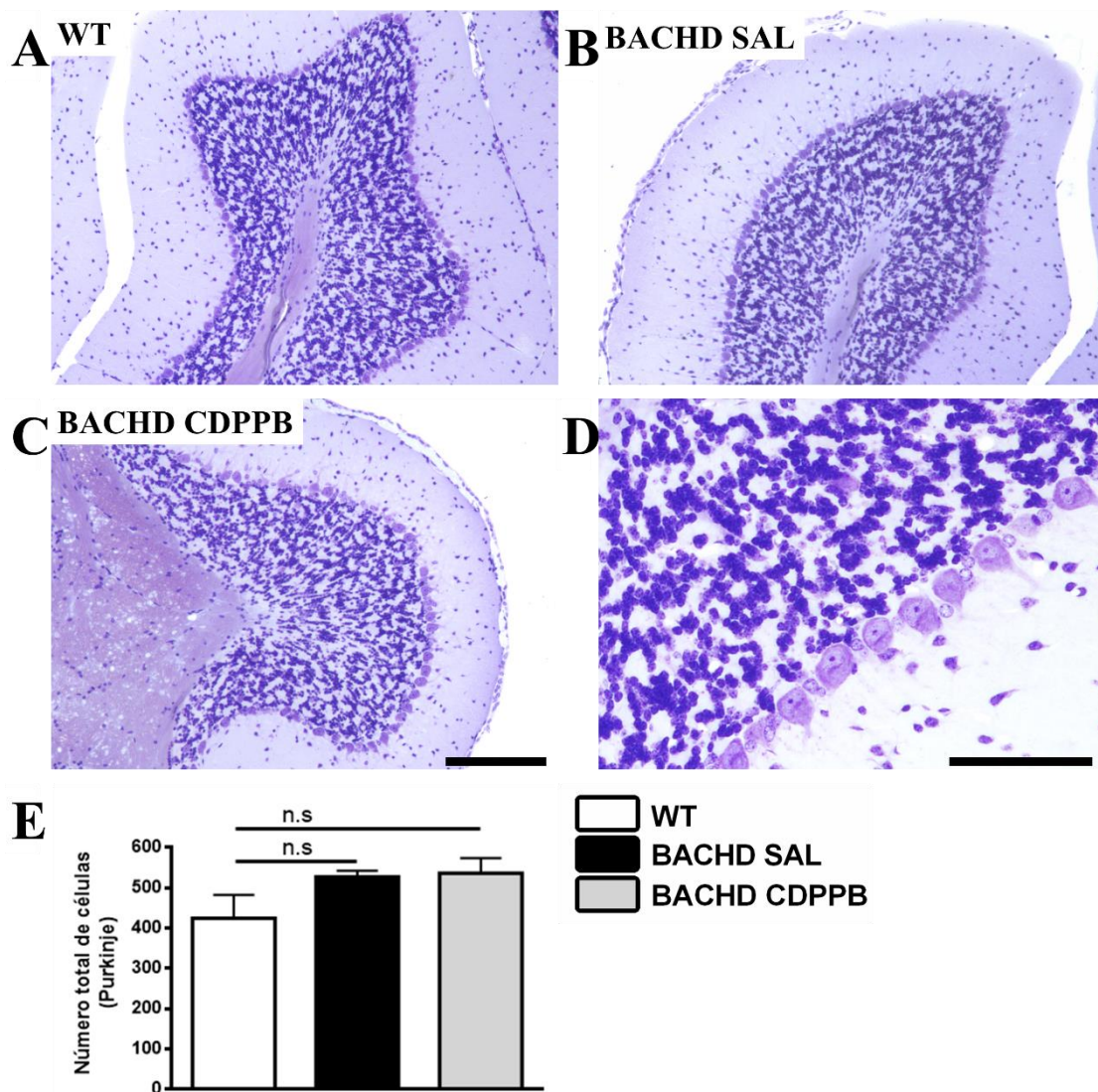


Figura 18: Quantificação das células de Purkinje não mostra diferença entre BACHD SALINA, WT e BACHD CDPPB. A-C. Imagens representativas de folhas cerebelares de camundongos WT (A), BACHD SALINA (B) e BACHD CDPPB (C), no qual não se observa diferença em relação ao número de células de Purkinje entre os três grupos analisados. Imagens representativas, feitas com objetiva de 20x. D. Imagem em aumento de 40x mostrando a preservação da morfologia das células de Purkinje no modelo BACHD SALINA. E. A quantificação confirma que não houve redução no número de neurônios de Purkinje nos animais BACHD SALINA em comparação com WT, sendo que o tratamento com CDPPB não mostra efeitos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. Foram analisadas 150 imagens para cada grupo experimental (n=3 animais por tratamento). Barra de escala = 50 μ m.

4.4. Avaliação do padrão morfológico dos corpos celulares sobreviventes na região do Córtex por microscopia eletrônica de transmissão, mostra indícios de neurodegeneração nos animais BACHD em relação ao WT e o tratamento com CDPPB sugere redução desses achados.

Uma vez que nós demonstramos uma redução no número de células na região do córtex de camundongos BACHD comparado com WT e uma possível tendência da droga CDPPB atuar aumentando a sobrevivência dessas células nos animais transgênicos submetidos ao tratamento, nós partimos para uma análise da morfologia dos corpos celulares dessa região. Avaliamos a presença de sinais que indicassem neurodegeneração como por exemplo a presença de corpos elétron-densos (lipofuscina) no citoplasma (**Figura 19**).

Nas análises quantitativa e semi-quantitativa, foi observado que os corpos celulares de camundongos BACHD SALINA apresentavam um maior número de neurônios apoptóticos com corpos elétron densos de lipofuscina em maior número e em diferentes estádios de desenvolvimento ($p=0,01$; teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's) (**Figura 20 A e B**). O tratamento com CDPPB apresenta uma tendência à reversão desse quadro. Para a análise estatística nós selecionamos 7 corpos celulares para cada animal, valor esse baseado no número mínimo de células encontrado por animal, dessa forma, obtivemos um total de 21 células por condição experimental. A semi-quantificação foi realizada pela seleção de no mínimo 45 corpos celulares por grupo experimental.

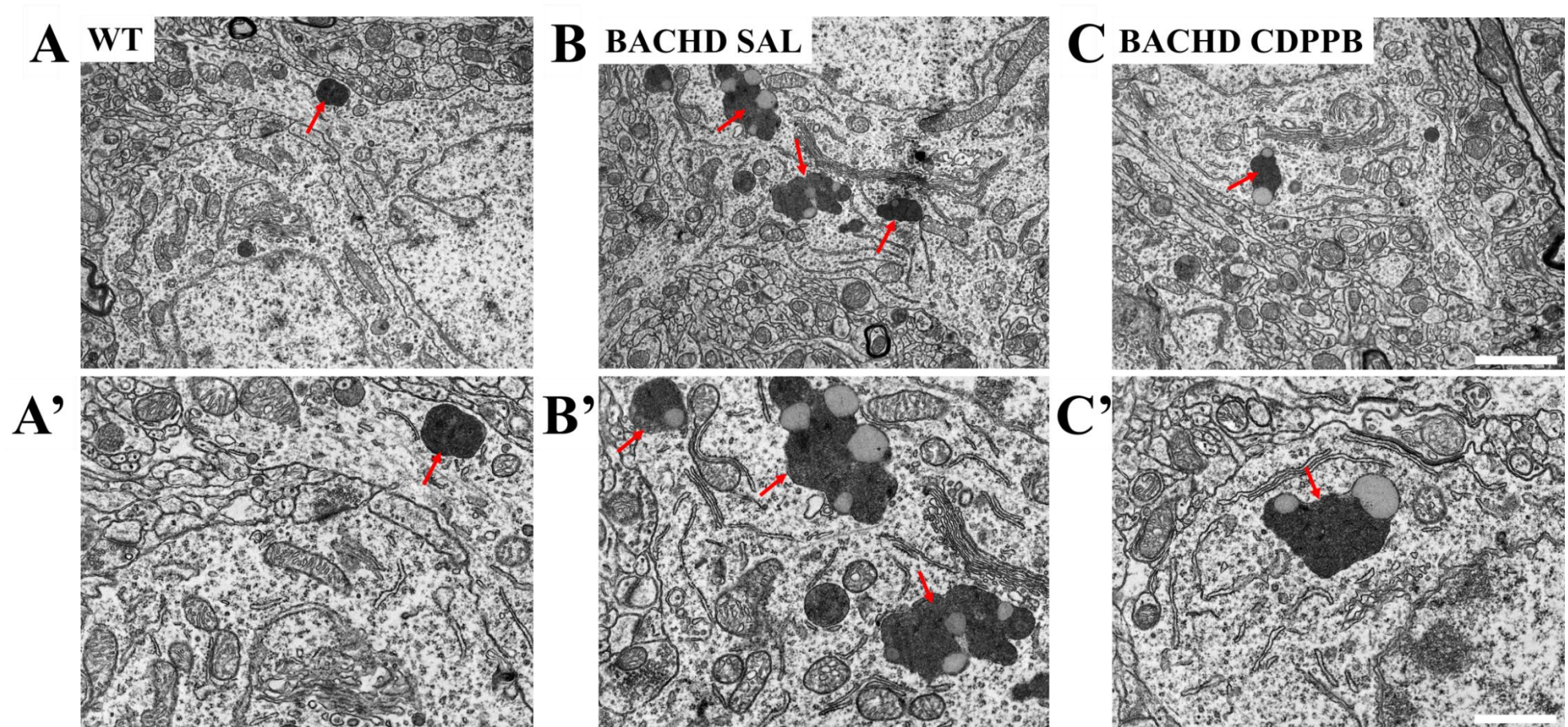


Figura 19: Corpos celulares presentes no córtex cerebral de camundongos BACHD SALINA apresentam sinais de neurodegeneração em relação aos WT e o tratamento com CDPPB. Na primeira coluna (**A e A'**) temos a representação de corpos celulares dos animais WT, na segunda coluna (**B e B'**) dos animais BAHCD SALINA e na terceira (**C e C'**) os animais BACHD CDPPB. Na primeira linha (**A, B e C**) notamos que a presença de corpos elétrons densos de lipofuscina (setas vermelhas) no citoplasma das células são mais evidentes em número e estágio de desenvolvimento nos animais BACHD SALINA quando comparados com os animais WT e BACHD CDPPB. Barra de escala = 2 μ m (26.500x). Na segunda linha (**A', B' e C'**), observamos em maior aumento, detalhes dos corpos de celulares (setas vermelhas). Barra de escala = 1 μ m (43.000x).

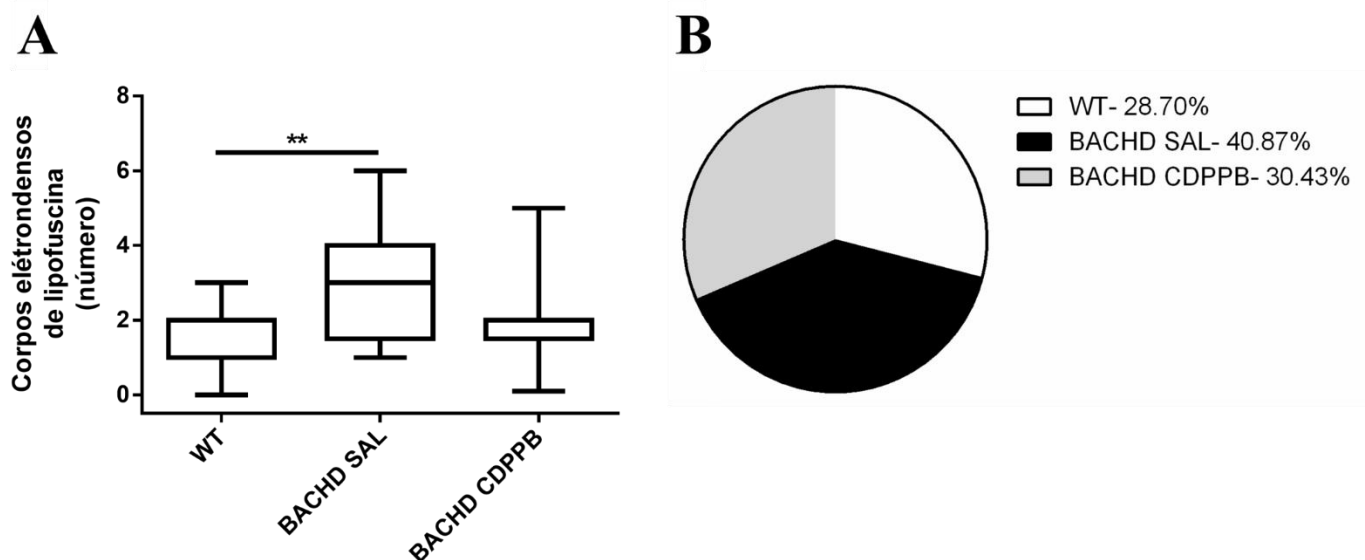


Figura 20: Análise quantitativa das figuras de degeneração visualizadas nos corpos celulares do córtex cerebral dos 3 grupos experimentais avaliados. A. Representação gráfica onde observa-se aumento estatisticamente significativo no número de corpos elétronétrondensos de lipofuscina nos animais BACHD SALINA quando comparado aos animais WT (** $p < 0,05$; teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's). O tratamento com CDPPB evidencia uma tendência a redução no número de grânulos, no entanto, sem significância estatística. **B.** Avaliação semi-quantitativa mostrando uma maior porcentagem de corpos elétronétrondensos de lipofuscina nos camundongos BACHD SALINA comparado aos WT e uma possível redução da presença desses corpos nos animais BACHD tratados com CDPPB. Para o gráfico de dispersão (box plot), foram analisados 21 corpos celulares por genótipo e condição experimental. A análise semi-quantitativa foi baseada na análise de 45 corpos celulares por condição experimental. N= 3 animais por condição experimental.

4.5. Análise ultraestrutural das sinapses na região do Córtex mostram diferenças em relação a área do terminal pré-sináptico, número de vesículas por área do terminal e número de vesículas nas zonas ativas nos 3 grupos experimentais.

Na região do Córtex, no qual já se sabe existir um grande comprometimento das células neuronais nos animais BACHD SALINA, viu-se que a área do terminal pré-sináptico nesses animais é estatisticamente menor que a área das sinapses presentes nos animais WT ($p=0,002$). No entanto, com esta idade e tempo de tratamento com CDPPB ainda não se nota, até o momento, efeito da droga neste parâmetro. Observe que a área pré-sináptica do BACHD CDPPB é estatisticamente menor à área dos animais WT. Ao analisarmos o total de vesículas sinápticas por área, notamos uma redução na quantidade de vesículas presente nas sinapses dos animais BACHD SALINA em relação aos WT ($p=0,0004$), sendo que o tratamento com CDPPB promove uma neuroproteção, uma vez que há uma diferença significativa em relação ao controle e ao BACHD SALINA (**Figura 21 e 22**).

Sendo assim, analisamos especificamente o número de vesículas presentes a 200 nanômetros das Z.A das sinapses a fim de avaliarmos se há alguma alteração no número de vesículas que estão localizadas no pool de liberação imediata (Readily Releaseable Pool- RRP). O resultado mostrou uma redução no número de vesículas a 200 nm da Z.A nos animais BACHD SALINA em relação ao WT ($p=0,0004$) (**Figura 21 e 22**). O tratamento com CDPPB tende a reverter parcialmente a redução no número de vesículas nas Z.A, aproximando-se dos animais WT. No entanto, a diferença dos animais BACHD CDPPB em relação aos WT, ainda persiste. A tabela 4 sumariza essas observações.

GENÓTIPO/TRATAMENTO	Área pré-sináptica	Vesículas/área	Vesículas na Z.A
WT	$0,60 \pm 0,03$	$56,12 \pm 0,85$	$18,13 \pm 0,86$
BACHD SAL	$0,44 \pm 0,001^a$	$37,38 \pm 0,22^a$	$13,37 \pm 0,34^a$
BACHD CDPPB	$0,43 \pm 0,018^a$	$44,78 \pm 2,46^{ab}$	$15,27 \pm 0,46^a$

Tabela 4: Resultado da análise de quantificação da área do terminal pré-sináptico, o número de vesículas por área de terminal o número de vesículas na Z.A nos três genótipos/tratamentos estudados. ^a diferença significativa em relação ao WT, ^{ab} diferença significativa em relação ao WT e BACHD SAL.

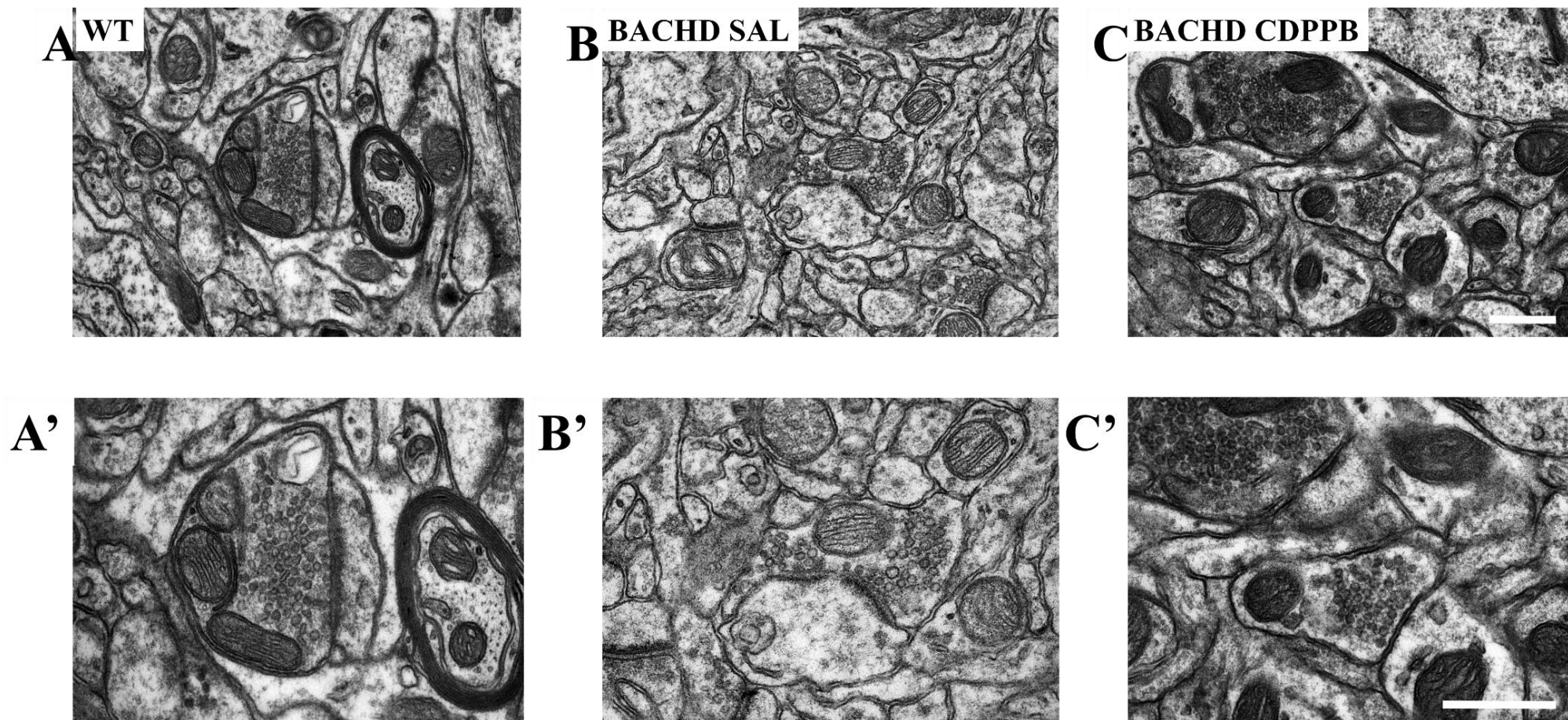


Figura 21: Eletromicrografias representativas que mostram sinapses presentes no córtex cerebral dos grupos de tratamento avaliados. A. Micrografias panorâmicas do córtex cerebral de camundongos WT. **B.** camundongos BACHD tratados com salina e **C.** camundongos BACHD tratados com CDPPB. Em A', B' e C', respectivamente, a ampliação em 50.000x, onde se pode perceber a redução na área do terminal, no número de vesículas dentro do terminal pré-sináptico e no número de vesículas a 200 nanômetros da Z.A dos animais BACHD SALINA em relação aos WT BACHD tratados com CDPPB. (Barra de escala =500 μ m)

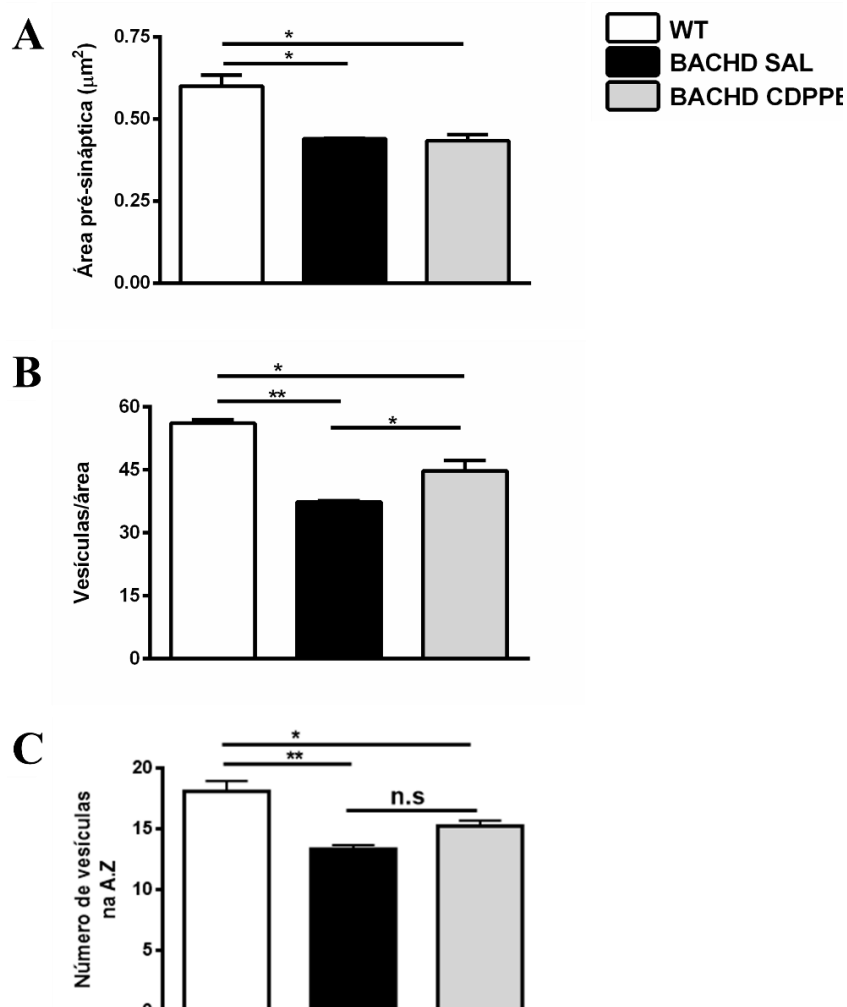


Figura 22: Quantificação da análise ultraestrutural da área do terminal pré-sináptico, do número de vesículas/área e do número de vesículas a 200 nm da Z.A na região do córtex cerebral. A. Gráfico de barra mostrando uma redução na área do terminal pré-sináptico dos animais BACHD SALINA comparado aos WT. O tratamento com a droga CDPPE não mostrou efeito significativo nesse parâmetro. **B.** Gráfico do número total de vesículas sinápticas por área de terminal, no qual os animais WT apresentaram um número significativamente maior de vesículas quando comparado com os camundongos BACHD SALINA e BACHD CDPPE. Neste caso, veja que o tratamento dos animais com CDPPE foi capaz de aumentar parcialmente o número total de vesículas nas terminações, quando se compara com os animais BACHD SALINA. **C.** Gráfico mostrando o número de vesículas a 200 nm da Z.A, no qual os animais WT apresentam um maior número de vesículas recrutadas, em relação aos BACHD SALINA. Os camundongos BACHD CDPPE apresentam um leve aumento no número de vesículas, no entanto os animais WT ainda apresentam um número maior de vesículas recrutadas. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. * e ** p < 0,05. Foram analisadas 10 sinapses por animal (n=3 animais por tratamento) totalizando 33 imagens para cada grupo experimental.

4.6. Análise ultraestrutural das sinapses na região do Hipocampo

Na região do hipocampo, especificamente no giro denteado, foi observado um comprometimento das células neuronais nos animais BACHD SALINA. Sendo assim, analisamos as sinapses presentes na região do hipocampo e constatou se que tanto em relação a área do terminal pré-sináptico, o número de vesículas sinápticas por área e o número de vesículas presentes a 200 nm da Z.A nas sinapses, (**Figura 23**) não houve diferença significativa entre os animais WT, BACHD SALINA e BACHD CDPPB (**Figura 24**). A tabela 4 sumariza essas observações.

GENÓTIPO/TRATAMENTO	Área pré-sináptica	Vesículas/área	Vesículas na Z.A
WT	0,45 ± 0,05	90,62 ± 0,40	16,47 ± 0,67
BACHD SAL	0,44 ± 0,02	83,35 ± 1,04	16,50 ± 0,49
BACHD CDPPB	0,44 ± 0,01	86,40 ± 5,13	15,53 ± 0,73

Tabela 5: Resultado da análise de quantificação da área do terminal pré-sináptico, o número de vesículas total no terminal e o número de vesículas na Z.A do hipocampo nos três genótipos/tratamentos estudados.

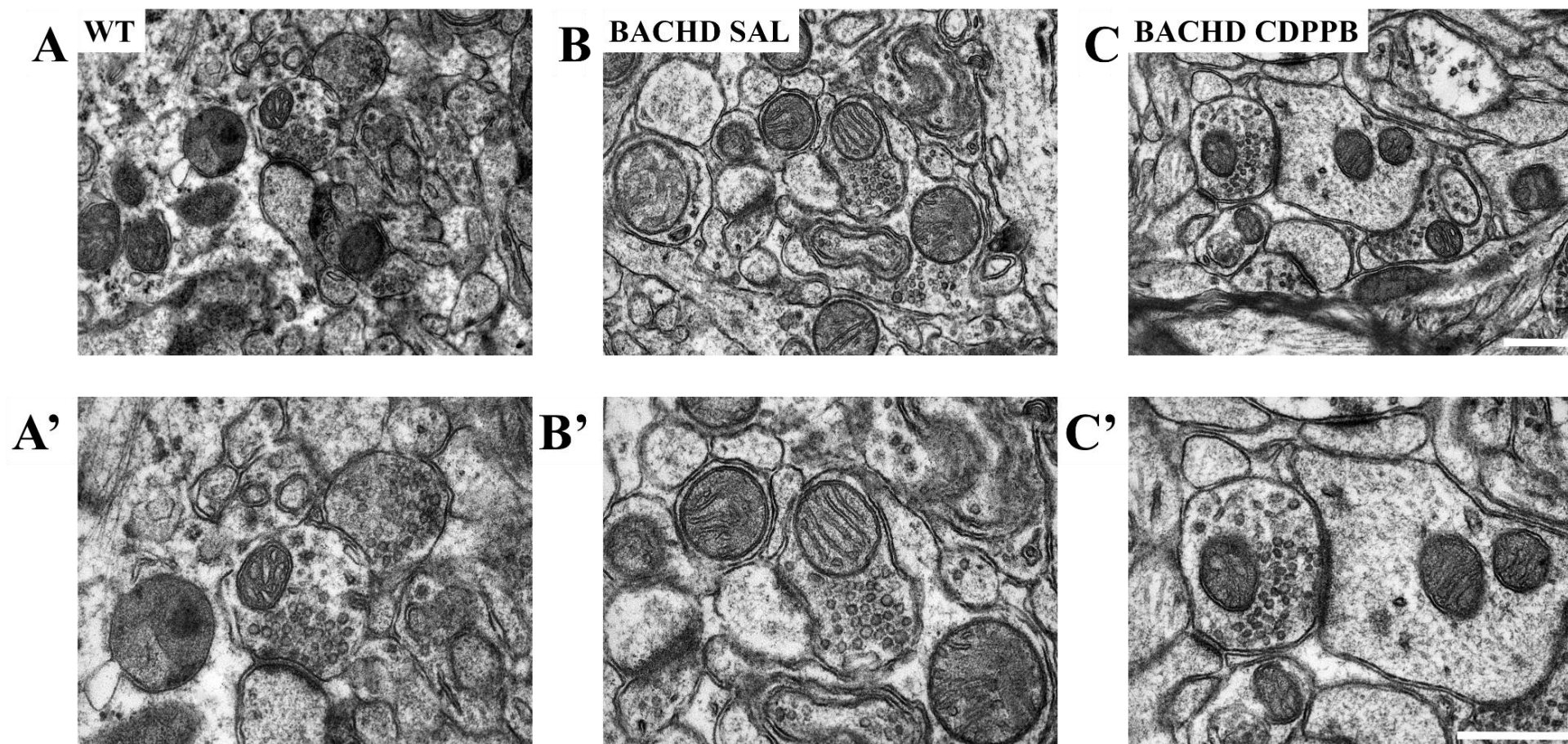


Figura 23: Eletromicrografias representativas que mostram sinapses presentes no hipocampo dos grupos de tratamento avaliados. A. Micrografias panorâmicas do hipocampo de camundongos WT, **B.** camundongos BACHD tratados com salina e **C.** camundongos BACHD tratados com CDPPB. Em **A'**, **B'** e **C'**, respectivamente, a ampliação em 50.000x, onde aparentemente não se observa diferença na área do terminal, no número de vesículas dentro do terminal pré-sináptico e no número de vesículas a 200nm da Z.A dos animais BACHD SALINA em relação aos WT e BACHD tratado com CDPPB. (Barra de escala =500 μ m)

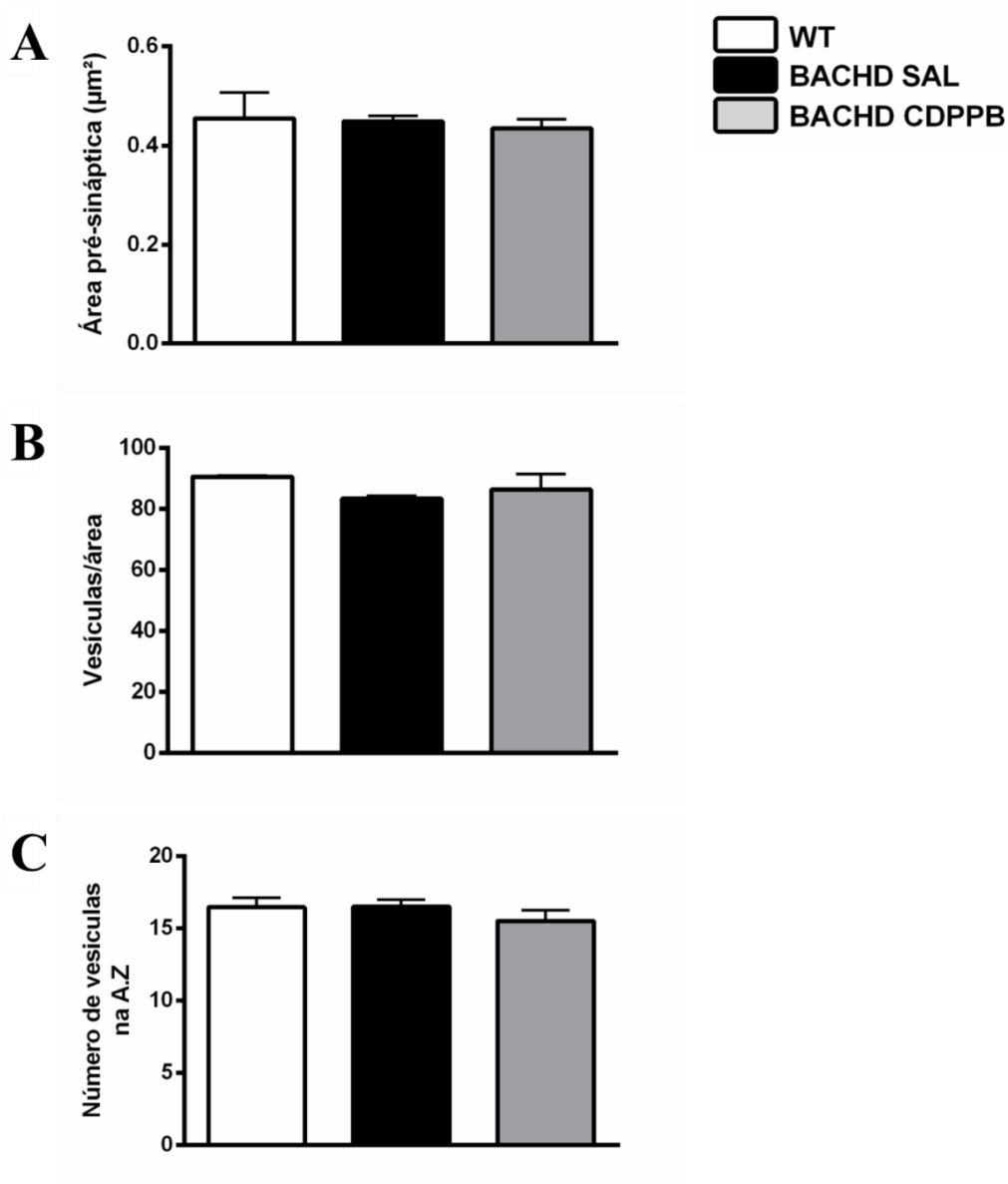


Figura 24: Quantificação da análise ultraestrutural da área do terminal pré-sináptico, do número de vesículas/área e do número de vesículas a 200 nm da Z.A no hipocampo.

A. Gráfico de barra mostrando que não houve diferença significativa na área do terminal pré-sináptico dos animais BACHD SALINA comparado aos WT. **B.** Gráfico do total de vesículas sinápticas dentro do terminal, no qual os animais WT, BACHD SALINA e animais BACHD tratados com CDPPB não apresentaram diferença estatisticamente significativa. **C.** Gráfico mostrando que tanto para os animais WT, BACHD SALINA e BACHD CDPPB, o número de vesículas a 200 nm da Z.A foi aproximadamente o mesmo nos 3 grupos analisados. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. Foram analisadas 10 sinapses por animal (n=3 animais por tratamento) totalizando 33 imagens para cada grupo experimental.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Dados da literatura mostram que existe uma alta prevalência de doenças neurodegenerativas em todo o mundo, com aumento da taxa de incidência de forma exponencial de acordo com o envelhecimento da população, o que se torna um problema de saúde grave (REITZAND MAYEUX, 2014). Atualmente, a prevalência é estimada em 24 milhões e há previsão de quadruplicar até o ano de 2050 (REITZAND MAYEUX, 2014).

A DH é uma desordem neurodegenerativa cujos indivíduos afetados tipicamente desenvolvem comprometimentos motores, cognitivos e psiquiátricos (HUNTINGTON, 1872). Com base na progressão e em alterações observadas na DH, vários grupos têm desenvolvido e testado hipóteses, bem como drogas para tratamento, a fim de se entender e elucidar a patogênese da doença e dessa forma, retardar ou até mesmo parar a progressão da mesma (GRAY *et al.*, 2008). Sendo assim, o uso de modelos animais geneticamente modificados se torna importante, pois estes são utilizados para investigar os mecanismos celulares e moleculares que estão relacionados à patogênese da doença, permitindo, dessa forma, uma melhor compreensão da mesma (REYMOND *et al.*, 2012). Além disso, como a perda neuronal é o principal fator que leva ao desenvolvimento das doenças neurodegenerativas, a avaliação de drogas que possuem caráter neuroprotetor é um importante avanço para o tratamento dessas doenças.

Segundo Vonsattel e DiFiglia, (1998), a DH é primariamente caracterizada por uma perda neuronal nas regiões do corpo estriado e córtex cerebral. No entanto, outras regiões como hipocampo também são afetadas (revisado por Reymond *et al.*, 2012). Dessa forma, este trabalho buscou avaliar possíveis alterações morfológicas em regiões do cérebro no modelo animal transgênico para a DH (os camundongos BACHD), tratados com a droga neuroprotetora, CDPPB.

Sabendo-se que esta droga tem o seu sítio de ligação ao mGluR5, um estudo realizado em colaboração com o nosso laboratório demonstrou que 18 semanas de tratamento com CDPPB foi capaz de reduzir a neurodegeneração, uma vez que reduz significativamente a formação de agregados da proteína htt no cérebro de camundongos BACHD (DORIA *et al.*, 2015). Além disso, o tratamento com CDPPB aumentou o número de células sobreviventes no corpo estriado dos camundongos BACHD. Com relação a análise morfológica das sinapses nesta região, a microscopia eletrônica mostrou

uma diminuição significativa no número de vesículas sinápticas, localizadas nas Z.A de terminais pré-sinápticos, (i.e, local no qual as vesículas se encontram prontas para serem exocitadas) nos animais BACHD, sendo que o tratamento crônico com CDPPB tende a reduzir esse déficit. A reversão das alterações morfológicas com o tratamento, foi também acompanhada por melhoras na coordenação motora, além de recuperação da memória nos camundongos BACHD tratados com a droga (DORIA, *et al*, 2015).

Em 2015, foi mostrado que o tratamento crônico com CDPPB nos camundongos BACHD era capaz de aumentar a fosforilação de proteínas como ERK e AKT no córtex cerebral de camundongos BACHD, o que se relaciona com uma maior ativação de vias de sinalização que levam a uma maior neuroproteção (DORIA *et al.*, 2015). Foi visto também que os níveis de BDNF, um fator essencial para o desenvolvimento embrionário do SNC e também para o cérebro adulto, estava aumentado no córtex após o tratamento dos camundongos BACHD com CDPPB (FIGUROV *et al.*, 1996; KANG e SCHUMAN, 1995; TANAKA *et al.*, 2008, DORIA *et al.*, 2015).

Nosso primeiro resultado, portanto, mostrou que os animais BACHD apresentam uma perda celular significativa em relação aos animais WT na região do córtex cerebral. De forma interessante, o tratamento com CDPPB se mostrou potencial em reverter este quadro de morte. Em 2008, Gray *et al.*, ao caracterizar este modelo animal, demonstraram que camundongos BACHD com 12 meses de idade apresentavam uma atrofia do cérebro quando comparado com a linhagem WT. Ao quantificarem o volume cortical, notaram uma robusta redução desse parâmetro nos camundongos BACHD em relação aos WT. Esses resultados corroboram nossos achados e mostram que a perda celular que mostramos através da quantificação do número de corpos celulares no córtex cerebral dos camundongos BACHD, possivelmente está relacionado com a atrofia cortical vista na DH.

Em relação ao hipocampo sabe-se que, dentre suas funções mais conhecidas, está a retenção de informações na memória de curto prazo e sua transferência para a memória de longo prazo (REMAUD *et al*, 2014). IANNICOLA *et al*, (2000), demonstraram que camundongos transgênicos para DH do tipo TgN6/1 apresentavam na camada CA3 do hipocampo neurônios com aspectos altamente condensados e com evidente basofilia nuclear que são características sugestivas de células em apoptose, mostrando evidente neurodegeneração nessa região. Foi demonstrado por Southwell *et al.*, (2009) que os camundongos BACHD possuem comprometimento cognitivo. Interessantemente, Doria e colaboradores (2015), mostraram que o tratamento dos animais BACHD com CDPPB

foi capaz de reverter o déficit de memória e cognitivo. Além disso, esses pesquisadores identificaram que o tratamento com CDPPB em camundongos BACHD aumentou significativamente a fosforilação de proteínas AKT no hipocampo dos animais tratados quando comparado aos animais WT e BACHD SALINA.

Com base nesses achados, nós analisamos o número de células granulares do giro denteado do hipocampo dos 3 grupos experimentais. Nossos resultados corroboram esses achados, uma vez que notamos uma redução estatisticamente significativa no número de células na região do giro denteado de camundongos BACHD SALINA em relação ao WT, o que pode justificar os déficits de memória apresentado pelos pacientes com DH. Além disso, o tratamento com CDPPB mostrou uma tendência a reverter essa perda celular.

A literatura nos mostra que em outros modelos de camundongos para DH como, por exemplo, o YAC128, a neurodegeneração pode acontecer de forma seletiva nas diferentes regiões do cérebro como córtex e estriado e não interferir com os neurônios do cerebelo, aumentando assim o processo de excitotoxicidade de forma seletiva nestas áreas (VAN RAAMSDONK *et al.*, 2007). O cerebelo, portanto, por estar envolvido em processos que desencadeiam alterações na marcha, déficits motores, alterações na coordenação e equilíbrio nos pacientes com doenças neurodegenerativas, tem sido postulado como uma região de controle para validar modelos e drogas experimentais (LOAL ALZGHOUL, *et al.*, 2012). Nossos resultados, mostram que a quantificação do número de neurônios de Purkinje nas folhas cerebelares não mostrou diferença entre os tres grupos experimentais, o que corrobora Van Raamsdonk *et al.*, (2007). Esse resultado pode indicar que o cerebelo de animais BACHD com 8 meses de idade não apresenta alterações no número de neurônios de Purkinje corroborando dados da literatura que mostram que o cerebelo não apresenta alterações (JACKSON *et al.*, 1995 e TABRIZI *et al.*, 1999)

Uma vez demonstrado uma redução no número de células na região do córtex cerebral de camundongos BACHD SALINA quando comparado aos animais WT e uma possível tendência da droga CDPPB aumentar a sobrevivência dessas células nos animais transgênicos submetidos ao tratamento, nós realizamos uma análise ultraestrutural da morfologia dos corpos celulares dessa região nos três grupos experimentais. Nessa análise, nós verificamos se os corpos celulares sobreviventes apresentavam algum indício que indicasse neurodegeneração. No modelo BACHD com 12 meses de idade, Gray *et al.*, 2008 mostraram características de neurodegeneração presente nos corpos celulares do

córtex cerebral, visualizados através da M.E.T. Esses autores, encontraram estruturas eletrondensas, neurônios com atrofia e alterações na morfologia das organelas, detalhes esses, que não foram vistos nos animais controle. Outro estudo realizado em 2008 por Gjurmakc *et al*, utilizando um modelo de camundongo para a DA (A β PP-YAC), investigou a presença de alterações ultraestruturais que pudessem estar relacionadas com os sintomas da patologia neurodegenerativa. Os resultados mostraram que os camundongos controle não apresentaram alterações particulares na ultraestrutura de células hipocâmpais. No entanto, os corpos celulares dos camundongos A β PP-YAC apresentaram diferentes graus de alterações nas mitocôndrias, similar às alterações vistas em pacientes com Doença de Alzheimer (DA). Mitocôndrias parcialmente e até completamente danificadas, foram associadas com a formação de corpos eletrondensos de lipofuscina com densidade e tamanhos variados, sendo identificados como características da anormalidade neuronal (ALIEV *et al.*, 2003).

De forma semelhante, em nosso trabalho, foi analisado a presença de corpos eletrondensos de lipofuscina. O resultado mostrou que camundongos BACHD SALINA apresentam, estatisticamente, uma maior quantidade dessas estruturas (41%), quando comparados aos animais WT que apresentaram (29%). Esse resultado indica que os camundongos transgênicos para DH com 8 meses de idade apresentam mitocôndrias danificadas parcialmente e completamente, uma vez que estas podem estar associadas com a formação dos corpos de lipofuscina (ALIEV, *et al.*, 2003). No entanto, mais estudos utilizando técnicas que visam a identificação de alterações mitocondriais são necessários. Assim como Aliev, e colaboradores (2003), acreditamos que esses corpos de lipofuscina associados a lesões mitocondriais podem estar ligados ao comprometimento da região cortical na DH. Além disso, de forma interessante, ao analisarmos os camundongos CDPPB, vimos que o número de corpos eletrondensos de lipofuscina se encontra próximo ao encontrado nos animais WT, mostrando que o tratamento com esta droga pode agir de forma a retardar ou evitar os danos celulares na região do córtex cerebral. Outro estudo interessante feito em miócitos e neurônios mostrou que as mitocôndrias são um dos primeiros componentes celulares a sofrer alterações estruturais graduais associados à idade. Estas variações vão desde a perda gradual das cristas mitocondriais até a destruição completa das membranas internas e a formação de material eletrôn-denso amorfo que é visto como os corpos eletrondensos de lipofuscina (BRUNK, *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que para esta análise realizada no córtex cerebral dos 3 grupos, sugere-se a utilização de metodologias que possam confirmar de forma mais específica esses achados e suas correlações com a patologia da DH. Neste caso, sugerimos análise de mais corpos celulares em um N maior de animais, com idades e tempo de tratamento diferentes afim de avaliar o curso temporal de aparecimento dessas estruturas e correlacionar com o início e agravamento dos sintomas.

Dados da literatura mostram que em um modelo animal para a DH, o R6/2, as terminações axonais desses animais apresentam agregados da htt mutada, o que leva a uma redução na densidade de vesículas sinápticas, juntamente com uma redução na liberação do neurotransmissor glutamato (HE LI *et al*, 2003). A redução na densidade de vesículas sinápticas, vista neste modelo, pode estar associada a uma diminuição de proteínas pré-sinápticas importantes no processo de exocitose das vesículas e assim, como a atuação da htt mutada pode bloquear fisicamente a circulação de organelas e outras moléculas e dessa forma, comprometer o processo de neurotransmissão (HE LI *et al*, 2003).

Em nosso trabalho, foi demonstrada uma redução estatisticamente significativa na área do terminal pré-sináptico dos animais BACHD SALINA e BACHD CDPPB em relação ao WT na região do córtex cerebral. Além deste achado, viu-se uma redução no número de vesículas sinápticas dentro do terminal pré-sináptico dos camundongos BACHD SALINA em relação aos WT nessa mesma região supracitada. Assim como os resultados mostrados por He Li *et al*, (2003), nossos dados corroboram a hipótese da htt mutada estar associada de forma anormal a vesículas sinápticas, o que pode prejudicar a função sináptica. Além disso, GAUTHIR *et al*, (2004) relataram que a diminuição na liberação das vesículas sinápticas pode ter consequências importantes, já que a redução de BDNF no corpo estriado não é só devida a redução do mRNA para o BDNF, mas também porque o transporte vesicular de BDNF pode estar comprometido na DH. Seria interessante investigar as consequências desse déficit vesicular nas sinapses corticais dos camundongos BACHD SALINA e compara com WT e BACHD CDPPB.

Acredita-se que mudanças na eficácia sináptica na região do hipocampo estão associadas a processos cognitivos como aprendizado e memória (MOHAMED., 2014). No entanto, assim como demonstrado no trabalho de DORIA *et al*, (2015), os animais BACHD SALINA apresentavam déficit de memória com 30 semanas de idade. Neste trabalho, ao analisarmos as sinapses presentes na região do hipocampo nos camundongos

com 30 semanas, não encontramos diferenças em parâmetros como área total do terminal pré-sináptico, relação vesícula/área e vesículas a 200nm da Z.A.

Sendo assim, diante dos resultados aqui discutidos, mostramos que as alterações presentes nas regiões do córtex e hipocampo de camundongos BACHD podem ter relação com as alterações motoras e déficits de memória presentes na doença, uma vez que observamos redução no número de células nestas regiões. Alinhado a isso, identificamos alterações morfológicas das sinapses no córtex e possivelmente, modificações na maquinaria de vesículas sinápticas, levando a uma redução no número de vesículas sinápticas nas Z.A, locais esses onde ocorrem a exocitose das mesmas.

Neste trabalho, mostramos uma maior quantidade de grânulos eletrondensos de lipofuscina em amostras de córtex dos camundongos BACHD, o que pode estar relacionado com a progressão da doença e alterações celulares, uma vez que a presença da htt mutada, pode levar a uma fragmentação mitocondrial que está associada com a formação dessas estruturas. Este trabalho então é pioneiro em caracterizar morfolologicamente as sinapses corticais a nível ultraestrutural dos camundongos BACHD, indicando que as alterações vistas em outras regiões do cérebro, como exemplo, a redução nos níveis de BDNF no estriado mostrado por Doria *et al.*, (2015), pode também estar relacionado a problemas no transporte e liberação vesicular desse fator no córtex.

Nossos resultados mostraram uma recuperação parcial das alterações observadas no número total de células do córtex cerebral, no giro denteado do hipocampo e na ultraestrutura dos corpos celulares do córtex cerebral. Além disso, vimos reversão parcial de alguns parâmetros sinápticos do córtex cerebral. Já foi demonstrado que a injeção intraperitoneal de CDPPB na concentração de 10mg/Kg (30 minutos antes do treino cognitivo) em um modelo animal para o autismo foi capaz de reverter às alterações sinápticas relacionadas a déficits cognitivos e comportamentais (AUERBACH, OSTERWEIL, BEAR, 2011). A utilização de outro MAP do mGluR5 (VU0360172 {N-cyclobutyl-6-[2-(3-fluorophenyl)ethynyl]-3-pyridinecarboxamidehydrochloride), utilizado no tratamento de lesões cerebrais traumáticas, na dose de 50mg/Kg injetado intraperitonealmente, mostrou redução significativa do volume da lesão após o tratamento 3 a 24 horas pós-lesão, quando comparado ao grupo controle sem tratamento. Além disso, foi demonstrado que a densidade de células no giro denteado do hipocampo que se encontrava reduzido no grupo lesionado, recuperou significativamente após tratamento com o referido MAP (LOANE *et al.*, 2014). Dessa forma, sugerimos que possivelmente,

a utilização de doses maiores da droga, como as mostradas pelos estudos acima, poderia ser mais eficaz em reverter as alterações celulares observadas neste estudo.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

Sendo a DH uma desordem neurodegenerativa, se torna fundamental estudar e demonstrar como a morfologia das principais regiões atingidas pela doença se apresentam. Para isso, mostramos alterações importantes a nível histológico e ultra estrutural em 3 regiões do cérebro de um modelo animal, BACHD, que mimetiza os sintomas da doença em humanos por apresentar uma mutação no gene que codifica a proteína htt. Assim, mostramos que o tratamento com a droga neuroprotetora CDPPB, pode reverter em alguns casos a perda neuronal que está diretamente relacionada aos sintomas da doença bem como manter íntegra as estruturas sinápticas. O conjunto desses resultados, ajuda a entender melhor o papel da mutação na proteína htt no curso da doença, e ao considerarmos que o diagnóstico da DH pode ser feito ainda antes da manifestação dos sintomas, este estudo se torna uma base para novas investigações acerca da eficácia do tratamento com CDPPB, principalmente na elaboração de novas frentes investigativas para se avaliar se um período maior de administração da droga levaria a uma redução da morte neuronal e diminuição na progressão da doença.

7. Referências

7. REFERÊNCIAS

- AARTS, M. M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. **Curr Mol Med.** v. 4, n. 2, p. 137-47, 2004.
- ANBORGH, P. H., GODIN, C., PAMPILLO, M. *et al.* Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin. **J Biol Chem.** v. 280, n. 41, p. 34840-8, 2005.
- ARAGÃO, Bárbara. C. **Análise óptica da junção neuromuscular de diafragma em modelo de camundongo transgênico para Doença de Huntington.** 2013. 71f.. (Mestrado em Biologia Celular) –Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- AUERBACH, B.D., OSTERWEIL, E.K., BEAR, M.F. Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. **Nature.** V.480, p.63-69, 2011.
- BANO, D.; ZANETTI, F.; MENDE, Y.; NICOTERA, P. Neurodegenerative process in Huntington's Disease. **Cell Death and Disease,** v.2, nov.2011
- BATES, G.P. History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history. **Nat Rev Genet.,** v. 6, n.10, p. 766 - 73, 2005.
- BECHERER, U.; GUATIMOSIM, C.; BETZ, W. J. Effects of Staurosporine on Exocytosis and Endocytosis at Frog Motor Nerve Terminals. **The Journal of Neuroscience.** v. 21, n.3, p.782–787, 2001.
- BLAKELY, R. D.; EDWARDS, R. H. Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.** v.4(2), 2012.
- BROUWN, R.C, LOCKWOOD, A.H, SONAWANE, B.R. Neurodegenerative Diseases: An Overview of Environmental Risk Factors. **Environmental Health Perspectives.** v.113, n.9, p.1250-1256, 2005.
- CHANG, R., LIU, X., LI, S., et al. Transgenic animal models for study of the pathogenesis of Huntington's Disease and therapy. **Drug Design, Development and Therapy.** V.15;9, p.2179-2188, 2015.

CHAPMAN, E. R. Synaptotagmin: A Ca^{2+} sensor that triggers exocytosis?. **Molecular Cell Biology**. v.3, p.1-11, 2002.

CHEN, Y., GOUDET, C., PIN, J.P, *et al.* N-{4-Chloro-2-[(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl]phenyl}-2-hydroxybenzamide (CPPHA) acts through a novel site as a positive allosteric modulator of group 1 metabotropic glutamate receptors. **Mol Pharmacol**. v. 73, n. 3, p. 909-18, 2008.

DORIA, J.G, SILVA, F.R, de SOUZA, J.M *et al.* Metabotropic Glutamate Receptor 5 Positive Allosteric Modulator are Neuroprotective in a Mouse Model of Huntington's Disease. **British Journal of Pharmacology**. v.169(4), p.909-921, 2013.

DORIA, Juliana. C. Efeito neuroprotetor dos moduladores alostéricos positivos do receptor metabotrópico de glutamato 5 na Doença de Huntington. 2013. 74f. Mestrado em Neurociências- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

FAIDEAU, M., KIM, J., COMIER, K., *et al.* In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. **Hum Mol Genet**. v. 19, n. 15, p. 3053-67, 2010.

FREMEAUX, Jr, R. T.; KAM, K.; QUERSHI, T. *et al.* Vesicular glutamate transporter 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. **Science**. v. 304, n. 5678, p. 1815–1819, 2004 a.

GAUTHIER, L.R., CHARRIN, B.C, BORRELL-PAGÈS, M. *et al.* Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. **Cell**. v.118(1), p.127-138, 2004.

GRAY M; SHIRASAKI D. I; CEPEDA C; ANDRE V. M; WILBURN B, *et al.* Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. **The Journal of Neuroscience**. v.28, n.24, p.6182-95, 2008.

GUAN, D.F; REN, P-Y; WEI HU, *et al.* The mGluR5 Positive Allosteric Modulator CDPBB Inhibits SO_2 -Induced Protein Radical Formation and Mitochondrial Dysfunction

Through Activation of Akt in Mouse Hippocampal HT22 Cells. **Cell Mol Neurobiol** . V.35, p.573–583, 2014.

HAN, Y.; KAESER, P. S.; SÜDHOF, T. C.; SCHNEGGENBURGER, R. RIM Determines Ca²⁺ Channel Density and Vesicle Docking at the Presynaptic Active Zone. **Neuron**. v.69, p.304–316, 2011.

HO, L.W.; CARMICHAEL, J.; SWARTZ, J.; WYTTEBACH, A.; RANKIN, J.; RUBINSZTEIN, D.C. The molecular biology of Huntington's disease. *Psychol Med* . v. 31, n. 1, p. 3- 14, 2001.

HO, A. K., SAHAKIAN, B.J., BROWN, R.G., *et al.* Profile of cognitive progression in early Huntington's disease. **Neurology**. v. 61, n. 12, p. 1702-6, 2003.

Huntington's disease collaborative research group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell** 1993, 72:971-983.

HUNTINGTON, G. 1872. On Chorea. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**. v.15, p.109-112, 2003.

IANNICOLA, C., MORENO, S., OLIVERIO, S. *et al.* Early Alterations in Gene Expression and Cell Morphology in a Mouse Model of Huntington's Disease. **J. Neurochem.**, Vol.75, N. 2, 2000.

JACKSON, M., GENTLEMAN, S., LENNOX, G. *et al.* The cortical neuritic pathology of Huntington's disease. **Neuropathol Appl Neurobiol.**, v.21(1), p.18-26, 1995.

KATZ, B. Nerve, **Muscle and Synapse**. McGraw-Hill Book Company. 1966. 193p.

KINNEY, G.G, O'BRIEN, J.A, LAMAIRE, W., *et al.* A novel selective positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor subtype 5 has in vivo activity and antipsychotic-like effects in rat behavioral models. *The J of Pharmacol and Exp Ther.* v.313(1), p.199-206, 2005.

LAFORET, G.A., SAPP, E., CHASE, K., *et al.* Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. **The Journal of Neuroscience**. v. 21(23), p.9112-9123, 2001.

LANSKA, D.J., LAVINE, L., LANSKA, M.J., et al. Huntington's disease mortality in the United States. **Neurology**. V.38(5), p.769-772, 1988.

LI, L., SENGUPTA, A., HAQUE, N., et al. Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration. **FEBS Letters**. v.566, p.261-269, 2004.

LINDSLEY, C. W., WISNOSKI, D.D., LEISTER, W.H., et al. Discovery of positive allosteric modulators for the metabotropic glutamate receptor subtype 5 from a series of N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)benzamides that potentiate receptor function in vivo. **J Med Chem**. v. 47, n. 24, p. 5825-8, 2004.

LOANE, D.J., STOICA, B.A., TCHANTCHOU, F., et al. Novel mGluR5 Positive Allosteric Modulator Improves Functional Recovery, Attenuates Neurodegeneration, and Alters Microglial Polarization after Experimental Traumatic Brain Injury. **Neurotherapeutics**. V.11, p.857-869, 2014.

MAO, L., YANG, L., TANG, Q., et al. The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. **J Neurosci**. v. 25, n. 10, p. 2741-52, 2005.

MASU, M., TANABE, Y., TSUCHIDA, K., et al. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. **Nature**, v. 349, n. 6312, p. 760-5, 1991.

MEEK, P.D., MCKEITHAN, K., SCHUMOCK, G.T. Economic considerations in Alzheimer's disease. **Pharmacotherapy**. v.18, n. 2:, p. 68–73, 1998.

MURTHY, Venkatesh N.; DE CAMILLI, Pietro. Cell Biology of the presynaptic terminal. **Annual Review of Neuroscience**, v.26, p.701- 728, 2003.

NICHOLLS, D. G. Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. **Curr Mol Med**. v. 4, n. 2, p. 149-77, 2004.

O'BRIEN, J.A., LEMAIRE, W., CHEN, T.B., et al. A family of highly selective allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor subtype 5. **Mol Pharmacol**. v. 64, n. 3, p. 731-40, 2003.

QUARRELL, O., O'DONOVAN, K. L, BANDMANN. O, STRONG. M. The Prevalence of Juvenile Huntington's Disease: A Review of the Literature and MetaAnalysis. **PLOS Currents Huntington Disease**. 2012 Jul 20 . Edition 1.

REMAUD, J., CECCOM, J., CARPONCY, J., et al. Anisomycin injection in area CA3 of the hippocampus impairs both short-term and long-term memories of contextual fear. **Learning & Memory**. v. 21, p. 311-315, 2014

RIBEIRO, F.M., PAQUET, M., FERREIRA, L.T., *et al*. Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease. **J Neurosci**. v. 30, n. 1, p. 316-24, 2010.

RIZZOLI, S. O.; BETZ, W. J. Synaptic vesicle pools. **Nature Reviews Neurosciences**, v.6, n.1, p.57–69, 2005.

ROSS, R.A.C. Huntington's disease: a clinical review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. 5:40, 2010.

RUB, U., HOCHE, F., BRUNT, E.R., *et al*. Degeneration of the Cerebellum in Huntington's Disease (HD): Possible Relevance for the Clinical Picture and Potential Gateway to Pathological Mechanisms of the Disease Process. **Brain Pathology**. v. 23(2), p.165-177, 2013.

SHEN, J. Modeling the glutamate-glutamine neurotransmitter cycle. **Journal List**. v.5, 2013.

SMITH, R.; BRUNDIN, P.; LY, J. Y. Synaptic dysfunction in Huntington's Disease: a new perspective. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, p.1901-1912, 2005.

SÖLLNER, T.; BENNETT, M. K.; WHITEHEART, S. W. *et al*. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. **Cell**. v.75, n.3, p.409–418, 1993.

SOUSA, C.M., HUMBERT, S.. Huntingtin: Here, There, Everywhere! **Journal of Huntington's Disease** 2. 2(4), p. 395-403, 2013.

SOUTHWELL, A. L.; KO, J.; PATTERSON, P. H. Intrabody gene therapy ameliorates motor, cognitive, and neuropathological symptoms in multiple mouse models of Huntington's disease. **J Neurosci**. v. 29, n. 43, p. 13589-602, 2009.

SÜDHOF, T. C. The Synaptic Vesicle Cycle. **Annual Review of Neuroscience**, v.27, p.509- 547, 2004.

TRIBIZI, S.J., CLEETER, M.W., XUEREBA, J., *et al.* Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. **Ann Neurol**, v.45(1), p.25-32, 1999.

TRUSHINA, E., DYER, R.B., BADGER, J.D., *et al.* Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. **Mol Cell Biol**. v.24(18), p.8192-8209, 2004.

VONSATTEL, J.P.; DIFIGLIA, M. Huntington disease. **J Neuropathol Exp Neurol** . v. 57, n. 5, p. 369 - 84, 1998.

WALLING, H. W. BALDASSARE, J. J. WESTFALL, T. C. Molecular aspects of Huntington's Disease. **Journal of Neuroscience Research**. v.54, p.301-308, 1998.

WEBER T, ZEMELMAN BV, MCNEW JA, *et al.* SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. **Cell**. v.92, p.759–72, 1998.

WU, L.G., HAMID, E., SHIN, W., *et al.*,. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. **Annu Rev Physiol**. V.74, p.301-331, 2014.

YANG, X.W, GRAY, M. Chapter 7: Mouse Models for Validating Preclinical Candidates for Huntington's Disease. **Neurobiology of Huntington's disease: Applications to Drug Discovery**. Ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2011.

YOUNG, A. B. Huntingtin in health and disease. **J Clin Invest**. v. 111, n. 3, p. 299-302, Feb 2003.

8. Anexos

ANEXO – 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 3/2011**, relativo ao projeto intitulado "***Investigação da função de receptor MGLUR5 na ativação da quinase AKT e de sua sinalização subsequente, em conexão com a patologia da doença de huntington (DH)***", que tem como responsável(is) **Fabiola Mara Ribeiro**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **27/ 04/2011**.

Este certificado expira-se em **27/ 04/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 3/2011**, related to the project entitled "***na identification of mGluR5 receptor's role for activation of Akt kinase and subsequent signalling thereof, connected with a pathology of Huntington's disease (HD)***", under the supervisors of **Fabiola Mara Ribeiro**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 27, 2011**.

This certificate expires in **April 27, 2016**.

Belo Horizonte, 2 de Maio de 2011.

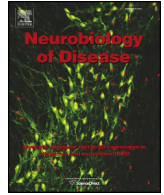
Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proc.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO – 2

Artigo publicado em 2015, cujos resultados das análises no corpo estriado dos camundongos BACHD e BACHD tratados com CDPPB foram apresentados e selecionados em 2014 como trabalho destaque na XXIII Semana de Iniciação Científica da UFMG, no qual Jéssica Neves Andrade ganhou o Grande Prêmio Professora Conceição Machado da Semana do Conhecimento da UFMG 2014



The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPPB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease



J.G. Doria^a, J.M. de Souza^a, J.N. Andrade^b, H.A. Rodrigues^b, I.M. Guimaraes^a, T.G. Carvalho^a, C. Guatimosim^b, T. Dobransky^c, F.M. Ribeiro^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

^b Departamento de Morfologia, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

^c DB Biotech, Kosice 040 11, Slovakia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 May 2014

Revised 1 July 2014

Accepted 14 August 2014

Available online 24 August 2014

Keywords:

CDPPB

Metabotropic glutamate receptors

Huntington's disease

BDNF

Neuroprotection

Memory and cognition

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an autosomal-dominant neurodegenerative disorder caused by a polyglutamine expansion in the amino-terminal region of the huntingtin protein (htt), leading to motor dysfunction, cognitive decline, psychiatric alterations, and death. The metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) has been implicated in HD and we have recently demonstrated that mGluR5 positive allosteric modulators (PAMs) are neuroprotective in vitro. In the present study we demonstrate that the mGluR5 PAM, CDPPB, is a potent neuroprotective drug, in vitro and in vivo, capable of delaying HD-related symptoms. The HD mouse model, BACHD, exhibits many HD features, including neuronal cell loss, htt aggregates, motor incoordination and memory impairment. However, chronic treatment of BACHD mice with CDPPB 1.5 mg/kg s.c. for 18 weeks increased the activation of cell signaling pathways important for neuronal survival, including increased AKT and ERK1/2 phosphorylation and augmented the BDNF mRNA expression. CDPPB chronic treatment was also able to prevent the neuronal cell loss that takes place in the striatum of BACHD mice and decrease htt aggregate formation. Moreover, CDPPB chronic treatment was efficient to partially ameliorate motor incoordination and to rescue the memory deficit exhibited by BACHD mice. Importantly, no toxic effects or stereotypical behavior were observed upon CDPPB chronic treatment. Thus, CDPPB is a potential drug to treat HD, preventing neuronal cell loss and htt aggregate formation and delaying HD symptoms.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder caused by an unstable CAG repeat expansion in the amino-terminal region of the huntingtin protein (htt) (Group, 1993). Clinical manifestations of HD usually initiate between 35 and 50 years of age as involuntary body movement, loss of cognitive function, and psychiatric disturbance, inevitably leading to death (Li and Li, 2004; Vonsattel and DiFiglia, 1998; Young, 2003). Neuropathological analysis reveals selective and progressive neuronal loss in the striatum (DiFiglia, 1990; Vonsattel et al., 1985).

Glutamate-mediated neurotoxicity has been postulated to play an important role in the pathogenesis of HD (Anborgh et al., 2005; Calabresi et al., 1999; DiFiglia, 1990; Ribeiro et al., 2010). Stimulation of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) leads to the formation

of inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) and release of intracellular Ca^{2+} and mutant htt can enhance this cell signaling pathway, leading to toxic levels of intracellular Ca^{2+} (Ribeiro et al., 2010; Tang et al., 2005; Tang et al., 2003). However, mGluR5 stimulation can also promote activation of neuroprotective cell signaling pathways, involving ERK1/2 and AKT (Doria et al., 2013; Ribeiro et al., 2010). We have recently demonstrated that mGluR5 positive allosteric modulators (PAMs) can promote neuronal survival by activating AKT without triggering Ca^{2+} release (Doria et al., 2013). Moreover, it has been shown that mGluR5 PAMs have a positive effect on memory, facilitating neurotransmission and improving spatial learning (Ayala et al., 2009) and rescuing pharmacologically induced object recognition memory impairment (Reichel et al., 2011; Uslaner et al., 2009). In contrast, both mGluR5 receptor antagonism and genetic deletion have been shown to cause deleterious effects on learning and memory (Simonyi et al., 2010). Thus, mGluR5 PAMs are potential drugs to treat HD.

In the present study we demonstrate that the mGluR5 PAM, 3-Cyano-N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)benzamide (CDPPB), can ameliorate pathology and phenotypic signs exhibited by a mouse model of HD, BACHD. We performed a concentration–response curve using CDPPB and we found that this mGluR5 PAM is a very potent

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Ave. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

E-mail address: fmribeiro@icb.ufmg.br (F.M. Ribeiro).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

neuroprotective drug as it was capable of protecting neurons against glutamate insult even at low concentrations. We also investigated the effect of CDPBP chronic administration and we found that BACHD mice treated with 1.5 mg/kg CDPBP s.c. for 18 weeks exhibited higher levels of AKT and ERK1/2 activation, as well as enhanced *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) mRNA expression. Moreover, treatment with CDPBP was capable of reducing the neurodegeneration and htt aggregate formation that take place in BACHD brain. Electron microscopy analyses showed that there was a decrease in the number of vesicles at the pre-synaptic active zone of BACHD mice and that CDPBP chronic treatment normalized this deficit. Finally, our behavioral tests demonstrated that CDPBP treatment partially improved motor coordination and normalized memory deficit in BACHD mice. Thus, our results indicate that CDPBP chronic treatment has the potential to prevent the neuronal loss and ameliorate the motor and cognitive symptoms observed in a HD mouse model.

Materials and methods

Materials

Neurobasal medium, N2 and B27 supplements, GlutaMAX (50.0 mg/ml penicillin and 50.0 mg/ml streptomycin), Live/Dead viability assay, TRIzol, Nuclease-Free Water, and Power SYBR® Green PCR Master Mix were purchased from Life Technologies (Foster City, CA, USA). Mouse anti-Huntingtin EM48 (Cat# MAB5374, RRID: [AB_177645](#)) and mouse anti-NeuN (Cat# MAB377, RRID: [AB_2298772](#)) monoclonal antibodies were purchased from Millipore (Billerica, MA, USA). 3-Cyano-N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)benzamide (CDPBP) was purchased from Tocris Cookson Inc. (Ellisville, MO, USA). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (Cat# 170-6515, <http://www.bio-rad.com/pt-br/sku/170-6515-goat-anti-rabbit-igg-h-l-hrp-conjugate>) was from BioRad (Hercules, CA, USA). ECL Western blotting detection reagents were from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Anti-phospho AKT (Cat# DB 127, [http://www.dbbiotech.com/products/antibodies/wb/anti-akt1-\(pser-473\).html](http://www.dbbiotech.com/products/antibodies/wb/anti-akt1-(pser-473).html)), anti-phospho ERK1/2 (Cat# DB 013, <http://www.dbbiotech.com/products/antibodies/wb/anti-phospho-erk-1,2.html>), anti-AKT (Cat# DB 126, <http://www.dbbiotech.com/products/antibodies/wb/anti-akt1.html>) and anti-ERK1/2 (Cat# DB 012, <http://www.dbbiotech.com/products/antibodies/wb/anti-erk-1,2.html>) rabbit monospecific clonal antibodies were from DB Biotech (Kosice, Slovakia). Vectastain Elite ABC Kit (Mouse IgG) and Vector SG Peroxidase Substrate Kit were purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). All other biochemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Mouse model

FVB/NJ (wild-type, RRID: IMSR_JAX:001800) and FVB/N-Tg(HTT^{97Q}) IXwy/J (BACHD) transgenic mice (RRID: IMSR_JAX:008197, <http://jaxmice.jax.org/strain/008197.html>) (Gray et al., 2008) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Mice were housed in an animal care facility at 23 °C on a 12 h light/12 h dark cycle with food and water provided ad libitum. Animal care was in accordance with the Universidade Federal de Minas Gerais Ethics Committee on Animal Experimentation, CETEA.

Neuronal primary culture preparation

Neuronal cultures were prepared from the striatal region of E15 mouse embryo brains. Animal procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation, CETEA/UFMG. After dissection, striatal tissue was submitted to trypsin digestion followed by cell dissociation using a fire-polished Pasteur pipette. Cells were plated on poly-L-ornithine coated dishes in Neurobasal medium supplemented with N2

and B27 supplements, 2.0 mM GlutaMAX, 50.0 µg/ml penicillin, and 50.0 µg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified incubator and cultured for 10 to 12 days in vitro (DIV) with medium replenishment every 4 days.

Drug administration

CDPBP was dissolved in dimethyl-sulfoxide (DMSO) and was continuously delivered by subcutaneously implanted Alzet® micro-osmotic pumps (200 µl total volume, model 2006, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany). Filling and preparation of micro-osmotic pumps for implantation were done as suggested by the manufacturer. Pump rate was 0.15 µl/h and pumping duration was 6 weeks. Either vehicle (DMSO) or CDPBP 1.5 mg/kg s.c. per day was continuously delivered to animals during a total of 18 weeks.

EM48 and NeuN immunohistochemistry

Mice were anesthetized with ketamine/xylazine (100/10 mg/kg) i.p. and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline (PBS). The brains were then dissected out and stored in 4% PFA in PBS for 24 h. Prior to sectioning, brains were put into 30% sucrose in PBS overnight at 4 °C. Brains were coronally sectioned in cryostat and 40 µm slices were stored in cryoprotect solution. Immunohistochemistry was performed on 40 µm free-floating sections using a peroxidase based immunostaining protocol. In brief, endogenous peroxidase activity was quenched using 0.3% hydrogen peroxide, washed 2 × 5 min with 1 × PBS, after which the membranes were permeabilized using 1% Triton X-100 for 10 min. Non-specific binding was blocked using 1.5% horse serum from Vector Elite Kit for 30 min, followed by incubation in either mouse anti-htt EM48 (1:100) or mouse anti-NeuN (1:100) primary antibodies, with 2% normal horse serum (from Vector Elite Kit) and 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS overnight at 4 °C. Sections were washed in PBS and then incubated in secondary antibody (biotinylated horse anti-mouse, 1:400, Vector Elite ABC kit mouse) for 90 min at 4 °C. Finally, sections were incubated in avidin-biotin enzyme reagent complex (from Vector Elite Kit) for 90 min at 4 °C, according to the manufacturer's instructions. Immunostaining was visualized using a chromogen (Vector SG substrate). Sections were mounted on slides and visualized using an Axio Imager A2-Carl Zeiss Microscope with a Zeiss 20× lens, representative 710 µm × 532 µm areas of striatum were imaged for analysis. The number of NeuN and EM48-positive puncta per image was counted using the cell counter tool from ImageJ (NIH, USA, RRID:nif-0000-30467).

Immunoblotting

Cortex, striatum and hippocampus were dissected and lysed in Triton buffer (1% Triton X-100, 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.2) containing protease inhibitors (1.0 mM AEBSF and 10.0 µg/ml of both leupeptin and aprotinin). 100.0 µg of total cellular protein for each sample was subjected to SDS-PAGE, followed by electroblotting onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% BSA in wash buffer (150.0 mM NaCl, 10.0 mM Tris-HCl, pH 7.0, and 0.05% Tween 20) for 1 h and then incubated with either rabbit anti-phospho AKT (S473) (1:1000) or rabbit anti-phospho ERK1/2 (Thr202/Thr204) (1:1000) antibodies in wash buffer containing 3% BSA for 2 h at room temperature. Membranes were rinsed three times with wash buffer and then incubated with secondary peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody diluted 1:5000 in wash buffer containing 3% skim milk for 1 h. Membranes were rinsed three times with wash buffer and incubated with ECL Western blotting detection reagents. Antibodies were then stripped and membranes were incubated with either rabbit anti-AKT (1:1000) or rabbit anti-ERK1/2 (1:1000) antibodies for 2 h and probed with secondary antibody anti-rabbit IgG diluted 1:5000 to determine total AKT and ERK1/2 expression. Non-saturated,

immunoreactive AKT and ERK1/2 bands were quantified by scanning densitometry. Immuno-band intensity was calculated using ImageJ software and the number of pixels of AKT and ERK1/2 phospho-bands was divided by the number of pixels of total AKT and ERK1/2 to normalize phosphorylation levels of kinases to total kinase expression.

Quantitative RT-PCR

RNA was isolated using TRIzol® reagent as per the manufacturer's instructions (Invitrogen, Burlington, ON, USA). RNA was re-suspended in 20 µl of RNase-free water, and its concentration and quality were analyzed by NanoDrop™ (Thermo Scientific, Wilmington, USA) and gel electrophoresis, respectively. cDNAs were prepared from 400 ng of total RNA extracted in a 20 µl final reverse transcription reaction. Quantitative PCR was performed using the Power SYBR® Green PCR Master Mix and the StepOnePlus™ Real-Time PCR system. Quantitative RT-PCR (qPCR) was performed to quantify mRNA levels of the brain-derived neurotrophic factor – *BDNF* (NM_001285416.1). Primers were designed according to [Agerman et al. \(2003\)](#) (forward: 5' ATGAAAGA AGTAAACGTCCAC 3'; reverse 5' CCAGCAGAAAGAGTAGAGGAG 3'). Samples were prepared in triplicate, and changes in gene expression were determined with the ΔC_t method using actin for normalization. RT-qPCRs showed good quality of amplification, and the specificity and efficiency of primers were tested and confirmed by the serial dilution method.

Cell death assay

Neurons were incubated for 20 h with either vehicle (Hank's balanced salt solution: HBSS) or glutamate, in the presence or absence of CDPPB, as indicated in the *figure legend*, and cell death was determined by Live/Dead viability assay, as described previously ([Doria et al., 2013](#)). Briefly, neurons were stained with 2.0 µM calcein acetoxymethyl ester (AM) and 2.0 µM ethidium homodimer-1 for 15 min and the fractions of live (calcein AM positive) and dead (ethidium homodimer-1 positive) cells were determined. Neurons were visualized by fluorescence microscopy EVOS® FLOID® Cell Imaging Station (Life Technologies, Carlsbad, CA, United States) and scored by a blinded observer. A minimum of 300 cells were analyzed per well in triplicate using ImageJ software. Dead cells were expressed as a percentage of the total number of cells.

Routine histology and transmission electron microscopy (TEM)

For histological and ultrastructural studies, mice were anesthetized with ketamine/xylazine (70/10 mg/kg) i.p. and transcardially perfused with ice-cold PBS for 10 min, followed by ice-cold fixative modified Karnovsky solution for 10 min. Perfused brains were maintained in fixative Karnovsky solution overnight at 4 °C. For routine histology, following fixation, striatal samples were dehydrated in ethanol ascendant series (70%, 80%, 90%, 95% 2×) and then included in glycol methacrylate resin. Blocks were sectioned (5 µm) in a microtome and stained with cresyl violet for posterior visualization in a Zeiss Axio Imager A2 microscope using a 40× objective. For EM, striatum samples were washed with cacodylate buffer 0.1 M, cut into several pieces, post-fixed in reduced osmium (2% osmium tetroxide containing 1.6% potassium ferrocyanide), contrasted *en bloc* with uranyl acetate (2% uranyl acetate in deionized water), dehydrated through an ascending series of ethanol solutions and embedded in EPON. Blocks were sectioned (50 nm) and collected on 300 mesh copper grids and contrasted with lead citrate. Sections were viewed using either a Tecnai-G2-Spirit-FEI/Quanta electron microscope (120 kV Philips), located at UFMG Microscopy Center, or an EM 10 Zeiss electron microscope (80 kV), at CAPI, ICB – UFMG.

TEM image analysis

Synapses were selected based on the presence of synaptic vesicles and mitochondria in presynaptic terminals and postsynaptic density in the postsynaptic membrane. Single sections through synapses of interest were traced and the terminal areas (cross section area of each nerve terminal) and synaptic vesicles' number were determined. Synaptic vesicle distribution was evaluated by quantification of the vesicles located at different distances from the active zone, as previously described ([Becherer et al., 2001](#); [Han et al., 2011](#); [Rodrigues et al., 2013](#)). Vesicles within 200 nm from the presynaptic membrane were counted in 50 nm bins. All image analysis in this study was performed “blind” in the sense that the person performing the analysis did not know what genotype or treatment the sample had received.

Object recognition

The object recognition test is based on differential spontaneous exploration of objects placed at a novel location. The apparatus used was an open box made of PVC 50 cm × 35 cm × 25 cm surmounted by a video camera and a light. Two identical objects made of glass or plastic were used and their weight was such that they could not be displaced by mice. As far as we could ascertain, they had no natural significance for mice and they had never been associated with reinforcement. Initial tests showed that mice did not have any preference for the objects used. The general procedure consisted of three different phases: a familiarization phase, a training phase and a test phase. On the 1st day, mice were individually submitted to a single familiarization session of 10 min, during which they were introduced to the empty arena. On the second day (24 h later), animals were submitted to a single 10 min training session during which two identical objects were placed in symmetrical positions from the center of the arena and each object was 15 cm from the side walls. After a 90 min delay during which mice returned to their home-cage, they were reintroduced into the arena for 10 min (test phase) and exposed to the same objects, but one of the objects was displaced to a novel position. To control for odor cues, the apparatus was cleaned with 70% ethanol and ventilated between each session and animal. All sessions were performed during the first part of the light cycle and mice were acclimated to the room for at least 15 min before the beginning of each session.

Rotarod test

Training and testing of mice on the rotarod occurred during the light cycle between the hours of 08:00 and 14:00. Prior to rotarod assessment, mice were habituated to the testing room for 15–20 min. Mice were placed on the rotarod and left at rest for 5 min on the first day of training before beginning the accelerating protocol. Mice were then trained for a maximum of 2 min in five trials at an accelerating speed (from 4 to 40 RPM in 300 s) for three consecutive days with 10 min breaks between each trial and returned to their home cages at the end of training day. On test day, mice were assessed in three trials with accelerating speed separated by a 20-min inter-trial interval. The latency to fall from the rod was recorded, and the average obtained from the three trials was used for analysis. Mice remaining on the rod for 300 s were removed and their time scored as 300 s.

Data analysis

Means ± SEM are shown for the number of independent experiments indicated in *figure legends*. GraphPad Prism™ (RRID: [rid_000081](#)) software was used to analyze data for statistical significance and for curve fitting. Statistical significance was determined by analysis of variance (ANOVA) testing followed by Bonferroni post-hoc Multiple Comparison Testing.

Results

Glutamate is considered the major neurotransmitter involved in HD-related neuronal cell death and we have previously demonstrated that CDPPB can protect against glutamate-induced neuronal death *in vitro* (Doria et al., 2013). Thus, we decided to investigate whether CDPPB exhibits efficacy *in vivo*. To determine optimal CDPPB dose for *in vivo* studies we performed a concentration–response experiment. Primary cultured striatal neurons stimulated with 50.0 μ M glutamate for 20 h exhibited higher levels of neuronal death, as compared to control (Fig. 1). However, when neurons were stimulated with glutamate in the presence of CDPPB at the concentrations of 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0 and 10,000.0 nM, neuronal cell death levels were substantially reduced (Fig. 1G). Moreover, when applied in the absence of glutamate, CDPPB did not increase neuronal death above basal levels at any tested

concentration (Fig. 1G). Thus, CDPPB is a very potent drug, exhibiting neuroprotection even when applied at low doses.

In order to perform the *in vivo* tests using CDPPB, 12 weeks old BACHD mice, which is a mouse model of HD (Gray et al., 2008), were treated with either vehicle (DMSO) or 1.5 mg/kg s.c. CDPPB for a total of 18 weeks. To evaluate CDPPB effects, molecular and behavioral features of BACHD mice treated with either vehicle or CDPPB were compared to those of WT littermates. It has been shown that primary cultured cortical neurons treated with CDPPB exhibit high levels of ERK1/2 activation (Chen et al., 2012). To determine whether CDPPB is capable of activating ERK1/2 *in vivo*, levels of ERK1/2 phosphorylation were assessed using cell lysates from the cortex, striatum and hippocampus of 30 weeks old WT, vehicle-treated and CDPPB-treated BACHD mice. CDPPB chronic treatment increased ERK1/2 activation in the cortex of BACHD mice, as compared to vehicle-treated BACHD and

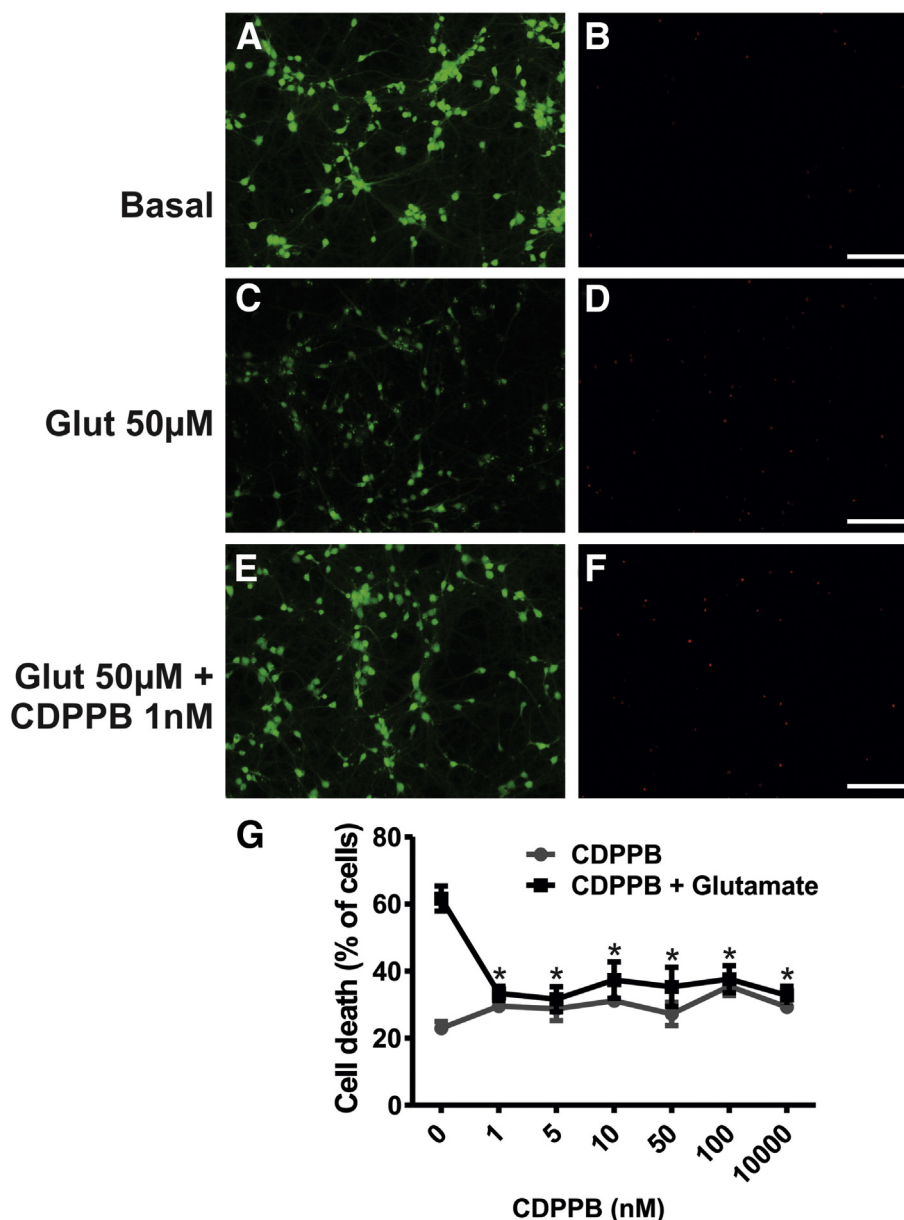


Fig. 1. CDPPB protects against glutamate-induced neuronal cell death. Shown is a representative image for primary cultured striatal neurons labeled with calcein AM (A, green, live cells) and ethidium homodimer-1 (B, red, dead cells) exhibiting basal neuronal death. Also shown is a representative image for primary cultured striatal neurons treated with 50.0 μ M glutamate for 20 h in the absence (calcein AM (C) and ethidium homodimer-1 (D)) or presence of 1.0 nM CDPPB (calcein AM (E) and ethidium homodimer-1 (F)). (G) Graph shows the effect of CDPPB at the concentrations of 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0, and 10,000.0 nM on the percentage of neuronal cell death in primary cultured striatal neurons that were either untreated or treated with 50.0 μ M glutamate for 20 h. Data represent the means $\pm$ SEM of five independent experiments. * indicate significant differences as compared to neurons treated with glutamate in the absence of CDPPB ($p < 0.05$).

WT mice (Fig. 2A and D). Although CDPPB treatment did not increase ERK1/2 activation in the striatum (Fig. 2B and E), ERK1/2 phosphorylation was higher in the hippocampus of CDPPB-treated BACHD mice, as compared to that of vehicle-treated BACHD mice (Fig. 2C and F).

Increased ERK1/2 phosphorylation can activate cell signaling pathways important for cell survival, including increased expression levels of the brain derived neurotrophic factor (BDNF). Quantitative PCR (qPCR) indicated that BDNF mRNA levels were decreased in the cortex of 52 weeks old BACHD mice, but not in 8 and 30 weeks old BACHD mice (Sup. Fig. 1). To determine whether CDPPB could increase BDNF expression levels, qPCR was performed to measure BDNF mRNA levels in the cortex, striatum and hippocampus of 30 weeks old WT, vehicle-treated and CDPPB-treated BACHD mice. At 30 weeks of age, BDNF expression was higher only in the cortex of CDPPB-treated BACHD mice, as compared to vehicle-treated BACHD and WT mice (Fig. 3). Similar results were obtained using a second pair of BDNF-specific primers (data not shown). Thus, the augmentation in ERK1/2 activation in the cortex was followed by increased BDNF expression and this increase may normalize BDNF levels at older mice.

BACHD mice exhibit robust levels of htt aggregates and cortical and striatal atrophy at 12, but not at 6 months of age (Gray et al., 2008). Thus, to determine whether CDPPB is effective to ameliorate HD-related pathological alterations we analyzed neurodegeneration in both 30 weeks and 52 weeks old mice. For all CDPPB-treated mice, CDPPB treatment started at the 12th week and finished at the 30th week of life. However, a group of mice was sacrificed right after the end of treatment (30 weeks old mice) and another group of mice was left to age up until the 52nd week. From the 30th to the 52nd week mice received no CDPPB. Histological analysis indicated that 30 weeks old vehicle-treated BACHD mice exhibited reduced number of cells in the striatum, as compared to WT mice (Fig. 4A–D). However, the number of striatal cells of CDPPB-treated BACHD mice was not different from that of WT mice (Fig. 4D). To further quantify the effect of CDPPB on neurodegeneration, we determined the weight of the striatum and hippocampus of 30 weeks old WT, vehicle-treated and CDPPB-treated BACHD mice. The weight of the striatum and hippocampus of vehicle-treated BACHD mice were significantly smaller than those of WT mice (Sup. Fig. 2). Nevertheless, the weight of CDPPB-treated BACHD mice striatum and hippocampus were not different than those of WT mice

(Sup. Fig. 2). To determine whether the cells that are lost in the striatum of BACHD mice are neurons, immunohistochemistry experiments were performed using the neuronal specific marker, neuronal nuclei (NeuN). 52 weeks old vehicle-treated BACHD mice exhibited diminished number of neurons in the striatum, as compared to WT mice (Fig. 5). However, the number of striatal neurons of CDPPB-treated BACHD mice was very similar to that of WT mice and increased when compared to vehicle-treated BACHD mice (Fig. 5). These data indicate that CDPPB chronic treatment is capable of preventing striatal neuronal cell loss in vivo.

Previously we demonstrated that CDPPB is capable of increasing AKT activation when applied to striatal neuronal cultures (Doria et al., 2013). To determine whether CDPPB chronic treatment also activates AKT in vivo, we measured AKT activation levels in the cortex, striatum and hippocampus of 30 weeks old WT, vehicle-treated and CDPPB-treated BACHD mice. CDPPB treatment increased AKT phosphorylation in the cortex, striatum and hippocampus of BACHD mice, as compared to WT mice (Fig. 6). Moreover, AKT activation was higher in the striatum and hippocampus of CDPPB-treated BACHD mice, as compared to vehicle-treated BACHD mice (Fig. 6B–C and E–F). AKT activation can promote phosphorylation of mutant htt protein, which functions to lessen htt aggregate formation and neuronal cell death (Humbert et al., 2002; Warby et al., 2009). To determine the levels of htt aggregate formation in the striatum of 52 weeks old WT, vehicle-treated and CDPPB-treated BACHD mice we performed immunohistochemistry experiments using EM48 antibody, which specifically labels htt aggregates. Vehicle-treated BACHD mice exhibited high levels of htt aggregation, as compared to WT mice, which did not exhibit htt aggregates (Fig. 7A–B and D). However, the striatum of CDPPB-treated BACHD mice displayed much less htt aggregate formation than that of vehicle-treated BACHD mice (Fig. 7B–D). Together, these data indicate that CDPPB chronic treatment is capable of activating AKT in vivo and decreasing htt aggregate formation.

In order to perform a detailed analysis of synapse morphology we employed EM to examine slices depicting the striatum area of 30 weeks old WT, vehicle-treated and CDPPB-treated BACHD mice. General analysis of neuronal morphology indicated that at the ultra-structure level there was no gross difference among experimental groups regarding neuropil, pre- and post-synaptic contacts and general

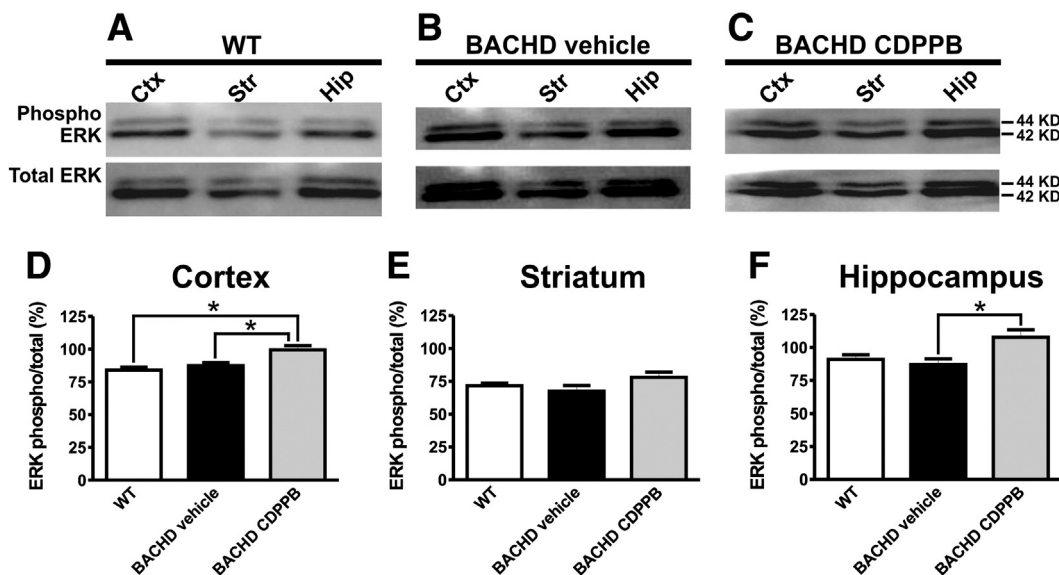


Fig. 2. ERK1/2 phosphorylation is augmented in 30 weeks old BACHD mice chronically treated with CDPPB. Shown are representative immunoblots for phospho-(upper panel) and total-ERK1/2 expression (lower panel) in the cortex (Ctx), striatum (Str) and hippocampus (Hip) of wild-type (WT) (A), vehicle-treated (B) and CDPPB-treated (C) BACHD mice. 100.0 μ g of cell lysate was used for each sample. Graphs show the densitometric analysis of phospho-ERK1/2 normalized to total-ERK1/2 expression in the cortex (D), striatum (E) and hippocampus (F) of wild-type (WT, $n = 3$), vehicle-treated ($n = 3$) and CDPPB-treated ($n = 3$) BACHD mice. Data represent the means $\pm$ SEM, expressed as percentage of basal ERK1/2 phosphorylation. * indicate significant differences ($p < 0.05$).

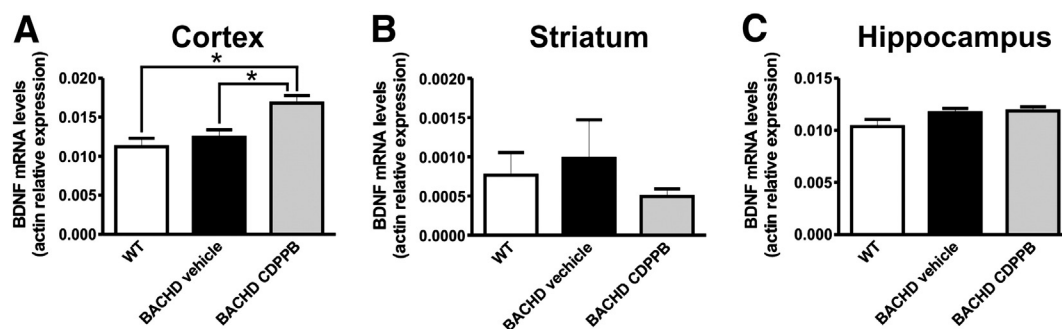


Fig. 3. BDNF gene expression is increased in 30 weeks old BACHD mice chronically treated with CDPPB. Graphs show mRNA levels of BDNF in the cortex, striatum and hippocampus of 30 weeks old wild-type (WT, $n = 3$) (D), vehicle-treated ($n = 3$) (E) and CDPPB-treated ($n = 3$) (F) BACHD mice determined by quantitative RT-PCR. qPCR reaction was performed in triplicate and normalized to actin mRNA levels. Data represent the means $\pm$ SEM. * indicate significant differences ($p < 0.05$).

organelles (Fig. 8A–C). We therefore performed detailed analyses in order to determine which, if any, synapse morphology parameters were altered in BACHD mice and whether CDPPB treatment could normalize such alterations (Fig. 8D–F). There was no difference in terms of presynaptic area size when comparing WT, vehicle-treated and CDPPB-treated BACHD mice (Fig. 8G). The number of synaptic vesicles in the presynaptic terminal was also not significantly different, although BACHD mice exhibited a tendency towards decreased amount of vesicles when compared to WT mice (Fig. 8H). The number of vesicles in the active zone is another important parameter to be measured, as it can directly influence neurotransmitter release and thus neuronal communication. Vehicle-treated BACHD mice exhibited reduced number of synaptic vesicles in the active zone, when compared to that of WT (Fig. 8I). However, CDPPB treatment appears to be able to, at least partially, rescue this deficit, as the number of vesicles in the active zone of CDPPB-treated BACHD mice was not different from that of WT mice (Fig. 8I).

BACHD mice exhibit progressive motor and cognitive deficits (Doria et al., 2013; Gray et al., 2008), which are important clinical features displayed by HD patients. Motor performance can be assessed using the accelerating rotarod paradigm (Ribeiro et al., 2014). Thus, WT,

vehicle-treated and CDPPB-treated BACHD mice at the ages of 12 and 30 weeks were submitted to the rotarod. At both 12 and 30 weeks of age, vehicle-treated BACHD mice latency to fall from the rotarod was reduced when compared to that of WT mice, indicating that BACHD mice exhibited motor incoordination (Fig. 9A–B). In the first week of CDPPB treatment (12th week), CDPPB-treated BACHD mice exhibited the same level of rotarod performance as vehicle-treated BACHD mice, which was much worse than that of WT mice. Conversely, the performance on the rotarod of CDPPB-treated BACHD mice at 30 weeks of age was not significantly different from that of WT mice (Fig. 9B). Although CDPPB treatment was not able to completely reverse BACHD motor incoordination, these data indicate that the mGluR5 PAM has a positive effect on the motor alterations observed in BACHD mice.

To test whether CDPPB chronic treatment could improve the memory deficit observed in BACHD mice we performed the object location memory task, which measures mice preference for objects placed on a new location. In training phase, mice were allowed to explore two identical objects for 10 min. Following a 90 min delay, mice were reintroduced into the arena for test phase and were exposed for 10 min to the same two objects, one placed at the familiar location and the other displaced to a novel location. Time of object exploration

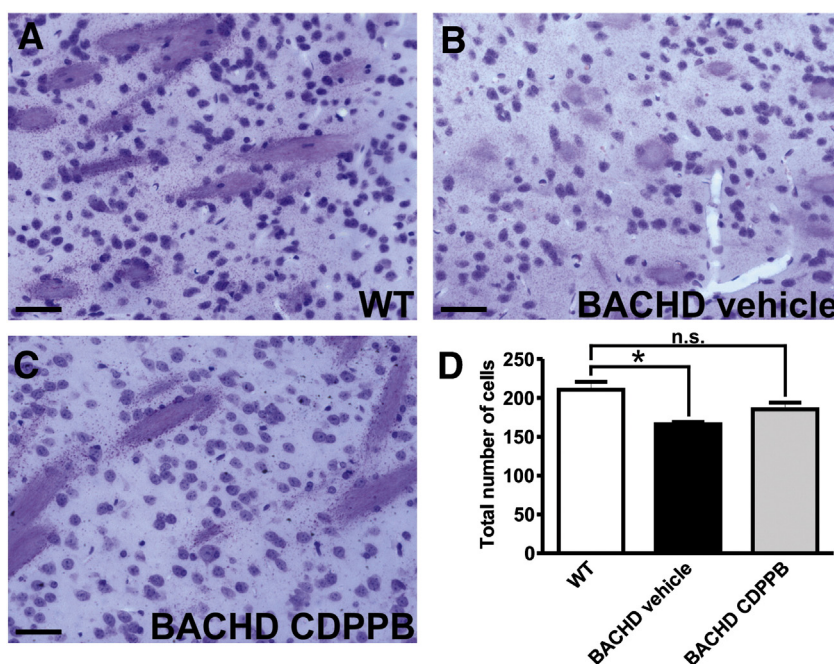


Fig. 4. CDPPB chronic treatment rescues cell loss in the striatum of 30 weeks old BACHD mice. Shown are representative histological images of the striatum from WT (A), vehicle-treated (B) and CDPPB treated (C) BACHD mice. Scale bar = 50 μ m. (D) Graph shows quantification of total number of cells found in the striatum of WT ($n = 3$), vehicle-treated ($n = 3$) and CDPPB-treated ($n = 3$) BACHD mice. Data represent the means $\pm$ SEM obtained from images taken from at least 24 histological slices per experimental condition. “n.s.” indicates no significant difference as compared to WT ($p > 0.05$) and * indicates significant difference as compared to WT ($p < 0.05$).

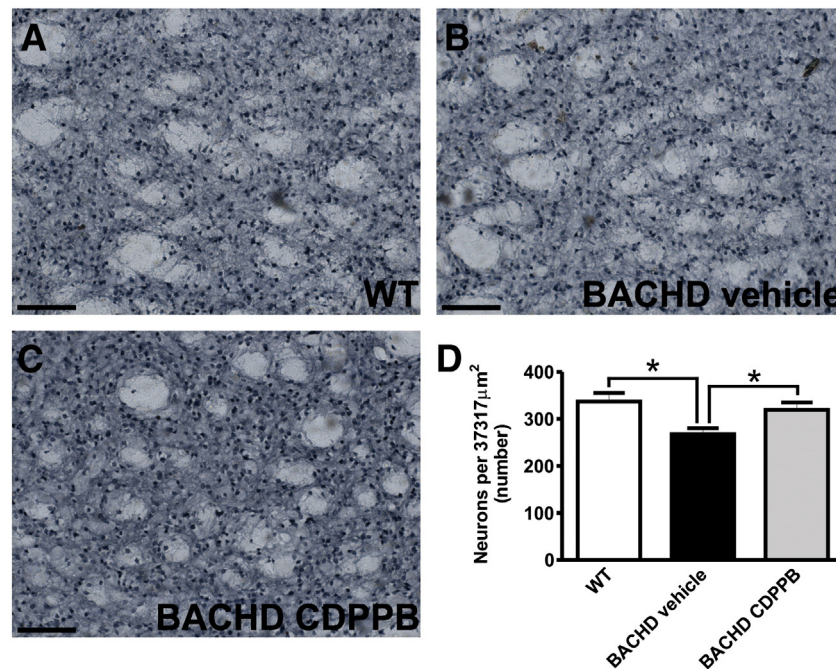


Fig. 5. CDPPB chronic treatment prevents neuronal cell loss in the striatum of 52 weeks old BACHD mice. Shown are representative images for NeuN immunostaining of the striatum from WT (n = 3) (A), vehicle-treated (n = 3) (B) and CDPPB-treated (n = 3) (C) BACHD mice. Scale bar = 100 μm. Graph shows quantification of NeuN labeled striatal neurons per 37,317 μm² in WT (n = 3), vehicle-treated (n = 3) and CDPPB-treated (n = 3) BACHD mice. Data represent the means ± SEM obtained from 9 images taken from 3 histological slices per mouse. * indicates significant differences as compared to vehicle-treated BACHD mice (p < 0.05).

was calculated as the time mice explored the object in test phase as a percentage of time exploring the same object in training phase plus test phase. At the age of 16 weeks, WT, vehicle-treated and CDPPB-treated BACHD mice explored more the object placed at the novel location, indicating that the animals remembered the familiar location (Fig. 9C). 30 weeks old WT mice were also able to remember the familiar location, as the animals explored more the novel location (Fig. 9D). On the other hand, 30 weeks old vehicle-treated BACHD mice displayed no preference for the object placed at the novel location (Fig. 9D), which

indicates memory impairment. To the same extent as WT mice, 30 weeks old CDPPB-treated BACHD mice explored more the object placed at the novel location than the object placed at the familiar location (Fig. 9D), indicating that the memory deficit observed in BACHD mice could be reversed by CDPPB chronic treatment. Together, these behavioral assessments support the notion that CDPPB chronic treatment has a positive effect on both motor incoordination and memory alterations observed in a HD mouse model. Moreover, no toxic effects or stereotypical behavior were observed upon CDPPB chronic treatment.

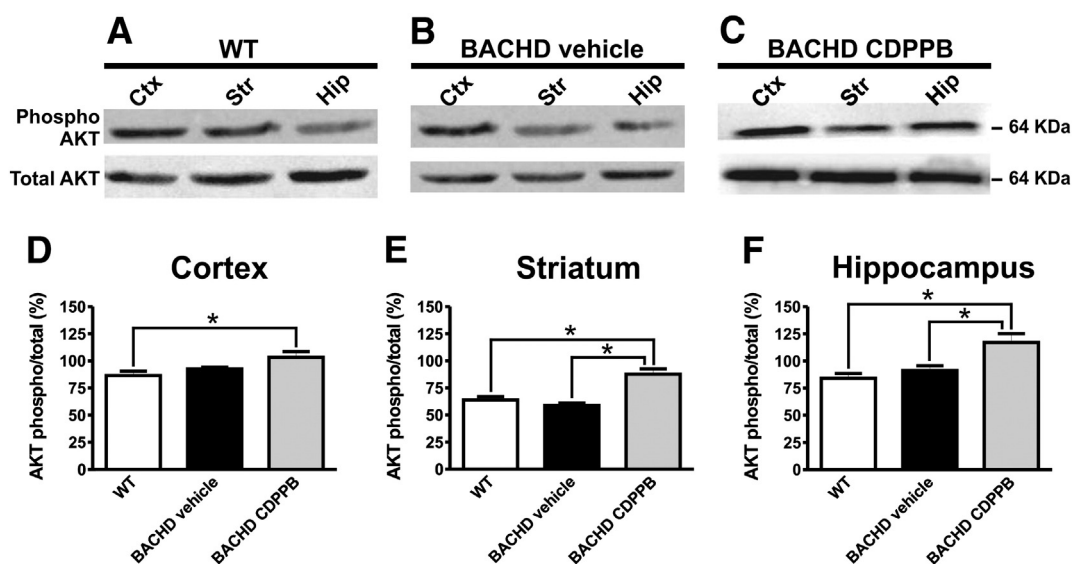


Fig. 6. AKT phosphorylation is augmented in 30 weeks old BACHD mice chronically treated with CDPPB. Shown are representative immunoblots for phospho- (upper panel) and total-AKT expression (lower panel) in the cortex (Ctx), striatum (Str) and hippocampus (Hip) of wild-type (WT) (A) vehicle-treated (B) and CDPPB-treated (C) BACHD mice. 100.0 μg of cell lysate was used for each sample. Graphs show the densitometric analysis of phospho-AKT normalized to total-AKT expression in the cortex (D), striatum (E) and hippocampus (F) of wild-type (WT, n = 3), vehicle-treated (n = 3) and CDPPB-treated (n = 3) BACHD mice. Data represent the means ± SEM, expressed as percentage of basal AKT phosphorylation. * indicate significant differences (p < 0.05).

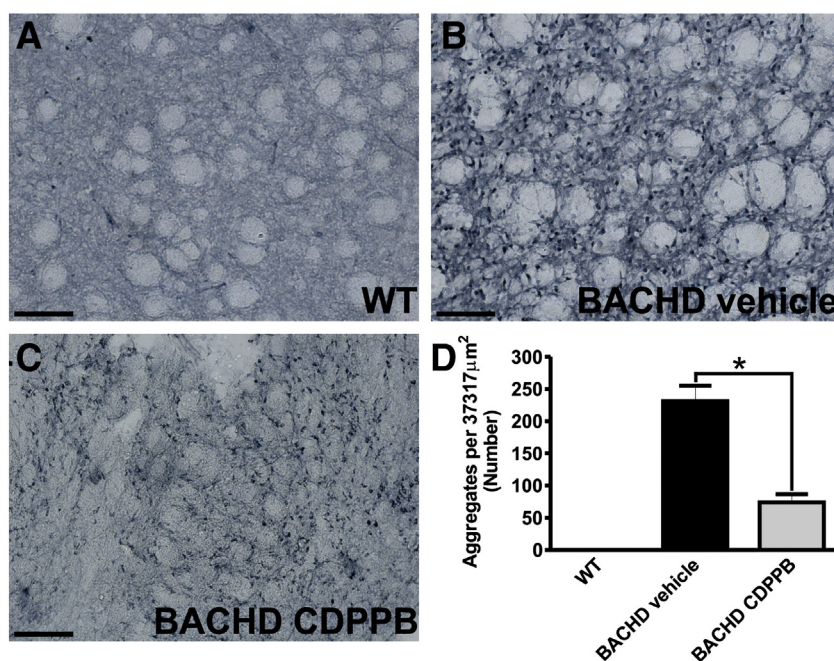


Fig. 7. Number of huntingtin aggregates in the striatum of 52 weeks old BACHD mice is reduced upon CDPPB chronic treatment. Shown are representative images for EM48 immunostaining of the striatum from WT (A), vehicle-treated (B) and CDPPB-treated (C) BACHD mice. Scale bar = 100 μm . Graph shows quantification of the number of EM48 labeled huntingtin aggregates per 37,317 μm^2 in the striatum from WT ($n = 3$), vehicle-treated ($n = 3$) and CDPPB-treated ($n = 3$) BACHD mice. Data represent the means $\pm$ SEM obtained from 9 images taken from 3 histological slices per mouse. * indicates significant difference as compared to vehicle-treated BACHD mice ($p < 0.05$).

Discussion

The high prevalence of neurodegenerative diseases worldwide poses a major public health problem as incidence rate increases exponentially with age. Currently, the prevalence is estimated to amount to 24 million and predicted to be quadruple by the year of 2050 (Reitz and Mayeux, 2014). Thus, drugs that could modify disease course are an urgent unmet need. In the present study we demonstrate that the mGluR5 positive allosteric modulator, CDPPB, can ameliorate various aspects related to HD symptoms and pathology. CDPPB is a very potent neuroprotective drug *in vitro* and can also prevent the neuronal cell loss that takes place in the striatum of an HD mouse model, BACHD. We have previously demonstrated that CDPPB-mediated neuroprotection is dependent on AKT activation (Doria et al., 2013) and we show here that CDPPB chronic treatment also efficiently activates neuroprotective pathways involving AKT, ERK1/2 and BDNF *in vivo*. In addition to preventing neuronal cell loss, CDPPB also decreases htt aggregate formation, further contributing to ameliorating HD pathology. We also demonstrate that BACHD mice striatal synaptic terminals exhibit reduced number of synaptic vesicles in the active zone region and CDPPB is efficient in ameliorating this deficit. Importantly, all these CDPPB-mediated molecular and pathological ameliorations reflect into partial improvement of HD-related motor coordination deficit and reestablishment of memory impairment exhibited by BACHD mice.

The neuroprotective effect of CDPPB *in vitro* and *in vivo* makes it a potential drug to treat neurodegenerative diseases. In agreement with previous *in vitro* experiments (Doria et al., 2013), we show here that CDPPB chronic treatment is capable of activating AKT and other neuroprotective pathways, including ERK1/2 and BDNF. However, AKT has a special role in HD, as it has been demonstrated that AKT can not only protect against neuronal death (Datta et al., 1999; Kandel and Hay, 1999), but also promote phosphorylation of mutated htt protein and reduce htt aggregate formation (Humbert et al., 2002; Warby et al., 2009). In agreement with these data, CDPPB chronic treatment tremendously decreased BACHD htt aggregate formation, further highlighting the potential of the mGluR5 PAM, CDPPB, as a prospective disease modifying drug to treat HD.

mGluR5 stimulation with the agonist DHPG leads to ERK1/2 activation and this pathway is sensitized in HD (Ribeiro et al., 2010). Moreover, mGluR5 PAMs, including CDPPB, in the absence of agonist, are also able to stimulate ERK1/2 activation in primary cultured cortical neurons (Chen et al., 2012). Our data indicated that CDPPB chronic treatment increases ERK1/2 activation in the cortex and hippocampus, but not in the striatum, of BACHD mice. Interestingly, BDNF mRNA levels were increased due to CDPPB treatment only in the cortex, although a tendency towards increased BDNF expression could be observed in the hippocampus. As ERK1/2 stimulation can lead to augmentation of BDNF expression via CREB phosphorylation (Balazs, 2006), we hypothesize that increased ERK1/2 activation in the cortex is contributing to BDNF mRNA level augmentation. BDNF is essential for embryonic development and also for adult brain functioning, having a role in modulating dendritic branching, spine morphology, synaptic plasticity, and influencing learning and memory (Figurov et al., 1996; Kang and Schuman, 1995; Tanaka et al., 2008). BDNF mRNA levels in the striatum are normally low and most striatal BDNF protein arrives by anterograde transport from the cortex via cortical–striatal afferents (Altar et al., 1997). However, mRNA levels and cortical release of BDNF into the striatum are decreased in HD (Zuccato et al., 2001). Highlighting the important role of BDNF in HD, infusion of BDNF protein into the striatum of a HD mouse model increases survival of striatal neurons and improves motor function (Canals et al., 2004). Thus, drugs that could increase BDNF levels, as shown here for CDPPB, would have a positive effect in HD. Future studies implementing CDPPB treatment for longer periods will be important to determine whether CDPPB would be efficient in normalizing decreased BDNF expression in the cortex of older BACHD mice.

It has been demonstrated that mutated htt protein interferes with axonal transport and alters presynaptic vesicle release (Trushina et al., 2004). Moreover, electrophysiological measurements indicate that cortical–striatal synapses in mouse models of HD exhibit a propensity towards synaptic depression upon normal and prolonged stimulation, with reduction of excitatory post-synaptic current (EPSC) amplitude, impaired long-term potentiation (LTP) and increased long-term depression (LTD) (Cummings et al., 2006; Milnerwood and Raymond, 2007).

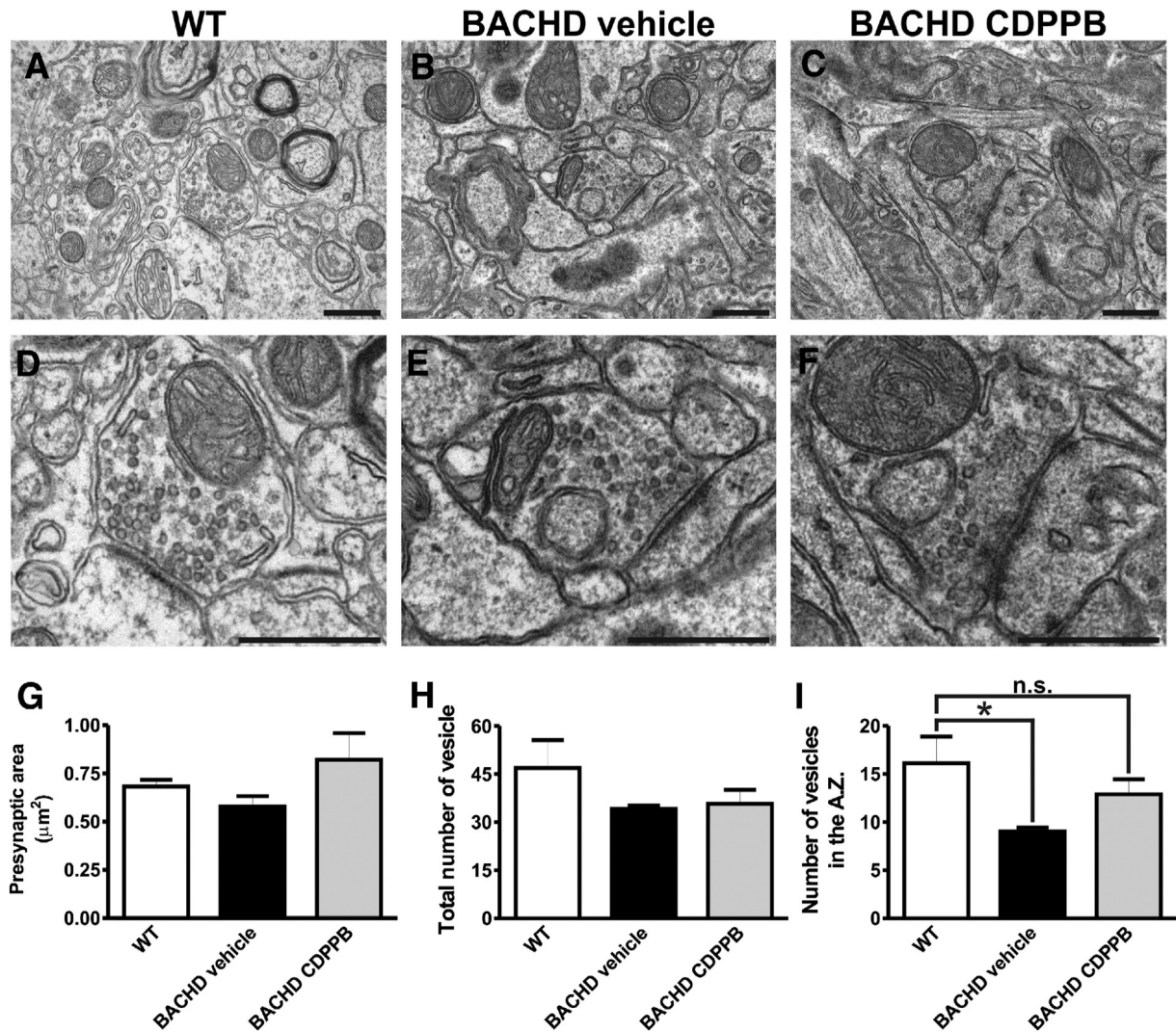


Fig. 8. CDPPB chronic treatment normalizes the number of synaptic vesicles in the active zone of 30 weeks old BACHD mice. Shown are representative panoramic electron micrographs (EMs) of the striatum from WT (A), vehicle-treated (B), and CDPPB-treated (C) BACHD mice. Scale bar = 500 nm. Magnification 50,000 $\times$. Also shown are higher zoom views of representative EMs exhibiting striatal presynaptic terminals from WT (D), vehicle-treated (E), and CDPPB-treated (F) BACHD mice. Scale bar = 500 nm. Magnification 50,000 $\times$. Graphs show quantification of cross section area of presynaptic terminals (G), total number of synaptic vesicles per presynaptic terminal (H), and average number of synaptic vesicles located at presynaptic active zones (AZ) (I) in WT (n = 3), vehicle-treated (n = 3) and CDPPB-treated BACHD mice. We analyzed 10 nerve terminal profiles per animal. "n.s." indicates no significant difference as compared to WT (p > 0.05) and * indicates significant difference as compared to WT mice (p < 0.05).

Diminished synaptic vesicle release can have important consequences and it has been demonstrated that decreased levels of BDNF in the striatum is not only due to reduction in BDNF mRNA levels, but also because BDNF vesicle transport is compromised in HD (Gauthier et al., 2004). Interestingly, it has been shown that mGluR5 PAMs are able to enhance afferent stimulation-induced LTP and LTD at hippocampal synapses and to improve performance in a model of hippocampus-dependent spatial learning (Ayala et al., 2009). Our data indicate that the number of vesicles in the synaptic active zone is reduced in BACHD mice, which could contribute to the diminished vesicle release observed in HD. Importantly, CDPPB treatment ameliorated this deficit, which could, for example, help to normalize BDNF release into the striatum, as well as the release of neurotransmitters important for memory and cognition. However, although our data start to shed some light on how CDPPB positively affects synaptic transmission, more experiments will be necessary to determine the consequence of increased number of vesicles in the synaptic active zone and to elucidate the molecular mechanism involved in CDPPB-mediated increase in active zone synaptic vesicle density.

CDPPB-mediated neuroprotection might play an important role in alleviating HD cognitive and motor symptoms. However, we and others have demonstrated that BACHD mice exhibit motor incoordination at a

young age (12 weeks of age), before any detectable neurodegeneration (Gray et al., 2008; Menalled et al., 2009). Moreover, other HD mouse models also share this feature (Li and Li, 2012; Ribeiro et al., 2013). Thus, it is possible that factors other than neurodegeneration, such as altered neurotransmission, could play a role in HD-related symptoms. As CDPPB improves synaptic transmission (Fig. 8) (Ayala et al., 2009), it is possible that the motor deficit amelioration could be further improved if drug treatment was initiated at an earlier stage. Moreover, although our in vitro data indicate that CDPPB is efficient at low doses and that higher doses do not augment neuroprotection, it is possible that a different dose of CDPPB could play a positive effect in vivo by, for example, further altering neurotransmission.

The BACHD chronic treatment presented here was important to demonstrate that CDPPB is effective in vivo and does not promote any detectable toxic effect or stereotypical mouse behavior. Further experiments will be important to more extensively examine CDPPB toxicity, but mGluR5 PAMs are being tested to treat schizophrenia and pre-clinical animal tests indicate that these drugs exhibit low toxicity and are well tolerated (Gray et al., 2012; Rodríguez et al., 2010; Spear et al., 2011). CDPPB was capable of activating neuroprotective pathways, decreasing htt aggregate formation and preventing neuronal cell

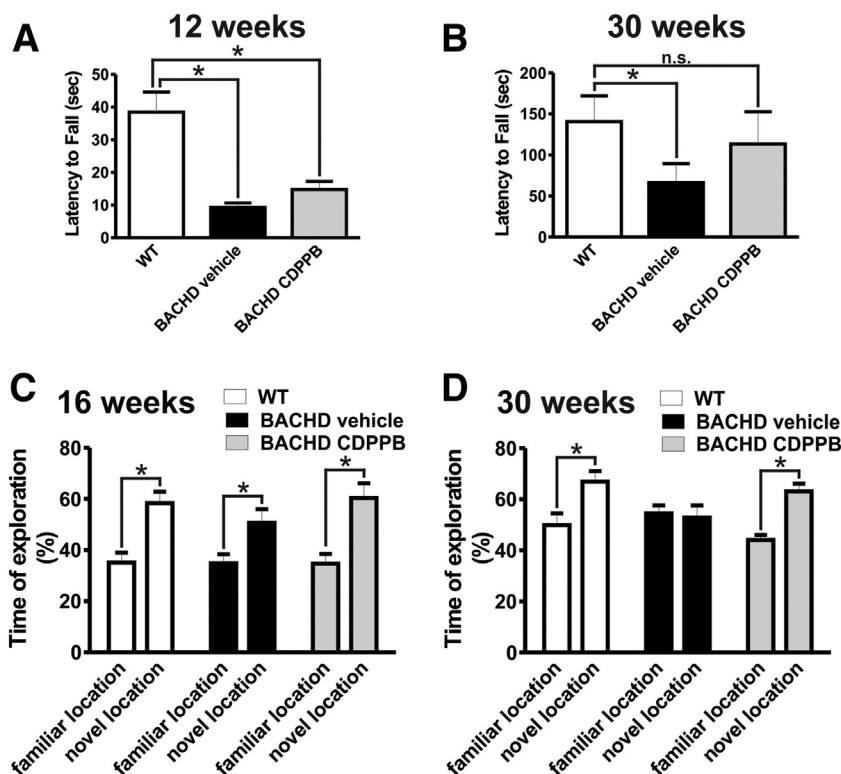


Fig. 9. CDPPB treatment improved BACHD mice performance on the rotarod and rescued object recognition memory. Graphs show latency to fall from accelerating rotarod by WT ($n = 11$), vehicle-treated ($n = 10$ – 11) and CDPPB-treated ($n = 8$) BACHD mice at 12 (A) and 30 weeks (B) of age. Each animal was tested in 3 trials and the average latency to fall was determined. Graphs show time of object exploration, which was calculated as the time mice explored the object in test phase as a percentage of time exploring the same object in training phase plus test phase. A higher score for object placed at the novel location indicates that mouse remembers the old location. WT ($n = 12$), vehicle-treated ($n = 10$) and CDPPB-treated ($n = 8$) BACHD mice were tested at 16 (C) and 30 (D) weeks of age. Data represent the means $\pm$ SEM. "n.s." indicates no significant difference as compared to WT ($p > 0.05$) and * indicate significant preference for object at novel location ($p < 0.05$).

loss. Moreover, CDPPB chronic treatment partially ameliorated motor incoordination and fully restored the memory deficit exhibited by BACHD mice. Thus, CDPPB appears to be a potential drug to treat HD patients, delaying or even stopping HD progression.

Abbreviations

HD	Huntington's disease
Htt	huntingtin
InsP3	inositol-1,4,5-triphosphate
PAM	positive allosteric modulator
mGluR	metabotropic glutamate receptor
CDPPB	3-Cyano- <i>N</i> -(1,3-diphenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-yl)benzamide
ERK	extracellular signal-regulated kinase
AKT	Protein kinase B
PFA	paraformaldehyde
HBSS	Hank's balanced salt solution
PBS	Phosphate buffered saline
DIV	days in vitro
BSA	Bovine serum albumin;
DMSO	dimethyl sulfoxide
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
RPM	Revolutions per minute
ANOVA	analysis of variance (ANOVA)
s.c.	Subcutaneous
i.p.	Intraperitoneal injection
WT	wild-type
EPSC	excitatory postsynaptic current
LTP	long-term potentiation
LTD	long-term depression.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.021>.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq (490191/2012-6) and FAPEMIG grants to F. M. R. (PPM-00015-13) and by the grant from the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic to T. D., DB Biotech, Slovakia. We thank L. R. Souza for the technical assistance. We also thank the Center of Acquisition and Processing of Images (CAPI) – ICB – Universidade Federal de Minas Gerais and Microscopy Center at Universidade Federal de Minas Gerais for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy.

References

- Agerman, K., Hjerling-Lefler, J., Blanchard, M.P., Scarfone, E., Canlon, B., Nosrat, C., Ernfors, P., 2003. BDNF gene replacement reveals multiple mechanisms for establishing neurotrophin specificity during sensory nervous system development. *Development* 130, 1479–1491.
- Altar, C.A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J.M., Acheson, A.L., Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., 1997. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389, 856–860.
- Anborgh, P.H., Godin, C., Pampillo, M., Dhami, G.K., Dale, L.B., Cregan, S.P., Truant, R., Ferguson, S.S., 2005. Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin. *J. Biol. Chem.* 280, 34840–34848.
- Ayala, J.E., Chen, Y., Banko, J.L., Sheffler, D.J., Williams, R., Telk, A.N., Watson, N.L., Xiang, Z., Zhang, Y., et al., 2009. mGluR5 positive allosteric modulators facilitate both

- hippocampal LTP and LTD and enhance spatial learning. *Neuropsychopharmacology* 34, 2057–2071.
- Balazs, R., 2006. Trophic effect of glutamate. *Curr. Top. Med. Chem.* 6, 961–968.
- Becherer, U., Guatimosim, C., Betz, W., 2001. Effects of staurosporine on exocytosis and endocytosis at frog motor nerve terminals. *J. Neurosci.* 21, 782–787.
- Calabresi, P., Centonze, D., Pisani, A., Bernardi, G., 1999. Metabotropic glutamate receptors and cell-type-specific vulnerability in the striatum: implication for ischemia and Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 158, 97–108.
- Canals, J.M., Pineda, J.R., Torres-Peraza, J.F., Bosch, M., Martin-Ibanez, R., Munoz, M.T., Mengod, G., Ernfrors, P., Alberch, J., 2004. Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.* 24, 7727–7739.
- Chen, T., Cao, L., Dong, W., Luo, P., Liu, W., Qu, Y., Fei, Z., 2012. Protective effects of mGluR5 positive modulators against traumatic neuronal injury through PKC-dependent activation of MEK/ERK pathway. *Neurochem. Res.* 37, 983–990.
- Cummings, D.M., Milnerwood, A.J., Dallerac, G.M., Waights, V., Brown, J.V., Vatsavayai, S.C., Hirst, M.C., Murphy, K.P., 2006. Aberrant cortical synaptic plasticity and dopaminergic dysfunction in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2856–2868.
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E., 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13, 2905–2927.
- DiFiglia, M., 1990. Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci.* 13, 286–289.
- Doria, J.G., Silva, F.R., de Souza, J.M., Vieira, L.B., Carvalho, T.G., Reis, H.J., Pereira, G.S., Dobransky, T., Ribeiro, F.M., 2013. Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease. *Br. J. Pharmacol.* 169, 909–921.
- Figurov, A., Pozzo-Miller, L.D., Olafsson, P., Wang, T., Lu, B., 1996. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 381, 706–709.
- Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelieres, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., et al., 2004. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118, 127–138.
- Gray, M., Shirasaki, D.I., Cepeda, C., Andre, V.M., Wilburn, B., Lu, X.H., Tao, J., Yamazaki, I., Li, S.H., et al., 2008. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J. Neurosci.* 28, 6182–6195.
- Gray, L.J., Hannan, A.J., Zhang, X., 2012. Metabotropic glutamate receptors as targets for novel antipsychotic treatments. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 1522–1534.
- Group, T.H.S.D.C.R., 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971–983.
- Han, Y., Kaeser, P.S., Sudhof, T.C., Schneggenburger, R., 2011. RIM determines Ca(2)+ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. *Neuron* 69, 304–316.
- Humbert, S., Bryson, E.A., Cordelieres, F.P., Connors, N.C., Datta, S.R., Finkbeiner, S., Greenberg, M.E., Saudou, F., 2002. The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev. Cell* 2, 831–837.
- Kandel, E.S., Hay, N., 1999. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell Res.* 253, 210–229.
- Kang, H., Schuman, E.M., 1995. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267, 1658–1662.
- Li, S.H., Li, X.J., 2004. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet.* 20, 146–154.
- Li, X.J., Li, S., 2012. Influence of species differences on the neuropathology of transgenic Huntington's disease animal models. *J. Genet. Genom.* 39, 239–245.
- Menalled, L., El-Khodori, B.F., Patry, M., Suarez-Farinas, M., Orenstein, S.J., Zahasky, B., Leahy, C., Wheeler, V., Yang, X.W., et al., 2009. Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiol. Dis.* 35, 319–336.
- Milnerwood, A.J., Raymond, L.A., 2007. Corticostriatal synaptic function in mouse models of Huntington's disease: early effects of huntingtin repeat length and protein load. *J. Physiol.* 585, 817–831.
- Reichel, C.M., Schwendt, M., McGinty, J.F., Olive, M.F., See, R.E., 2011. Loss of object recognition memory produced by extended access to methamphetamine self-administration is reversed by positive allosteric modulation of metabotropic glutamate receptor 5. *Neuropsychopharmacology* 36, 782–792.
- Reitz, C., Mayeux, R., 2014. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem. Pharmacol.* 88, 640–651.
- Ribeiro, F.M., Paquet, M., Ferreira, L.T., Cregan, T., Swan, P., Cregan, S.P., Ferguson, S.S., 2010. Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 30, 316–324.
- Ribeiro, F.M., Camargos, E.R., de Souza, L.C., Teixeira, A.L., 2013. Animal models of neurodegenerative diseases. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 35 (Suppl. 2), S82–S91.
- Ribeiro, F.M., Devries, R.A., Hamilton, A., Guimaraes, I.M., Cregan, S.P., Pires, R.G., Ferguson, S.S., 2014. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout promotes motor and biochemical alterations in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2030–2042.
- Rodrigues, H.A., Fonseca Mde, C., Camargo, W.L., Lima, P.M., Martinelli, P.M., Naves, L.A., Prado, V.F., Prado, M.A., Guatimosim, C., 2013. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mouse neuromuscular junction. *PLoS One* 8, e78342.
- Rodriguez, A.L., Grier, M.D., Jones, C.K., Herman, E.J., Kane, A.S., Smith, R.L., Williams, R., Zhou, Y., Marlo, J.E., et al., 2010. Discovery of novel allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 reveals chemical and functional diversity and in vivo activity in rat behavioral models of anxiolytic and antipsychotic activity. *Mol. Pharmacol.* 78, 1105–1123.
- Simonyi, A., Schachtman, T.R., Christoffersen, G.R., 2010. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonism in learning and memory. *Eur. J. Pharmacol.* 639, 17–25.
- Spear, N., Gadiet, R.A., Wilkins, D.E., Do, M., Smith, J.S., Zeller, K.L., Schroeder, P., Zhang, M., Arora, J., et al., 2011. Preclinical profile of a novel metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulator. *Eur. J. Pharmacol.* 659, 146–154.
- Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G.C., Kasai, H., 2008. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319, 1683–1687.
- Tang, T.S., Tu, H., Chan, E.Y., Maximov, A., Wang, Z., Wellington, C.L., Hayden, M.R., Bezprozvanny, I., 2003. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol (1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron* 39, 227–239.
- Tang, T.S., Slow, E., Lupu, V., Stavrovskaya, I.G., Sugimori, M., Llinas, R., Kristal, B.S., Hayden, M.R., Bezprozvanny, I., 2005. Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2602–2607.
- Trushina, E., Dyer, R.B., Badger II, J.D., Ure, D., Eide, L., Tran, D.D., Vrieze, B.T., Legendre-Guillemin, V., McPherson, P.S., et al., 2004. Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8195–8209.
- Uslaner, J.M., Parmentier-Batteur, S., Flick, R.B., Surles, N.O., Lam, J.S., McNaughton, C.H., Jacobson, M.A., Hutson, P.H., 2009. Dose-dependent effect of CDPBB, the mGluR5 positive allosteric modulator, on recognition memory is associated with GluR1 and CREB phosphorylation in the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuropharmacology* 57, 531–538.
- Vonsattel, J.P., DiFiglia, M., 1998. Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 369–384.
- Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., Richardson Jr., E.P., 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44, 559–577.
- Warby, S.C., Doty, C.N., Graham, R.K., Shively, J., Singaraja, R.R., Hayden, M.R., 2009. Phosphorylation of huntingtin reduces the accumulation of its nuclear fragments. *Mol. Cell. Neurosci.* 40, 121–127.
- Young, A.B., 2003. Huntingtin in health and disease. *J. Clin. Invest.* 111, 299–302.
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B.R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Silani, V., et al., 2001. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293, 493–498.

Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease

Priscila Aparecida Costa Valadão,¹ Bárbara Campos de Aragão,¹ Jéssica Neves Andrade,¹ Matheus Proença S. Magalhães-Gomes,¹ Giselle Foureaux,¹ Julliane Vasconcelos Joviano-Santos,¹ José Carlos Nogueira,¹ Fabíola Mara Ribeiro,² Juan Carlos Tapia³ and Cristina Guatimosim¹ 

¹Departamento de Morfologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

²Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³Department of Biomedical Sciences, University of Talca, Talca, Chile

Keywords: BACHD, motoneuron, neuromuscular junctions, spinal cord, sternomastoid muscle

Edited by Yoland Smith

Received 18 April 2016, revised 7 December 2016, accepted 8 December 2016

Abstract

Involuntary choreiform movements are clinical hallmark of Huntington's disease, an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by an increased number of CAG trinucleotide repeats in the huntingtin gene. Involuntary movements start with an impairment of facial muscles and then affect trunk and limbs muscles. Huntington's disease symptoms are caused by changes in cortex and striatum neurons induced by mutated huntingtin protein. However, little is known about the impact of this abnormal protein in spinal cord motoneurons that control movement. Therefore, in this study we evaluated abnormalities in the motor unit (spinal cervical motoneurons, motor axons, neuromuscular junctions and muscle) in a mouse model for Huntington's disease (BACHD). Using light, fluorescence, confocal, and electron microscopy, we showed significant changes such as muscle fibers atrophy, fragmentation of neuromuscular junctions, axonal alterations, and motoneurons death in BACHD mice. Noteworthy, the surviving motoneurons from BACHD spinal cords were smaller than WT. We suggest that this loss of larger putative motoneurons is accompanied by a decrease in the expression of fast glycolytic muscle fibers in this model for Huntington's disease. These observations show spinal cord motoneurons loss in BACHD that might help to understand neuromuscular changes in Huntington's disease.

Introduction

Huntington's disease (HD) is a progressive, autosomal dominant, debilitating, and neurological disease caused by an increased CAG trinucleotide repetition at the short arm of chromosome 4 that leads to a polyglutamine expansion in the huntingtin (Htt) protein (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Bates, 2005). Its symptoms include cognitive and psychiatric disturbances and progressive motor decline with involuntary movements, rigidity, bradykinesia, and dystonia starting with motor impairment in facial muscles and then progressing to trunk and limb muscles (Bates *et al.*, 2002).

It has been described that Htt interacts with more than two hundred proteins and it is involved in many functions, such as regulating gene transcription, cell signaling, vesicular transport, exocytosis, endocytosis, etc. (Harjes & Wanke, 2003; Zuccato *et al.*, 2010). Furthermore, Htt plays a critical role in cell survival by regulating

apoptotic pathways (Ona *et al.*, 1999). For example, synthesis of Htt protects striatal neurons from apoptotic stimuli (Rigamonti *et al.*, 2000).

Previous reports have shown that mutated Htt (mHtt) leads to the generation of insoluble toxic protein aggregates, which accumulate inside the striatum, causing cellular dysfunction, degeneration and neuronal death, all hallmarks of HD neuropathology (Sathasivam *et al.*, 1999; Moffitt *et al.*, 2009). In mammals, besides the Central Nervous System (CNS), Htt is expressed in a number of tissues and organs, including skeletal muscles (Hoogveen *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993; Trotter *et al.*, 1995). Indeed, Sathasivam *et al.* (1999), using R6/2 mouse model for HD, observed force and contractility reduction and deregulation in the transcription of contractile proteins that are directly related to the presence of protein aggregates in muscles. Ribchester *et al.* (2004), used the same mouse model to demonstrate peripheral disorders, including muscle atrophy as well as morphological and electrophysiological changes in neuromuscular junctions (NMJs). Recently, Mielcarek (2015) also observed muscle contractile dysfunction and progressive loss of functional motor

Correspondence: Cristina Guatimosim, as above.

E-mail: cguati@icb.ufmg.br

units in R6/2 mice. However, these studies only speculated the possibility of changes in motoneurons from the spinal cord. Thus, even though several groups have been investigating alterations induced by mHtt (Sathasivam *et al.*, 1999; Ribchester *et al.*, 2004; Zielonka *et al.*, 2014; Mielcarek, 2015), to our knowledge, little is known about motor unit changes induced by mHtt.

In this study, we investigated by a combination of methods (optical, confocal, and transmission electron microscopy) putative abnormalities in muscle fibers, neuromuscular junctions, spinal roots, and spinal cord motoneurons in a transgenic model for HD (BACHD). This murine HD model expresses the complete human *Htt* gene (Gray *et al.*, 2008), with a mutant full length sequence coding for a polyglutamine stretch (CAA-CAG) that is more stable through generations compared to the R6/1 and R6/2 mice models (Mangiarini *et al.*, 1996; Kazantsev *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1997). In addition, BACHD mice present robust motor deficits (such as decreased rotarod performance and hypolocomotion) and a slow progression of the disease, allowing to conduct more detailed longitudinal studies when compared to other models of fast progression like the R6/2 (Menalled *et al.*, 2009; Yang & Gray, 2011). The rationale for this study relies upon recent evidence indicating that muscle wasting in HD might occur independently of the cortex and basal ganglia dysfunction (Van Der Burg *et al.*, 2009; Mantovani *et al.*, 2016).

Materials and methods

BACHD mice

FVB/NJ (wild type) and FVB/N-Tg (HTT*97Q)IXwy/J (BACHD) male transgenic mice were generated by Gray *et al.* (2008) introducing 170 kb human *Htt* in 240 kb RP11-866L6 BAC. *Htt* locus was altered by inserting an exon1 with 97 mixed CAA-CAG repeats into the human *Htt* gene. The animals were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and used to establish a new colony where 12 months old (mo) WT and BACHD mice were obtained.

Our experiments were done in 12 months WT and BACHD animals as previous studies using this mouse model demonstrated morphological changes in the brain, like atrophy of the cerebral cortex (Gray *et al.*, 2008). Furthermore, Holmes *et al.* (2002), showed that changes in behavior tests were more pronounced in 12 months BACHD mice (For a detailed review see Yang & Gray, 2011).

Mice were held in a place with controlled temperature (23 °C) in a 12 h light/12 h dark cycle and with food and water provided *ad libitum*. Animal care was in accordance with the Universidade Federal de Minas Gerais Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA) under approved protocol #036/2013.

Skeletal muscle and spinal roots morphology

Animals from both genotype (WT and BACHD) were deeply anesthetized with ketamine/xylazine (0.1 mL/20 g) in accordance with CEUA/UFMG protocol. The sternomastoid (STM) muscle were dissected out and fixed in 4% glutaraldehyde diluted in phosphate-buffered saline (0.2 M) for 24 h at room temperature. After dehydration in an ascending series of alcohols (70, 80, 90, 95% 2X), samples were embedded in glycolmethacrylate resin (Leica) and sectioned in a microtome (Reichert Jung) where 5 µm thick sections were obtained. Sections from muscle samples were stained with toluidine blue (EMS), to determine the cross-sectional area (CSA) of individual myofibers. Images were acquired using a microscope (Leica DM2500) coupled to a CCD camera (Leica DFC345FX). Muscles sections were imaged with 10× objective.

Samples containing cervical ventral roots were processed following Transmission electron microscopy (TEM) protocol (see below). Semi-thin cross-sections (300 nm) were obtained and stained with toluidine blue. Images of whole ventral roots cross-sections from WT and BACHD mice were captured using a 20× objective in a ZEISS Axio Lab.A1 microscope. The cross-sectional area of the ventral roots was measured using ImageJ plugins (NIH), and the total number of axons counted. To quantify axonal myelination we used the G-ratio, which was calculated measuring the axonal inner diameter and dividing it by the outer diameter following the formula: $G = d/D$, where G is the G-ratio, d is the inner diameter and D is the outer diameter (Chau *et al.*, 2000). The size adopted to classify large myelinated fibers was >4.5 µm, according to the evaluation criteria described by Kong & Xu (1999).

Skeletal muscle fiber typing

The STM muscle fiber typing was performed according to the protocol described by Valdez *et al.* (2012). Mice were sacrificed and the STM muscles were dissected. Samples were put in freezing molds covered with OCT freezing medium (Easy Path) and was fresh frozen in isopentane (Sigma-Aldrich) cooled in liquid nitrogen and stored at −80 °C. The muscle was cut on a cryostat (Leica CM3050S) and the cross-sections (10 µm) were collected on glass slides coated with gelatin (Sigma-Aldrich). First, slides containing muscle sections passed through blockade step with 3% BSA, 5% goat serum and 0.1% Triton X-100, 30 min at room temperature. The muscle sections were then incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies all diluted in 3% BSA, 5% goat serum: anti-MyHC I (NCL-Novocastra, Leica 1 : 250); anti-MyHC IIA (SC-71, Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB 1 : 100), anti-MyHC IIX (BF-35 which recognizes all types of muscles fibers except fast IIX, DSHB 1 : 100) and anti-MyHC IIB (BF-F3, DSHB 1 : 100). Slides were washed three times with PBS 1× and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies Alexa 488 goat anti-mouse IgG1 (recognizes type I, IIA and IIX antibodies) and Alexa 488 goat anti-mouse IgM (recognizes IIB antibody). The slides were then washed three times with PBS 1× and coverslipped using ProLong® Gold antifade (Thermo Scientific). Images were acquired in a fluorescence microscope (Leica DM2500) coupled to a Leica DFC 345FX camera and visualized in a microcomputer using the Leica Application Suite software (LAS). The microscope was equipped with air objective (10×, 0.25 NA). Excitation light came from a 100W Hg lamp and a FITC filter was used to collect emitted light. We imaged the whole STM muscle cross-sections. Each fiber type was expressed as a percentage of the total number of fibers counted.

Cervical spinal cord immunofluorescence

To evaluate the expression of caspase-3 in BACHD spinal cords, cervical segments (C1–C3) were dissected, and immediately immersed in neutral-buffered formalin (NBF) for 24 h. Thereafter, samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70, 80, 90, 95, and 100%), cleared in xylene and embedded in paraffin. Sections (5 µm) were obtained using a microtome (model HM335E; Microm, Inc., Minneapolis, MN). Nonspecific antibody binding was blocked by incubation of the samples in a solution of 2% BSA with 0.1% Tween-20 for 1 h in a moist chamber. Sections were incubated with primary antibody (polyclonal rabbit anti-caspase-3, 1 : 100; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) diluted in blocking solution overnight at 4 °C in a moist chamber. Sections were then washed 3 Xs with PBS

and incubated with secondary antibody (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit 1 : 1000; Invitrogen, Eugene, OR) for 1 h. Subsequently, sections were washed 3 Xs with PBS, and in the last wash, stained with DAPI to allow identification of cells nuclei (1 : 1000; Invitrogen, Eugene, OR). The stained slides were imaged using NIKON ECLIPSE Ti microscope (100× objective, N.A: 1.49). All digital images were quantitatively analyzed using IMAGE J software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

For specific labeling of putative motoneurons, cervical spinal cord segments (C1–C3) were removed and fixed with 4% PFA for 48 h. Subsequently these segments were kept in 30% sucrose for 24 h. Then, the samples were oriented in freezing molds covered with freezing medium OCT (Easy Path) and were fresh frozen in isopentane (Sigma-Aldrich) cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C . The cervical spinal cords were cut on a cryostat (Leica CM3050S) and the cross sections (30 μm) were collected on gelatin coated slides. The slides containing sections of the cervical segments were blocked 60 min at room temperature with 3% BSA, 5% donkey serum and 0.1% Triton X-100. Then, the sections were incubated overnight at 4°C with the following primary antibody diluted in 3% BSA, 5% donkey serum: ChAT anti-goat, AB 144P Millipore Corporation (1 : 100).

Slides were washed 3 Xs with PBS 1× and incubated for 2 h at room temperature with secondary antibody Alexa 488 donkey anti-goat IgG1 (1 : 800). The slides were washed again 3Xs with PBS 1× and mounted using ProLong[®] Gold antifade (Thermo Scientific Invitrogen[™]). Images were acquired using a 63× oil immersion (N.A: 1.4) objective attached to a laser-scanning confocal microscope (Zeiss LSM 510 Meta, Zeiss GmbH, Jena, Germany). An Argon (488 nm) laser was used for excitation of motor neurons marked with anti-ChAT and Alexa 488. The Z series optical sections were collected at 2.0 μm intervals. All digital images were quantitatively analyzed using IMAGE J software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), to determine both the number and Ferret diameter of putative motoneurons. The total number of putative motoneurons located in the ventral horn of the cervical spinal cord segments (C1–C3) were counted and had their diameter measured.

NMJ immunofluorescence and confocal microscopy analysis

Mice were anesthetized with ketamine/xylazine (0.1 mL/20 g) and left ventricular transcardiac perfused with ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). Muscles were dissected and blocked in 3% BSA + 5% goat serum + 0.5% Triton X-100 for 30 min at room temperature. Next, primary antibody anti-synaptotagmin was added (Anti-synaptotagmin, anti-mouse, IgG2A, DSHB, 1 : 250) in the blocking solution, and incubated overnight at 4°C . Muscles were washed 3× with PBS and incubated 1 h at room temperature with Alexa 555- α -bungarotoxin (α -btx) 1 : 1000 (Molecular Probes, Eugene, OR) together with secondary antibody 1 : 1000 (Alexa-488 goat anti-mouse IgG2A; Invitrogen). Muscles were then washed 3× with PBS and whole-mounted slides using Vectashield (Vector Laboratories, Eching, Germany).

Images of NMJs stained with anti-synaptotagmin and bungarotoxin (α -btx) were acquired using a 63× oil immersion (N.A: 1.4) objective attached to a laser-scanning confocal microscope (Zeiss LSM 510 Meta, Zeiss GmbH, Jena, Germany). Argon (Ar 488 nm) and helium-neon (He–Ne, 543 nm) lasers were used for excitation of terminals stained with anti-synaptotagmin and acetylcholine receptors (nAChR) clusters marked with (α -btx), respectively. The Z series optical sections were collected at 2.0 μm intervals and the whole STM muscle samples were scanned. The nerve terminals

were identified considering their colocalization with nAChR clusters. Images were converted to gray scale format (8 bits) and each synaptic element was individually evaluated. We used the method of particles analysis to obtain the NMJs fragmentation index, based on the pixels presented in each image. Briefly, the images were converted into a binary image pattern and were skeletonized. Next, to describe the connectivity for each pixel in the image, a histogram was generated using the BinaryConnectivityClass plugin from IMAGEJ (Pratt *et al.*, 2013). We analyzed the degree of fragmentation in pre- and postsynaptic elements comparing the muscle samples from WT and BACHD mice. The parameters adopted for fragmentation were defined according to the evaluation criteria described by Valdez *et al.* (2010), which establishes fragmentation by five or more islands both in the presynaptic and postsynaptic membranes.

Transmission electron microscopy (TEM)

For ultrastructure analyses, we used the protocol previously described by our research group (Rodrigues *et al.*, 2013). Briefly, mice were anesthetized with ketamine/xylazine (0.1 mL/20 g), left ventricular transcardiac perfused with ice-cold modified Karnovsky fixative (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at 4°C) and maintained in this solution for at least 24 h at 4°C . Cervical spinal cord segments (C1–C3) and the STM muscles from WT and BACHD mice were then removed. After fixation, samples were washed with cacodylate buffer (0.1 M), cut into several fragments, post-fixed in reduced osmium (1% osmium tetroxide containing 1.6% potassium ferrocyanide), contrasted *en bloc* with uranyl acetate (UA, 2% in deionized water), dehydrated through an ascending series of ethanol solutions and embedded in EPON. Blocks were sectioned (50 nm) and collected on 200 or 300 mesh copper grids and contrasted with lead citrate. Sections were viewed with a Tecnai- G2-Spirit FEI/Quanta electron microscope (120 kV Philips). The same protocol was used to obtain semi-thin sections of cervical ventral roots. Images of the semi-thin sections encompassing whole ventral roots were acquired using ZEISS Axio Lab.A1 (20× objective, N.A: 0.45) and analyzed qualitatively and quantitatively as described previously. We analyzed a total of 3.222 axons in WT animals and 1.937 in BACHD.

For the quantification of lipofuscin granules, 30 electron micrographs of the motoneurons from the cervical spinal cord were used for each genotype. The counting of beads was performed using the software IMAGEJ plugins (NIH). Data are presented as granules/area using the GRAPH PAD PRISM 6.

Statistical analysis

All Data were analyzed using Microsoft Excel and plotted using the program GRAPH PAD PRISM 6. Statistical significance was evaluated using the un-paired Student's *t*-test and represent the mean $\pm$ Standard deviation (mean $\pm$ SD) or (median), as described in the text. When data were not normally distributed, we applied the Man–Whitney test, as described in the text. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Changes in BACHD STM muscle fibers area, MyHC expression and ultrastructure

Previous studies suggested that limb and trunk muscle of HD patients are affected during disease progression, causing significant

postural instability (Tian *et al.*, 1992; Brožová *et al.*, 2011). Based on this observation, we began our investigation by searching for morphology changes in a neck muscle directly involved in head posture, the STM muscle, in a mouse model for HD disease (BACHD).

Figure 1(A–B) shows representative transverse section images of STM muscle fibers from 12 months control (WT) and diseased (BACHD) mice. An initial analysis of the STM muscle fiber show no signs of degeneration in both genotypes at the age indicated. However, when compared to WT muscles fiber CSA, BACHD mice presented a reduction in approximately 40% in CSA suggesting a possible muscle fibers atrophy (BACHD: $1333 \mu\text{m}^2$ vs. $2772 \mu\text{m}^2$ for WT (Median); $P = 0.0001$; We have analyzed ~3000 muscle fibers per genotype, $n = 3$ individual animals per genotype; Mann–Whitney test) (Fig. 1H).

As we noted atrophy of the STM muscle, our next step was to investigate whether this atrophy was associated to shifts in MyHC isoforms expression. Skeletal muscle fibers are characterized as slow-twitch fiber (type I) and three types of fast-twitch fibers (type IIA, type IIX and type IIB) (reviewed by Wang & Pessin, 2013). For this purpose, we performed an immunostaining for fiber types using specific monoclonal antibodies against the different MyHC isoforms. The representative images in Fig. 1C show cross-sections of the STM muscle fibers from WT. Figure 1C–C''' shows the staining for type I, IIA, IIX, and IIB muscle fibers respectively. Figure 1D–D''' shows the same staining for BACHD muscle fibers. Compared to WT, we observed more fibers stained for the IIA fibers in BACHD (Fig. 1D'). Indeed our quantification showed that the percentage of IIA fibers were in fact increased in BACHD STM muscle fibers [BACHD: $44.0 \pm 4.0\%$ vs. WT: $34.2 \pm 1.7\%$ (Mean $\pm$ SD); $t_4 = 3.8$; $P = 0.01$; We counted each fiber type in one muscle section in $n = 3$ individual animals per genotype; unpaired student *t*-test]. In addition, BACHD mice presented less staining for the IIX muscle fibers in STM compared to WT (Fig. 1D''). Quantification of several muscle fibers from both genotypes stained for IIX showed a reduction in the percentage of these fibers in the BACHD STM muscle [BACHD: $18.7 \pm 4.0\%$ vs. WT: $28.0 \pm 4.1\%$ (Mean $\pm$ SD); $t_4 = 2.8$; $P = 0.04$; $n = 3$ individual animals per genotype; unpaired student *t*-test]. These data showed that there was a significant fiber-typing switch in BACHD STM muscles.

We next performed a qualitative ultrastructure analysis of STM muscle fibers from BACHD mice (Fig. 1E–G, 90 images analyzed per genotype from 3WT and 3 BACHD animals). In comparison to WT muscle (Fig. 1E), analysis of the ultrastructure of the STM in BACHD mice revealed: (i) sarcoplasmic reticulum (SR) significantly enlarged, invading spaces (demarcated area in F) that were previously occupied by myofibrils (Fig. 1G, red arrows); (ii) Mitochondria containing abnormal vacuoles within the mitochondria matrix (Fig. 1G, blue arrow); (iii) increase in inter-myofibrillar glycogen deposits (Fig. 1G, yellow arrows) and (iv) areas with dramatic decrease in myofibrils (Fig. 1F, asterisk). Together, the ultrastructure

alterations can be an indicative that muscle fibers are under a degenerative process, corroborating the muscle histology data.

NMJs alterations in BACHD mice

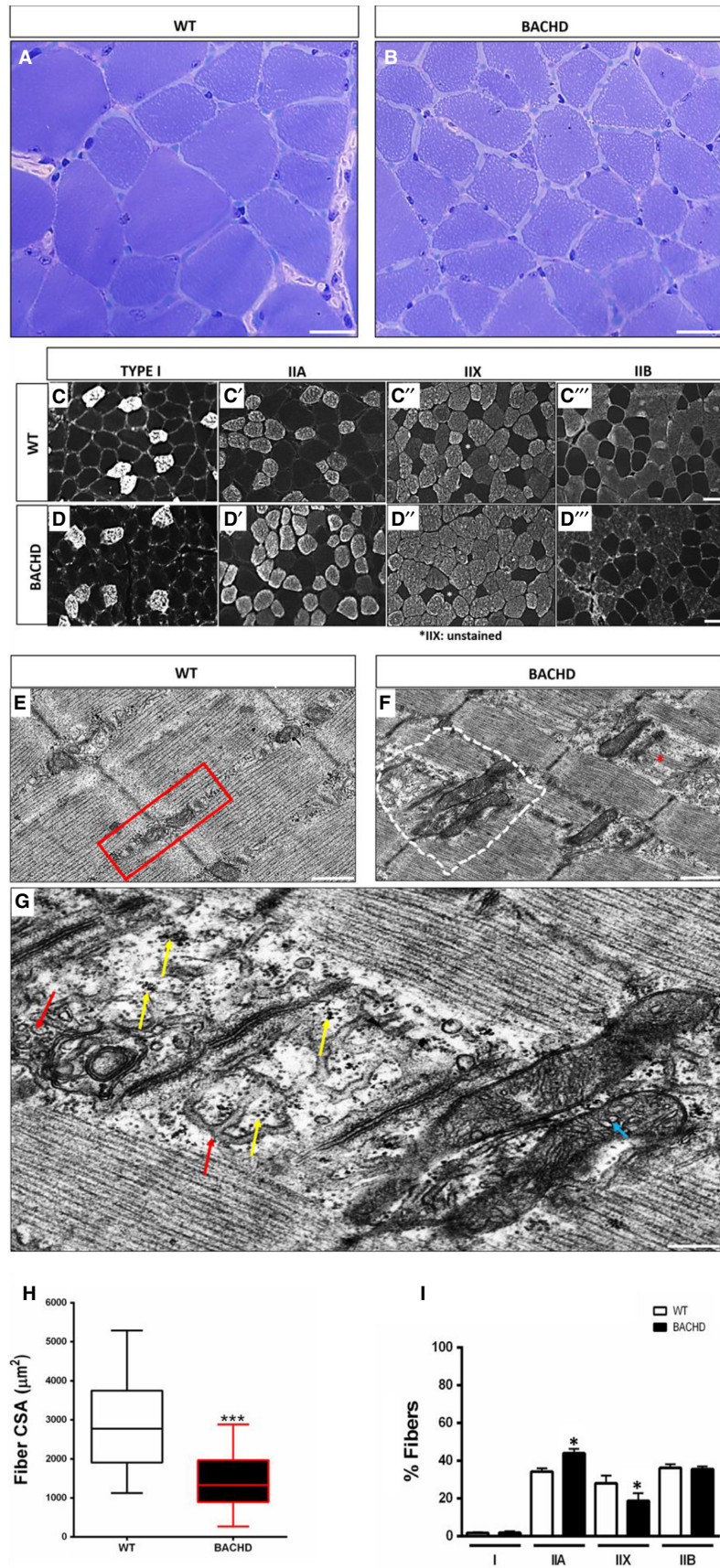
Given the degree of STM- muscle atrophy and the pronounced changes observed in BACHD muscle fibers, our next step was to investigate whether muscle damage could be related to alterations at neuromuscular junctions. To address this question, STM- muscle whole mounts from WT and BACHD mice were stained with pre-synaptotagmin and postsynaptic (α -btx) markers and the NMJs morphology were examined by confocal microscopy.

Figure 2 shows representative images of presynaptic nerve terminals from 12 months WT (Fig. 2A) and BACHD (Fig. 2C) STM muscles. Figure 2A' and C' shows the postsynaptic AChRs stained with α -btx in the same WT and BACHD muscle fibers respectively. The Fig. 2B and D shows representations of the particle analysis of NMJs of WT and BACHD. Figure 2B' and D' shows the skeletonization of NMJs of WT and BACHD. Our analyzes showed normal structure and synaptic elements colocalization in the NMJs from WT animals. In contrast, we observed that in BACHD STM muscles the presynaptic axon terminals did not completely co-localized with the postsynaptic AChRs [BACHD: $87.3 \pm 2.0\%$ for vs. $98.4 \pm 1.6\%$ for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 8.0$; $**P = 0.001$ unpaired student *t*-test] (Fig. 2C and C' and 2E for quantification), supporting the view of an ongoing degenerative process like denervation. We next analyzed the degree of denervation in NMJs and observed that many NMJs from BACHD STM muscles were partially denervated [BACHD: $20.0 \pm 4.0\%$ vs. $2.7 \pm 2.3\%$ for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 6.5$; $**P = 0.002$ unpaired student *t*-test] (Fig. 2F for quantification and 2C''), with patches of postsynaptic AChRs showing no presynaptic partner associated to them (arrow). Additionally, we found that the areas of the pre- and postsynaptic terminals in the BACHD NMJs were smaller than WT [Presynaptic area- BACHD: $923 \mu\text{m}^2$ vs. $1655 \mu\text{m}^2$ for WT (median); $***P = 0.0001$ (Fig. 2G); Postsynaptic area- BACHD: $1011 \mu\text{m}^2$ vs. $1669 \mu\text{m}^2$ for WT (median); $***P = 0.0005$ (Fig. 2H)]. In general, the pre- and postsynaptic elements were significantly fragmented in BACHD but not in WT [BACHD: $81.7 \pm 4.7\%$ vs. $58.0 \pm 2.6\%$ for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 7.6$; $**P = 0.001$ unpaired student *t*-test (Fig. 2I)]. We have analyzed 75 NMJs per genotype in $n = 3$ individual animals per genotype.

Axonal abnormalities in BACHD mice

We next evaluated whether the changes described here in BACHD NMJs could be a consequence of damage in motor axons close to the spinal cord. Thus, our next set of experiments aimed to investigate axons exiting the ventral roots. Semi-thin cross-sections of the cervical ventral roots were obtained and stained with toluidine blue (see methods). Qualitative analysis showed that, compared to WT

FIG. 1. Decreased CSA, reduction in IIB fiber typing and ultrastructure abnormalities in BACHD STM muscle fibers. (A–B) Representative images of STM skeletal muscle fibers from 12 months old WT and BACHD mice. Scale bar: $50 \mu\text{m}$; C–C''' to D–D''': Representative images of STM fiber typing from 12 months old WT and BACHD mice. Note that the STM from BACHD presented less staining for the IIX fibers in comparison to WT (C'' and D''). The IIA fibers are also increased in this muscle (C' and D'). Scale bar: $50 \mu\text{m}$. (E–F) Representative electron micrographs of STM fibers from WT and BACHD animals. Observe a normal triad in WT (red box). Note a reduction in the number of myofibrils in the sarcomere (asterisk) in BACHD. (G) High magnification view of the area shown in F depicting enlargement and invasion of the sarcoplasmic reticulum (demarcated area). Also note the presence of vacuoles within the inner space of mitochondrial organelles (blue arrow), abnormal deposition of glycogen in inter-myofibrillar space (yellow arrows) and atypical SR (red arrows). Scale bar: 500 nm . We have analyzed 90 images for WT and 90 images for BACHD from three individual animals per genotype. (H) The box plot shows the CSA median values for WT and BACHD STM muscle fibers. These results represent the median $\pm$ SD of more than 3,000 muscle fibers per genotype ($***P < 0.0001$; Man–Whitney test; $n = 3$ individual animals per genotype). (I) Quantitative analysis of the fiber typing showing decreased expression of IIX isoform and an increase in the expression of the IIA in 12 months old BACHD STM muscle fibers compared to WT. The results represent the mean $\pm$ SD (unpaired Student's *t*-test, $*P < 0.05$, $n = 3$ animals per genotype).



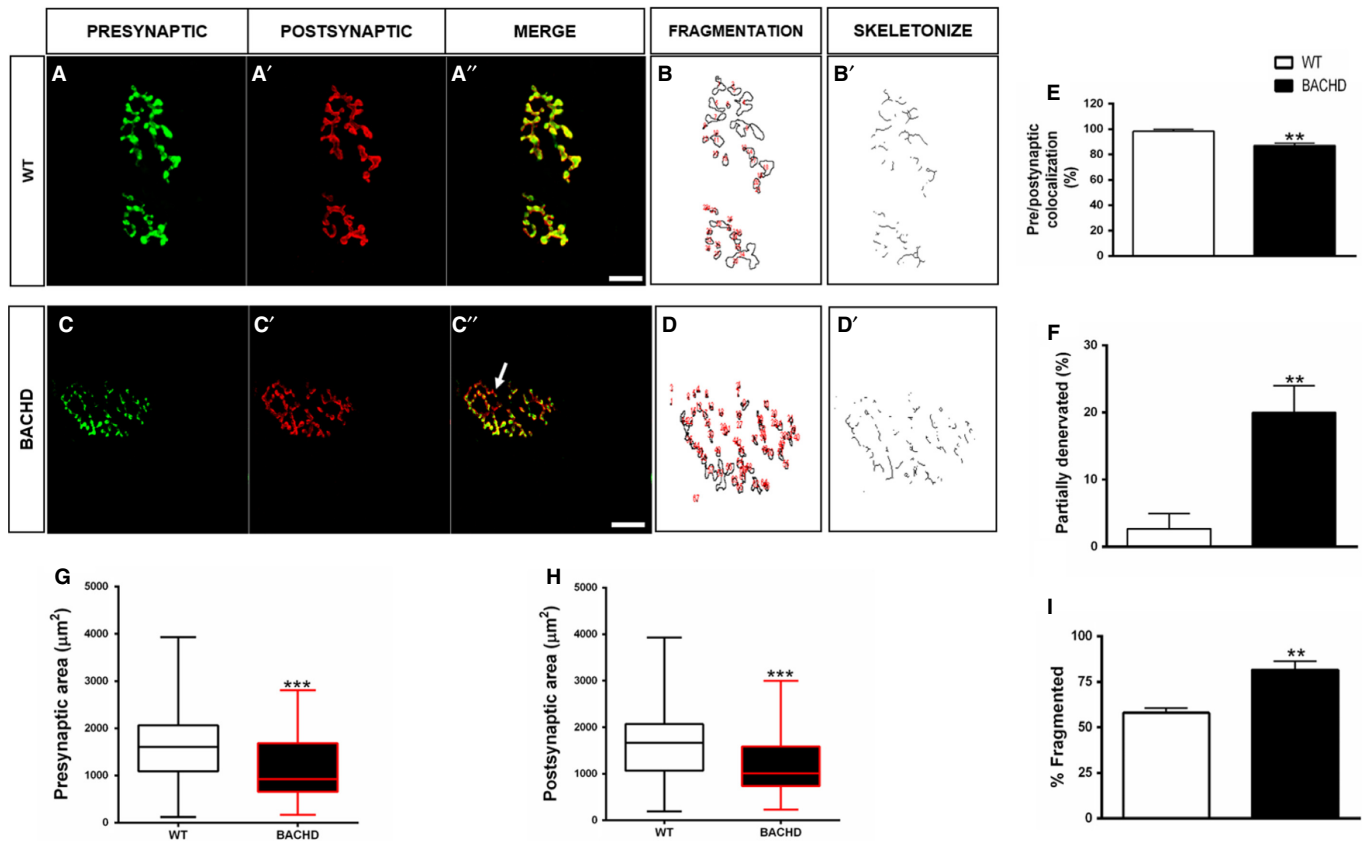


FIG. 2. Fragmentation and denervation in NMJs from BACHD. (A–C'') Representative images of STM-NMJs from 12 months WT and BACHD mice. (A and C) Presynaptic terminals labeled with Alexa-488 anti-synaptotagmin antibody (green). (A' and C') Postsynaptic AChRs labeled with Alexa-555 α -bungarotoxin (red). (A'' and C'') Overlapping images showing partial denervation (arrow). Scale bar: 10 μ m. (B and D) Representation of particle analysis in endplates from WT and BACHD. (B' and D') Skeletonization rendering of fragmentation in endplates from WT and BACHD. (E–I) Graphs showing the degree of colocalization (E) $^{**}P = 0.001$ unpaired student *t*-test], partial denervation (F) $^{**}P = 0.002$ unpaired student *t*-test], pre-synaptic area (G) $^{***}P = 0.0001$, post-synaptic area (H) $^{***}P = 0.0005$ and fragmentation of the endplates (I) $^{**}P = 0.001$ unpaired student *t*-test]. The results represent the mean $\pm$ SD from 75 NMJs per genotype ($n = 3$ individual animals per genotype).

(Fig. 3A), axons from BACHD mice presented severe morphology changes (Fig. 3B red arrows). The quantitative analysis of the ventral roots demonstrated a reduction in the number of axons per area in BACHD [BACHD: 0.08 ± 0.03 axons/ μ m² vs. 0.2 ± 0.02 axons/ μ m² for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 5.7$; $^{**}P = 0.004$ unpaired student *t*-test] (Fig. 3E). The histogram in Fig. 3F shows a reduction in the number of larger myelinated fibers (>4.5 μ m) in BACHD [Interval between 5–6 microns-BACHD: 48.7 ± 3.8 μ m vs. 90.7 ± 12.7 μ m for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 5.5$; $^{**}P = 0.005$ unpaired student *t*-test; interval between 6–7 microns- BACHD: 41.3 ± 3.0 μ m vs. 84.3 ± 6.1 μ m for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 10.1$; $^{***}P = 0.0004$ unpaired student *t*-test; interval between 7–8 microns- BACHD: 40.0 ± 6.5 μ m vs. 70.3 ± 6.0 μ m for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 6.0$; $^{**}P = 0.004$ unpaired student *t*-test and interval between 8 and 9 microns- BACHD: 20.7 ± 4.1 μ m vs. 33.3 ± 5.0 μ m for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 3.3$; $^{*}P = 0.02$ unpaired student *t*-test, $n = 3$ individual animals per genotype (Fig. 3F)]. However, the *G*-ratio (relationship between axonal inner and outer diameter) [BACHD: 0.6 ± 0.1 vs. 0.7 ± 0.1 for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 0.7$; $P = 0.5$ unpaired student *t*-test] and the thickness of the myelin sheath ratio [BACHD: 1.5 ± 0.1 μ m vs. 1.5 ± 0.1 μ m for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 0.4$; $P = 0.7$ unpaired student *t*-test, $n = 3$ individual animals per genotype] were not different from control, (Fig. 3G–H). We have analyzed one semi-thin section per animal in

$n = 3$ mice per genotype. Ultrastructure analyses confirmed the histological observations and showed that axons from BACHD presented various degenerative features such as structural breakdown of the myelin sheath with lamellar separations (Fig. 3D, yellow arrows) and vacuoles within the axoplasm (blue arrows). We have qualitatively analyzed 30 images for each animal in $n = 3$ mice per genotype.

Motoneurons loss and atrophy in the spinal cord from BACHD mice

We next looked at the morphology and number of cervical spinal cord motoneurons. To identify putative spinal cord motoneurons we used an antibody that recognizes the enzyme ChAT. We found that there were ChAT- positive neurons clustered in the ventral horn of the cervical spinal cord segments in both genotypes. Figure 4 shows representative images of cervical segments stained with anti-ChAT from WT (Fig. 4A) and BACHD (Fig. 4B). Figure 4C shows an example of an atrophic ChAT-positive putative motoneuron in BACHD (white arrow). Confirming this observation, quantitative analysis of putative motoneurons' diameters showed statistically significant reduction in this parameter in BACHD compared to WT [BACHD: 26.4 ± 1.4 μ m vs. 32.8 ± 2.8 μ m for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 3.5$; $^{*}P = 0.02$; $n = 3$ individual animals per genotype; unpaired student *t*-test] (Fig. 4L). In addition, we detected

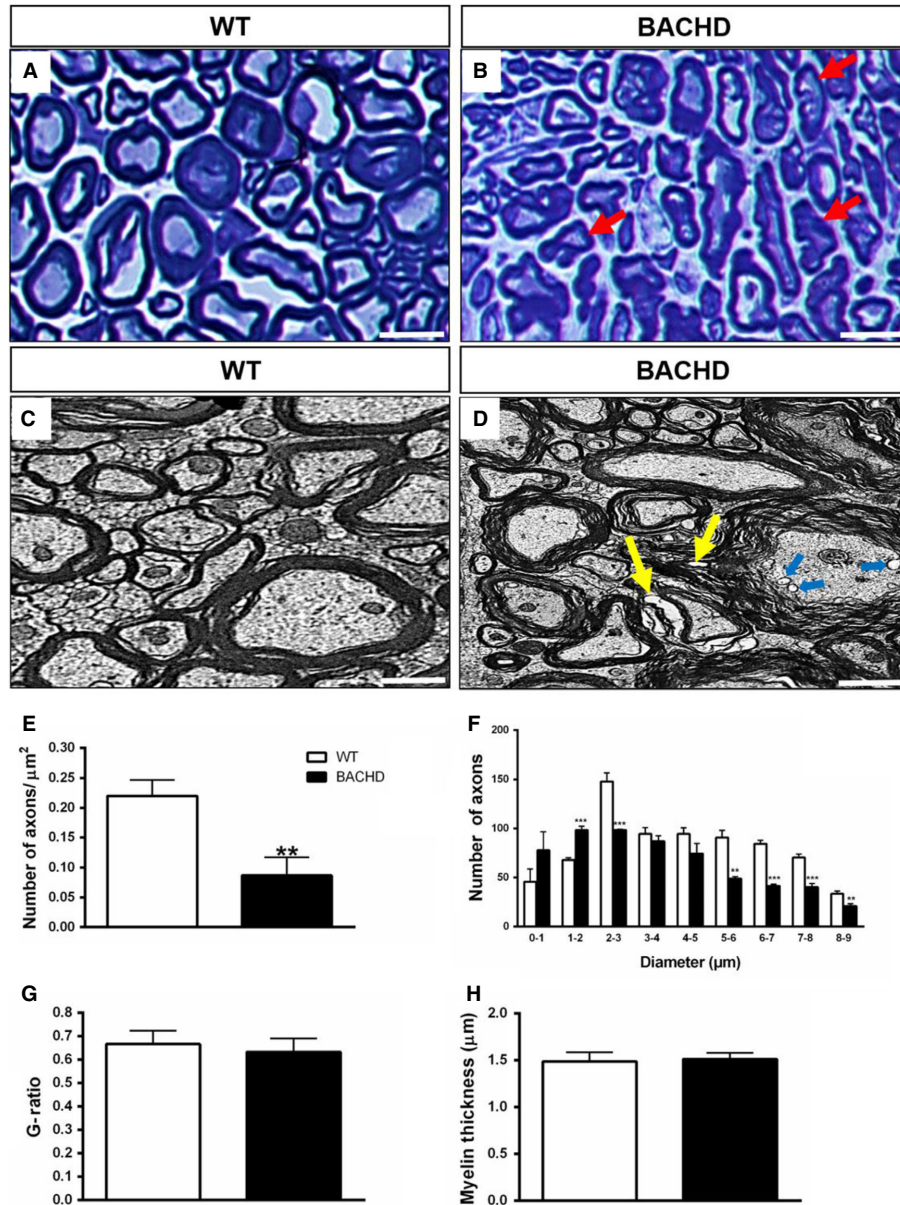


FIG. 3. Axonal changes in BACHD. (A–B) Representative images of axons from 12 months WT and BACHD respectively. Note in A typical axons with preserved structure and shape whereas in B note the presence of atypical axons in degeneration with morphological abnormalities (red arrows). The axons were stained by toluidine blue. Scale bar: 40 μm . (C–D) Electron micrograph of the axons from WT and BACHD. Note in D axons with signs of degeneration like lamellar separation (yellow arrows) and vacuolization in the axoplasm (blue arrows). We analyzed 90 electron micrographs per genotype. Scale bar: 2 μm . (E–H). Quantification of the number of axons by nerve area, number of large axons ($>4.5 \mu\text{m}$), G-ratio and myelin thickness, respectively. We have analyzed 9 semi-thin sections per genotype and a total of 3.222 axons in WT and 1.937 in BACHD (*, **, *** $P < 0.05$, unpaired Student's *t*-test, $n = 3$ individual animals per genotype).

a reduction in the number of putative ChAT-positive motoneurons in sections of the cervical spinal cord segments [BACHD: 270 ± 22.6 vs. 342.3 ± 29 for WT; (mean $\pm$ SD); $t_4 = 3.4$; * $P = 0.02$; $n = 3$ individual animals per genotype; unpaired student *t*-test] (Fig. 4K). A similar reduction in the total number of cells was observed in cervical spinal cord segments stained with toluidine blue [BACHD: 128.7 ± 11.7 vs. 177.0 ± 26.5 for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 2.9$; * $P = 0.04$; $n = 3$ individual animals per genotype; unpaired student *t*-test] (Fig. 4M).

Comparing to WT motoneurons, qualitative analysis of TEM micrographs showed atypical atrophic nuclei in a BACHD motoneuron (Fig. 4H-white arrow). We also observed an increase in the number of lipofuscin granules in BACHD motoneurons (Fig. 4G – red arrows) compared to WT (Fig. 4F – red arrows) [BACHD:

0.2 ± 0.1 granules/area vs. 0.1 ± 0.03 granules/area for WT (mean $\pm$ SD); $t_4 = 2.5$; * $P = 0.03$; $n = 3$ individual animals per genotype. We have analyzed 30 motoneurons per genotype, unpaired student's *t*-test]. Furthermore, we observed vacuolated mitochondria in BACHD motoneurons (Fig. 4J) that were not observed at WT counterparts (Fig. 4I).

To test whether putative motoneurons were undergoing apoptosis, we immunostained sections that contained C1–C3 cervical segments from WT and BACHD spinal cords with an antibody against caspase-3, a marker of cell death. Figures 4D–E show representative images of the caspase-3 in the cervical segments from BACHD and WT mice. Compared to WT, we observed approximately three times more putative motoneurons positive for caspase-3 in BACHD spinal cords (Fig. 4O) [BACHD: 126 ± 10.6 cells vs. 42 ± 13.1 for WT

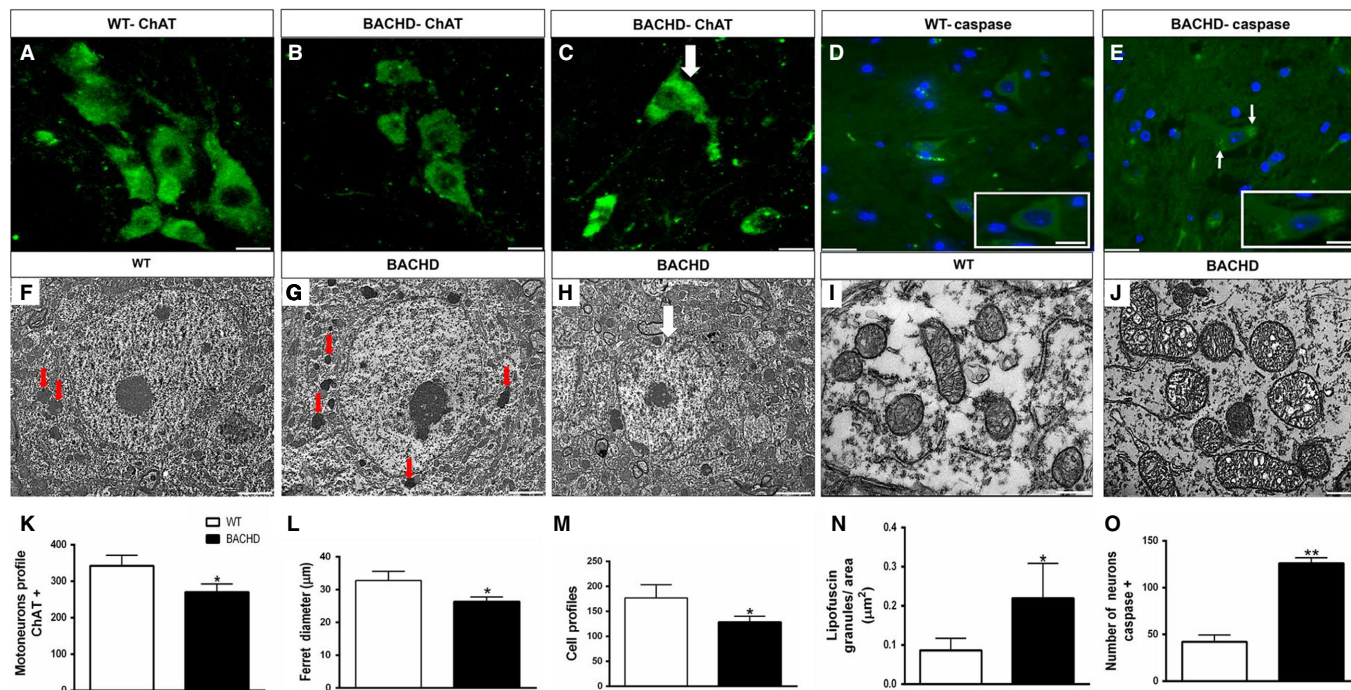


FIG. 4. Motoneurons atrophy in BACHD cervical spinal cords. (A–C) Representative images of putative motoneurons from cervical spinal cord sections stained for ChAT from 12 months WT (A) and BACHD (B). (C) Atypical motoneuron. Scale bar: 50 μm. (D–E) Fluorescence images of motoneurons stained for caspase-3 in WT (D) and BACHD (arrow). Nuclei were stained with DAPI. Inset: putative motoneuron positive for caspase-3 in BACHD. Scale bar: 50 μm. (F–G) Ultrastructural images showing motoneuron with more lipofuscin granules (red arrows) in BACHD compared to WT. (H) Representative images of an atrophic motoneuron from BACHD spinal cords. Scale bar: 5 μm. (I–J) Representative images showing normal and vacuolated mitochondria in WT and BACHD respectively. Scale bar: 500 nm. (K) Quantification of ChAT-positive motoneurons profiles in WT and BACHD cervical spinal cords (~150 neurons analyzed per genotype). (L) Ferret diameter. (M) Number of cell profiles in spinal cord sections from WT and BACHD stained with toluidine blue (~2,000 cells analyzed per genotype; unpaired student's *t*-test; **P* < 0.05; *n* = 3 animals per genotype). (N) Quantification of the number of lipofuscin granules/area in WT and BACHD motoneurons (Total analyzed 87 granules in WT and 224 granules in BACHD from 30 motoneurons per genotype; unpaired student's *t*-test; **P* < 0.05; *n* = 3 animals per genotype). (O) Graphical quantification of motoneurons stained positively for caspase-3 in WT and BACHD (~150 neurons analyzed per genotype; unpaired student's *t*-test; ***P* < 0.001; *n* = 3 animals per genotype). All results described here are from *n* = 3 individual animals per genotype and were expressed as mean ± SD.

(mean ± SD); $t_4 = 8.6$; ***P* = 0.001; *n* = 3 individual animals per genotype; unpaired student's *t*-test]. This result indicates that the activation of apoptotic cascades may be responsible for the putative motoneuron degeneration observed in BACHD spinal cords.

Discussion

Most scientific investigations on HD disease focused their studies mainly in the brain pathology and the neurological symptoms that arise from such alterations. From this perspective, and taking advantage of BACHD murine model for HD, we investigated putative alterations caused by mHtt in the motor unit (NMJs, axons and spinal cord motoneurons) that control muscle contraction.

We first investigated the impact of the mHtt on the last component of the MU: the skeletal muscle. It is well described that the motor symptoms in HD involve involuntary movements of the face and limbs and postural instability of the neck and trunk (Bates *et al.*, 2002). In this study, we evaluated possible changes in the STM, a neck muscle important for head control and posture (Kim, 2015). We found that many of the STM muscle fibers were significantly smaller in the HD mice than in the age-matched control fibers (WT mice) (Fig. 1 and schematic representation in Fig. 5). Consistent with our results, atrophy of skeletal muscles has been considered a hallmark for HD in humans (Farrer, 1985; Farrer & Meaney, 1985; Ribchester *et al.*, 2004; Trejo *et al.*, 2004). Mielcarek (2015) observed in R6/2 mice significant physiological alterations in the contractile properties of the extensor longus digitorum (EDL) and tibialis anterior (TA)

muscles, as well as a reduction in muscle mass. Although it has been suggested that mHtt has deleterious effects on muscles in R6/2 mice, via accumulation of poly-glutamine aggregates (Sathasivam *et al.*, 1999; Moffitt *et al.*, 2009) and formation of inclusions in myoblasts and myotubes (Orth *et al.*, 2003), the subjacent mechanism(s) of muscle atrophy is (are) not yet elucidated.

The ultrastructure analyses of STM muscle fibers from BACHD showed enlargement of the sarcoplasmic reticulum, invading the myofibrils region. We also observed the presence of vacuoles inside the mitochondria. Moreover, we observed the presence of inter-myofibrillar glycogen and disorganization of the triads (Fig. 1). These changes suggested a pathological ongoing process during muscle atrophy in BACHD mice. Furthermore, the mitochondrial defects reported here might be a key factor to the degenerative process seen in HD animal models and patients with this disease. Indeed, mHtt protein has been found to interfere with the normal function of mitochondria (Chaturvedi *et al.*, 2009; Chandra *et al.*, 2016).

Another ultrastructure change that caught our attention was the great amount of glycogen granules accumulated at the inter-myofibrillar spaces in the BACHD STM muscle fibers. It is known that glycogen accumulation at these spaces and in the intra-myofibrillar compartments are normal events and the deposits are used depending on the muscle energy demand (Marchand *et al.*, 2002). However, we cannot exclude the fact that the abnormally high levels of glycogen may be a consequence of energy imbalance caused by putative mitochondrial dysfunction. In addition, areas of degraded contractile structures together with invaded portions of the

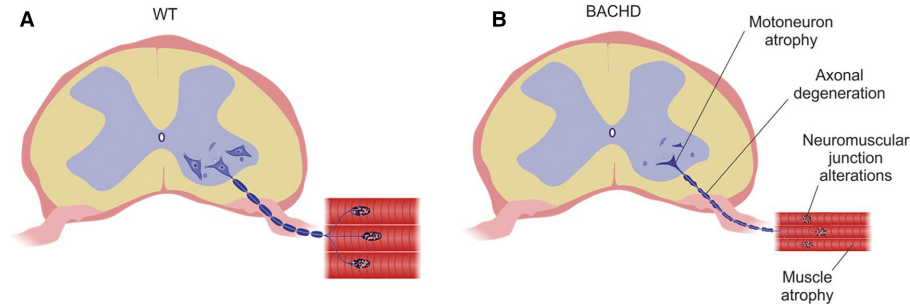


FIG. 5. Schematic representation of cervical spinal cords from WT and BACHD (A) Motor unit of WT mice showing preservation of all structures. (B) Changes seen in the motor unit of BACHD such as motoneurons atrophy, axonal degeneration, neuromuscular junction fragmentation and muscle fiber atrophy.

sarcoplasmic reticulum were described in denervated muscles (Pellegrino & Franzini, 1963). The authors also reported that, during atrophy, there was a reduction in the number of the contractile filaments similar to what we have reported here for BACHD STM muscle fibers (Fig. 1F). Here, we have also observed changes in sarcoplasmic reticulum and myofibrils. Moreover, it has been reported that there is a close relationship between the accumulation of inter-myofibrillar glycogen and SR function (Nielsen *et al.*, 2009).

We next performed the muscle fiber typing to confirm that the BACHD STM muscle fibers atrophy could be related to a decrease in the proportion of the largest IIX fiber type. We observed that STM muscles from BACHD mice presented a decrease in large fibers (IIX) and partial increase in smaller fibers (IIA) (Fig. 1). Such reduction in fast-twitch fibers (IIX) is in accordance with previous works from the literature showing that they are more vulnerable than slow-twitch fibers under a variety of atrophic conditions (reviewed by Wang & Pessin, 2013). Data from the literature have shown that motoneurons and their NMJs differ drastically in sizes with the biggest ones, with largest NMJs, innervating fast muscle fibers (Burke *et al.*, 1971; Mantilla *et al.*, 2007). We therefore hypothesized that the reduction in IIX muscle fibers in BACHD might also be associated to other alterations described here such as decrease in the area of pre- and postsynaptic elements (Fig. 2) and decreased size of putative motoneurons in BACHD (Fig. 4) (see also the cartoon in Fig. 5). However, we cannot rule out the possibility that the reduction in ChAT-positive cells diameter observed in BACHD spinal cords reflects putative motoneurons shrinkage before they die. Decrease in neuron's size has been recognized in other degenerative disorders such as Alzheimer's, Parkinson's diseases and in ALS patients, where there is a depletion of large pyramidal neurons from the primary motor cortex (Betz cells) and large spinal cord motoneurons compared to control subjects (Kiernan & Hudson, 1991). Additional experiments are necessary to clarify if larger motoneurons selective die in BACHD spinal cords.

Our next experiments were designed to investigate whether BACHD mice showed alterations in the NMJs. STM-NMJs from BACHD presented several degenerative signs such as loss of colocalization between the pre- and postsynaptic elements, reduction in the synaptic area, endplates fragmentation and partial denervation (Fig. 2 and schematic representation in Fig. 5).

Many morphological studies on NMJs in neurodegenerative diseases (Sarantseva *et al.*, 2011; Valdez *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2012) or in age-related degenerative processes (Balice-Gordon, 1997; Courtney & Steinbach, 1981; Gutmann *et al.*, 1971; Valdez *et al.*, 2010) correlated similar alterations to the axonal denervation

process. For example, Ribchester *et al.* (2004) observed changes in NMJs from R6/2 mice such as denervation, reduction in the area of presynaptic terminals, increased acetylcholine sensitivity, and reduction in the sensitivity to μ -conotoxin (Ribchester). Therefore, it has been suggested that mHtt might alter synaptic components and then interfere with its structure affecting neurotransmission (Smith *et al.*, 2005). The results presented here are in line with this view.

After observing abnormalities in key components of the motor unit such as skeletal muscle and NMJs, we analyzed the ventral roots of the cervical spinal cord. The ultrastructural analysis of the ventral roots of the cervical segment of BACHD spinal cords showed lamellar separation and vacuoles in the myelin sheath and axoplasm (Fig. 3 and schematic representation in Fig. 5). Furthermore, we observed an intense process of axonal degeneration with decrease in diameter and number per area. We also observed that the myelinated fibers that were most affected in BACHD animals were of the highest caliber. Previous work demonstrated similar changes in ultrastructure preferable seen in large-caliber fibers in the sciatic nerve of the R6/2 mice (Wade *et al.*, 2008). Sobue *et al.* (1981) also found higher incidence of large-caliber fibers at the expense of smaller caliber in cervical ventral roots of patients with ALS. These data suggested that large myelinated fibers, corresponding to α -motoneurons fibers, were selectively affected and that the small myelinated fibers, corresponding to γ -motor neurons fibers, were preserved to some extent (Sobue *et al.*, 1981; Biscoe *et al.*, 1982).

Previous studies performed in R6/2 mice models for HD showed marked atrophy of skeletal muscles like TA and EDL and they related these findings on skeletal muscle atrophy to possible alterations in the α -motoneurons. However, none of these studies investigated what might be happening to α -motoneurons (Ribchester *et al.*, 2004; Mielcarek, 2015). Furthermore, Mielcarek (2015) showed, through functional tests, that the physiological evaluation of the motor unit of the R6/2 mice presented a progressive loss in the number of motor units in the EDL muscle. Our findings might contribute to a better understanding of muscle atrophy in this mice model for HD as we observed death and atrophy of putative motoneurons.

As we demonstrated neuronal loss in the cervical segment of the spinal cord, our next experiments aimed to investigate whether these neurons were undergoing apoptosis. A quantitative analysis of the number of caspase-3 positive neurons revealed that cervical spinal cords from BACHD mice had three times more neurons positive for Caspase-3 than their WT counterparts (Fig. 4). Our data suggest that the reported neuronal death in the cervical spinal cord in BACHD might be occurring by an activation of the apoptotic cascade.

These data are in accordance to previous studies using mouse models for HD that showed neuronal death by apoptosis in other regions of the CNS (Dragunow *et al.*, 1995). Other works also suggested that the Htt could be a substrate to caspase-3, leading to an increase in the cleavage rate of Htt, causing additional stress to the cell and consequently the cell death by apoptosis (Wellington *et al.*, 2002). Furthermore, Toulmond *et al.* (2004) showed that the inhibition of the activity of caspase-3 by its reversible inhibitor (M-826), resulted in a significant reduction in the neuronal death in rat models for HD.

We next investigated through TEM possible alterations at the ultrastructural level in motoneurons from cervical spinal cords of BACHD mice. Mitochondria are vital organelles that generate energy to all cellular processes and regulate cell function, thus, any impairment in these structures can lead to generation of reactive oxygen species that can induce cell death by necrosis or apoptosis (Benard *et al.*, 2007). It has been shown that mitochondria dysfunction plays an important role in the pathogenesis of HD (Browne & Beal, 2004; Reddy *et al.*, 2009). In our study, we observed cristae disruption and vacuoles in mitochondria (Fig. 4). Previous *in vivo* studies showed that N-terminals Htt fragments could directly interfere with mitochondria functioning, resulting in calcium related abnormalities and subsequent energy deficit (Panov *et al.*, 2002). It is interesting to note that neurons are the first cells to be affected by mitochondria alterations as they are very sensitive to oxidative stress, excitotoxic stress, expression of inflammatory signals, proapoptotic signals and energy depletion that might play a role in the observed neuronal death in HD (Kim *et al.*, 2010a, b).

Another feature that we observed in the EM images was the presence of lipofuscin granules (Fig. 4H) in BACHD motoneurons. It is well-described that the accumulation of these granules in neurons during aging is a normal process (Samorajski *et al.*, 1965). However, there are evidences that this deposition may also be related to neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis (Mchholm *et al.*, 1984; Cataldo *et al.*, 1994). Furthermore, it is known that oxidative stress caused by mitochondrial damage in brain of HD patients leads to the increase in lipofuscin granules (Brown, 1999). Based on these evidences, we suggested that the accumulation of lipofuscin granules observed in motoneurons from BACHD might be a sign of degeneration. In addition, we suggested that the mitochondria observed in motoneurons at the ultrastructure level might be related to cell atrophy and death by apoptosis in cervical spinal cord from BACHD mice.

In conclusion, our study provides evidences of significant alterations at the spinal cord motoneurons, ventral roots, NMJs, and STM muscle in a mouse model for HD (see Fig. 5). We suggest that although this disease is caused by damage in the upper CNS structures that control movement, the motor unit, which is the final pathway of the motor system, also suffers significant changes in BACHD. Further experiments are necessary to identify mechanisms involved in these alterations. Therefore, our data may open new routes of investigation and could help in establishing new directions in the therapeutics of HD.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPEMIG (#00271-13), CNPq (#467220/2014-0 and #475735/2013-7) and CAPES. Cristina Guatimosim is a Bolsista de Produtividade em Pesquisa (CNPq). The authors would like to acknowledge the Center of Acquisition and Processing of Images (CAPI) – ICB – Universidade Federal de Minas Gerais and Microscopy Center at Universidade Federal de Minas Gerais for providing the equipments and technical support for experiments involving confocal and electron microscopy

respectively. The authors thank Isadora Souza Furtado for her work on maintaining the BACHD colonies used in this study; Isabella Guimarães Olmo and Juliana Guimarães Dória for the assistance in genotyping the animals, Leonardo Sawakuchi for the assistance in statistical analysis and Carla Morais for her work in Schematic representation of cervical spinal cords.

Abbreviations

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CNS, central nervous system; CSA, cross-sectional area; EDL, extensor longus digitorum; FF, fast fatigable; HD, Huntington's disease; htt, Huntingtin; mHtt, mutated huntingtin; MU, motor unit; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; NMJs, neuromuscular junctions; PGC-1 α , proliferator-activated receptor γ co activator 1 α ; RT, room temperature; SR, sarcoplasmic reticulum; STM, sternomastoid; TA, tibialis anterior; TEM, transmission electron microscopy; WT, wild type; α -btx, α -bungarotoxin.

References

- Balace-Gordon, R.J. (1997) Age-related changes in neuromuscular innervation. *Muscle Nerve Suppl.*, **5**, S83–S87.
- Bates, G.P. (2005) History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease – a history. *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 766–773.
- Bates, G.P., Harper, P.S. & Jones, A.L. (2002) *Huntington's Disease*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 429–472.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T. & Rossignol, R. (2007) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.*, **120**, 838–848.
- Biscoe, T.J., Nickels, S.M. & Stirling, C.A. (1982) Numbers and sizes of nerve fibres in mouse spinal roots. *Exp. Physiol.*, **67**, 473–494.
- Brown, G.C. (1999) Nitric oxide and mitochondrial respiration. *BBA-Bioenergetics*, **1411**, 351–369.
- Browne, S.E. & Beal, M.F. (2004) The energetics of Huntington's disease. *Neurochem. Res.*, **29**, 531–546.
- Brožová, H., Štochl, J., Klempíř, J., Kucharík, M., Růžicka, E. & Roth, J. (2011) A sensitivity comparison of clinical tests for postural instability in patients with Huntington's disease. *Gait Posture*, **34**, 245–247.
- Burke, R.E., Levine, D.N., Zajac, F.E.D., Tsairis, P. & Engel, W.K. (1971) Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science*, **174**, 709–712.
- Cataldo, A.M., Hamilton, D.J. & Nixon, R.A. (1994) Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease. *Brain Res.*, **640**, 68–80.
- Chandra, A., Sharma, A., Calingasan, N.Y., White, J.M., Shurubor, Y., Yang, X.W. & Johri, A. (2016) Enhanced mitochondrial biogenesis ameliorates disease phenotype in a full-length mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 2269–2282.
- Chaturvedi, R.K., Adhiketty, P., Shukla, S., Hennessy, T., Calingasan, N., Yang, L., Starkov, A., Kiaei, M. *et al.* (2009) Impaired PGC-1 α function in muscle in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 3048–3065.
- Chau, W.K., So, K.F., Tay, D. & Dockery, P. (2000) A morphometric study of optic axons regenerated in a sciatic nerve graft of adult rats. *Restor. Neurol. Neurosci.*, **16**, 105–116.
- Courtney, J. & Steinbach, J.H. (1981) Age changes in neuromuscular junction morphology and acetylcholine receptor distribution on rat skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, **320**, 435–447.
- Dragunow, M., Faull, R.L.M., Lawlor, P., Beilharz, E.J., Singleton, K., Walker, E.B. & Mee, E. (1995) In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *NeuroReport*, **6**, 1053–1057.
- Farrer, L.A. (1985) Diabetes mellitus in Huntington disease. *Clin. Genet.*, **27**, 62–67.
- Farrer, L.A. & Meaney, F.J. (1985) An anthropometric assessment of Huntington's disease patients and families. *Am. J. Phys. Anthropol.*, **67**, 185–194.
- Gray, M., Shirasaki, D.I., Cepeda, C., André, V.M., Wilburn, B., Lu, X.H. & Li, X.J. (2008) Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J. Neurosci.*, **28**, 6182–6195.
- Gutmann, E., Hanzlikova, V. & Vysokocil, F. (1971) Age changes in cross striated muscle of the rat. *J. Physiol.*, **216**, 331–343.
- Harjes, P. & Wanke, E.E. (2003) The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Cell Press*, **28**, 425–433.

- Holmes, A., Yang, R.J., Murphy, D.L. & Crawley, J.N. (2002) Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. *Neuropsychopharmacology*, **27**, 914–923.
- Hoogeveen, A.T., Willemsen, R., Meyer, N., De Rooij, K.E., Roos, R.A., Van Ommen, G.J.B. & Galjaard, H. (1993) Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 2069–2073.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, **72**, 971–983.
- Kazantsev, A., Preisinger, E., Dranovsky, A., Goldgaber, D. & Housman, D. (1999) Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 11404–11409.
- Kiernan, J.A. & Hudson, A.J. (1991) Changes in sizes of cortical and lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, **114**, 843–853.
- Kim, M.S. (2015) Neck kinematics and sternocleidomastoid muscle activation during neck rotation in subjects with forward head posture. *J. Phys. Ther. Sci.*, **27**, 3425.
- Kim, J., Moody, J.P., Edgerly, C.K., Bordiuk, O.L., Cormier, K., Smith, K., Beal, M.F. & Ferrante, R.J. (2010a) Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3919–3935.
- Kim, J., Moody, J.P., Edgerly, C.K., Bordiuk, O.L., Cormier, K., Smith, K. & Ferrante, R.J. (2010b) Mitochondrial loss, dysfunction, and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3919–3935.
- Kong, J. & Xu, Z. (1999) Peripheral axotomy slows motoneuron degeneration in a transgenic mouse line expressing mutant SOD1 G93A. *J. Comp. Neurol.*, **412**, 373–380.
- Li, S.H., Schilling, G., Young, W., Margolis, R.L., Stine, O.C., Wagster, M.V. & Hedree, N.J.C. (1993) Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron*, **11**, 985–993.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C. & Bates, G.P. (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, **87**, 493–506.
- Mantilla, C.B., Rowley, K.L., Zhan, W.Z., Fahim, M.A. & Sieck, G.C. (2007) Synaptic vesicle pools at diaphragm neuromuscular junctions vary with motoneuron soma, not axon terminal, inactivity. *Neuroscience*, **146**, 178–189.
- Mantovani, S., Gordon, R., Li, R., Christie, D.C., Kumar, V. & Woodruff, T.M. (2016) Motor deficits associated with Huntington's disease occur in the absence of striatal degeneration in BACHD transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 1780–1791.
- Marchand, I., Chorneyko, K., Tarnopolsky, M., Hamilton, S., Shearer, J., Potvin, J. & Graham, T.E. (2002) Quantification of subcellular glycogen in resting human muscle: granule size, number, and location. *J. Appl. Physiol.*, **93**, 1598–1607.
- Mchom, G.B., Aguilar, M.J. & Norris, F.H. (1984) Lipofuscin in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.*, **41**, 1187.
- Menalled, L., El-Khodori, B., Patry, M. & Suarez-Farinas, M. (2009) Systematic behavioral evaluation of transgenic and knock-in mouse models of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.*, **35**, 319–336.
- Mielcarek, M. (2015) Huntington's disease is a multi-system disorder. *Rare Dis.*, **3**, e1058464.
- Moffitt, H., McPhail, G.D., Woodman, B., Hobbs, C. & Bates, G.P. (2009) Formation of polyglutamine inclusions in a wide range of non-CNS tissues in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*, **30**, e8025.
- Nielsen, J., Schröder, H.D., Rix, C.G. & Ørtenblad, N. (2009) Distinct effects of subcellular glycogen localization on tetanic relaxation time and endurance in mechanically skinned rat skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, **587**, 3679–3690.
- Ona, V.O., Li, M., Vonsattel, J.P., Andrews, L.J., Khan, S.Q., Chung, W.M., Frey, A.S., Menon, A.S. *et al.* (1999) Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature*, **399**, 263–267.
- Orth, M., Cooper, J.M., Bates, G.P. & Schapira, A.H. (2003) Inclusion formation in Huntington's disease R6/2 mouse muscle cultures. *J. Neurochem.*, **87**, 1–6.
- Panov, A.V., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J. & Greenamyre, J.T. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.*, **5**, 731–736.
- Pellegrino, C. & Franzini, C. (1963) An electron microscope study of denervation atrophy in red and white skeletal muscle fibres. *J. Cell Biol.*, **17**, 327–349.
- Pratt, S.J., Shah, S.B., Ward, C.W., Inacio, M.P., Stains, J.P. & Lovering, R.M. (2013) Effects of in vivo injury on the neuromuscular junction in healthy and dystrophic muscles. *J. Physiol.*, **591**, 559–570.
- Reddy, P.H., Mao, P. & Manczak, M. (2009) Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease. *Brain Res. Rev.*, **61**, 33–48.
- Ribchester, R.R., Thomson, D., Wood, N.I., Hinks, T., Gillingwater, T.H., Wishart, T.M., Court, F.A. & Morton, A.J. (2004) Progressive abnormalities in skeletal muscle and neuromuscular junctions of transgenic mice expressing the Huntington's disease mutation. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 3092–3114.
- Rigamonti, D., Bauer, J.H., De-Fraja, C., Conti, L., Sipione, S., Sciorati, C., Clementi, E., Hackam, A. *et al.* (2000) Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J. Neurosci.*, **20**, 3705–3713.
- Rodrigues, H.A., Fonseca, M.D.C., Camargo, W.L., Lima, P.M., Martinelli, P.M., Naves, L.A. & Guatimosim, C. (2013) Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mouse neuromuscular junction. *PLoS One*, **8**, e78342.
- Samorajski, T., Ordry, J.M. & Keefe, J.R. (1965) The fine structure of lipofuscin age pigment in the nervous system of aged mice. *J. Cell Biol.*, **26**, 779–793.
- Sarantseva, S.V., Kislik, G.A., Tkachenko, N.A., Vasil'ev, A.N. & Shvartsman, A.L. (2011) [Morphological and functional abnormalities in neuromuscular junctions of *Drosophila melanogaster* induced by the expression of human APP gene]. *Tsitologiia*, **54**, 421–429.
- Sathasivam, K., Hobbs, C., Turmaine, M., Mangiarini, L., Mahal, A., Bertaux, F., Wanker, E.E., Doherty, P. *et al.* (1999) Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 813–822.
- Smith, R., Brundin, P. & Ly, J.Y. (2005) Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 1901–1912.
- Sobue, G., Matsuoka, Y., Mukai, E., Takayanagi, T. & Sobue, I. (1981) Pathology of myelinated fibers in cervical and lumbar ventral spinal roots in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, **50**, 413–421.
- Tian, J.R., Herdman, S.J., Zee, D.S. & Folstein, S.E. (1992) Postural stability in patients with Huntington's disease. *Neurology*, **42**, 1232.
- Toulmond, S., Tang, K., Bureau, Y., Ashdown, H., Degen, S., O'donnell, R., Tam, J., Han, Y. *et al.* (2004) Neuroprotective effects of M826, a reversible caspase-3 inhibitor, in the rat malonate model of Huntington's disease. *Brit. J. Pharmacol.*, **141**, 689–697.
- Trejo, A., Tarrats, R.M., Alonso, M.E., Boll, M.C., Ochoa, A. & Velásquez, L. (2004) Assessment of the nutrition status of patients with Huntington's disease. *Nutrition*, **20**, 192–196.
- Trottier, Y., Lutz, Y., Stevanin, G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G. & Agid, Y. (1995) Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, **378**, 403–406.
- Valdez, G., Tapia, J.C., Kang, H., Clemenson, G.D.J.R., Gage, F.H., Lichtman, J.W. & Sanes, J.R. (2010) Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 14863–14868.
- Valdez, G., Tapia, J.C., Lichtman, J.W., Fox, M.A. & Sanes, J. (2012) Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One*, **7**, e34640.
- Van Der Burg, J.M., Björkqvist, M. & Brundin, P. (2009) Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol.*, **8**, 765–774.
- Wade, A., Jacobs, P. & Morton, A.J. (2008) Atrophy and degeneration in sciatic nerve of presymptomatic mice carrying the Huntington's disease mutation. *Brain Res.*, **1188**, 61–68.
- Wang, Y. & Pessin, J.E. (2013) Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr. Opin. Clin. Nutr.*, **16**, 243–250.
- Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Gutekunst, C.A., Rogers, D., Warby, S., Graham, R.K., Loubser, O., Van Raamsdonk, J. *et al.* (2002) Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.*, **22**, 7862–7872.
- Xia, R., Liu, Y., Yang, L., Gal, J., Zhu, H. & Jia, J. (2012) Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a *Drosophila* model of Fus-mediated ALS. *Mol. Neurodegener.*, **7**, 10.
- Yang, X.W. & Gray, M. (2011) Mouse models for validating preclinical candidates for Huntington's disease. In Lo, D.C. & Hughes, R.E. (Eds),

- Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, FL. Chapter 7.
- Yang, X.W., Model, P. & Heintz, N. (1997) Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nature Biotechnol.*, **15**, 859–865.
- Zielonka, D., Piotrowska, I., Marcinkowski, J.T. & Mielcarek, M. (2014) Skeletal muscle pathology in Huntington's disease. *Front. Physiol.*, **5**, 1–5.
- Zuccato, C., Valenza, M. & Cattaneo, E. (2010) Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in Huntington's disease. *Physiol. Rev.*, **90**, 905–981.