



Dissertação de mestrado

Jéssica Mabelle de Souza

Influência do mGluR5 e da proteína huntingtina mutante na expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas (ICB)

Belo Horizonte, 02 de fevereiro de 2017

Dissertação de mestrado

Jéssica Mabelle de Souza

Influência do mGluR5 e da proteína huntingtina mutante na expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiola M. Ribeiro

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas (ICB)

Belo Horizonte, 02 de fevereiro de 2017

Colaboradores

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Cnpq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Adriano e Aparecida, as minhas irmãs, Livia e Clarinha, a minha avó Carmelinda e ao meu noivo Tiago. Obrigada pelo suporte, amor, carinho e compreensão, que fizeram com que as adversidades não me desviassem do caminho.

Devo tudo que sou a vocês!

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Prof^a Fabíola Ribeiro por ter me acolhido desde 2011. Foram muitos ensinamentos, desafios e projetos. Sem o seu apoio essa etapa da minha vida não seria possível. Obrigada por cada palavra, puxão de orelha, encorajamento, confiança e por me guiar em todos os momentos.

Agradeço à minha querida amiga Toniana, que compartilha comigo não só todos os momentos do laboratório, mas também da vida. Obrigada por cada palavra amiga, cada risada, por aguentar meus dramas e reclamações. Todo o tempo gasto com projetos, experimentos, artigos e seminários não seria o mesmo sem seu apoio e amizade incondicional.

Agradeço também as minhas amadas companheiras Juliana, Isabella e Flávia. O que eu sei, devo a vocês. Obrigada por cada técnica ensinada, pela paciência e parceria. Obrigada por nunca terem me deixado na mão. Como é bom ter vocês ao meu lado! Espero conseguir retribuir um pouquinho do muito que já fizeram por mim.

E o que seria do laboratório sem as ICs? Muito obrigada minhas queridas Esther, Nathália e Ana Luísa. Sem o suporte de vocês nada seria possível. Obrigada pela disponibilidade e boa vontade. Agradeço também a Adriane e Pablo, pela ajuda e parceria nesse período.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos do Laboratório RNAi. É muito bom conviver diariamente com pessoas tão inteligentes, disponíveis e com alto astral. Obrigada por sempre me ajudarem em tudo e pela calorosa amizade.

Também agradeço a todos os meus amigos de BASES. Aqueles três meses não teriam sido tão dramáticos/sensacionais sem vocês. Obrigada pelo aprendizado, festas e pela amizade. Levarei vocês sempre comigo.

Por fim, agradeço a DEUS! Obrigada por ser meu porto seguro. Obrigada por renovar minhas energias a cada dia para conseguir concluir essa etapa. Obrigada por estar comigo em todos os momentos.

Lista de figuras e tabelas

Figura 1: Representação esquemática da maquinaria do REST/NRSF para a repressão transcricional de genes.

Figura 2: Genotipagem dos camundongos BACHD.

Figura 3: Genotipagem de camundongos mutantes para o gene mGluR5.

Figura 4: A expressão de REST encontra-se reduzida na região do córtex nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade.

Figura 5: A expressão de REST encontra-se reduzida na região do corpo estriado nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade.

Figura 6: A expressão de REST encontra-se reduzida na região do hipocampo nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 6 e 12 meses de idade.

Figura 7: Não há diferença na expressão de REST na região do cerebelo nos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade.

Figura 8: A expressão de GluR2 encontra-se reduzida nos camundongos BACHD e aumentada nos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do hipocampo.

Figura 9: A expressão de sinapsina encontra-se reduzida nos camundongos BACHD e aumentada nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do hipocampo.

Figura 10: A expressão de SNAP25 encontra-se reduzida nos camundongos BACHD e aumentada nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do hipocampo.

Figura 11: Não há diferença na expressão de sinaptotagmina na região do hipocampo nos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-}.

Figura 12: A expressão de BDNF encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} na região do hipocampo.

Figura 13: A ativação de CREB encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do córtex.

Figura 14: A ativação de CREB encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do corpo estriado.

Figura 15: A ativação de CREB encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do hipocampo.

Figura 16: A expressão de ARC encontra-se reduzida nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} na região do hipocampo.

Figura 17: A expressão de sintaxina 1A encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do córtex.

Figura 18: A expressão de sintaxina 1A encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do corpo estriado.

Figura 19: A expressão de sintaxina 1A encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do hipocampo.

Figura 20: Não há diferença na expressão de sintaxina na região do cerebelo dos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade.

Figura 21: A expressão de PSD95 encontra-se reduzida nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do córtex.

Figura 22: A expressão de PSD95 encontra-se reduzida nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do corpo estriado.

Figura 23: A expressão de PSD95 encontra-se reduzida nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 6 e 12 meses de idade na região do hipocampo.

Figura 24: Não há diferença na expressão de PSD95 na região do cerebelo nos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade.

Figura 25: Não há diferença na expressão de NGF na região do hipocampo nos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade.

Tabela 1: Iniciadores utilizados no PCR convencional.

Tabela 2: Iniciadores utilizados no PCR convencional.

Tabela 3: Características dos iniciadores utilizados nas reações de qPCR.

Tabela 4: Análises de expressão gênica e ativação de proteínas em camundongos com 12 meses de idade, comparado a camundongos selvagens (WT).

Lista de abreviaturas

µg: microgramas

µL: microlitros

µM: micromolar

°C: graus Celsius

AC: adenilato ciclase

AMPA: ácido aminopropiônico

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

AP1: ativador de proteína 1

Arc/Arg3.1: proteína regulada por atividade e associada ao citoesqueleto

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

CaMK: proteína quinase dependente de cálcio Ca²⁺/calmodulina

CBP: proteína que se liga ao CREB

CDPPB: 3-ciano-N-(1,3-difenil-1H-pirazol-5-il)benzamida

ChIP: imunoprecipitação da cromatina

CoREST: co-repressor de REST

CREB: proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc

DA: doença de Alzheimer

DAG: 1,2,-diacilglicerol

DH: doença de Huntington

Elk1: proteína com domínio ETS

ERK: quinase regulada por sinais extracelulares

GPCR: proteína G acoplada ao receptor metabotrópico

Gα: subunidade alfa da proteína G

HAP1: proteína associada a huntingtina 1

HDACs: histonas desacetilases

HIP1: proteína que interage com huntingtina 1

htt: proteína huntingtina

IP₃: inositol 1,4,5 trifosfato

kDa: kiloDaltons

KID: domínio indutível por quinase

LTD: depressão de longa duração

LTP: potencial de longa duração

M: molar

MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos

mGluR: receptor metabotrópico glutamatérgico

mhtt: huntingtina mutada

mM: milimolar

MPEP: 2-metil-6(feniletinil) piridina

MSN: neurônios espinhosos médios

Nav 1.2: canais de sódio do tipo II

ND2: neuroD2

NF- κ B: fator nuclear κ B

nm: nanômetro

NMDA: N-metil d-aspartato

NMDAR: receptor N-metil d-aspartado

NRSE: silenciador restrito aos neurônios

NRSF: fator silenciador restrito aos neurônios

PI: fosfatidilinositol

PI3K: fosfatidilinositol-3-kinase

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKA: proteína quinase A

PKC: proteína quinase C

PLC: fosfolipase C

PSD95: proteína de densidade pós-sináptica 95

RE: retículo endoplasmático

RE1: elemento repressor 1

REST: fator de transcrição que silencia o elemento repressor 1

SNAP25: proteína associada ao sinaptossoma 25 kDa

SNC: sistema nervoso central

SP1: proteína específica 1

TBP: proteína que se liga ao TATA

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 - Doença de Huntington	15
1.2 - Modelos experimentais para a Doença de Huntington	16
1.3 - A proteína huntingtina	17
1.4 - Plasticidade sináptica e Doença de Huntington	18
1.5 - Receptores Metabotrópicos de Glutamato	18
1.6 - Receptores Metabotrópicos de Glutamato 5	19
1.7 - mGluR5 e a Doença de Huntington	20
1.8 - Influência da huntingtina e do mGluR5 na expressão gênica	20
1.9 - CREB	21
1.10 - REST	22
2. OBJETIVOS	25
2.1 - Objetivo geral	25
2.2 - Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS	26
4. MÉTODOS	26
4.1 - Animais	26
4.2 - Genotipagem	27
4.2.1 - Extração do DNA	27
4.2.2 - Amplificação do DNA para identificação da huntingtina mutante	27
4.2.3 - Amplificação do DNA para identificação do mGluR5	28
4.3 - RT-PCR quantitativo (qPCR)	30
4.4 - Imunohistoquímica	31
4.5 - Análise estatística	32
5. RESULTADOS	33
5.1 - mGluR5 modula a expressão de REST	33
5.2 - O mGluR5 e a mtt modulam a expressão dos alvos de REST	37
5.3 - O mGluR5 e a mtt modulam a expressão do CREB e de seus alvos	43
6. DISCUSSÃO	57
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
9. ANEXOS	74
9.1 – Anexo 1	74

Resumo

A doença de Huntington (DH) é uma desordem neurodegenerativa autossômica dominante, causada por uma expansão de poliglutaminas (>35 repetições) na região amino-terminal da proteína huntingtina (htt). A htt possui a capacidade de se ligar a vários fatores de transcrição, como o CREB e o REST. Essas interações estão frequentemente alteradas na presença da huntingtina mutante (mhtt). Uma alteração importante nos mecanismos celulares promovida pela mhtt são as modificações da sinalização celular ativadas via receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 (mGluR5). O mGluR5 exerce um papel dinâmico no controle da expressão gênica, já que regula a atividade de vários fatores de transcrição. Logo, o objetivo desse estudo foi investigar as alterações na expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica promovidas pelo mGluR5 e pela proteína huntingtina mutante através do *knockout* do mGluR5 em um modelo murino da doença de Huntington, o BACHD. Nossos resultados demonstraram que os animais mGluR5 *knockout* apresentaram uma menor expressão de REST. Entretanto, a expressão dos alvos desse repressor gênico sofreram influência não só do mGluR5, mas também da mhtt, uma vez que os animais BACHD exibiram uma redução da expressão, enquanto que os animais mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} um aumento. Além disso, vimos que a ativação do CREB e a expressão de seus alvos estavam reduzidas nos animais mGluR5 *knockout*, expressando ou a htt selvagem ou a mhtt. Nossos resultados também sugerem um comprometimento da plasticidade sináptica e do número de terminais sinápticos nos animais BACHD/mGluR5^{-/-}, já que esses animais apresentaram uma diminuição da expressão de genes utilizados como marcadores dos terminais pré- e pós-sináptico, como a syntaxina e a PSD95, respectivamente. Como conclusão, esse trabalho demonstra a influência do mGluR5 e da mhtt na expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica. Também evidencia-se a interferência dominante do mGluR5 na expressão dos genes analisados, uma vez que o animal BACHD/mGluR5^{-/-} segue o perfil de expressão da linhagem mGluR5^{-/-}. Ademais, destaca-se o papel do mGluR5 na expressão de REST, algo que ainda não havia sido relatado. Logo, futuros experimentos serão necessários para elucidar os mecanismos subjacentes às alterações observadas nos camundongos BACHD/ mGluR5^{-/-}.

Palavras chaves: Doença de Huntington, huntingtina, mGluR5, CREB, REST, expressão gênica

Abstract

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by a polyglutamine expansion (> 35 replicates) in the amino-terminal region of the huntingtin protein (htt). Htt has the ability to bind to various transcription factors, such as CREB and REST. However, these interactions are often disrupted in the presence of mutant huntingtin (mhtt). One major change in the cellular physiology triggered by mhtt is the alteration in cell signaling activated via the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5). mGluR5 plays a dynamic role in the control of gene expression, as it regulates the activity of several transcription factors. Therefore, the aim of this study was to investigate the changes promoted by mGluR5 and mhtt in the expression of genes involved in synaptic plasticity by knocking out mGluR5 expression in a mouse model of HD, the BACHD. Our results demonstrated that mGluR5^{-/-} mice exhibited a lower expression of REST, as compared to wild-type mice. However, expression of REST target genes was influenced not only by mGluR5 but also by mhtt, since BACHD animals exhibited a reduction in expression, whereas animals mGluR5^{-/-} and BACHD/mGluR5^{-/-} showed an increase. In addition, our data indicate that CREB activation and the expression of its target genes are reduced in mGluR5 knockout animals, expressing either wild-type or mhtt. Our results also suggest that there is impairment in synaptic plasticity and in the number of synaptic terminals in BACHD/mGluR5^{-/-} animals, since these animals exhibited a decrease in the expression of genes that are used as pre- and postsynaptic markers, such as syntaxin and PSD95, respectively. In conclusion, this study demonstrates the influence of mGluR5 and mhtt on the expression of genes involved in synaptic plasticity. Moreover, our data show a dominant interference of mGluR5 in the expression of the analyzed genes, since the BACHD/mGluR5^{-/-} animal follows the same expression pattern as mGluR5^{-/-}. Interestingly, the mGluR5 role in REST expression is a very important finding, as it is a novel finding. Therefore, future experiments will be needed to elucidate the mechanisms underlying the changes observed in BACHD/mGluR5^{-/-} mice.

Keywords: Huntington's disease, huntingtin, mGluR5, CREB, REST, gene expression

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Doença de Huntington

A doença de Huntington (DH) é uma desordem neurodegenerativa autossômica dominante, causada por uma mutação no éxon 1 do gene IT15 que codifica a proteína huntingtina (htt), localizado no braço curto do cromossomo 4 (4p16.3) (Gusella, Wexler et al. 1983, Group 1993). Essa alteração gênica é caracterizada por uma expansão instável de poliglutamina na região amino-terminal da htt (Group 1993).

A huntingtina mutada (mhtt) é expressa ao longo de toda a vida. Porém, a maioria das pessoas acometidas pela DH apresentam o início da doença entre 35 e 50 anos de idade. A progressão da DH é contínua, levando o paciente ao óbito 15-20 anos após o início dos primeiros sintomas (Gil and Rego 2008). Sabe-se que o tamanho da repetição de poliglutamina é inversamente correlacionado com a idade do início da doença e diretamente correlacionado com a severidade dos sintomas. A htt selvagem apresenta entre 15 e 35 repetições de glutaminas, enquanto que a mhtt exibe um número de repetições superior a 35 (Illarioshkin, Igarashi et al. 1994). Indivíduos que apresentam entre 36 a 39 repetições apresentam penetrância incompleta dos sintomas. Por outro lado, pacientes portadores de 40 ou mais repetições de glutaminas inevitavelmente desenvolvem os sintomas da DH (Wexler, Lorimer et al. 2004). Entretanto, sexo, fatores ambientais e modificações genéticas podem alterar a variabilidade das manifestações clínicas.

Embora tanto a htt selvagem quanto a mutada sejam ubiquamente expressas nos tecidos, a DH está associada a uma perda neuronal seletiva (Zuccato, Valenza et al. 2010). A degeneração e atrofia ocorrem preferencialmente no caudado e putamen (corpo estriado em roedores) e no córtex (Waldvogel, Thu et al. 2012). Cerca de 95% dos neurônios presentes no caudado e putamen são neurônios espinhosos médios (MSN) gabaérgicos, os quais são os primeiros neurônios afetados na DH (Zuccato, Valenza et al. 2010). Nos estágios mais tardios, a neurodegeneração estende-se para uma variedade de regiões cerebrais, incluindo hipocampo e hipotálamo (Vonsattel, Myers et al. 1985).

As manifestações clínicas dessa patologia são caracterizadas por alterações cognitivas, anormalidades psiquiátricas e transtornos motores (Landles and Bates 2004). Inicialmente, o indivíduo com DH apresenta movimentos involuntários (corea), que se intensificam durante o curso da doença, causando prejuízos em suas atividades diárias. Além disso, também sofrem de

instabilidade postural e falta de coordenação motora, levando-o a quedas frequentes (Piira, van Walsem et al. 2014). Esses distúrbios são acompanhados por disfunção nos movimentos dos olhos, disartria (transtornos da articulação da fala) e disfagia (transtornos da deglutição) (Heemskerk and Roos 2011, Anderson and MacAskill 2013, Skodda, Schlegel et al. 2014). Entretanto, aproximadamente 30-50% dos pacientes exibem primeiramente sintomas cognitivos, como perda de memória, distúrbios da atenção, da compreensão, do fluxo e associação do pensamento; e psiquiátricos, como irritabilidade, ansiedade, agressividade, compulsão e depressão (Di Maio, Squitieri et al. 1993, Witjes-Ane, Zwinderman et al. 2002, Young 2003, van Dellen, Grote et al. 2005).

Apesar de ter uma causa conhecida, os mecanismos exatos que desencadeiam a progressão da DH ainda não estão claros. Além disso, não existem drogas capazes de tratar o indivíduo acometido por esta desordem. Estratégias terapêuticas existentes visam apenas amenizar os sintomas, e não atuam diretamente na causa (Puigdellivol, Saavedra et al. 2016). Portanto, é de suma importância um maior entendimento dos processos fisiopatológicos envolvidos nessa doença.

1.2 - Modelos experimentais para a Doença de Huntington

A partir da identificação da mutação ocorrida na doença de Huntington, em 1993 (Group 1993), muitos avanços foram conquistados na construção de modelos animais capazes de reproduzir o fenótipo característico da doença. Estes esforços são importantes no sentido de compreender os mecanismos patológicos da doença e, desta forma, auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Além disso, o cruzamento entre as linhagens modelo para a DH com animais geneticamente modificados para outros genes e em regiões específicas do cérebro certamente ajudarão a dissecar os mecanismos comportamentais e moleculares da doença.

Diferentes grupos desenvolveram linhagens de camundongos transgênicos obtidos através da inserção do gene codificante para a proteína htt humana inteira (BACHD e YAC128) ou apenas a sua região amino-terminal (R6/2) (Menalled and Chesselet 2002). O BACHD é um modelo transgênico para a DH, o qual expressa a htt humana contendo 97 repetições de glutamina na porção do éxon 1. Ele exibe um fenótipo comportamental e neuropatológico típico da doença. Dentre as características apresentadas, incluem-se um progressivo déficit motor, o qual se inicia precocemente aos 2 meses de idade, e um declínio cognitivo, sendo possível detectar um déficit de memória nesses camundongos aos 6 meses de idade. Além disso, os

camundongos BACHD apresentam uma redução de células neuronais e da formação de agregados de mhtt aos 12 meses de idade (Gray, Shirasaki et al. 2008, Abada, Schreiber et al. 2013, Doria, de Souza et al. 2015).

1.3 - A proteína huntingtina

A htt é uma proteína composta por cerca de 3100 aminoácidos, com uma massa molecular de aproximadamente 349 kDa, dependendo do número de resíduos de glutamina (Group 1993). Após anos de pesquisas desde a identificação do gene da htt e de seu sequenciamento, ainda não está claro quais seriam as suas funções. A sua vasta distribuição subcelular dificulta a definição de suas atribuições, além do que, a htt não apresenta estrutura homóloga a nenhuma outra proteína conhecida (Ferrante, Gutekunst et al. 1997, Gil and Rego 2008).

Para entender o papel da htt e seus efeitos patológicos, muitos estudos identificaram proteínas com as quais a htt interage. Baseado em análises obtidas por meio do sistema de duplo híbrido em levedura, ensaios de afinidade, western blot e co-imunoprecipitação, observou-se que a htt associa-se com várias proteínas. Por exemplo, a htt interage com proteínas envolvidas com a transmissão sináptica, como a proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD95) e a proteína que interage com huntingtina 1 (HIP1) (Smith, Brundin et al. 2005). A htt também interage com proteínas envolvidas no transporte vesicular do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), como a proteína associada a huntingtina 1 (HAP1) e a subunidade p150 da dinactina (Hofer, Pagliusi et al. 1990, Mizuno, Carnahan et al. 1994, Altar, Cai et al. 1997, Jovanovic, Czernik et al. 2000). Além dessas, a htt interage com proteínas importantes para a regulação transcricional, como a proteína que se liga ao CREB (CBP) (Steffan, Kazantsev et al. 2000) e o fator de transcrição que silencia o elemento repressor 1 (REST) (Zuccato, Tartari et al. 2003, Zuccato, Belyaev et al. 2007, Soldati, Bithell et al. 2011). A htt ainda é capaz de facilitar mecanismos anti-apoptóticos por inibir a ativação das caspases 3 e 9 (Rigamonti, Bauer et al. 2000, Rigamonti, Sipione et al. 2001). Como esperado, a presença da expansão de poliglutamina na mhtt pode romper e/ou modificar a natureza dessas interações. Ademais, a mhtt tem a capacidade de agregar-se, formando corpos de inclusões nucleares e citoplasmáticos, prejudicando funções celulares importantes (Martindale, Hackam et al. 1998, Persichetti, Trettel et al. 1999).

1.4 - Plasticidade sináptica e Doença de Huntington

A plasticidade sináptica é um processo biológico, pelo qual estímulos com determinados padrões específicos resultam em mudanças na força sináptica. Tanto os mecanismos do pré quanto do pós-sináptico podem contribuir para a plasticidade sináptica, favorecendo a formação da memória e da aprendizagem (Park and Goda 2016).

O fortalecimento ou o enfraquecimento da resposta sináptica ao estímulo pode ocorrer devido a uma intervenção direta de várias proteínas relacionadas à transmissão sináptica. Proteínas como a SNAP25 (proteína associada ao sinaptossoma 25 kDa), a sinapsina, a sinaptotagmina e a syntaxina atuam de forma efetiva nos mecanismos de transporte de vesículas e liberação de neurotransmissores, sendo indispensáveis para comunicação neuronal (Sollner, Whiteheart et al. 1993, Teng, Wang et al. 2001, Yoshihara, Adolfsen et al. 2003, Cesca, Baldelli et al. 2010). Além disso, proteínas como a Arc/Arg3.1 (proteína regulada por atividade e associada ao citoesqueleto), o BDNF, o GluR2 e o PSD95 são importantes para a plasticidade sináptica dependente de atividade, incluindo LTP (potencial de longa duração) e LTD (depressão de longa duração) (Luscher and Frerking 2001, Cheng, Hoogenraad et al. 2006, Plath, Ohana et al. 2006, Chen, Nelson et al. 2011). A LTP e a LTD são tipos de plasticidade correlacionados aos mecanismos de formação de memória, principalmente na região do hipocampo.

Estudos com pacientes e modelos da DH indicam que os sintomas cognitivos iniciais dessa patologia precedem a perda neuronal. Isso sugere que os primeiros déficits cognitivos, que em muitos casos se manifestam antes dos sintomas motores clássicos da DH, podem refletir anormalidades subjacentes à transmissão sináptica e à função neuronal (Usdin, Shelbourne et al. 1999, Caramins, Halliday et al. 2003, Levine, Cepeda et al. 2004, Mazarakis, Cybulska-Klosowicz et al. 2005). Logo, a investigação das alterações na expressão desses genes relacionados à plasticidade sináptica no contexto da DH torna-se crucial para uma maior compreensão da progressão dessa doença.

1.5 - Receptores Metabotrópicos de Glutamato

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do cérebro, é responsável por regular uma variedade de funções fisiológicas, tais como desenvolvimento neuronal, plasticidade sináptica, aprendizado, memória e outras funções cognitivas (DiFiglia 1990, Ribeiro, Paquet et al. 2010). Entretanto, esse receptor também é conhecido por influenciar a morte de neurônios (DiFiglia 1990).

O glutamato age por meio de receptores ionotrópicos e metabotrópicos (mGluRs). Os receptores ionotrópicos são canais iônicos regulados por ligante e incluem os receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR), alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e cainato. Existem oito subtipos de mGluRs, todos membros da superfamília dos receptores acoplados a proteína G (GPCR) (Nakanishi 1994). Baseado na homologia de sequência, bem como na especificidade de acoplar-se a determinada proteína G, os mGluRs são divididos em três subgrupos distintos: grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3) e grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) (Nakanishi 1994, Dhami and Ferguson 2006).

A desregulação da sinalização glutamatérgica está amplamente associada à patofisiologia de múltiplas doenças neurodegenerativas (Ribeiro, Paquet et al. 2010). Muitos estudos destacam que essa desregulação é atribuída à excitotoxicidade mediada por NMDA. Entretanto, o mGluR5 também foi associado à progressão de neuropatologias, incluindo a DH (Calabresi, Centonze et al. 1999, Paquet, Ribeiro et al. 2013).

1.6 - Receptores Metabotrópicos de Glutamato 5

O mGluR5 é largamente expresso no SNC, tanto em neurônios quanto em células não-neuronais (Balazs, Miller et al. 1997). Ele é encontrado nos terminais pré e pós-sinápticos, embora seja predominantemente localizado na região peri-sináptica da membrana pós-sináptica das sinapses glutamatérgicas (Shigemoto, Nomura et al. 1993). O mGluR5 é expresso em altos níveis nos MSNs e interneurônios do corpo estriado, no córtex cerebral, nas células piramidais do hipocampo, e em células granulares no bulbo olfatório (Shigemoto, Nomura et al. 1993, Testa, Standaert et al. 1994, Bordi and Ugolini 1999).

Os mGluRs do grupo I são acoplados à proteína $G_{\alpha_{11}}$, a qual ativa a fosfolipase C (PLC) (Nakanishi 1994, Calabresi, Centonze et al. 1999, Ribeiro, Paquet et al. 2010). A PLC cliva o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃). O IP₃ liga-se aos receptores do retículo endoplasmático, causando uma rápida liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares. Por sua vez, o Ca^{2+} e o DAG contribuem para a ativação da proteína quinase C (PKC). Além disso, a estimulação dos mGluRs do grupo I podem mediar a ativação de outros efetores enzimáticos, tais como PKA (proteína quinase A), CaMK (proteína quinase dependente de cálcio Ca^{2+} /calmodulina), MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) e PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase) (Mao and Wang 2003, Harris, Cho et al. 2004, Ribeiro, Ferreira et al. 2009, Nicodemo, Pampillo et al. 2010).

1.7 - mGluR5 e a Doença de Huntington

O mGluR5 é altamente expresso nas regiões cerebrais que são afetadas pela DH, incluindo o corpo estriado, o córtex e o hipocampo (Shigemoto, Nomura et al. 1993). Além disso, esse receptor pode interagir direta e fisicamente tanto com a htt selvagem quanto com a mhtt (Anborgh, Godin et al. 2005). Ademais, a interação entre o mGluR5 e a mhtt parece ter consequências funcionais, uma vez que a sinalização mediada pelo mGluR5 encontra-se alterada em um modelo murino *knock-in* da DH (Ribeiro, Paquet et al. 2010).

Não há um consenso se a ativação do mGluR5 retarda ou exacerba o desenvolvimento da HD. Essa divergência deve-se ao envolvimento desse receptor na ativação de vias neuroprotetoras e neurotóxicas, dependendo do contexto celular (Bruno, Battaglia et al. 2001). Corroborando a hipótese neurotóxica, estudos mostram que através da ativação do mGluR5, a mhtt associa-se diretamente à HAP1 e aos receptores de IP3 do retículo endoplasmático, aumentando a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, e que por sua vez, intensifica a morte neuronal (Tang, Slow et al. 2005). Por outro lado, outros estudos mostram que a ativação do mGluR5 em um modelo murino da DH estimula vias de sinalização neuroprotetoras, como a ativação de ERK (quinase regulada por sinal extracelular) e de Akt (Ribeiro, Paquet et al. 2010, Doria, de Souza et al. 2015). Além disso, a ativação crônica do mGluR5 por um modulador alostérico positivo acarreta uma melhora do processo neurodegenerativo, diminuindo a morte neuronal e a formação de agregados da mhtt e prevenindo o déficit de memória observado no camundongo modelo da DH, o BACHD (Doria, de Souza et al. 2015).

Sabe-se que tanto a htt quanto o mGluR5 são capazes de regular a transcrição gênica. Logo, uma maior compreensão sobre a sinalização mediada por este receptor é essencial para um esclarecimento da desregulação gênica típica da DH. Grande parte da disfunção transcricional que ocorre nessa patologia afeta a expressão genes que codificam proteínas envolvidas na diferenciação neuronal e plasticidade sináptica, como neurotrofinas, fatores de crescimento e proteínas de vesícula (Zuccato, Belyaev et al. 2007). Estes são os mesmos tipos de genes regulados pelo mGluR5, sustentando a hipótese de que a interação entre esse receptor e a mhtt possa ocupar um eixo central no desenvolvimento da DH.

1.8 - Influência da huntingtina e do mGluR5 na expressão gênica

O mGluR5 e a htt regulam a atividade de vários fatores de transcrição. Quando o mGluR5 é bloqueado e/ou ativado, ocorrem mudanças na expressão de numerosos genes através da regulação de um grande número de vias de sinalização (Gass and Olive 2008). Sob

o estímulo de glutamato, o mGluR5 modula a ativação de ERK1/2, CaMK IV, AC (adenilato ciclase), PKC, dentre outras. Essas proteínas medeiam a expressão de vários genes através da ativação de vários fatores de transcrição, como CREB (proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc), Elk1 (proteína com domínio ETS), AP1 (ativador de proteína 1), c-Jun, c-Rel e NF- κ B (fator nuclear κ B).

Já a htt possui a capacidade de se ligar a vários fatores de transcrição importantes para a expressão de genes neuronais, influenciando na síntese de várias proteínas (Li and Li 2004). Dentre esses fatores de transcrição, incluem-se o CBP (Steffan, Kazantsev et al. 2000), a proteína que se liga ao TATA (TBP) (Huang, Faber et al. 1998), proteína específica 1 (SP1) (Dunah, Jeong et al. 2002), p53 (Steffan, Kazantsev et al. 2000) e o REST (Zuccato, Tartari et al. 2003, Zuccato, Belyaev et al. 2007, Soldati, Bithell et al. 2011). Essas interações fisiológicas são frequentemente alteradas na presença da mhht (Rubinsztein and Carmichael 2003).

1.9 - CREB

O CREB foi originalmente identificado em 1987 como uma proteína nuclear com 43 kDa que se liga ao elemento responsivo ao cAMP (CRE) (Montminy and Bilezikjian 1987). Nos anos seguintes a estrutura tridimensional do CREB foi determinada, exibindo uma organização contendo diferentes domínios que o permite interagir com o DNA, cofatores e componentes do complexo transcricional (Johannessen, Delghandi et al. 2004). Dentre esses domínios, o KID (domínio indutível por quinase) destaca-se dos demais. Essa é uma região que regula as mudanças na expressão gênica mediadas por CREB. A porção central do KID é a serina 133, a qual é alvo de numerosas quinases que induzem sua ativação, como CaMKII e IV, PKA, PKC, PKB, dentre outras. (Gonzalez and Montminy 1989, de Groot, den Hertog et al. 1993, Ginty, Bonni et al. 1994, Deak, Clifton et al. 1998, Du and Montminy 1998). Essas proteínas cinases podem ser ativadas através de receptores acoplados à proteína G, como é o caso do mGluR5, bem como por outros receptores, como os receptores do tipo tirosina quinase (TrK) (Pizzorusso, Ratto et al. 2000, Mao and Wang 2003, Warwick, Nahorski et al. 2005).

O CREB exerce um papel central no desenvolvimento do sistema nervoso, uma vez que induz a expressão gênica de neurotransmissores, fatores de crescimento, fatores de transdução de sinal e enzimas (Yagita and Okamura 2000, St-Pierre, Drori et al. 2006). Vários trabalhos ressaltam a importância do CREB na consolidação da memória, aprendizado e plasticidade sináptica, principalmente através de mecanismos que envolvem a indução da expressão de Arc/Arg3.1 (proteína regulada por atividade e associada ao citoesqueleto) (Impey, Smith et al.

1998, Plath, Ohana et al. 2006, Wang and Zhuo 2012). Outros estudos destacam a influência do CREB no desenvolvimento e sobrevivência neuronal, sobretudo por mediar a transcrição de neurotrofinas, como o BDNF (Riccio, Ahn et al. 1999, Jeong, Cohen et al. 2012, Giampa, Montagna et al. 2013, Panja and Bramham 2014).

A desregulação de CREB tem sido associada a várias desordens do sistema nervoso central (SNC), incluindo a DH, a doença de Alzheimer (DA), a doença de Parkinson, a isquemia e a depressão (Walton and Dragunow 2000, Nucifora, Sasaki et al. 2001, Carlezon, Duman et al. 2005, Chalovich, Zhu et al. 2006). Na DH, os agregados de mhtt presentes no núcleo e citoplasma interagem com outras proteínas celulares que apresentam um curto domínio de poliglutamina, como por exemplo, o CBP (Martindale, Hackam et al. 1998, Persichetti, Trettel et al. 1999, Nucifora, Sasaki et al. 2001). O CBP é um co-ativador de transcrição, exercendo um papel majoritário como mediador e regulador dos sinais de sobrevivência estimulados por CREB (Sekeres, Mercaldo et al. 2012). Na presença da mhtt, o CBP é sequestrado nos corpos de inclusão, deixando de ativar a transcrição de genes alvos do CREB (Nucifora, Sasaki et al. 2001). Estudos mostram que em estágios mais tardios da DH, quando uma grande concentração de CBP está complexado com a mhtt, há uma aceleração na progressão da doença (Obrietan and Hoyt 2004). Logo, estratégias terapêuticas que visam aumentar a transcrição gênica dependente de CREB, podem resultar em grandes benefícios neuroprotetores para essa e outras neuropatologias.

1.10 - REST

O REST, também conhecido como fator silenciador restrito aos neurônios (NRSF), tem um papel central na regulação transcricional e epigenética (Ooi and Wood 2007). Pertencente à família dos fatores de transcrição dedos de zinco do tipo Krüppel, o REST funciona como repressor transcricional, modulando a expressão de genes ao longo de todo o corpo, mas principalmente no cérebro (Chong, Tapia-Ramirez et al. 1995, Schoenherr and Anderson 1995, Consortium 2012). Além disso, o REST controla a expressão de RNAs não-codificantes, como os microRNAs (miRNA) (Johnson, Zuccato et al. 2008, Packer, Xing et al. 2008).

Os alvos do REST são os genes que contêm uma sequência cis-regulatória de aproximadamente 21 pares de bases, conhecida como elemento repressor 1 (RE1), ou silenciador restrito aos neurônios (NRSE) (Chong, Tapia-Ramirez et al. 1995, Schoenherr and Anderson 1995). Essa sequência foi originalmente identificada na região promotora do gene que codifica os canais de sódio do tipo II (*Nav 1.2*) (Kraner, Chong et al. 1992). Entretanto,

deve-se salientar que RE1 representa os alvos canônicos de REST. Análises subsequentes do genoma por experimentos de ChIP (imunoprecipitação da cromatina) revelaram sítios de ligação não-canônicos, os quais ainda não estão muito bem estabelecidos (Johnson, Teh et al. 2008).

Após o reconhecimento da sequência RE1, a repressão gênica mediada por REST se dá através dos seus dois domínios repressores, que compreendem as regiões amino (N) e carboxi (C)-terminais. Esses domínios são biologicamente distintos em suas estruturas primárias e na maneira como se ligam ao DNA (Tapia-Ramirez, Eggen et al. 1997, Thiel, Lietz et al. 1998). A porção N-terminal do REST recruta o co-repressor Sin3A e as histonas desacetilases (HDACs) 1 e 2, permitindo a repressão da expressão gênica por meio da remoção de grupos acetil das histonas, incluindo a lisina 9 da histona H3 (H3K9Ac). Por outro lado, a porção C-terminal pode recrutar uma variedade de fatores, incluindo o co-repressor de REST (CoREST), histona demetilase LSD1 (que remove grupos metil da H3K4 mono ou di-metilada), a histona metiltransferase G9a (que metila a H3K4), e fatores que remodelam a cromatina como a BAF70, BRAF35 e BRG1 (figura 1) (Nightingale, O'Neill et al. 2006, Zheng, Zhao et al. 2009). A combinação dos co-fatores recrutados por REST é dependente do gene alvo, bem como do tipo de célula.

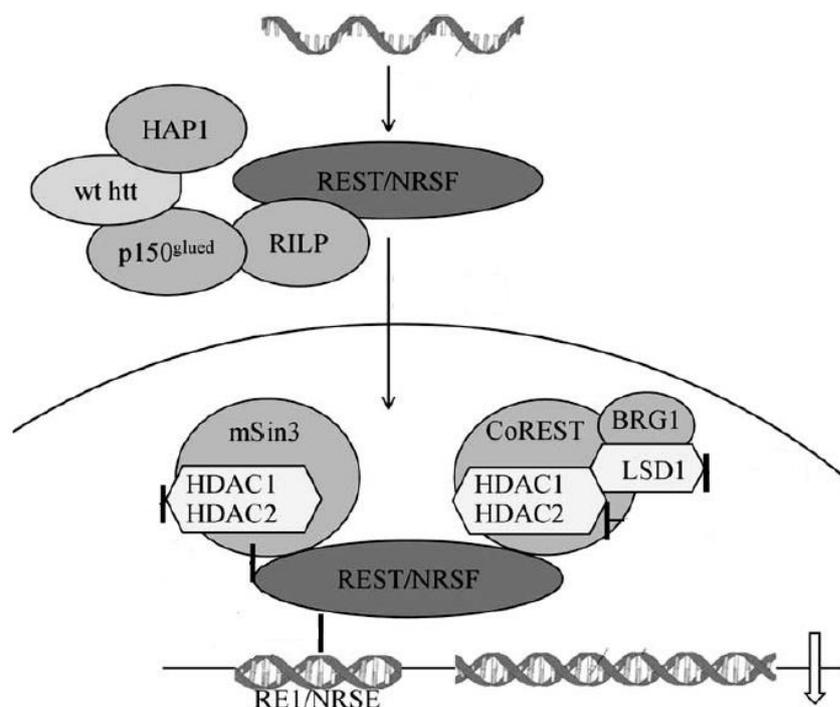


Figura 1: Representação esquemática da maquinaria do REST/NRSF para a repressão transcricional de genes. No citoplasma, a presença de um complexo citoplástico formado por

huntingtina (WT htt), subunidade p150^{glued} da dinactina, proteína associada a huntingtina 1 (HAP1) e proteína com domínio LIM que interage com REST (RILP), prende o REST/NRSF nesse compartimento subcelular. Quando o REST/NRSF não é sequestrado nesse complexo, ele transloca até o núcleo, no qual levará a repressão de genes que apresenta uma sequência regulatória chamada elemento repressor 1/ silenciador restrito aos neurônios (RE1/NRSE). Ao se ligar a essa sequência, o REST/NRSF permite a formação de dois complexos repressores, sendo um na região amino terminal formado por mSin3 e histonas desacetilases 1 e 2 (HDAC 1 e 2); e o outro na região carboxi terminal, formado pelo co-repressor de REST (CoREST), HDAC 1 e 2, LSD1 e BRG1. Adaptado de Rigamonti, Mutti et al. 2009.

Por meio de uma variedade de metodologias, como análises *in silico* e ChIP, mais de 2000 alvos do REST já foram descritos (Johnson, Gamblin et al. 2006, Mortazavi, Leeper Thompson et al. 2006, Otto, McCorkle et al. 2007). Grande parte desses genes são importantes para o desenvolvimento neuronal e transmissão sináptica, como o BDNF, a sinapsina, o SNAP25 e o receptor AMPA (Widmer and Hefti 1994, Schoch, Cibelli et al. 1996, Calderone, Jover et al. 2003, D'Alessandro, Klajn et al. 2009). Muitos desses alvos apresentam-se desregulados tanto em pacientes, quanto em modelos murinos da DH, fortalecendo o notável papel do REST na patogênese dessa desordem.

Em condições fisiológicas, a htt selvagem sequestra o REST no citoplasma através da formação de um complexo composto pela subunidade p150 da dinactina, HAP1, RILP (proteína com domínio LIM que interage com REST) e htt (Shimojo and Hersh 2003, Shimojo 2008). Dessa forma, a htt estimula a transcrição dos genes alvos do REST, bem como previne a formação do complexo repressor nuclear (figura 1). Entretanto, na DH, a mhtt não é capaz de reter o REST no citoplasma de maneira eficiente, permitindo a sua entrada excessiva no núcleo e assim, reduzindo a transcrição de seus genes alvos (Zuccato, Tartari et al. 2003).

Embora a influência da mhtt na expressão mediada por REST esteja estabelecida, o amplo número de alvos desse repressor torna bastante complexo o entendimento das consequências desta interação. Além disso, não há evidências na literatura que revelem a influência do mGluR5 na expressão de REST e/ou sob a sua sinalização. Portanto, é de suma importância uma maior compreensão dos mecanismos que permeiam a desregulação gênica orquestrada por REST na DH.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Investigar as alterações de expressão gênica promovidas pelo mGluR5 e pela proteína huntingtina mutante através do *knockout* do mGluR5 em um modelo murino da doença de Huntington, o BACHD.

2.2 - Objetivos específicos

- Avaliar a expressão gênica do repressor de transcrição REST nos camundongos WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-}, com 2, 6 e 12 meses de idade;
- Avaliar o perfil de ativação do fator de transcrição CREB nos camundongos WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-}, com 12 meses de idade;
- Determinar a influência de REST e CREB na expressão gênica do BDNF, gene alvo de ambos os fatores de transcrição, nos camundongos WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-}, com 2, 6 e 12 meses de idade;
- Avaliar a expressão de genes alvos do REST (GluR2, SNAP25, sinaptotagmina e sinapsina) e CREB (Arc/Arg1.3) nos camundongos WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-}, com 2, 6 e 12 meses de idade;
- Determinar a influência da huntingtina e do mGluR5 na expressão de genes envolvidos no tráfego de vesículas e plasticidade sináptica, como PSD95 e syntaxina, nos camundongos WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-}, com 2, 6 e 12 meses de idade.

3. MATERIAIS

2-propanol, solução de Betaína, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, NaCl, paraformaldeído, proteinase K, solução Tris (hidroximetil) aminometano–hidroclorídrico (Tris HCl) e solução tris (hidroximetil) aminometano - ácido etilenodiamino tetra-acético (Tris-EDTA) foram adquiridos da Sigma Aldrich®. Tubos tipo eppendorff e ponteiros de micropipetas foram adquiridos da Axygen Brasil. Agarose, sacarose e sulfato dodecil de sódio (SDS) foram adquiridos tanto da empresa HEXAPUR quanto da Sigma Aldrich®. (dNTPs) foram adquiridos da Thermo Scientific®. H₂O Nucleasefree foi adquirida da Ambion®. Os iniciadores utilizados para as reações de PCR e qPCR estão devidamente descritos nas tabelas 1 e 2 e foram adquiridos da Sintese Biotecnologia. O kit Power SYBR® Green PCR Master Mix, bem como o SYBR® Safe foram adquiridos pela Thermo Scientific®. Lamínulas de 12mm e lamínas foram adquiridas pela Pró cito Laboratórios. Os kits Vectastain Elite ABC (Mouse IgG) e Vector SG Peroxidase Substrate foram adquiridos da Vector Laboratories. O anticorpo anti-pCREB foi adquirido da empresa DB Biotech.

4. MÉTODOS

4.1 - Animais

Este trabalho foi realizado utilizando-se camundongos transgênicos modelos da DH, FVB/N-Tg(HTT*97Q)IXwy/J (BACHD) (Gray, Shirasaki et al. 2008) provenientes do The Jackson's Laboratory e camundongos *mGluR5 knockout*, o C57/B6;129-Grm5tm1Rod/J (*mGluR5^{-/-}*). Primeiramente, camundongos *mGluR5^{-/-}* foram cruzados com camundongos BACHD, obtendo-se a linhagem parental F1. Posteriormente, os camundongos F1 foram cruzados entre si para obtenção das linhagens de interesse (F2): WT, *mGluR5^{-/-}*, BACHD e BACHD/*mGluR5^{-/-}*. Apenas camundongos F1 foram utilizados para cruzamentos e os camundongos heterozigotos F2 foram descartados. Os animais foram criados e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG em ciclo de 12 horas claro/escuro, com temperatura constante de 23°C e recebendo água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho receberam aprovação do CETEA-UFMG (Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFMG), protocolo nº 234/2016 (Anexo 1).

4.2 - Genotipagem

4.2.1 - Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada a partir do recorte de tecidos dos camundongos mutantes para a *htt* e o *mGluR5*. Adicionou-se às amostras 500 µL de solução de extração (SDS 10%, Tris-EDTA, NaCl, Proteinase K), seguido de incubação *overnight* em banho-maria a 55 °C. Após centrifugação a 15000g por 10 minutos (min) à temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para novos tubos tipo Eppendorf contendo 500 µL de isopropanol. Em seguida foi realizada a homogeneização por inversão (10x) e uma nova etapa de centrifugação a 15000 x g por 10 min à temperatura ambiente. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados invertidos e abertos para secar por 1 hora à temperatura ambiente. Foi adicionado 200 µL de solução TE 0,5X (Tris HCl 1M, EDTA 0,5M) e colocado no banho-maria a 37°C por no mínimo 1 hora. As amostras de DNA foram armazenadas a 4°C.

4.2.2 - Amplificação do DNA para identificação da huntingtina mutante

Os iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) para identificar as linhagens mutantes (BACHD) e homozigotas selvagens (WT) foram obtidos a partir do *Jackson Laboratory*, desenvolvidos a partir da sequência depositada no GenBank sob o identificador NM_010414.2. As características dos iniciadores, tais como sequência e tamanho dos amplicons gerados são mostrados na tabela 1 e um exemplo da identificação é mostrado na figura 2.

As reações foram realizadas utilizando 0,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen); 2,0 mM de betaína (5M); 0,5 mM de DMSO; 0,2 mM de dNTPs; 1,00 µM de cada iniciador (tabela 1); 500 ng de DNA genômico, juntamente com o tampão fornecido pelo fabricante diluído para 1X, num volume final de 12 µL de reação. O programa de amplificação no termociclador apresenta uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos formados por uma etapa de desnaturação a 94°C por 20 segundos, uma etapa de anelamento a 57°C por 20 segundos e uma etapa de extensão a 70°C por 90 segundos. A ciclagem termina com uma etapa de extensão final a 72°C por 7 min.

Tabela 1: Iniciadores utilizados no PCR convencional

Nome no estoque	Sequência	Amplicon (pb)	%GC
HTT-M4F	TGAATTGTACAGCCGATGGA	157	53,4
HTT-M4R	CCGTAGTTCTGTCAGCGTCA	157	57,5

Após a amplificação, 12 μ L do produto de PCR juntamente com 3 μ L de tampão de amostra 5x foram aplicados em gel não desnaturante contendo 2% de agarose, SYBR® Safe e solução tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5X. O gel foi acondicionado em uma cuba de eletroforese horizontal preenchida com TAE 0,5X e submetido a uma corrente de 100 volts por 30 min. A captura da imagem foi realizada utilizando o equipamento *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare Life Sciences).

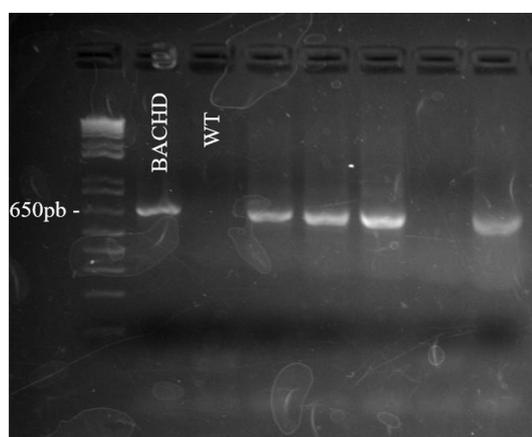


Figura 2: : Genotipagem dos camundongos BACHD. As bandas brancas na parte superior representam a amplificação do gene da *mhtt* (650pb), classificados como animais BACHD, sendo que as canaletas com ausência de bandas representam a ausência da *htt* transgênica humana, classificados como animais WT.

4.2.3 - Amplificação do DNA para identificação do *mGluR5*

Os iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) para identificar as linhagens homozigotas mutantes (*mGluR5*^{-/-}), heterozigotas (*mGluR5*^{+/-}) e homozigotas selvagens (*mGluR5*^{+/+}) foram obtidos a partir do *Jackson Laboratory*, desenvolvidos a partir da sequência depositada no GenBank sob o identificador NM_001081414.2. A reação é realizada através da técnica de Multiplex PCR, no qual vários iniciadores são utilizados, permitindo a identificação das linhagens numa mesma reação de PCR. As características dos iniciadores, tais

como sequência e tamanho dos amplicons gerados são mostrados na tabela 2, e um exemplo da identificação é mostrado na figura 4.

As reações foram realizadas utilizando 0,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2,00 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 1,00 μM de cada iniciador (tabela 1), 500 ng de DNA genômico, juntamente com o tampão fornecido pelo fabricante diluído para 1X, num volume final de 12 μL de reação. O programa de amplificação no termociclador apresenta uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 35 ciclos formados por uma etapa de desnaturação a 94°C por 45 segundos, uma etapa de anelamento a 60°C por 45 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 45 segundos. A ciclagem termina com uma etapa de extensão final a 72°C por 2 min.

Tabela 2: Iniciadores utilizados no PCR convencional

Nome no estoque	Sequência	Amplicon (pb)	%GC
Primer comum	CACATGCCAGGTGACATCAT		50
Selvagem – reverso	CCATGCTGGTTGCAGAGTAA	442	50
Mutante – reverso	CACGAGACTAGTGAGACGTG	650	55

Após a amplificação, 12 μL do produto de PCR juntamente com 3μL de tampão de amostra 5x foram aplicados em gel não desnaturante contendo 2% de agarose, SYBR® Safe (Life Technologies) e solução tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5X. O gel foi acondicionado em uma cuba de eletroforese horizontal preenchida com TAE 0,5X e submetido a uma corrente de 100 volts por 30 min. A captura da imagem foi realizada utilizando o equipamento *ImageQuant LAS 4000*. Apenas os camundongos homozigotos *mGluR5^{+/+}* e *mGluR5^{-/-}* foram utilizados neste estudo.

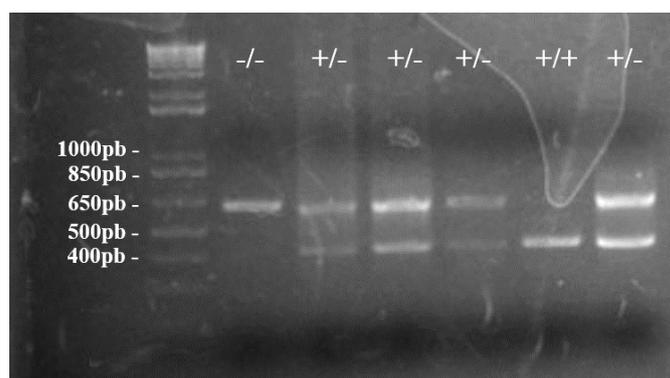


Figura 3: Genotipagem de camundongos mutantes para o gene mGluR5. O amplicon gerado pelos iniciadores da linhagem *mGluR5*^{-/-} possui 650 pb, da linhagem *mGluR5*^{+/-} possui 650 e 442 pb, e da linhagem *mGluR5*^{+/+} possui 442 pb.

4.3 - RT-PCR quantitativo (qPCR)

Amostras das regiões cerebrais do córtex, estriado, hipocampo e cerebelo das linhagens WT, *mGluR5*^{-/-}, BACHD e BACHD/*mGluR5*^{-/-} com 2, 6 e 12 meses de idade foram retiradas por microdissecção em solução salina. O RNA total das amostras foi isolado pelo método utilizando TRIzol® (Invitrogen, Burlington, EUA), segundo instruções do fabricante. O RNA foi ressuspensionado em 40 µL de água livre de nucleases, tendo sua concentração e qualidade analisadas por espectrofotômetro (NanoDrop – ThermoScientific, Wilmington, USA) e eletroforese em gel de agarose, respectivamente. Os cDNAs foram preparados a partir de 2 µg de RNA total em 20 µL de reação de transcrição reversa.

O PCR quantitativo (qPCR) foi realizado utilizando o kit Power SYBR® Green PCR Master Mix, segundo protocolo do fabricante. Para isso, foram utilizadas as plataformas de PCR em tempo real StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems e QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real-Time PCR System. A reação de qPCR foi realizada a fim de quantificar os níveis de mRNA dos seguintes genes: REST – *Rest* (NM_011263.2); GluR2 – *Glur2* (XM_006501015.3); Sinapsina – *Syn1* (NM_013680.4); SNAP25 – *Snap25* (NM_011428.3); Sinaptotagmina – *Syt1* (XM_017313868.1); BDNF – *Bdnf* (NM_007540.4); ARC – *Arc/arg3.1* (NM_018790.3); Sintaxina – *Stx1a* (NM_016801.3); PSD95 – *Dlg4* (NM_007864.3); NGF – *Ngf* (NM_013609.3). Os iniciadores, dos respectivos genes, foram desenhados com o auxílio do software Primer3plus (Untergasser, Nijveen et al. 2007) e são mostrados na tabela 3. Os iniciadores foram checados utilizando a ferramenta Primer-BLAST (Ye, Coulouris et al. 2012) para avaliação *in silico* da sua especificidade para com seus alvos.

As amostras foram preparadas em triplicatas e as variações da expressão gênica foram determinadas pelo método do Δ Ct utilizando o gene da actina (NM_007393.3) como gene constitutivo normalizador. Todas as reações de qPCR mostraram boa qualidade de amplificação e a eficiência dos iniciadores foi testada pelo método de diluição seriada.

Tabela 03: Características dos iniciadores utilizados nas reações de qPCR

Código	Sequência	Amplicon (pb)	Tm (°C)	%GC	Nº identificador
<i>Rest - R</i>	GTGCGAACTCACACAGGAGA	154	60	55	NM_011263.2
<i>Rest - F</i>	CATGCTGATTAGAGGCCACA		58	50	
<i>Glur2- R</i>	AGCAGAATCCAGCACAGCTT	123	59.96	50.00	XM_006501015.3
<i>Glur2 - F</i>	ATGCGACCTGACCTCAAAGG		60.04	55.00	
<i>Syn1- R</i>	GAGCAGATTGCCATGTCTGA	84	57.97	50.00	NM_013680.4
<i>Syn1- F</i>	CACTGCGCAGATGTCAAGTC		59.56	55.00	
<i>Snap25 -R</i>	CTTCATCCGCAGGGTAACAA	159	57,89	50	NM_011428.3
<i>Snap25 -F</i>	GCCTTCTCCATGATCCTGTC		57,75	55	
<i>Syt1 -R</i>	TACTCGGAATTAGGTGGCAAGA	201	58.90	45.45	XM_017313868.1
<i>Syt1 - F</i>	GTAGCGGAGGGAGAAGCAGAT		61.37	57.14	
<i>Bdnf -R</i>	GAGAAGAGTGATGACCATCCT	215	56.53	47.62	NM_007540.4
<i>Bdnf - F</i>	TCACGTGCTCAAAAGTGTCAG		59.07	47.62	
<i>Arc -R</i>	GCTGAAGCAGCAGACCTGA	64	60.00	57.89	NM_018790.3
<i>Arc - F</i>	TTCCTGGTATGAATCACTGCTG		58.74	43.48	
<i>Stx1a - R</i>	GAACAAAAGTTCGCTCCAAGC	153	57,96	50	NM_016801.3
<i>Stx1a -F</i>	GTGGCGTTGTACTCGGACAT		60,39	55	
<i>Dlg4 - R</i>	TCTGTGCGAGAGGTAGCAGA	221	60.32	55.00	NM_007864.3
<i>Dlg4 - F</i>	AAGCACTCCGTGAACTCCTG		59.97	55.00	
<i>Ngf - R</i>	AGCATTCCCTTGACACAG	99	54.46	50.00	NM_013609.3
<i>Ngf - F</i>	GGTCTACAGTGATGTTGC		52.73	50.00	
<i>Actina - R</i>	AATGCCTGGGTACATGGTGGTA	122	58,4	50	NM_007393.3
<i>Actina - F</i>	TGGAATCCTGTGGCATCCATGA		58,6	50	

4.4 - Imunohistoquímica

Os cérebros dos animais WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2, 6 e 12 meses de idade foram removidos e armazenados em paraformaldeído 4% em PBS por 72 horas

e, em seguida, colocados em sacarose 30% em PBS overnight, a 4°C. Os cérebros foram fatiados a 30 µm utilizando um criostato, e as fatias foram armazenadas no freezer em solução crioprotetora. Por meio de fatias “free-floating”, foi utilizado o protocolo de detecção através da enzima peroxidase. Em resumo, a atividade endógena da peroxidase foi extinguida utilizando 0,3% de peróxido de hidrogênio. Em seguida as fatias foram lavadas 2 x de 5 min com PBS 1X, seguido de permeabilização com Triton (X-100) 1% for 10 min. As ligações não específicas foram bloqueadas utilizando 1,5% de soro de cavalo (Vector Elite Kit) por 30 min, seguido de incubação com o anticorpo mouse anti-pCREB (1:100) (DB Biotech) em PBS contendo 2% de soro de cavalo e 3% de BSA por 90 minutos a 4°C. Em seguida, as fatias foram incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse (1:100) conjugado com a biotina (Vector Elite Kit) por 90 minutos a 4°C. Finalmente, as fatias foram incubadas com uma solução contendo a enzima peroxidase complexada a avidina (Vector Elite Kit) por 90 minutos a 4°C. A imunomarcação foi visualizada utilizando cromógeno contendo o substrato da enzima peroxidase (Vector Elite Kit). As fatias foram montadas em lâminas e visualizadas utilizando o Axio Imager A2-Carl Zeiss Microscope com lente Zeiss de 20x. Uma área representativa de 710x532 µm das imagens das regiões do córtex, estriado e hipocampo foram analisadas. O número de pCREB positivos por imagens foram contatos utilizando a ferramenta cell counter do software ImageJ (NIH, USA).

4.5 - Análise estatística

Para os resultados do qPCR e imunohistoquímica, a média e o erro padrão foram calculados a partir de triplicatas técnicas realizadas para cada experimento. Os resultados foram examinados através do teste ANOVA, que consiste em uma análise de variância. Para tal, foi utilizado o teste de Dunnett que compara simultaneamente os valores obtidos com o controle pré-determinado, como indicado nas legendas das figuras. Em ambos os métodos, as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPadPrism® versão 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA), sendo considerados significativos os testes que obtiveram valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 - mGluR5 modula a expressão de REST

Estudos mostram que a proteína htt modula a localização subcelular de REST, mas não a expressão do seu gene (Zuccato, Tartari et al. 2003). E até o momento, não há dados na literatura que relacionem o mGluR5 à expressão ou à localização do REST. Por isso, foi avaliado se a ausência do mGluR5 e/ou a presença da mhtt interferem na transcrição do REST. Para essa análise, foi realizado o PCR quantitativo (qPCR) a fim de mensurar a expressão de REST nas diferentes linhagens de animais: os animais WT, que são os animais controle; os mGluR5^{-/-}, que não expressam o mGluR5; o BACHD, que expressa a mhtt; e o BACHD/mGluR5^{-/-}, que expressa a mhtt e não apresenta o mGluR5. As análises foram realizadas nas regiões cerebrais do córtex, estriado e hipocampo, as quais são primordialmente afetadas pela DH e expressam altos níveis do mGluR5 (Vonsattel, Myers et al. 1985, Shigemoto, Nomura et al. 1993, Waldvogel, Thu et al. 2012). Além disso, também foi avaliada a expressão do REST no cerebelo como região controle, uma vez que esse substrato neural não é afetado na DH e não expressa o mGluR5 (Vonsattel, Myers et al. 1985, Shigemoto, Nomura et al. 1993, Waldvogel, Thu et al. 2012). Todas as análises foram realizadas em animais com 2, 6 e 12 meses de idade, visando acompanhar a progressão da DH.

Primeiramente, foi analisada a região do córtex cerebral. Nenhuma das linhagens com 2 e 6 meses de idade apresentaram diferença na expressão de REST (figuras 4A e B). Entretanto, os animais mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade apresentaram uma redução na expressão de REST, quando comparado aos camundongos WT (figuras 4C). Esse resultado evidencia a influência do mGluR5, mas não da mhtt, na expressão desse repressor gênico.

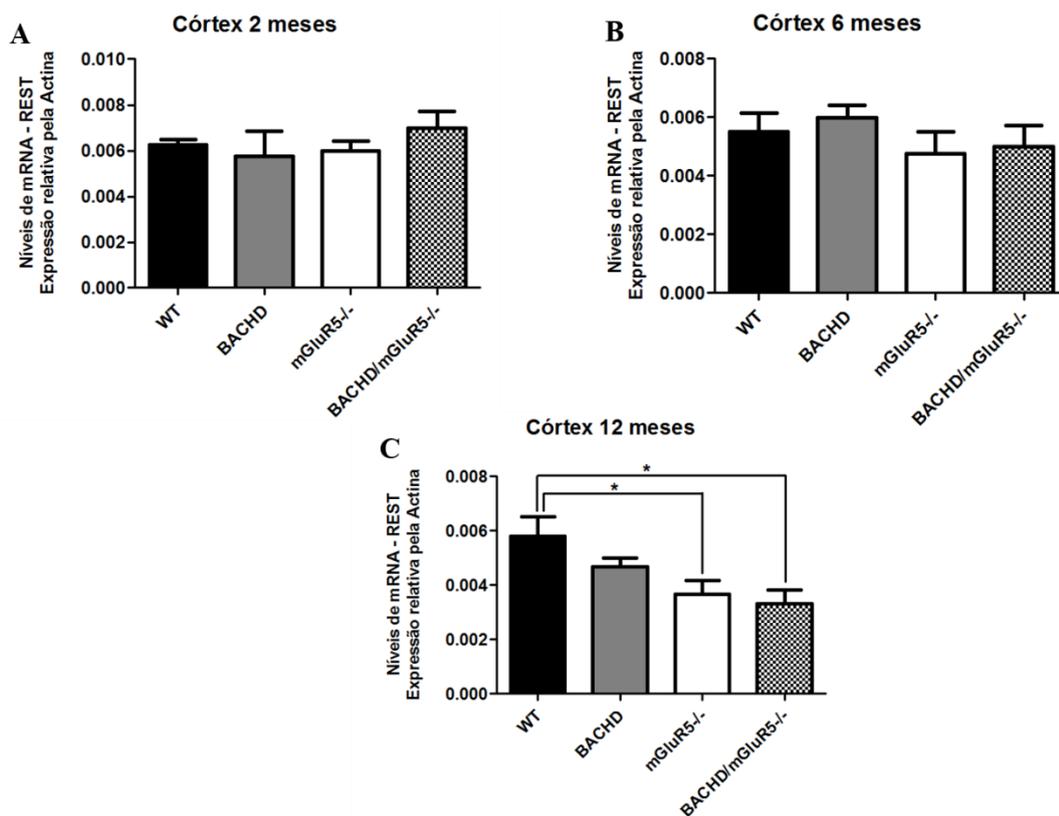


Figura 4: A expressão de REST encontra-se reduzida na região do córtex nos camundongos *mGluR5^{-/-}* e *BACHD/mGluR5^{-/-}* com 12 meses de idade. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *REST* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do córtex de camundongos das linhagens WT, *mGluR5^{-/-}*, BACHD e *BACHD/mGluR5^{-/-}* com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média \pm SEM. * representa $p < 0,05$ no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

Ao avaliar a expressão de REST no corpo estriado, foi obtido o mesmo perfil de expressão observado no córtex. Os animais com 2 e 6 meses de idade não apresentaram diferença na expressão de REST (figura 5A e B), enquanto que as linhagens *mGluR5^{-/-}* e *BACHD/mGluR5^{-/-}* com 12 meses de idade exibiram uma redução na sua expressão (figura 5C).

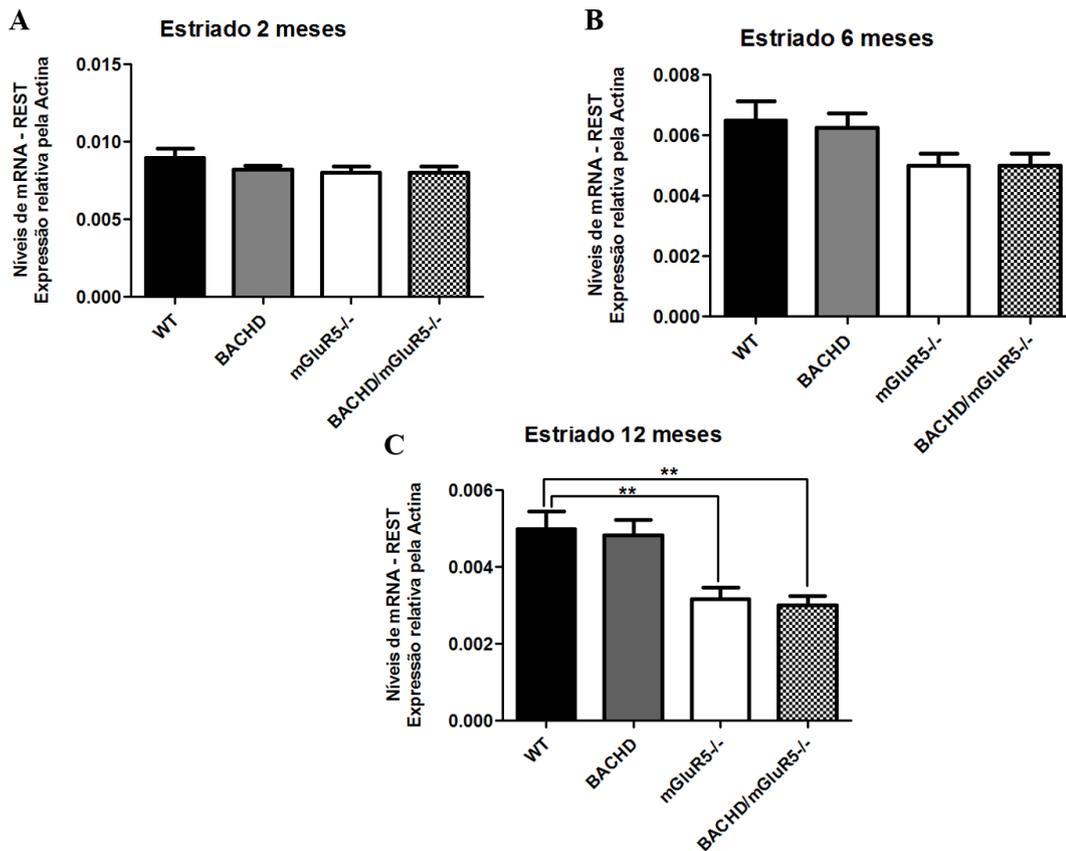


Figura 5: A expressão de REST encontra-se reduzida na região do corpo estriado nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *REST* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do corpo estriado de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM. ** representam p<0,01 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

Em seguida, foi analisada a expressão de REST na região do hipocampo. Os animais com 2 meses de idade não apresentaram diferença na expressão de REST (figura 6A). Entretanto, diferente das outras regiões, os animais mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 6 meses de idade exibiram uma diminuição da sua expressão, quando comparado aos camundongos selvagens (figura 6B). Esta redução da expressão de REST também foi observada nas mesmas linhagens com 12 meses de idade (figura 6C). Logo, esses dados indicam que a ausência do mGluR5 tem uma influência sobre a expressão de REST mais precoce no hipocampo do que nas demais regiões analisadas.

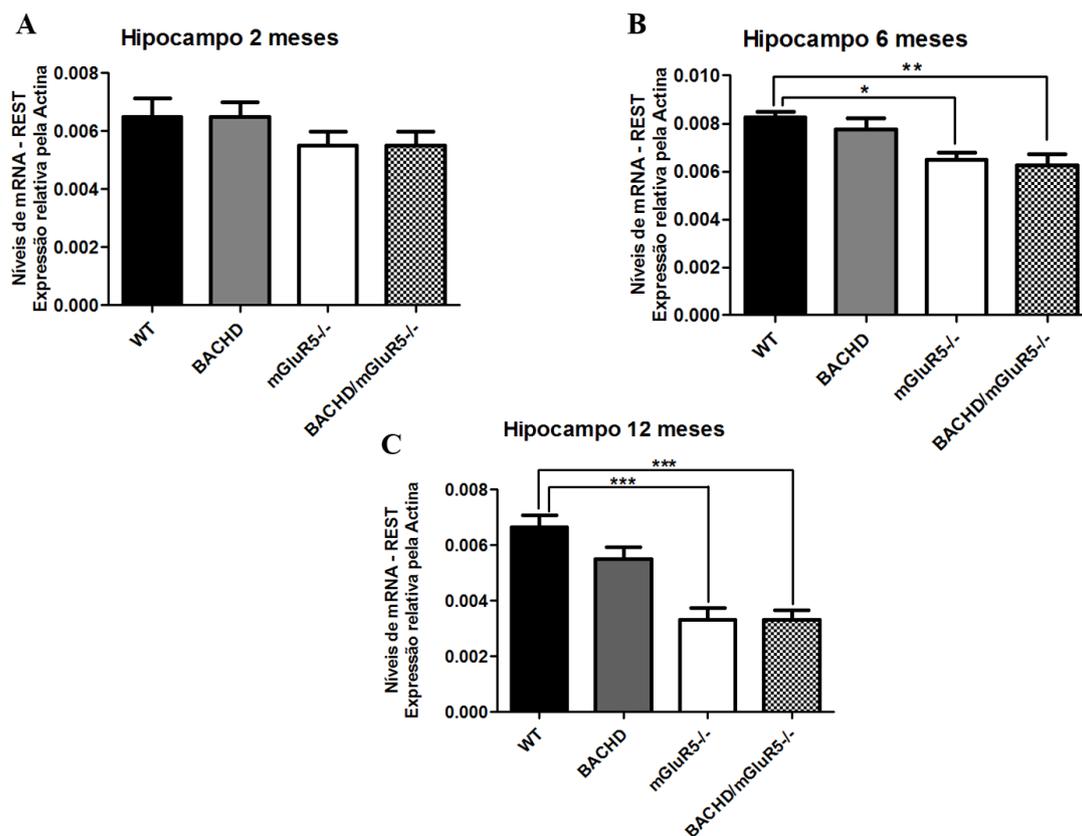


Figura 6: A expressão de REST encontra-se reduzida na região do hipocampo nos camundongos *mGluR5^{-/-}* e *BACHD/mGluR5^{-/-}* com 6 e 12 meses de idade. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *REST* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do hipocampo de camundongos das linhagens WT, *mGluR5^{-/-}*, BACHD e *BACHD/mGluR5^{-/-}* com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média \pm SEM. * representa $p < 0,05$, os ** representam $p < 0,01$ e os *** representa $p < 0,001$ no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

A fim de confirmar que a modulação da expressão de REST pelo mGluR5 era específica, analisou-se a expressão de REST no cerebelo, o qual não expressa mGluR5. Não houve diferença na expressão do repressor entre os animais com 12 meses de idade (figura 7). Dessa forma, esses dados são fortes evidências da importância do mGluR5, e não da *mhtt*, na regulação da transcrição de REST.

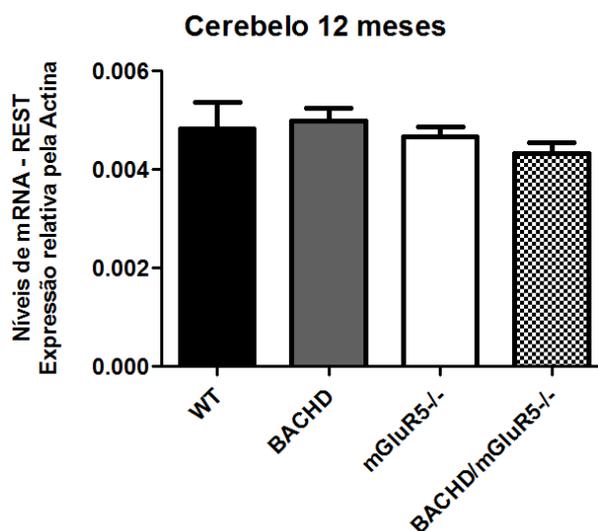


Figura 7: Não há diferença na expressão de REST na região do cerebelo nos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. O gráfico mostra os níveis de mRNA de *REST* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do cerebelo de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade (n=6). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM.

5.2 - O mGluR5 e a mtt modulam a expressão dos alvos de REST

O REST possui mais de 2000 alvos já descritos, e muitos deles estão desregulados tanto em pacientes quanto em modelos da DH (Johnson, Gamblin et al. 2006, Otto, McCorkle et al. 2007). Como houve uma redução da expressão de REST nos animais que apresentam o *knockout* do mGluR5, foi verificado se os genes alvos da sua sinalização também estariam alterados. Para tal verificação, foram escolhidos genes envolvidos nos mecanismos de plasticidade sináptica e memória. A região cerebral de escolha para as análises foi o hipocampo, uma vez que esses substrato neural tem uma função importantíssima no processo mnemônico e apresentou uma redução precoce da expressão do REST (figura 6B).

O primeiro alvo de REST analisado foi o GluR2, que é uma subunidade do receptor AMPA. O receptor ionotrópico glutamatérgico do tipo AMPA medeia a neurotransmissão excitatória no SNC, sendo crucial para o desenvolvimento neuronal, remodelamento estrutural e para a formação de memória, aprendizado e cognição (Liu and Zukin 2007). Sua expressão é induzida no terminal pós-sináptico durante o potencial de longa duração (LTP), participando de forma ativa dos mecanismos de plasticidade sináptica (Luscher and Frerking 2001, Henley and Wilkinson 2013). Analisando sua expressão nas diferentes linhagens, não foi observado

diferença significativa entre os animais com 2 e 6 meses de idade (figura 8A e B). Entretanto, com 12 meses de idade, os animais BACHD exibiram uma redução da sua expressão (figura 8C). Isso condiz com o fato de que, na presença da mhrt, o complexo que retém o REST no citoplasma não é formado, permitindo-o migrar para o núcleo e reprimir a expressão dos seus genes alvos (Zuccato, Tartari et al. 2003). Além disso, os animais *mGluR5*^{-/-} e BACHD/*mGluR5*^{-/-} apresentaram uma maior expressão de *GluR2* (figura 8C), corroborando os nossos resultados que mostram uma menor expressão de REST nessas linhagens (figura 6C).

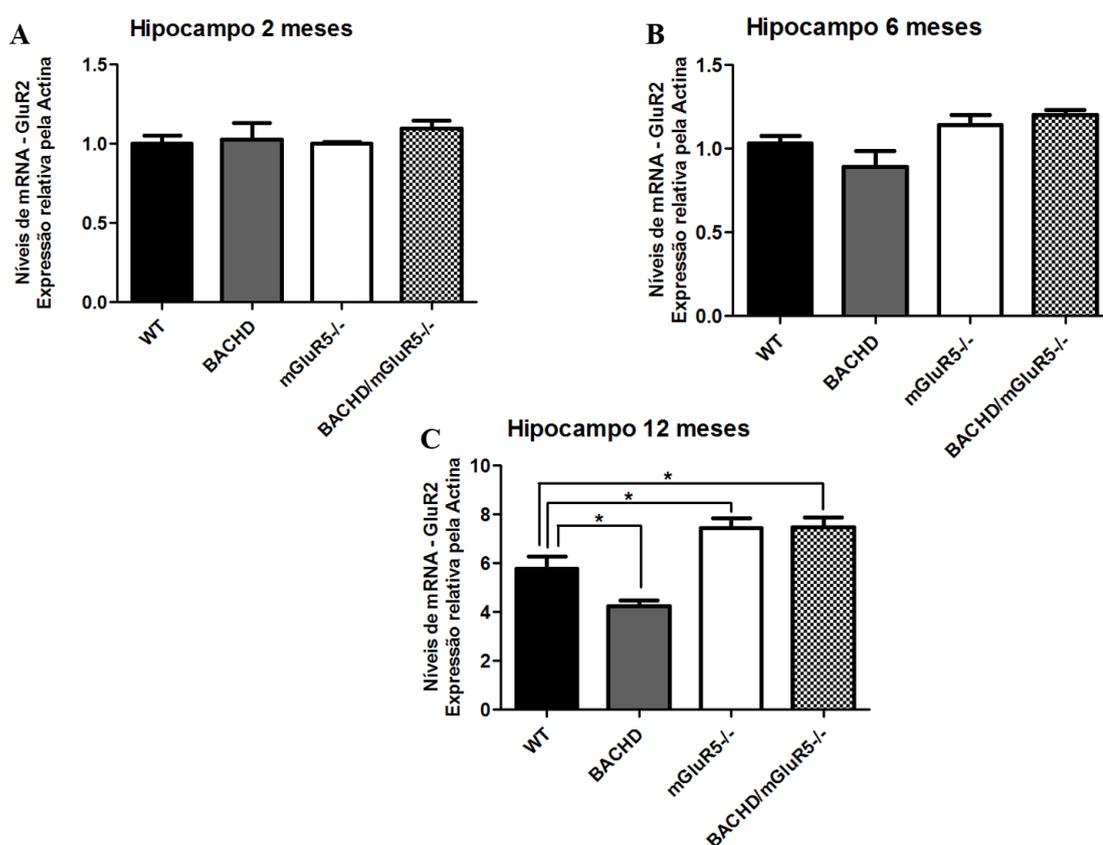


Figura 8: A expressão de *GluR2* encontra-se reduzida nos camundongos BACHD e aumentada nos *mGluR5*^{-/-} e BACHD/*mGluR5*^{-/-} com 12 meses de idade na região do hipocampo. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *GluR2* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do hipocampo de camundongos das linhagens WT, *mGluR5*^{-/-}, BACHD e BACHD/*mGluR5*^{-/-} com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM. * representa p<0,05 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

Um outro alvo analisado foi a proteína sinapsina, a qual está envolvida na regulação da liberação de neurotransmissores por se ligar a componentes de vesículas sinápticas, prevenindo

a liberação do seu conteúdo (Huttner, Schiebler et al. 1983). Entretanto, na presença de um potencial de ação, a sinapsina é fosforilada, desligando-se desses componentes e permitindo a liberação de neurotransmissores (Huttner, Schiebler et al. 1983, Cesca, Baldelli et al. 2010). O perfil de sua expressão foi bem semelhante ao do gene de GluR2, não exibindo diferença entre as linhagens com 2 e 6 meses de idade (figura 9A e B). Entretanto, animais BACHD de 12 meses de idade apresentaram uma redução da expressão de sinapsina, enquanto que os mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresentaram uma maior expressão, ressaltando a influência do mGluR5 e da mhtt na expressão dos alvos de REST (figura 9C).

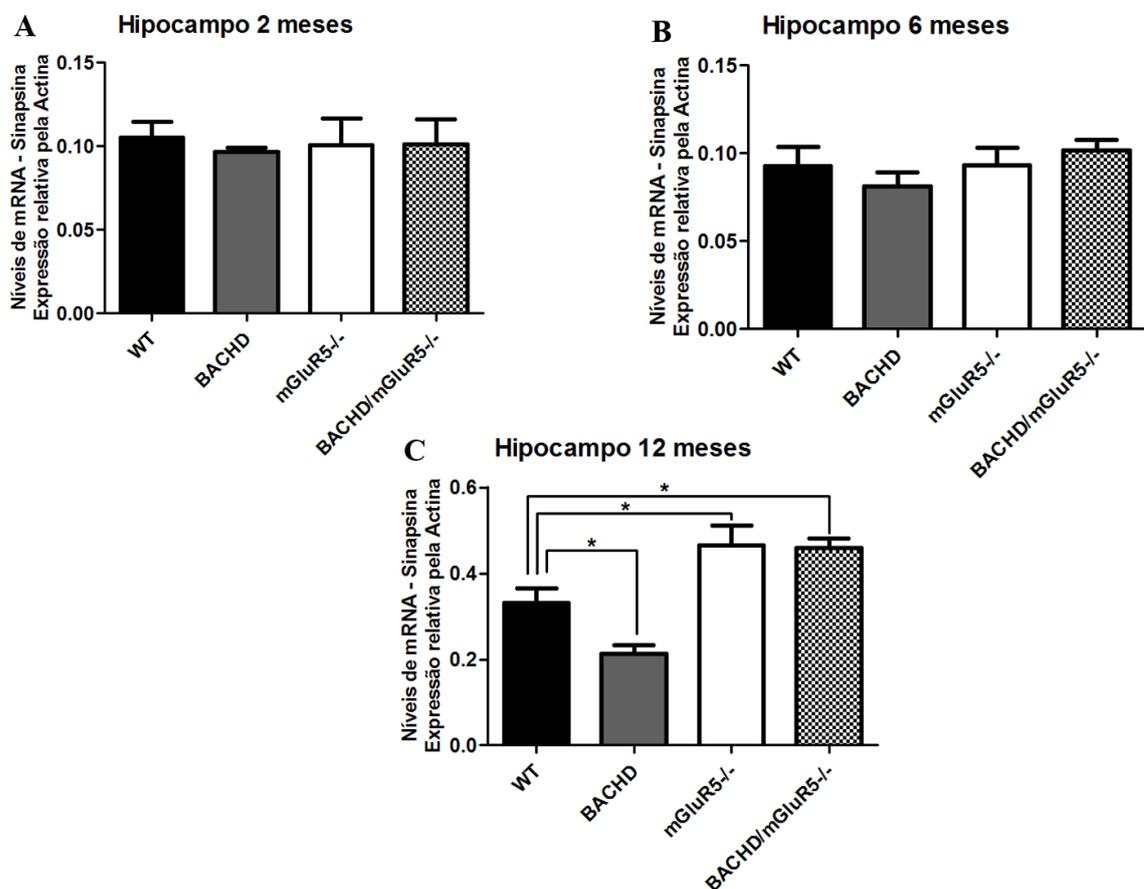


Figura 9: A expressão de sinapsina encontra-se reduzida nos camundongos BACHD e aumentada nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do hipocampo. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Syn1* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do hipocampo de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM. * representa p<0,05 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

Também foi investigada a expressão da SNAP25, uma proteína especificamente presente na membrana plasmática do terminal pré-sináptico de células nervosas (Sollner, Whiteheart et al. 1993). A SNAP25 faz parte do complexo SNARE, o qual medeia o ancoramento e fusão de vesículas sinápticas com a membrana do terminal pré-sináptico, permitindo a liberação de neurotransmissores (Sollner, Whiteheart et al. 1993). O perfil de sua expressão foi bem semelhante ao do gene de GluR2 e sinapsina, também não exibindo diferença entre as linhagens com 2 e 6 meses de idade (figura 10A e B). Entretanto, com 12 meses, os animais BACHD apresentaram uma redução da expressão de SNAP25, enquanto que os camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresentaram uma maior expressão, mais uma vez evidenciando a importância do mGluR5 e da mhtt na regulação da transcrição mediada por REST (figura 10C).

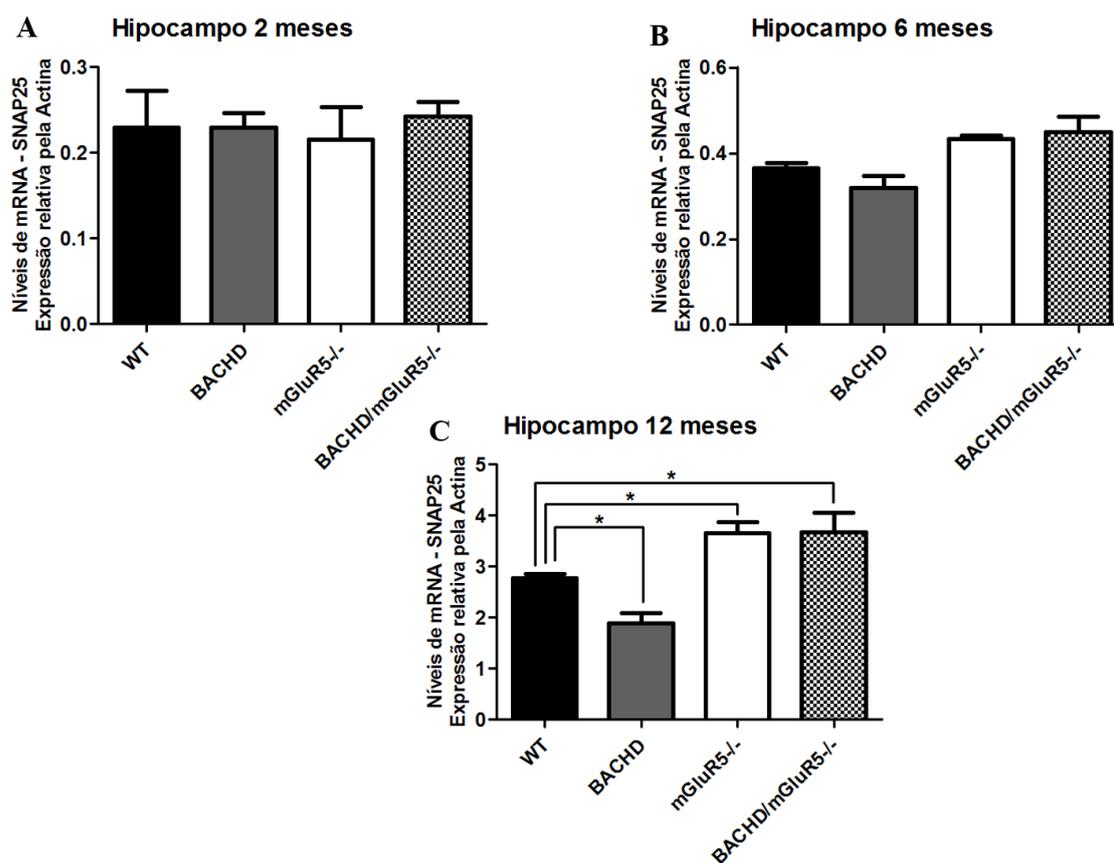


Figura 10: A expressão de SNAP25 encontra-se reduzida nos camundongos BACHD e aumentada nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do hipocampo. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Snap25* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do hipocampo de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR

foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média \pm SEM. * representa $p < 0,05$ no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

O próximo alvo investigado foi a sinaptotagmina, uma proteína de vesícula sináptica que atua como sensor de Ca^{2+} . Após o influxo desse cátion no terminal pré-sináptico, a sinaptotagmina desencadeia a fusão da vesícula com a membrana do terminal, agindo sobre o complexo SNARE e induzindo a exocitose (Yoshihara, Adolfsen et al. 2003). Observando a sua expressão nos animais estudados, pode-se notar que não houve diferença entre as linhagens em nenhuma das idades estudadas na região do hipocampo (figura 11 A-C). Logo, esses dados evidenciam a pouca influência da *mhtt* e do *mGluR5* na expressão da sinaptotagmina, e que possivelmente outro receptor e/ou via de sinalização esteja atuando de forma mais robusta na regulação da sua expressão.

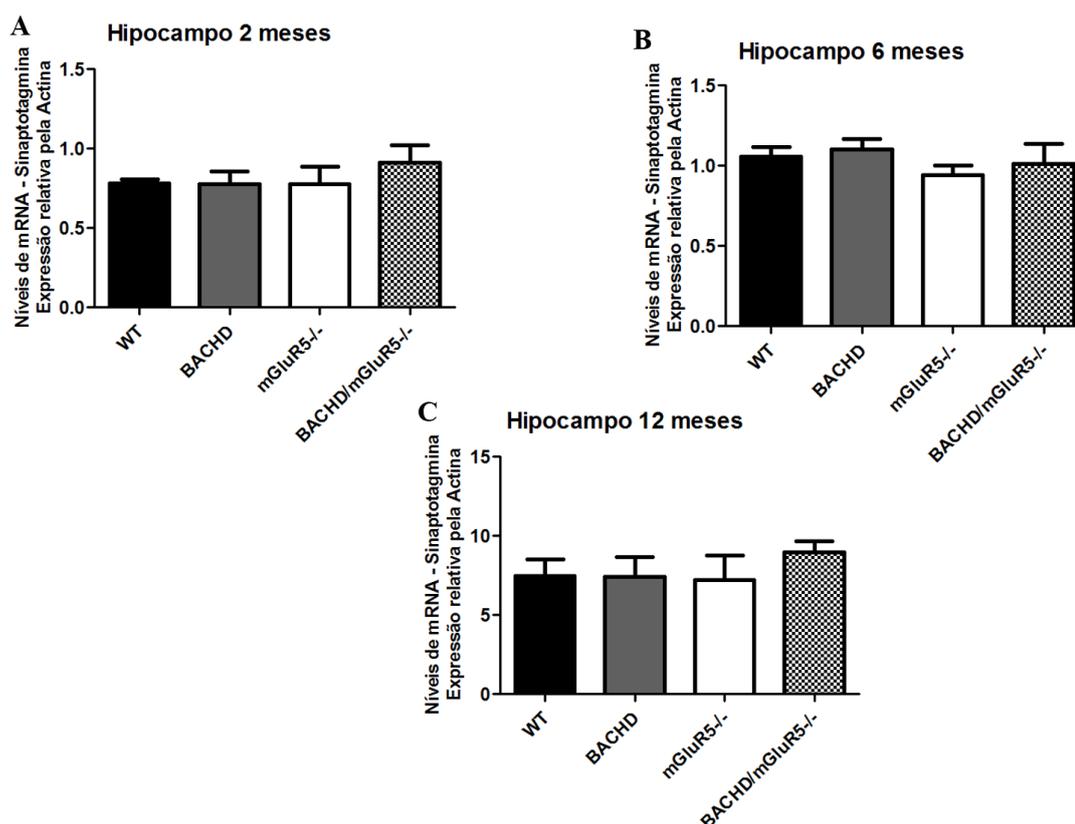


Figura 11: Não há diferença na expressão de sinaptotagmina na região do hipocampo nos camundongos WT, BACHD, *mGluR5*^{-/-} e BACHD/*mGluR5*^{-/-}. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Syt1* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do hipocampo de camundongos das linhagens WT, *mGluR5*^{-/-}, BACHD e BACHD/*mGluR5*^{-/-} com 2 (n=4) (A), 6 (n=4)

(B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média \pm SEM.

Por último, foi investigada a expressão do BDNF, uma neurotrofina de fundamental importância no SNC. O BDNF promove o crescimento e sobrevivência de vários neurônios, incluindo os da região do estriado e do hipocampo (Huang and Reichardt 2001). Além disso, atua na plasticidade sináptica, induzindo a LTP, e potencializa a neurogênese (Korte, Staiger et al. 1996, Pencea, Bingaman et al. 2001). Avaliando o seu perfil de expressão no hipocampo, pode-se perceber que com 2 meses de idade as linhagens mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresentaram uma redução da sua expressão (figura 12A). Já os animais com 6 meses de idades exibiram uma redução da expressão da neurotrofina nas linhagens BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} (figura 12B). Com 12 meses, os animais retomaram o perfil apresentado com 2 meses, exibindo uma redução da expressão de BDNF apenas nas linhagens mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} (figura 12C). Logo, foi perceptível que tanto o mGluR5 quanto a mhtt interferem na expressão de BDNF, entretanto, o mGluR5 parece ter uma influência mais robusta. Apesar disso, a influência do mGluR5 foi oposta a observada sobre os outros alvos de REST (GluR2, sinapsina e SNAP25). O esperado era que, como os animais mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresentaram uma redução na expressão de REST, houvesse um aumento da expressão de BDNF. Entretanto, observou-se o oposto. Como o BDNF é alvo de várias sinalizações ativadas via mGluR5, levantou-se a hipótese de que uma outra sinalização, mediada por um fator de transcrição distinto de REST, estivesse interferindo na transcrição de BDNF de forma mais proeminente. Por isso, analisou-se os níveis de ativação de CREB nesses animais.

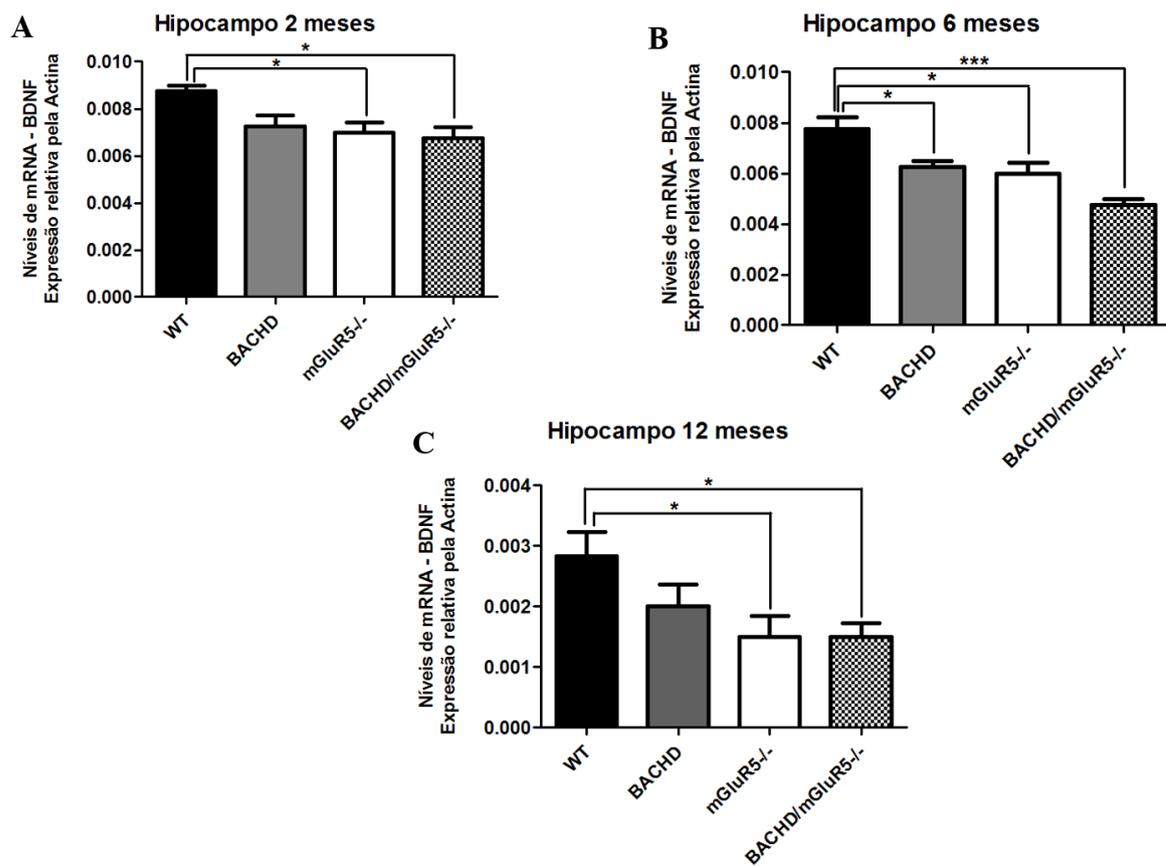


Figura 12: A expressão de BDNF encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} na região do hipocampo. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Bdnf* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do hipocampo de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM. * representa p<0,05 e os *** representam p<0,001 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

5.3 - O mGluR5 e a mhtt modulam a expressão do CREB e de seus alvos

O CREB é um fator de transcrição, cuja ativação é dependente de mGluR5, bem como de outros receptores (Mao and Wang 2003). Além disso, a mhtt também altera sua sinalização, uma vez que diminui os níveis de CBP livre, o qual é um co-ativador de transcrição necessário para a expressão dos genes alvos de CREB (Nucifora, Sasaki et al. 2001). Logo, por sofrer a influência do mGluR5 e da mhtt, o CREB foi escolhido como um possível responsável pelo perfil de expressão do BDNF. Por meio de experimentos de imunohistoquímica, fatias cerebrais das regiões do córtex, estriado e hipocampo foram marcadas com o anticorpo anti-pCREB a

fim de avaliar o seu nível de ativação nas diferentes linhagens. Primeiramente, avaliando a região do córtex, foi observado que com 12 meses de idade, os animais BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} exibiram uma redução no número de células marcadas, o que representa uma menor ativação desse fator de transcrição (figura 13A e B). Logo, esse resultado evidencia a influência do mGluR5 e da mhtt nos mecanismos que medeiam a sua ativação.

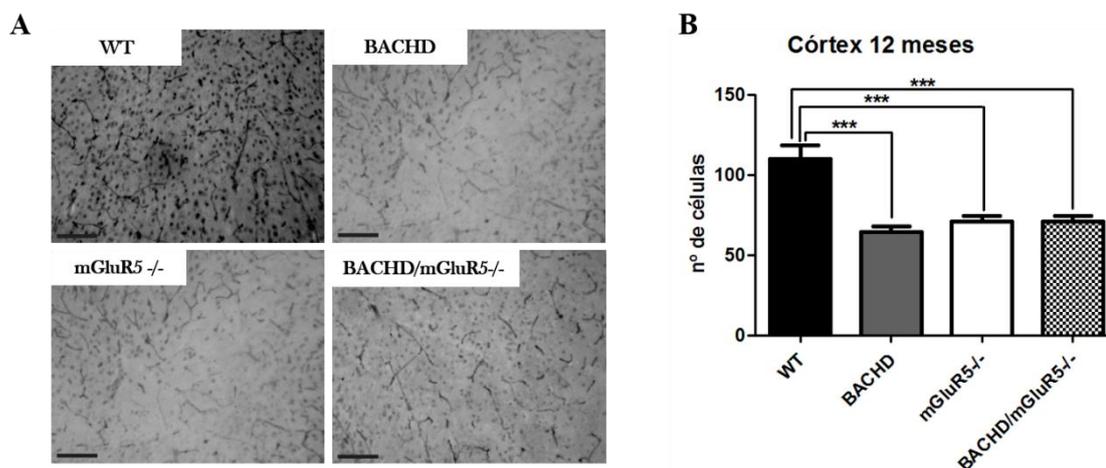


Figura 13: A ativação de CREB encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do córtex. (A) As imagens mostram cortes histológicos representativos da região do hipocampo de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. Escala=100µm (B) O gráfico mostra a quantificação do número de células marcadas com o anticorpo anti-pCREB (n=6). Dados representam a média ± SEM obtida a partir de 6 fotos tiradas para cada animal. *** representam p<0,001 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

Ao avaliar a ativação de CREB no corpo estriado, foi obtido o mesmo perfil observado no córtex. Os animais BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade exibiram uma redução no número de células marcadas com o anticorpo anti-pCREB (figura 14A e B).

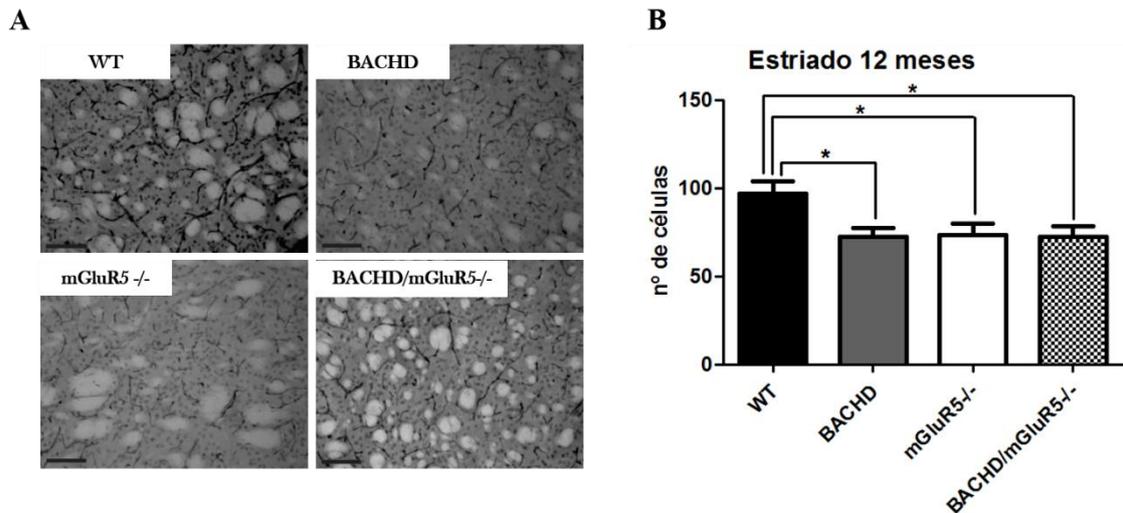


Figura 14: A ativação de CREB encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do corpo estriado. (A) As imagens mostram cortes histológicos representativos da região do hipocampo de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. Escala=100µm (B) O gráfico mostra a quantificação do número de células marcadas com o anticorpo anti-pCREB (n=6). Dados representam a média ± SEM obtida a partir de 6 fotos tiradas para cada animal. * representam p<0,05 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

Em seguida, foi analisada a ativação de CREB na região do hipocampo. Os animais BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade apresentaram uma diminuição no número de células marcadas com o anticorpo anti-pCREB, indicando uma menor ativação deste (figura 15A e B). Logo, esses resultados confirmam a influência do mGluR5 e da mhrt nos mecanismos que medeiam a sua ativação. Além disso, o resultado da região do hipocampo foi condizente com a expressão de BDNF, evidenciando um papel mais robusto de CREB na sua expressão.

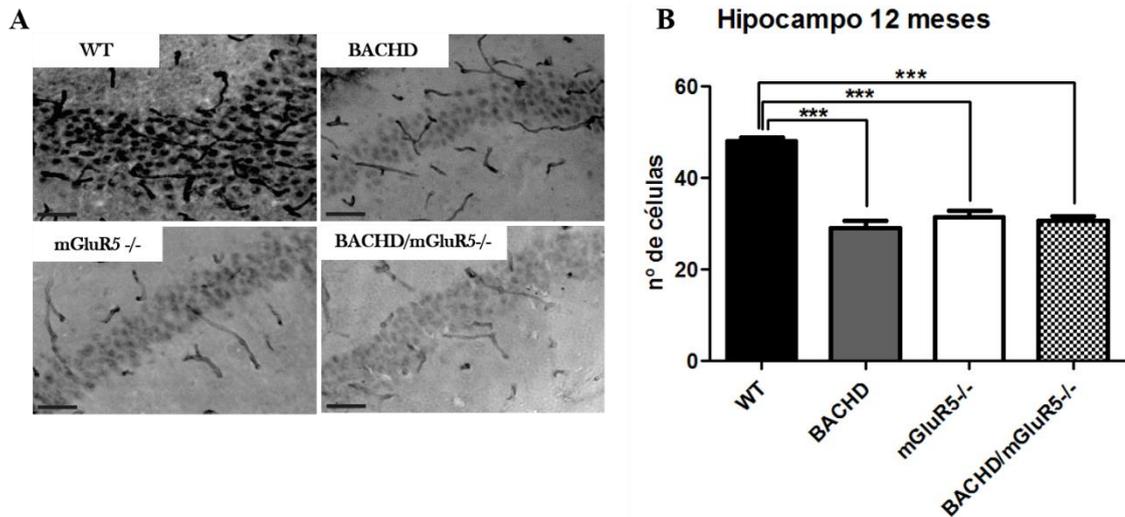


Figura 15: A ativação de CREB encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do hipocampo. (A) As imagens mostram cortes histológicos representativos da região do hipocampo de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. Escala=50µm (B) O gráfico mostra a quantificação do número de células marcadas com o anticorpo anti-pCREB (n=6). Dados representam a média ± SEM obtida a partir de 6 fotos tiradas para cada animal. *** representam p<0,001 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

A fim de confirmar a influência do perfil de ativação de CREB sobre a expressão de seus alvos, foi avaliada uma outra proteína chamada Arc/Arg3.1. Esta proteína pertence ao grupo de genes de resposta imediata (IEG), que são dinamicamente regulados por atividade neuronal (Guzowski, Timlin et al. 2005). *In vivo*, a expressão de Arc/Arg3.1 é induzida em populações neuronais importantes para o aprendizado, como por exemplo células hipocampais (Ramirez-Amaya, Vazdarjanova et al. 2005). Além disso, essa proteína é requerida para a consolidação da plasticidade sináptica e memória, induzindo a LTP (Plath, Ohana et al. 2006, Rial Verde, Lee-Osbourne et al. 2006). Avaliando essa proteína na região do hipocampo, observou-se que os animais com 2 meses de idade não apresentaram diferença quanto a sua expressão, apesar de uma forte tendência ser observada nas linhagens mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} (figura 16A). Esta tendência foi confirmada nos animais mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 6 e 12 meses de idade, os quais exibiram uma redução na expressão de Arc, quando comparado aos camundongos selvagens (figura 16B e C). Apesar do animal BACHD não ter apresentado diferença na expressão de Arc quando comparado ao camundongo WT, a linhagem BACHD/mGluR5^{-/-} exibiu uma redução mais robusta quando comparado ao animal mGluR5^{-/-}, evidenciando a interferência da mhtt na expressão de Arc (figura 16C).

Portanto, o perfil de expressão dessa proteína se assemelha ao perfil de ativação de CREB.

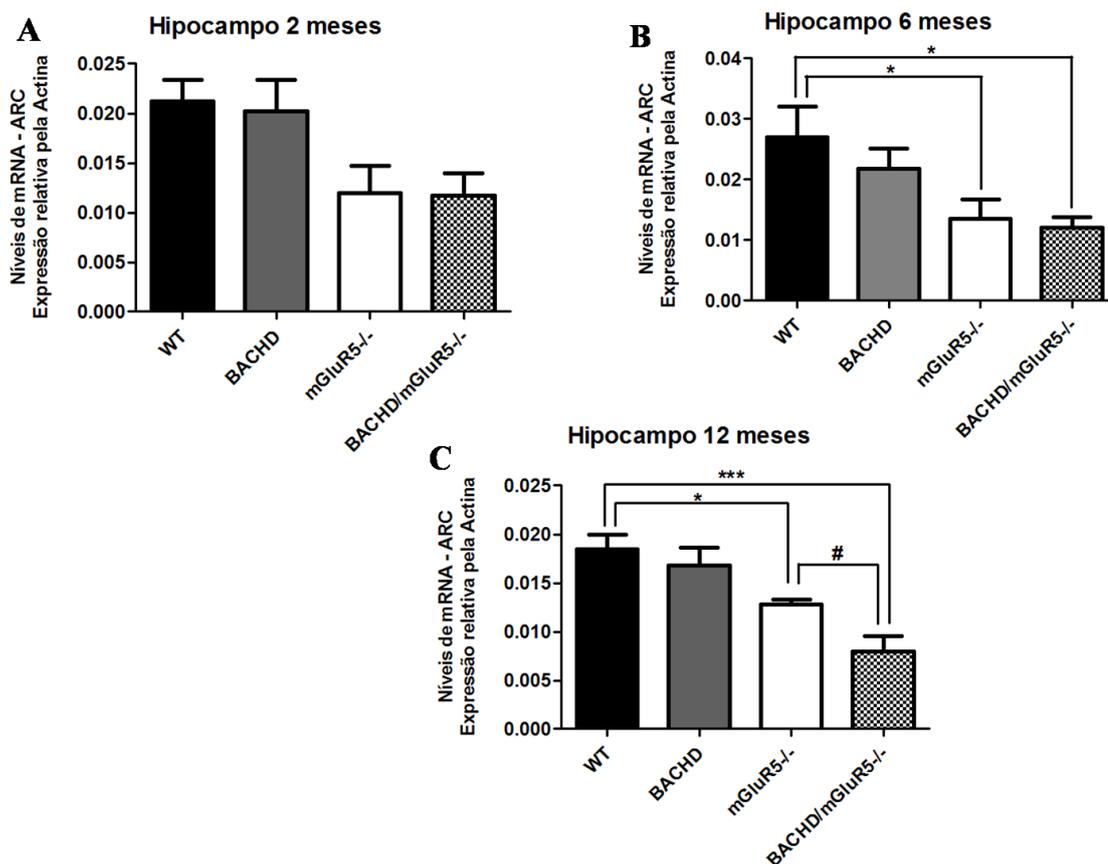


Figura 16: A expressão de ARC encontra-se reduzida nos camundongos *mGluR5^{-/-}* e *BACHD/mGluR5^{-/-}* na região do hipocampo. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Arc* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do hipocampo de camundongos das linhagens WT, *mGluR5^{-/-}*, BACHD e *BACHD/mGluR5^{-/-}* com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA da actina. Dados representam a média \pm SEM. * representa $p < 0,05$ e *** representam $p < 0,001$ no teste one way quando comparado à linhagem WT. # representa $p < 0,05$ no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem *mGluR5^{-/-}*.

Um outro alvo de CREB analisado foi a syntaxina 1A. Esta é uma proteína predominantemente localizada na membrana plasmática, implicada na fusão de vesículas sinápticas à membrana do terminal pré-sináptico (Bennett, Calakos et al. 1992). A syntaxina é parte do complexo SNARE, a qual interage com a sinaptotagmina e com canais de cálcio dependente de voltagem. (Bennett, Calakos et al. 1992, Teng, Wang et al. 2001). Por ser uma proteína típica dos terminais pré-sinápticos, a syntaxina é muito utilizada como marcador do número desses terminais. Assim, devido a sua importância, sua expressão foi avaliada em todas

as regiões cerebrais foco desse estudo. A primeira região analisada foi o córtex. Os animais com 2 e 6 meses de idade não apresentaram diferença na expressão da sintaxina 1A (figura 17A e B). Já os animais BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade exibiram uma redução na sua expressão, quando comparados aos camundongos WT, evidenciando a influência tanto do mGluR5 quanto da mhtt na sinalização que modula a expressão da sintaxina 1A (figura 17C).

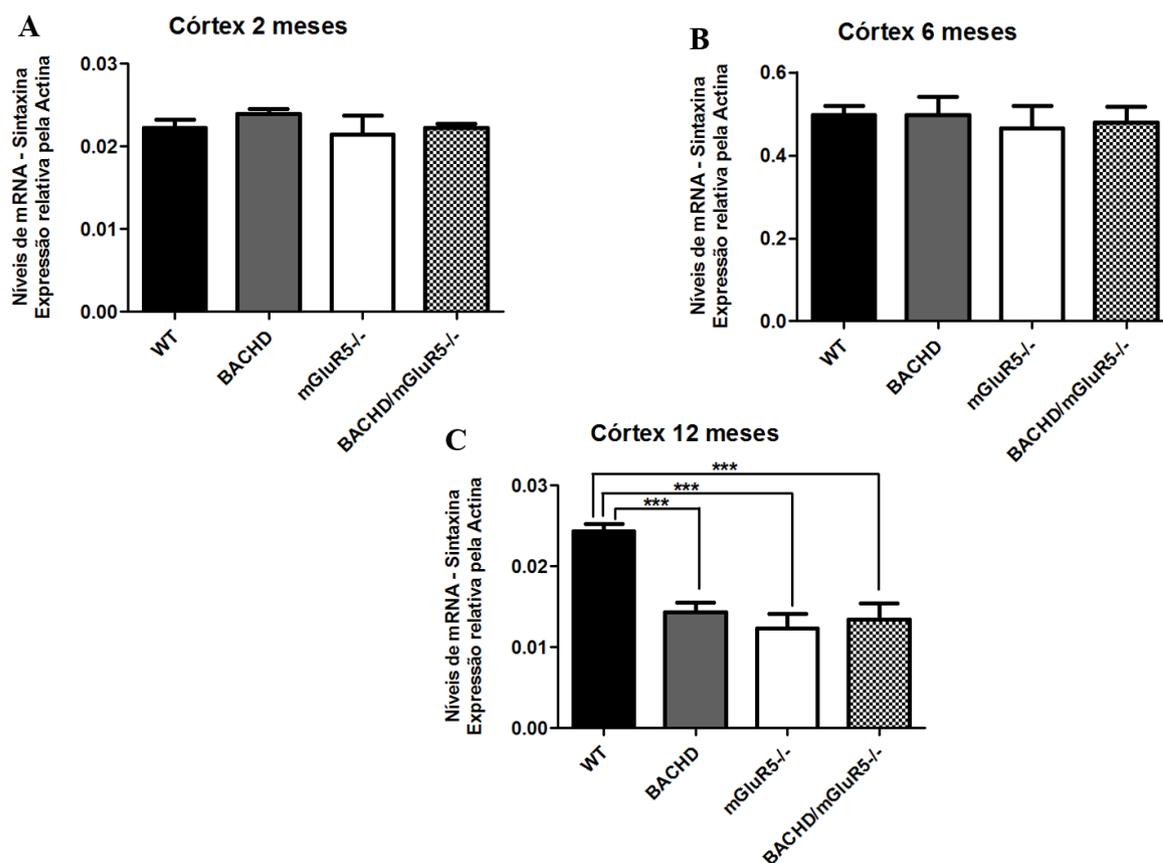


Figura 17: A expressão de sintaxina 1A encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do córtex. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Stx1a* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do córtex de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM. *** representam p<0,001 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

Ao avaliar a região do estriado, foi observado o mesmo perfil de expressão da sintaxina 1A na região do córtex. Os animais com 2 e 6 meses de idade não apresentaram diferença na

expressão de sintaxina (figura 18A e B), enquanto que as linhagens BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade exibiram uma redução na sua expressão, quando comparado a camundongos WT (figura 18C).

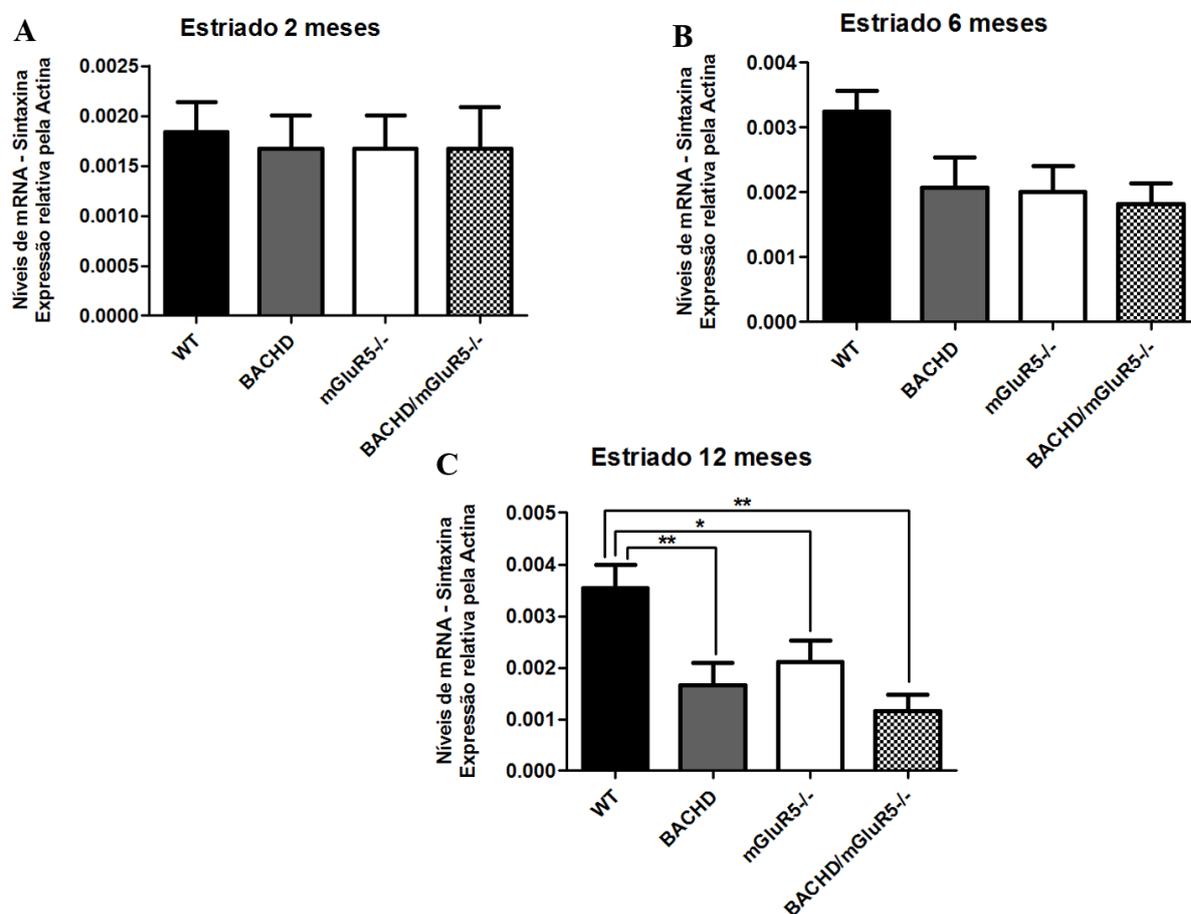


Figura 18: A expressão de sintaxina 1A encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do corpo estriado. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Stx1a* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do corpo estriado de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM. ** representam p<0,01 e *** representam p<0,001 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

Em seguida, foi analisada a expressão de sintaxina na região do hipocampo. Assim como nas demais regiões, os animais com 2 e 6 meses de idade não apresentaram diferença na expressão de sintaxina. (figura 19A e B) Entretanto, as linhagens BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade exibiram uma diminuição da sua expressão (figura 19C). Logo, esses dados ajudam a confirmar a importância do mGluR5 e da mhtt nos

mecanismos que ativam a sinalização de CREB, e por consequência, de seus alvos, uma vez que o perfil de expressão da syntaxina apresentou o mesmo perfil de ativação desse fator de transcrição.

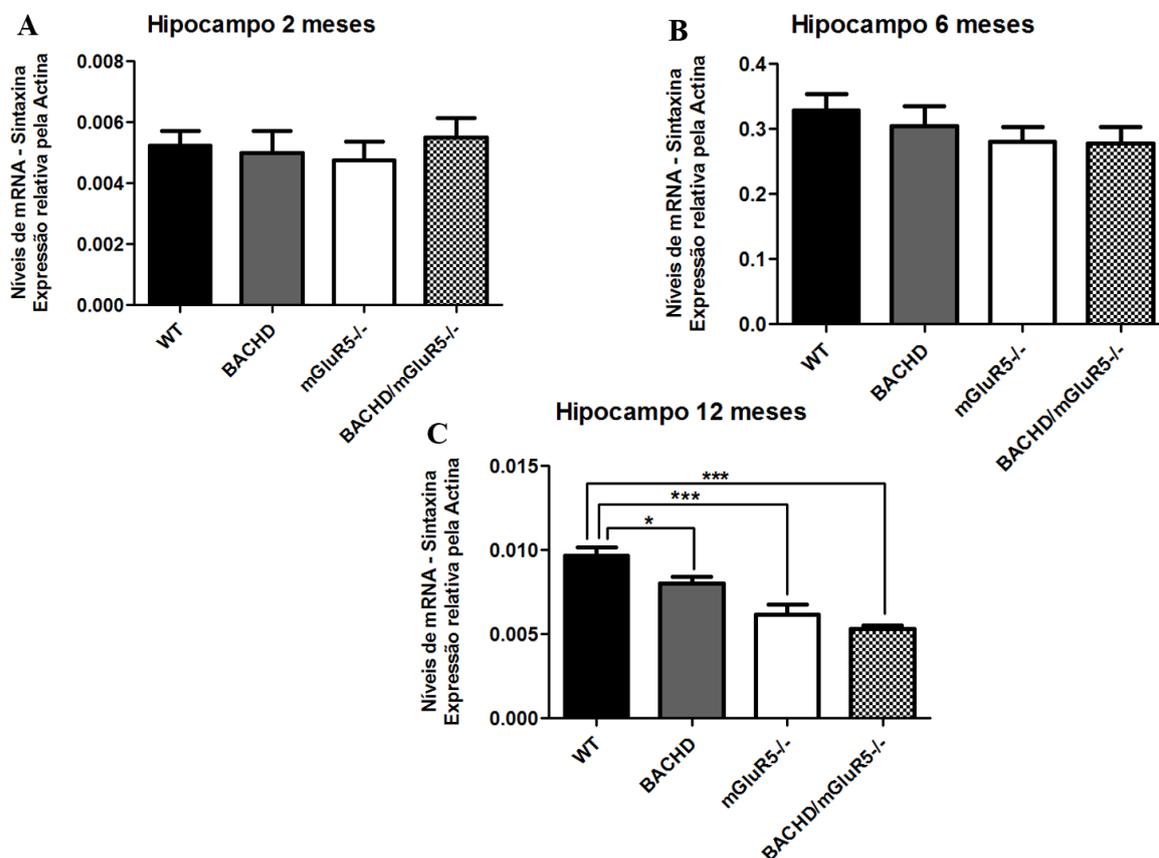


Figura 19: A expressão de syntaxina 1A encontra-se reduzida nos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do hipocampo. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Stx1a* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do hipocampo de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM. * representa p<0,05 e *** representam p<0,001 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

A fim de confirmar a modulação do mGluR5 e da mhtt sob a expressão de syntaxina 1A, analisou-se sua expressão no cerebelo, o qual foi utilizado como uma região controle. Como foi possível observar, não houve diferença na expressão da syntaxina no cerebelo dos animais com 12 meses de idade (figura 20). Dessa forma, existem fortes evidências da importância de ambos mGluR5 e mhtt na sinalização que medeia a transcrição de syntaxina.

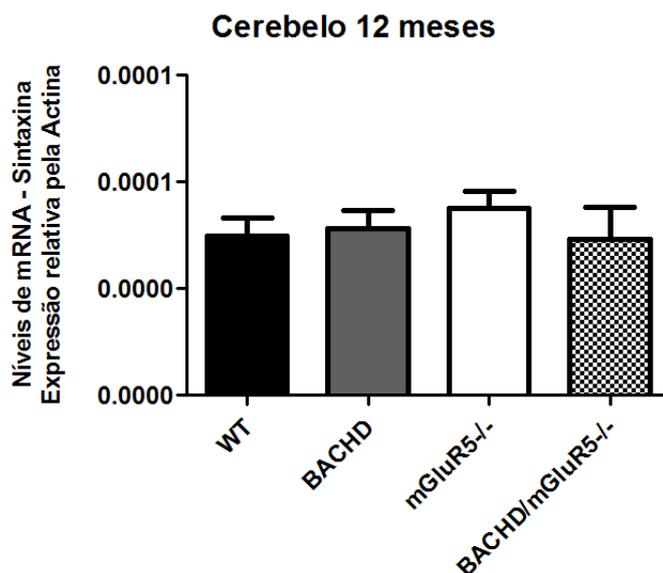


Figura 20: Não há diferença na expressão de sintaxina na região do cerebelo dos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Stx1a* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do cerebelo de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade (n=6). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM.

Como houve diferença na expressão de sintaxina entre as linhagens de camundongos e, conforme já foi citado, ela é usada como marcador do número de terminais pré-sinápticos, levantou-se a hipótese de que os terminais pós-sinápticos também estariam comprometidos. Para tal análise, foi avaliada a expressão de uma proteína típica dos terminais pós-sinápticos, a PSD95. Essa proteína é a mais abundante da densidade pós-sináptica (PSD), e devido ao grande número de proteínas com as quais interage, é implicada em promover a estabilidade de sinapses excitatórias (Cheng, Hoogenraad et al. 2006, Chen, Nelson et al. 2011, Taft and Turrigiano 2014). A fim de correlacionar os resultados da expressão da PSD95 com os da sintaxina, sua análise também abrangeu todas as regiões estudadas. Primeiramente, foi analisada a região do córtex cerebral. Nesta região cerebral, nenhuma das linhagens com 2 e 6 meses de idade apresentaram diferença na expressão de PSD95 (figura 21A e B). Entretanto, os animais mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade apresentaram uma redução na sua expressão (figura 21C). Esse resultado evidencia a influência do mGluR5, mas não da mhtt, na expressão da PSD95.

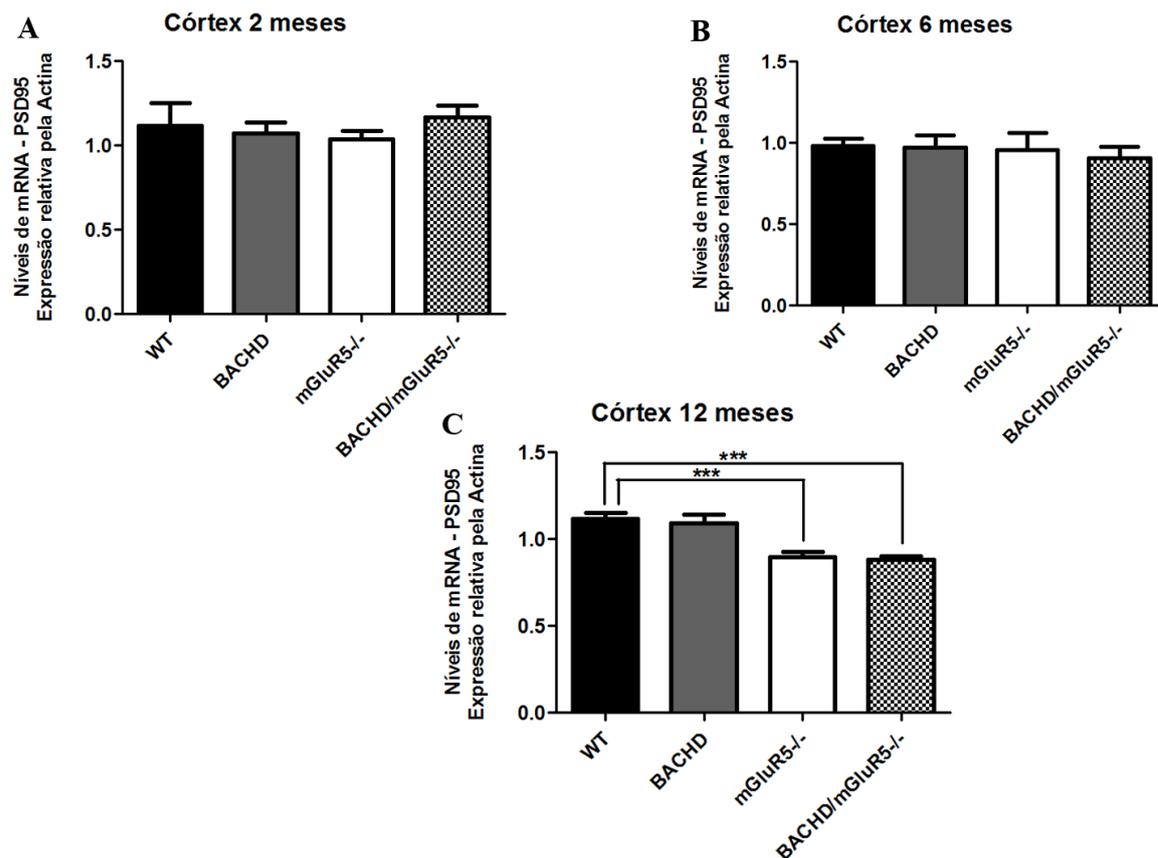


Figura 21: A expressão de PSD95 encontra-se reduzida nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do córtex. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Dgl4* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do córtex de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM. *** representam p<0,001 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

Ao avaliar a região do estriado, foi obtido o mesmo perfil de expressão da PSD95 observado na região do córtex. Os animais com 2 e 6 meses de idade não apresentaram diferença na expressão de PSD95 (figura 22A e B), enquanto que as linhagens mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade exibiram uma redução na sua expressão, quando comparado a camundongos WT (figura 22C).

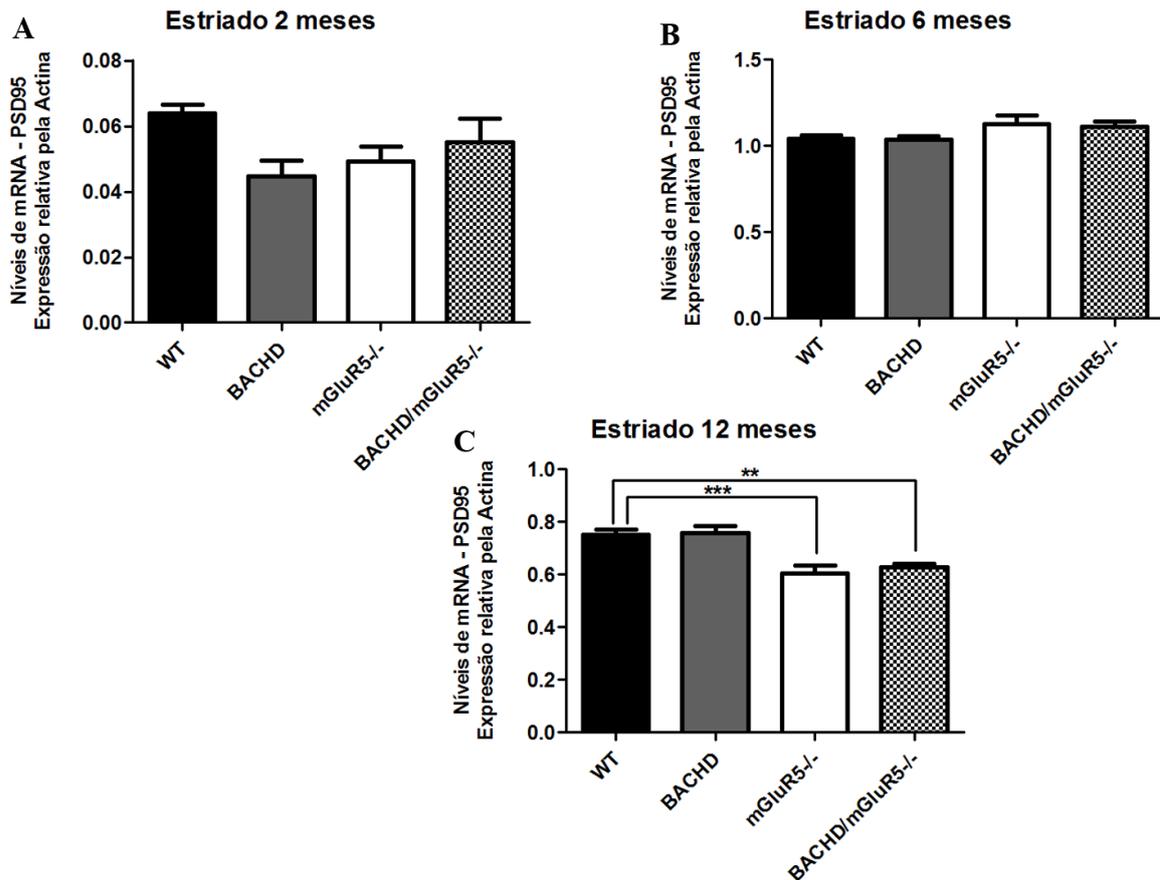


Figura 22: A expressão de PSD95 encontra-se reduzida nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região do corpo estriado. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Dgl4* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do corpo estriado de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM. ** representam p<0,01 e *** representam p<0,001 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

Em seguida, foi analisada a expressão de PSD95 na região do hipocampo. Os animais com 2 meses de idade não apresentaram diferença na sua expressão (figura 23A). Entretanto, diferentemente das outras regiões, os animais mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 6 meses de idade exibiram uma diminuição da expressão da PSD95, quando comparado a camundongos WT (figura 23B). Esta redução precoce da expressão da PSD95 foi reproduzida nas mesmas linhagens com 12 meses de idade (figura 23C). Logo, esses dados ajudam a confirmar a importância do mGluR5 na regulação da transcrição da PSD95. Além disso, a mudança da expressão tanto do PSD95 quanto da syntaxina constitui um forte indicativo de comprometimento da plasticidade sináptica e do número de terminais sinápticos nesses animais.

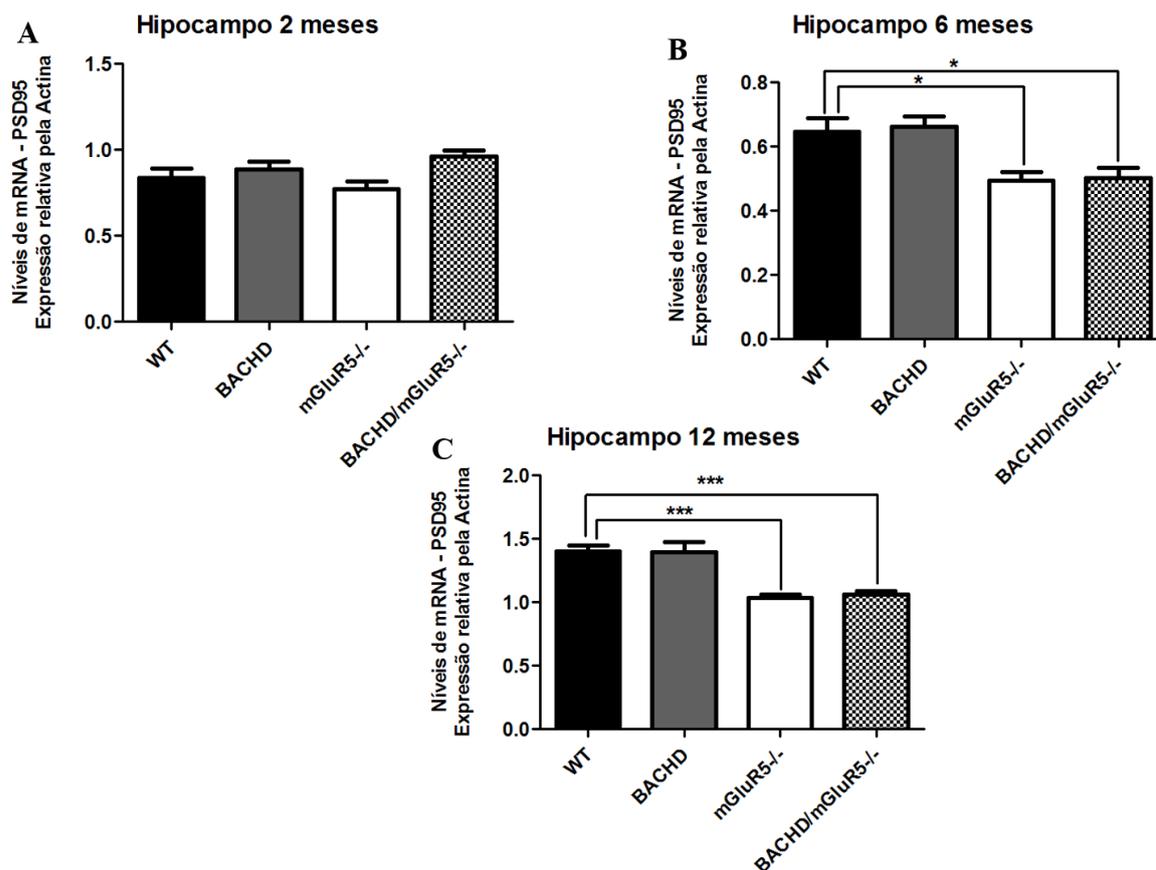


Figura 23: A expressão de PSD95 encontra-se reduzida nos camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 6 e 12 meses de idade na região do hipocampo. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Dgl4* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do hipocampo de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2 (n=4) (A), 6 (n=4) (B) e 12 (n=6) (C) meses de idade. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM. * representa p<0,05 e *** representam p < 0,001 no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

Para confirmar a modulação do mGluR5 sob a expressão de PSD95, analisou-se sua expressão no cerebelo, a qual foi utilizada como uma região controle. Como foi possível observar, não houve diferença na expressão do mRNA da PSD95 entre os animais com 12 meses de idade (figura 24). Dessa forma, existem fortes evidências da importância do mGluR5, e não da mhtt, nos mecanismos envolvidos na expressão da PSD95.

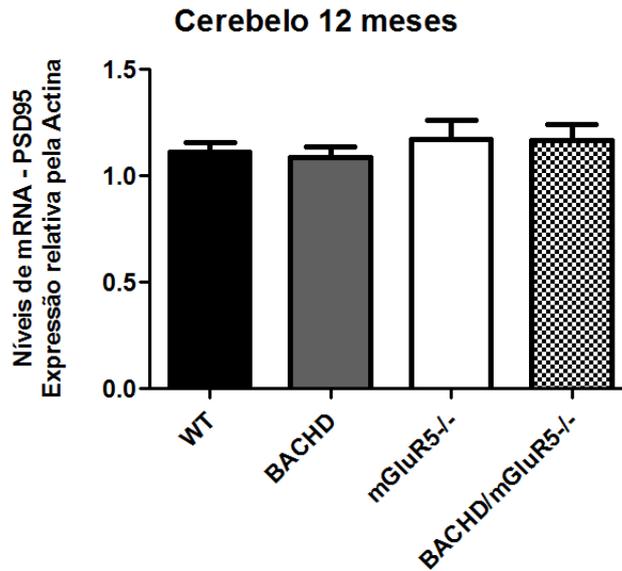


Figura 24: Não há diferença na expressão de PSD95 na região do cerebelo nos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Dgl4* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do cerebelo de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade (n=6). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM.

Por fim, foi analisado a expressão do fator de crescimento nervoso (NGF), uma das proteínas mais bem documentadas com relação ao seu papel em prevenir a morte celular programada durante o desenvolvimento. O NGF estimula o crescimento, sobrevivência e a diferenciação de neurônios simpáticos e sensoriais. Além disso, essa neurotrofina atua como mediador inflamatório e modula a hiperalgesia e plasticidade sináptica (Ebendal 1992, Lewin and Mendell 1993, Bradshaw, Murray-Rust et al. 1994). Quanto aos mecanismos envolvidos na sua expressão, não há na literatura dados que relacionem NGF à regulação de transcrição mediada por REST e CREB, tornando-o um bom controle negativo para a análise da expressão de mRNAs que dependem desses fatores de transcrição. A avaliação da expressão de NGF na região do hipocampo de animais com 12 meses de idade não indicou diferenças entre as linhagens (figura 25). Esse resultado indica que a influência robusta do mGluR5 e da mhtt na sinalização mediada por CREB e REST são específicas.

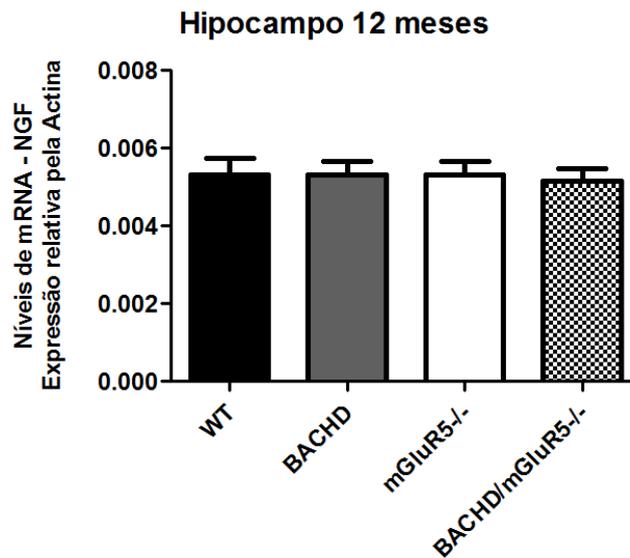


Figura 25: Não há diferença na expressão de NGF na região do hipocampo nos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de *Ngf* determinados por qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do hipocampo de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade (n=6). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos que tanto o mGluR5 quanto a mhtt interferem na expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica nas regiões cerebrais mais afetadas pela DH. Confirmamos dados da literatura que evidenciam a interferência de ambos na sinalização modulada por CREB. Como já foi demonstrado, o bloqueio do mGluR5 pelo antagonista MPEP (2-metil-6(feniletinil) piridina) acarreta uma redução da fosforilação de CREB, e por consequência, uma diminuição da expressão de seus alvos (Mao and Wang 2003, Warwick, Nahorski et al. 2005). Entretanto, a ativação de CREB ainda não havia sido avaliada em camundongos mGluR5^{-/-}. Os nossos resultados demonstraram que o *knockout* do mGluR5 promoveu uma diminuição da ativação de CREB e da expressão de seus genes alvos, corroborando dados previamente publicados. Além disso, também já havia sido descrito que a presença da proteína mhtt compromete a sinalização de CREB por meio do sequestro do CBP pelos agregados de mhtt (Nucifora, Sasaki et al. 2001, Obrietan and Hoyt 2004). Os resultados apresentados nesse trabalho são importantes visto que demonstram como a combinação da ausência do mGluR5 e da expressão da mhtt (BACHD/mGluR5^{-/-}) podem influenciar a expressão dos genes alvos. Os nossos resultados evidenciaram que os animais BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresentaram uma menor ativação de CREB, e que a expressão de seus alvos, como BDNF, ARC e syntaxina, encontrava-se comprometida.

Observamos que a mhtt interfere não só na expressão dos alvos de CREB, mas também altera a expressão dos alvos do repressor gênico analisado, o REST. Os animais que apresentavam a mhtt mostraram uma redução na expressão de GluR2, SNAP25 e da sinapsina, todos alvos da regulação da transcrição por REST. Entretanto, apesar da diminuição dos seus genes alvos, a expressão de REST não se mostrou alterada nos camundongos BACHD. Esses resultados corroboram dados publicados anteriormente que indicam que a mhtt não é capaz de reter o REST no citoplasma, permitindo a sua entrada excessiva no núcleo e, assim, reduzindo a transcrição gênica e a produção proteica (Zuccato, Tartari et al. 2003). Nossos resultados também revelaram que o mGluR5 interfere na expressão do REST e de seus alvos, uma vez que as linhagens mGluR5 *knockout* apresentaram uma menor expressão de REST, e um aumento da expressão do GluR2, SNAP25 e da sinapsina. Entretanto, não há até o momento trabalhos que demonstrem uma associação do mGluR5 e a expressão ou localização subcelular do REST. Sabe-se que a expressão desse repressor gênico é regulada pela via canônica do Wnt, cujo componente central é o co-ativador transcricional denominado β -catenina (Nishihara, Tsuda et al. 2003). Quando a sinalização do Wnt é ativada, a β -catenina é estabilizada e translocada até

o núcleo para interagir com fatores de transcrição da família LEF/TCF, ativando assim a expressão dos seus genes alvos, como o REST. Na ausência do ligante Wnt, a β -catenina permanece associada a uma proteína de membrana plasmática chamada caderina, ou, estando no citoplasma, é constantemente fosforilada e degradada por ação do complexo da axina (Aberle, Bauer et al. 1997, Gao, Seeling et al. 2002, Nishihara, Tsuda et al. 2003). Um trabalho publicado recentemente mostrou que, no endotélio vascular, a ativação do mGluR5 por homocisteína modula a dissociação da VE-caderina (caderina do endotélio vascular) com a β -catenina, via PKC (Beard, Reynolds et al. 2012). Além disso, esse grupo também demonstrou que a localização nuclear, a ligação ao DNA e a expressão de genes alvos da β -catenina foram bloqueadas na presença de um inibidor do mGluR5 (Beard, Reynolds et al. 2012). Portanto, baseados nesses artigos, nossa hipótese para a influência do mGluR5 na expressão do REST no cérebro é que, sob o estímulo de glutamato e na presença do ligante Wnt, este receptor promove a dissociação da N-caderina (caderina do SNC) com a β -catenina, levando a uma ativação da transcrição do REST. Assim, na ausência do mGluR5, a expressão do REST estaria comprometida, como observado em nossos dados.

Nossos resultados demonstraram que nem todos os alvos de REST testados apresentaram uma alteração da expressão, como foi o caso da sinaptotagmina. Uma das hipóteses é que sua expressão esteja sendo influenciada de forma mais determinante por fatores de transcrição que não são afetados pela mhtt ou pelo mGluR5, como é o caso do neuroD2 (ND2). Sobre esse agente transcricional, sabe-se que ele exerce um papel importante na indução de genes envolvidos na formação das sinapses. Além disso, camundongos *knockout* para ND2 apresentam anormalidades no neurodesenvolvimento e sobrevida curta (Lin, Hansen et al. 2005, Ince-Dunn, Hall et al. 2006). Não há relatos na literatura que demonstre sua relação com a DH ou a sinalização do mGluR5, mas já foi evidenciado que o ND2 estimula a expressão da sinaptotagmina (Messmer, Shen et al. 2012).

Um fato relevante em nossos resultados é que apesar do *knockouteamento* do mGluR5 estar presente desde a concepção dos camundongos, diferenças na expressão dos diversos genes analisados só foram evidenciados aos 12 meses de idade, com algumas exceções na região do hipocampo. É possível que se trate de um efeito adaptivo, através do qual outros receptores que também são capazes de modular a expressão/ativação dos fatores de transcrição analisados sejam capazes de compensar a ausência do mGluR5. Esses mecanismos podem ter sido efetivos até uma determinada idade, mas podem ter se tornado insuficientes com o avançar da idade. Um exemplo de mecanismo de adaptação é o que envolve a syntaxina. A syntaxina é uma proteína alvo da sinalização do CREB (Guo, Senzel et al. 2010). Este, por sua vez, é ativado

por várias quinases como CaMK II e IV, PKA, PKC, AKT (Gonzalez and Montminy 1989, de Groot, den Hertog et al. 1993, Ginty, Bonni et al. 1994, Deak, Clifton et al. 1998, Du and Montminy 1998), dentre outras, as quais podem ser ativadas não só através da sinalização mediada pelo mGluR5, mas também através da ativação de outros receptores, como o receptor de NMDA e TrK (Ghosh, Ginty et al. 1994, Pizzorusso, Ratto et al. 2000, Kawasaki, Kohno et al. 2004). Logo, a ativação de CREB por esses receptores poderia induzir a expressão da syntaxina em idades mais precoces, compensando a ausência do mGluR5. Entretanto, o envelhecimento dos animais pode ter comprometido essa sinalização compensatória, já que o avanço da idade prejudica a regulação de vários sistemas (Lau, Bengtson et al. 2015, Scheibye-Knudsen 2016). Por exemplo, dados publicados por nosso grupo indicam que a sinalização do mGluR5 e a produção do segundo mensageiro IP3 é reduzida com o avançar da idade do camundongo, sendo que camundongos de 12 meses de idade apresentam uma redução significativa da formação de IP3 via mGluR5 (Ribeiro, Paquet et al. 2010). Assim como o mGluR5, outros receptores também apresentam uma sinalização celular reduzida devido ao envelhecimento. Um exemplo disso é o receptor de insulina (Haas, Kalinine et al. 2016). Isso explicaria o fato de que apenas aos 12 meses de idade o efeito cumulativo da falta do mGluR5 foi passível de ser quantificado nos camundongos. Quanto aos animais que expressam a mhtt, o efeito tardio justifica-se pela progressão da doença, cujos efeitos são robustamente desencadeados e identificados em idades mais avançadas no modelo murino BACHD. Por exemplo, a atrofia cerebral, a perda neuronal e o acúmulo de agregados da proteína mhtt são evidenciados nos camundongos BACHD apenas aos 12 meses de idade (Gray, Shirasaki et al. 2008, Doria, de Souza et al. 2015).

Como já foi relatado, os genes analisados neste trabalho estão relacionados à plasticidade sináptica. A capacidade das sinapses de se adaptarem de forma distinta aos estímulos recebidos favorece a formação da memória e da aprendizagem (Benke, Luthi et al. 1998, Carroll, Beattie et al. 2001, Lisman, Schulman et al. 2002, Yamazaki, Fujii et al. 2002). Vários estudos demonstram que a expressão gênica é essencial para a formação da memória, especialmente a memória de longo prazo (Park, Gong et al. 2006, Chen, Rahman et al. 2016). Em nossos resultados vimos que a mhtt e o *knockout* do mGluR5 reduziram a ativação de CREB e a expressão de seus alvos, como BDNF, syntaxina e ARC, o que poderia facilitar o desenvolvimento de um déficit de memória nesses animais. Em contrapartida, vimos que o *knockout* do mGluR5 reduz a expressão de REST e aumenta a de seus alvos, como SNAP25, GluR2 e sinapsina. Dessa forma, o *knockout* do mGluR5 poderia melhorar a plasticidade sináptica via REST por reprimir a sua expressão e induzir a de seus alvos, os quais são

importantes para a plasticidade sináptica. Entretanto, experimentos comportamentais de memória realizados com os camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} indicaram que tanto o knockout do mGluR5 quanto a expressão da mhrt promovem um prejuízo da memória, sendo que os camundongos BACHD/mGluR5^{-/-} apresentaram o pior desempenho (dados não mostrados). Esses dados sugerem que a diminuição da expressão dos genes alvos do CREB apresentam um efeito mais preponderante sobre o comportamento de memória dos animais do que o aumento da expressão dos genes alvos de REST. É possível que os níveis fisiológicos de expressão dos genes alvo de REST já sejam suficientes para a plasticidade sináptica e um aumento da expressão desses não acarretaria em uma melhora de memória. Além disso, estudos recentes mostraram um papel neuroprotetor do REST (Lu, Aron et al. 2014). Esse estudo mostrou ainda que níveis elevados da expressão de REST estão associados à preservação da função cognitiva e aumento da longevidade. Esse efeito seria uma consequência da repressão de genes que promovem a morte celular e o avanço da Doença de Alzheimer (Lu, Aron et al. 2014). De fato, o REST possui como alvo genes com função apoptótica, como o citocromo C, TRADD (proteína com domínio associado ao receptor do fator de necrose tumoral do tipo 1) e FAS, que, ao serem reprimidos, preservam a sobrevivência celular (Lu, Aron et al. 2014). Como esses genes não foram analisados em nosso trabalho, mais estudos serão necessários para elucidarmos de forma ampla a função de REST nos animais *knockout* para o mGluR5.

Os nossos resultados mostram que tanto o mGluR5 quanto a mhrt modulam a expressão gênica. Entretanto, o efeito desse receptor parece sobrepor ao da proteína mutada no que diz respeito à regulação da transcrição gênica via REST. Isso pode ser evidenciado observando-se os resultados obtidos a partir dos animais BACHD/mGluR5^{-/-}, os quais seguem majoritariamente o perfil de expressão da linhagem mGluR5^{-/-}. Observamos assim que apesar da mhrt acarretar uma redução na expressão dos alvos de REST, a ausência do mGluR5 age de forma mais intensa na determinação do fenótipo de expressão, uma vez que a linhagem BACHD/mGluR5^{-/-} apresenta um aumento da expressão dos seus genes alvos, mesmo na presença da mhrt. Esse fato permite inferir que em um contexto apresentando a expressão de ambos, a sinalização mediada pelo mGluR5 torna-se dominante sob os efeitos desencadeados pela mhrt sobre a expressão gênica. Um exemplo que corrobora essas evidências advém do aumento da expressão do BDNF em camundongos BACHD tratados com um modulador alostérico positivo do mGluR5, o CDPPB (Doria, de Souza et al. 2015). Logo, nossos dados fortalecem a importância do estudo desse receptor como um possível alvo terapêutico para a DH.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A transcrição gênica tem uma função preponderante sobre os processos de plasticidade sináptica e memória (Freund, Graw et al. 2016, Li, Papale et al. 2016). Através dos nossos resultados, percebemos a grande influência do mGluR5 e da mhtt na expressão de genes essenciais para a plasticidade sináptica (tabela 4). Ademais, ressalta-se o papel dominante do mGluR5 frente a indução da transcrição dos vários genes analisados nos animais BACHD/mGluR5^{-/-}.

Tabela 4: Análises de expressão gênica e ativação de proteínas em camundongos com 12 meses de idade, comparado a camundongos selvagens (WT)

<i>Linhagem/Genes da via de REST</i>	REST	GluR2	SNAP25	Sinapsina	Sinaptotagmina
BACHD	não alterado	redução	redução	redução	não alterado
mGluR5 ^{-/-}	redução	aumento	aumento	aumento	não alterado
BACHD/mGluR5 ^{-/-}	redução	aumento	aumento	aumento	não alterado

<i>Linhagem/Genes da via de CREB</i>	CREB	ARC	Sintaxina	BDNF
BACHD	redução	não alterado	redução	não alterado
mGluR5 ^{-/-}	redução	redução	redução	redução
BACHD/mGluR5 ^{-/-}	redução	redução	redução	redução

<i>Linhagem/Genes não alvos de REST e CREB</i>	PSD95	NGF
BACHD	não alterado	não alterado
mGluR5 ^{-/-}	redução	não alterado
BACHD/mGluR5 ^{-/-}	redução	não alterado

 *alvos de REST e CREB*

Esse trabalho demonstra a influência marcante do mGluR5 e da mhtt na sinalização do fator de transcrição CREB. Além disso, nossos dados também evidenciam a importância do mGluR5 na expressão do repressor gênico REST, cuja relação com o mGluR5 ainda não havia sido relatada em nenhum estudo anterior. Logo, experimentos futuros serão necessários para elucidar os mecanismos subjacentes às alterações observadas nos camundongos BACHD/mGluR5^{-/-}.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abada, Y. S., R. Schreiber and B. Ellenbroek (2013). "Motor, emotional and cognitive deficits in adult BACHD mice: a model for Huntington's disease." Behav Brain Res **238**: 243-251.

Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert and R. Kemler (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." EMBO J **16**(13): 3797-3804.

Altar, C. A., N. Cai, T. Bliven, M. Juhasz, J. M. Conner, A. L. Acheson, R. M. Lindsay and S. J. Wiegand (1997). "Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain." Nature **389**(6653): 856-860.

Anborgh, P. H., C. Godin, M. Pampillo, G. K. Dhimi, L. B. Dale, S. P. Cregan, R. Truant and S. S. Ferguson (2005). "Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin." J Biol Chem **280**(41): 34840-34848.

Anderson, T. J. and M. R. MacAskill (2013). "Eye movements in patients with neurodegenerative disorders." Nat Rev Neurol **9**(2): 74-85.

Balazs, R., S. Miller, C. Romano, A. de Vries, Y. Chun and C. W. Cotman (1997). "Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulation." J Neurochem **69**(1): 151-163.

Beard, R. S., Jr., J. J. Reynolds and S. E. Bearden (2012). "Metabotropic glutamate receptor 5 mediates phosphorylation of vascular endothelial cadherin and nuclear localization of beta-catenin in response to homocysteine." Vascul Pharmacol **56**(3-4): 159-167.

Benke, T. A., A. Luthi, J. T. Isaac and G. L. Collingridge (1998). "Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity." Nature **393**(6687): 793-797.

Bennett, M. K., N. Calakos and R. H. Scheller (1992). "Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones." Science **257**(5067): 255-259.

Bordi, F. and A. Ugolini (1999). "Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases." Prog Neurobiol **59**(1): 55-79.

Bradshaw, R. A., J. Murray-Rust, C. F. Ibanez, N. Q. McDonald, R. Lapatto and T. L. Blundell (1994). "Nerve growth factor: structure/function relationships." Protein Sci **3**(11): 1901-1913.

Bruno, V., G. Battaglia, A. Copani, V. M. Cespedes, M. F. Galindo, V. Cena, J. Sanchez-Prieto, F. Gasparini, R. Kuhn, P. J. Flor and F. Nicoletti (2001). "An activity-dependent switch from facilitation to inhibition in the control of excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors." Eur J Neurosci **13**(8): 1469-1478.

Calabresi, P., D. Centonze, A. Pisani and G. Bernardi (1999). "Metabotropic glutamate receptors and cell-type-specific vulnerability in the striatum: implication for ischemia and Huntington's disease." Exp Neurol **158**(1): 97-108.

Calderone, A., T. Jover, K. M. Noh, H. Tanaka, H. Yokota, Y. Lin, S. Y. Grooms, R. Regis, M. V. Bennett and R. S. Zukin (2003). "Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die." J Neurosci **23**(6): 2112-2121.

Caramins, M., G. Halliday, E. McCusker and R. J. Trent (2003). "Genetically confirmed clinical Huntington's disease with no observable cell loss." J Neurol Neurosurg Psychiatry **74**(7): 968-970.

Carlezon, W. A., Jr., R. S. Duman and E. J. Nestler (2005). "The many faces of CREB." Trends Neurosci **28**(8): 436-445.

Carroll, R. C., E. C. Beattie, M. von Zastrow and R. C. Malenka (2001). "Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci **2**(5): 315-324.

Cesca, F., P. Baldelli, F. Valtorta and F. Benfenati (2010). "The synapsins: key actors of synapse function and plasticity." Prog Neurobiol **91**(4): 313-348.

Chalovich, E. M., J. H. Zhu, J. Caltagarone, R. Bowser and C. T. Chu (2006). "Functional repression of cAMP response element in 6-hydroxydopamine-treated neuronal cells." J Biol Chem **281**(26): 17870-17881.

Chen, X., C. D. Nelson, X. Li, C. A. Winters, R. Azzam, A. A. Sousa, R. D. Leapman, H. Gainer, M. Sheng and T. S. Reese (2011). "PSD-95 is required to sustain the molecular organization of the postsynaptic density." J Neurosci **31**(17): 6329-6338.

Chen, X., R. Rahman, F. Guo and M. Rosbash (2016). "Genome-wide identification of neuronal activity-regulated genes in *Drosophila*." Elife **5**.

Cheng, D., C. C. Hoogenraad, J. Rush, E. Ramm, M. A. Schlager, D. M. Duong, P. Xu, S. R. Wijayawardana, J. Hanfelt, T. Nakagawa, M. Sheng and J. Peng (2006). "Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum." Mol Cell Proteomics **5**(6): 1158-1170.

Chong, J. A., J. Tapia-Ramirez, S. Kim, J. J. Toledo-Aral, Y. Zheng, M. C. Boutros, Y. M. Altshuler, M. A. Frohman, S. D. Kraner and G. Mandel (1995). "REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons." Cell **80**(6): 949-957.

Consortium, E. P. (2012). "An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome." Nature **489**(7414): 57-74.

D'Alessandro, R., A. Klajn and J. Meldolesi (2009). "Expression of dense-core vesicles and of their exocytosis are governed by the repressive transcription factor NRSF/REST." Ann N Y Acad Sci **1152**: 194-200.

de Groot, R. P., J. den Hertog, J. R. Vandenheede, J. Goris and P. Sassone-Corsi (1993). "Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function." EMBO J **12**(10): 3903-3911.

Deak, M., A. D. Clifton, L. M. Lucocq and D. R. Alessi (1998). "Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB." EMBO J **17**(15): 4426-4441.

- Dhami, G. K. and S. S. Ferguson (2006). "Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis." Pharmacol Ther **111**(1): 260-271.
- Di Maio, L., F. Squitieri, G. Napolitano, G. Campanella, J. A. Trofatter and P. M. Conneally (1993). "Onset symptoms in 510 patients with Huntington's disease." J Med Genet **30**(4): 289-292.
- DiFiglia, M. (1990). "Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease." Trends Neurosci **13**(7): 286-289.
- Doria, J. G., J. M. de Souza, J. N. Andrade, H. A. Rodrigues, I. M. Guimaraes, T. G. Carvalho, C. Guatimosim, T. Dobransky and F. M. Ribeiro (2015). "The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPBB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease." Neurobiol Dis **73**: 163-173.
- Du, K. and M. Montminy (1998). "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB." J Biol Chem **273**(49): 32377-32379.
- Dunah, A. W., H. Jeong, A. Griffin, Y. M. Kim, D. G. Standaert, S. M. Hersch, M. M. Mouradian, A. B. Young, N. Tanese and D. Krainc (2002). "Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease." Science **296**(5576): 2238-2243.
- Ebendal, T. (1992). "Function and evolution in the NGF family and its receptors." J Neurosci Res **32**(4): 461-470.
- Ferrante, R. J., C. A. Gutekunst, F. Persichetti, S. M. McNeil, N. W. Kowall, J. F. Gusella, M. E. MacDonald, M. F. Beal and S. M. Hersch (1997). "Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum." J Neurosci **17**(9): 3052-3063.
- Freund, R. K., S. Graw, K. S. Choo, K. E. Stevens, S. Leonard and M. L. Dell'Acqua (2016). "Genetic knockout of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor gene alters hippocampal long-term potentiation in a background strain-dependent manner." Neurosci Lett **627**: 1-6.
- Gao, Z. H., J. M. Seeling, V. Hill, A. Yochum and D. M. Virshup (2002). "Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1182-1187.
- Gass, J. T. and M. F. Olive (2008). "Transcriptional profiling of the rat frontal cortex following administration of the mGlu5 receptor antagonists MPEP and MTEP." Eur J Pharmacol **584**(2-3): 253-262.
- Ghosh, A., D. D. Ginty, H. Bading and M. E. Greenberg (1994). "Calcium regulation of gene expression in neuronal cells." J Neurobiol **25**(3): 294-303.
- Giampa, C., E. Montagna, C. Dato, M. A. Melone, G. Bernardi and F. R. Fusco (2013). "Systemic delivery of recombinant brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the R6/2 mouse model of Huntington's disease." PLoS One **8**(5): e64037.

Gil, J. M. and A. C. Rego (2008). "Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease." Eur J Neurosci **27**(11): 2803-2820.

Ginty, D. D., A. Bonni and M. E. Greenberg (1994). "Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB." Cell **77**(5): 713-725.

Gonzalez, G. A. and M. R. Montminy (1989). "Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133." Cell **59**(4): 675-680.

Gray, M., D. I. Shirasaki, C. Cepeda, V. M. Andre, B. Wilburn, X. H. Lu, J. Tao, I. Yamazaki, S. H. Li, Y. E. Sun, X. J. Li, M. S. Levine and X. W. Yang (2008). "Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice." J Neurosci **28**(24): 6182-6195.

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. The Huntington's Disease Collaborative Research Group." Cell **72**(6): 971-983.

Guo, C. H., A. Senzel, K. Li and Z. P. Feng (2010). "De novo protein synthesis of syntaxin-1 and dynamin-1 in long-term memory formation requires CREB1 gene transcription in *Lymnaea stagnalis*." Behav Genet **40**(5): 680-693.

Gusella, J. F., N. S. Wexler, P. M. Conneally, S. L. Naylor, M. A. Anderson, R. E. Tanzi, P. C. Watkins, K. Ottina, M. R. Wallace, A. Y. Sakaguchi and et al. (1983). "A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease." Nature **306**(5940): 234-238.

Guzowski, J. F., J. A. Timlin, B. Roysam, B. L. McNaughton, P. F. Worley and C. A. Barnes (2005). "Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression." Curr Opin Neurobiol **15**(5): 599-606.

Haas, C. B., E. Kalinine, E. R. Zimmer, G. Hansel, A. W. Brochier, J. P. Oses, L. V. Portela and A. P. Muller (2016). "Brain Insulin Administration Triggers Distinct Cognitive and Neurotrophic Responses in Young and Aged Rats." Mol Neurobiol **53**(9): 5807-5817.

Harris, S. L., K. Cho, Z. I. Bashir and E. Molnar (2004). "Metabotropic glutamate receptor signalling in perirhinal cortical neurons." Mol Cell Neurosci **25**(2): 275-287.

Heemskerk, A. W. and R. A. Roos (2011). "Dysphagia in Huntington's disease: a review." Dysphagia **26**(1): 62-66.

Henley, J. M. and K. A. Wilkinson (2013). "AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging." Dialogues Clin Neurosci **15**(1): 11-27.

Hofer, M., S. R. Pagliusi, A. Hohn, J. Leibrock and Y. A. Barde (1990). "Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain." EMBO J **9**(8): 2459-2464.

Huang, C. C., P. W. Faber, F. Persichetti, V. Mittal, J. P. Vonsattel, M. E. MacDonald and J. F. Gusella (1998). "Amyloid formation by mutant huntingtin: threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins." Somat Cell Mol Genet **24**(4): 217-233.

Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." Annu Rev Neurosci **24**: 677-736.

Huttner, W. B., W. Schiebler, P. Greengard and P. De Camilli (1983). "Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation." J Cell Biol **96**(5): 1374-1388.

Illarioshkin, S. N., S. Igarashi, O. Onodera, E. D. Markova, N. N. Nikolskaya, H. Tanaka, T. Z. Chabrashwili, N. G. Insarova, K. Endo, I. A. Ivanova-Smolenskaya and et al. (1994). "Trinucleotide repeat length and rate of progression of Huntington's disease." Ann Neurol **36**(4): 630-635.

Impey, S., D. M. Smith, K. Obrietan, R. Donahue, C. Wade and D. R. Storm (1998). "Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning." Nat Neurosci **1**(7): 595-601.

Ince-Dunn, G., B. J. Hall, S. C. Hu, B. Ripley, R. L. Huganir, J. M. Olson, S. J. Tapscott and A. Ghosh (2006). "Regulation of thalamocortical patterning and synaptic maturation by NeuroD2." Neuron **49**(5): 683-695.

Jeong, H., D. E. Cohen, L. Cui, A. Supinski, J. N. Savas, J. R. Mazzulli, J. R. Yates, 3rd, L. Bordone, L. Guarente and D. Krainc (2012). "Sirt1 mediates neuroprotection from mutant huntingtin by activation of the TORC1 and CREB transcriptional pathway." Nat Med **18**(1): 159-165.

Johannessen, M., M. P. Delghandi and U. Moens (2004). "What turns CREB on?" Cell Signal **16**(11): 1211-1227.

Johnson, R., R. J. Gamblin, L. Ooi, A. W. Bruce, I. J. Donaldson, D. R. Westhead, I. C. Wood, R. M. Jackson and N. J. Buckley (2006). "Identification of the REST regulon reveals extensive transposable element-mediated binding site duplication." Nucleic Acids Res **34**(14): 3862-3877.

Johnson, R., C. H. Teh, G. Kunarso, K. Y. Wong, G. Srinivasan, M. L. Cooper, M. Volta, S. S. Chan, L. Lipovich, S. M. Pollard, R. K. Karuturi, C. L. Wei, N. J. Buckley and L. W. Stanton (2008). "REST regulates distinct transcriptional networks in embryonic and neural stem cells." PLoS Biol **6**(10): e256.

Johnson, R., C. Zuccato, N. D. Belyaev, D. J. Guest, E. Cattaneo and N. J. Buckley (2008). "A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease." Neurobiol Dis **29**(3): 438-445.

Jovanovic, J. N., A. J. Czernik, A. A. Fienberg, P. Greengard and T. S. Sihra (2000). "Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release." Nat Neurosci **3**(4): 323-329.

Kawasaki, Y., T. Kohno, Z. Y. Zhuang, G. J. Brenner, H. Wang, C. Van Der Meer, K. Befort, C. J. Woolf and R. R. Ji (2004). "Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization." J Neurosci **24**(38): 8310-8321.

- Korte, M., V. Staiger, O. Griesbeck, H. Thoenen and T. Bonhoeffer (1996). "The involvement of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal long-term potentiation revealed by gene targeting experiments." J Physiol Paris **90**(3-4): 157-164.
- Kraner, S. D., J. A. Chong, H. J. Tsay and G. Mandel (1992). "Silencing the type II sodium channel gene: a model for neural-specific gene regulation." Neuron **9**(1): 37-44.
- Landles, C. and G. P. Bates (2004). "Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series." EMBO Rep **5**(10): 958-963.
- Lau, D., C. P. Bengtson, B. Buchthal and H. Bading (2015). "BDNF Reduces Toxic Extrasynaptic NMDA Receptor Signaling via Synaptic NMDA Receptors and Nuclear-Calcium-Induced Transcription of inhba/Activin A." Cell Rep **12**(8): 1353-1366.
- Levine, M. S., C. Cepeda, M. A. Hickey, S. M. Fleming and M. F. Chesselet (2004). "Genetic mouse models of Huntington's and Parkinson's diseases: illuminating but imperfect." Trends Neurosci **27**(11): 691-697.
- Lewin, G. R. and L. M. Mendell (1993). "Nerve growth factor and nociception." Trends Neurosci **16**(9): 353-359.
- Li, S., L. A. Papale, Q. Zhang, A. Madrid, L. Chen, P. Chopra, S. Keles, P. Jin and R. S. Alisch (2016). "Genome-wide alterations in hippocampal 5-hydroxymethylcytosine links plasticity genes to acute stress." Neurobiol Dis **86**: 99-108.
- Li, S. H. and X. J. Li (2004). "Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease." Trends Genet **20**(3): 146-154.
- Lin, C. H., S. Hansen, Z. Wang, D. R. Storm, S. J. Tapscott and J. M. Olson (2005). "The dosage of the neuroD2 transcription factor regulates amygdala development and emotional learning." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(41): 14877-14882.
- Lisman, J., H. Schulman and H. Cline (2002). "The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory." Nat Rev Neurosci **3**(3): 175-190.
- Liu, S. J. and R. S. Zukin (2007). "Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death." Trends Neurosci **30**(3): 126-134.
- Lu, T., L. Aron, J. Zullo, Y. Pan, H. Kim, Y. Chen, T. H. Yang, H. M. Kim, D. Drake, X. S. Liu, D. A. Bennett, M. P. Colaiacovo and B. A. Yankner (2014). "REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease." Nature **507**(7493): 448-454.
- Luscher, C. and M. Frerking (2001). "Restless AMPA receptors: implications for synaptic transmission and plasticity." Trends Neurosci **24**(11): 665-670.
- Mao, L. and J. Q. Wang (2003). "Metabotropic glutamate receptor 5-regulated Elk-1 phosphorylation and immediate early gene expression in striatal neurons." J Neurochem **85**(4): 1006-1017.

- Mao, L. and J. Q. Wang (2003). "Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in cultured striatal neurons by metabotropic glutamate receptor subtype 5." J Neurochem **84**(2): 233-243.
- Martindale, D., A. Hackam, A. Wieczorek, L. Ellerby, C. Wellington, K. McCutcheon, R. Singaraja, P. Kazemi-Esfarjani, R. Devon, S. U. Kim, D. E. Bredesen, F. Tufaro and M. R. Hayden (1998). "Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates." Nat Genet **18**(2): 150-154.
- Mazarakis, N. K., A. Cybulska-Klosowicz, H. Grote, T. Pang, A. Van Dellen, M. Kossut, C. Blakemore and A. J. Hannan (2005). "Deficits in experience-dependent cortical plasticity and sensory-discrimination learning in presymptomatic Huntington's disease mice." J Neurosci **25**(12): 3059-3066.
- Menalled, L. B. and M. F. Chesselet (2002). "Mouse models of Huntington's disease." Trends Pharmacol Sci **23**(1): 32-39.
- Messmer, K., W. B. Shen, M. Remington and P. S. Fishman (2012). "Induction of neural differentiation by the transcription factor neuroD2." Int J Dev Neurosci **30**(2): 105-112.
- Mizuno, K., J. Carnahan and H. Nawa (1994). "Brain-derived neurotrophic factor promotes differentiation of striatal GABAergic neurons." Dev Biol **165**(1): 243-256.
- Montminy, M. R. and L. M. Bilezikjian (1987). "Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene." Nature **328**(6126): 175-178.
- Mortazavi, A., E. C. Leeper Thompson, S. T. Garcia, R. M. Myers and B. Wold (2006). "Comparative genomics modeling of the NRSF/REST repressor network: from single conserved sites to genome-wide repertoire." Genome Res **16**(10): 1208-1221.
- Nakanishi, S. (1994). "Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity." Neuron **13**(5): 1031-1037.
- Nicodemo, A. A., M. Pampillo, L. T. Ferreira, L. B. Dale, T. Cregan, F. M. Ribeiro and S. S. Ferguson (2010). "Pyk2 uncouples metabotropic glutamate receptor G protein signaling but facilitates ERK1/2 activation." Mol Brain **3**: 4.
- Nightingale, K. P., L. P. O'Neill and B. M. Turner (2006). "Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code." Curr Opin Genet Dev **16**(2): 125-136.
- Nishihara, S., L. Tsuda and T. Ogura (2003). "The canonical Wnt pathway directly regulates NRSF/REST expression in chick spinal cord." Biochem Biophys Res Commun **311**(1): 55-63.
- Nucifora, F. C., Jr., M. Sasaki, M. F. Peters, H. Huang, J. K. Cooper, M. Yamada, H. Takahashi, S. Tsuji, J. Troncoso, V. L. Dawson, T. M. Dawson and C. A. Ross (2001). "Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity." Science **291**(5512): 2423-2428.
- Obrietan, K. and K. R. Hoyt (2004). "CRE-mediated transcription is increased in Huntington's disease transgenic mice." J Neurosci **24**(4): 791-796.

Ooi, L. and I. C. Wood (2007). "Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST." *Nat Rev Genet* **8**(7): 544-554.

Otto, S. J., S. R. McCorkle, J. Hover, C. Conaco, J. J. Han, S. Impey, G. S. Yochum, J. J. Dunn, R. H. Goodman and G. Mandel (2007). "A new binding motif for the transcriptional repressor REST uncovers large gene networks devoted to neuronal functions." *J Neurosci* **27**(25): 6729-6739.

Packer, A. N., Y. Xing, S. Q. Harper, L. Jones and B. L. Davidson (2008). "The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease." *J Neurosci* **28**(53): 14341-14346.

Panja, D. and C. R. Bramham (2014). "BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown." *Neuropharmacology* **76 Pt C**: 664-676.

Paquet, M., F. M. Ribeiro, J. Guadagno, J. L. Esseltine, S. S. Ferguson and S. P. Cregan (2013). "Role of metabotropic glutamate receptor 5 signaling and homer in oxygen glucose deprivation-mediated astrocyte apoptosis." *Mol Brain* **6**: 9.

Park, C. S., R. Gong, J. Stuart and S. J. Tang (2006). "Molecular network and chromosomal clustering of genes involved in synaptic plasticity in the hippocampus." *J Biol Chem* **281**(40): 30195-30211.

Park, Y. K. and Y. Goda (2016). "Integrins in synapse regulation." *Nat Rev Neurosci*.
Pencea, V., K. D. Bingaman, S. J. Wiegand and M. B. Luskin (2001). "Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus." *J Neurosci* **21**(17): 6706-6717.

Persichetti, F., F. Trettel, C. C. Huang, C. Fraefel, H. T. Timmers, J. F. Gusella and M. E. MacDonald (1999). "Mutant huntingtin forms in vivo complexes with distinct context-dependent conformations of the polyglutamine segment." *Neurobiol Dis* **6**(5): 364-375.

Piira, A., M. R. van Walsem, G. Mikalsen, L. Oie, J. C. Frich and S. Knutsen (2014). "Effects of a Two-Year Intensive Multidisciplinary Rehabilitation Program for Patients with Huntington's Disease: a Prospective Intervention Study." *PLoS Curr* **6**.

Pizzorusso, T., G. M. Ratto, E. Putignano and L. Maffei (2000). "Brain-derived neurotrophic factor causes cAMP response element-binding protein phosphorylation in absence of calcium increases in slices and cultured neurons from rat visual cortex." *J Neurosci* **20**(8): 2809-2816.

Plath, N., O. Ohana, B. Dammermann, M. L. Errington, D. Schmitz, C. Gross, X. Mao, A. Engelsberg, C. Mahlke, H. Welzl, U. Kobalz, A. Stawrakakis, E. Fernandez, R. Waltereit, A. Bick-Sander, E. Therstappen, S. F. Cooke, V. Blanquet, W. Wurst, B. Salmen, M. R. Bosl, H. P. Lipp, S. G. Grant, T. V. Bliss, D. P. Wolfner and D. Kuhl (2006). "Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories." *Neuron* **52**(3): 437-444.

Puigdellivol, M., A. Saavedra and E. Perez-Navarro (2016). "Cognitive Dysfunction in Huntington's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies Beyond BDNF." *Brain Pathol.*

- Ramirez-Amaya, V., A. Vazdarjanova, D. Mikhael, S. Rosi, P. F. Worley and C. A. Barnes (2005). "Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation." J Neurosci **25**(7): 1761-1768.
- Rial Verde, E. M., J. Lee-Osbourne, P. F. Worley, R. Malinow and H. T. Cline (2006). "Increased expression of the immediate-early gene arc/arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission." Neuron **52**(3): 461-474.
- Ribeiro, F. M., L. T. Ferreira, M. Paquet, T. Cregan, Q. Ding, R. Gros and S. S. Ferguson (2009). "Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 5 desensitization and internalization by G protein-coupled receptor kinase 2 in neurons." J Biol Chem **284**(35): 23444-23453.
- Ribeiro, F. M., M. Paquet, S. P. Cregan and S. S. Ferguson (2010). "Group I metabotropic glutamate receptor signalling and its implication in neurological disease." CNS Neurol Disord Drug Targets **9**(5): 574-595.
- Ribeiro, F. M., M. Paquet, L. T. Ferreira, T. Cregan, P. Swan, S. P. Cregan and S. S. Ferguson (2010). "Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease." J Neurosci **30**(1): 316-324.
- Riccio, A., S. Ahn, C. M. Davenport, J. A. Blendy and D. D. Ginty (1999). "Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons." Science **286**(5448): 2358-2361.
- Rigamonti, D., J. H. Bauer, C. De-Fraja, L. Conti, S. Sipione, C. Sciorati, E. Clementi, A. Hackam, M. R. Hayden, Y. Li, J. K. Cooper, C. A. Ross, S. Govoni, C. Vincenz and E. Cattaneo (2000). "Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3." J Neurosci **20**(10): 3705-3713.
- Rigamonti, D., S. Sipione, D. Goffredo, C. Zuccato, E. Fossale and E. Cattaneo (2001). "Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing." J Biol Chem **276**(18): 14545-14548.
- Rubinsztein, D. C. and J. Carmichael (2003). "Huntington's disease: molecular basis of neurodegeneration." Expert Rev Mol Med **5**(20): 1-21.
- Scheibye-Knudsen, M. (2016). "Neurodegeneration in accelerated aging." Dan Med J **63**(11).
- Schoch, S., G. Cibelli and G. Thiel (1996). "Neuron-specific gene expression of synapsin I. Major role of a negative regulatory mechanism." J Biol Chem **271**(6): 3317-3323.
- Schoenherr, C. J. and D. J. Anderson (1995). "The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes." Science **267**(5202): 1360-1363.
- Sekeres, M. J., V. Mercaldo, B. Richards, D. Sargin, V. Mahadevan, M. A. Woodin, P. W. Frankland and S. A. Josselyn (2012). "Increasing CRTCL1 function in the dentate gyrus during memory formation or reactivation increases memory strength without compromising memory quality." J Neurosci **32**(49): 17857-17868.

Shigemoto, R., S. Nomura, H. Ohishi, H. Sugihara, S. Nakanishi and N. Mizuno (1993). "Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain." Neurosci Lett **163**(1): 53-57.

Shimojo, M. (2008). "Huntingtin regulates RE1-silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) nuclear trafficking indirectly through a complex with REST/NRSF-interacting LIM domain protein (RILP) and dynactin p150 Glued." J Biol Chem **283**(50): 34880-34886.

Shimojo, M. and L. B. Hersh (2003). "REST/NRSF-interacting LIM domain protein, a putative nuclear translocation receptor." Mol Cell Biol **23**(24): 9025-9031.

Skodda, S., U. Schlegel, R. Hoffmann and C. Saft (2014). "Impaired motor speech performance in Huntington's disease." J Neural Transm (Vienna) **121**(4): 399-407.

Smith, R., P. Brundin and J. Y. Li (2005). "Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective." Cell Mol Life Sci **62**(17): 1901-1912.

Soldati, C., A. Bithell, P. Conforti, E. Cattaneo and N. J. Buckley (2011). "Rescue of gene expression by modified REST decoy oligonucleotides in a cellular model of Huntington's disease." J Neurochem **116**(3): 415-425.

Sollner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." Nature **362**(6418): 318-324.

St-Pierre, J., S. Drori, M. Uldry, J. M. Silvaggi, J. Rhee, S. Jager, C. Handschin, K. Zheng, J. Lin, W. Yang, D. K. Simon, R. Bachoo and B. M. Spiegelman (2006). "Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators." Cell **127**(2): 397-408.

Steffan, J. S., A. Kazantsev, O. Spasic-Boskovic, M. Greenwald, Y. Z. Zhu, H. Gohler, E. E. Wanker, G. P. Bates, D. E. Housman and L. M. Thompson (2000). "The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6763-6768.

Taft, C. E. and G. G. Turrigiano (2014). "PSD-95 promotes the stabilization of young synaptic contacts." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **369**(1633): 20130134.

Tang, T. S., E. Slow, V. Lupu, I. G. Stavrovskaya, M. Sugimori, R. Llinas, B. S. Kristal, M. R. Hayden and I. Bezprozvanny (2005). "Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(7): 2602-2607.

Tapia-Ramirez, J., B. J. Eggen, M. J. Peral-Rubio, J. J. Toledo-Aral and G. Mandel (1997). "A single zinc finger motif in the silencing factor REST represses the neural-specific type II sodium channel promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(4): 1177-1182.

Teng, F. Y., Y. Wang and B. L. Tang (2001). "The syntaxins." Genome Biol **2**(11): REVIEWS3012.

- Testa, C. M., D. G. Standaert, A. B. Young and J. B. Penney, Jr. (1994). "Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in the basal ganglia of the rat." J Neurosci **14**(5 Pt 2): 3005-3018.
- Thiel, G., M. Lietz and M. Cramer (1998). "Biological activity and modular structure of RE-1-silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes." J Biol Chem **273**(41): 26891-26899.
- Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts and J. A. Leunissen (2007). "Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W71-74.
- Usdin, M. T., P. F. Shelbourne, R. M. Myers and D. V. Madison (1999). "Impaired synaptic plasticity in mice carrying the Huntington's disease mutation." Hum Mol Genet **8**(5): 839-846.
- van Dellen, A., H. E. Grote and A. J. Hannan (2005). "Gene-environment interactions, neuronal dysfunction and pathological plasticity in Huntington's disease." Clin Exp Pharmacol Physiol **32**(12): 1007-1019.
- Vonsattel, J. P., R. H. Myers, T. J. Stevens, R. J. Ferrante, E. D. Bird and E. P. Richardson, Jr. (1985). "Neuropathological classification of Huntington's disease." J Neuropathol Exp Neurol **44**(6): 559-577.
- Waldvogel, H. J., D. Thu, V. Hogg, L. Tippett and R. L. Faull (2012). "Selective neurodegeneration, neuropathology and symptom profiles in Huntington's disease." Adv Exp Med Biol **769**: 141-152.
- Walton, M. R. and I. Dragunow (2000). "Is CREB a key to neuronal survival?" Trends Neurosci **23**(2): 48-53.
- Wang, H. and M. Zhuo (2012). "Group I metabotropic glutamate receptor-mediated gene transcription and implications for synaptic plasticity and diseases." Front Pharmacol **3**: 189.
- Warwick, H. K., S. R. Nahorski and R. A. Challiss (2005). "Group I metabotropic glutamate receptors, mGlu1a and mGlu5a, couple to cyclic AMP response element binding protein (CREB) through a common Ca²⁺ - and protein kinase C-dependent pathway." J Neurochem **93**(1): 232-245.
- Wexler, N. S., J. Lorimer, J. Porter, F. Gomez, C. Moskowitz, E. Shackell, K. Marder, G. Penchaszadeh, S. A. Roberts, J. Gayan, D. Brocklebank, S. S. Cherny, L. R. Cardon, J. Gray, S. R. Dlouhy, S. Wiktorski, M. E. Hodes, P. M. Conneally, J. B. Penney, J. Gusella, J. H. Cha, M. Irizarry, D. Rosas, S. Hersch, Z. Hollingsworth, M. MacDonald, A. B. Young, J. M. Andresen, D. E. Housman, M. M. De Young, E. Bonilla, T. Stillings, A. Negrette, S. R. Snodgrass, M. D. Martinez-Jaurieta, M. A. Ramos-Arroyo, J. Bickham, J. S. Ramos, F. Marshall, I. Shoulson, G. J. Rey, A. Feigin, N. Arnheim, A. Acevedo-Cruz, L. Acosta, J. Alvir, K. Fischbeck, L. M. Thompson, A. Young, L. Dure, C. J. O'Brien, J. Paulsen, A. Brickman, D. Krch, S. Peery, P. Hogarth, D. S. Higgins, Jr. and B. Landwehrmeyer (2004). "Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3498-3503.

- Widmer, H. R. and F. Hefti (1994). "Neurotrophin-4/5 promotes survival and differentiation of rat striatal neurons developing in culture." Eur J Neurosci **6**(11): 1669-1679.
- Witjes-Ane, M. N., A. H. Zwinderman, A. Tibben, G. J. van Ommen and R. A. Roos (2002). "Behavioural complaints in participants who underwent predictive testing for Huntington's disease." J Med Genet **39**(11): 857-862.
- Yagita, K. and H. Okamura (2000). "Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts." FEBS Lett **465**(1): 79-82.
- Yamazaki, Y., S. Fujii, T. Nakamura, H. Miyakawa, Y. Kudo, H. Kato and K. Ito (2002). "Changes in [Ca²⁺]_i during adenosine triphosphate-induced synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons of the guinea pig." Neurosci Lett **324**(1): 65-68.
- Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen and T. L. Madden (2012). "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction." BMC Bioinformatics **13**: 134.
- Yoshihara, M., B. Adolfsen and J. T. Littleton (2003). "Is synaptotagmin the calcium sensor?" Curr Opin Neurobiol **13**(3): 315-323.
- Young, A. B. (2003). "Huntingtin in health and disease." J Clin Invest **111**(3): 299-302.
- Zheng, D., K. Zhao and M. F. Mehler (2009). "Profiling RE1/REST-mediated histone modifications in the human genome." Genome Biol **10**(1): R9.
- Zuccato, C., N. Belyaev, P. Conforti, L. Ooi, M. Tartari, E. Papadimou, M. MacDonald, E. Fossale, S. Zeitlin, N. Buckley and E. Cattaneo (2007). "Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease." J Neurosci **27**(26): 6972-6983.
- Zuccato, C., M. Tartari, A. Crotti, D. Goffredo, M. Valenza, L. Conti, T. Cataudella, B. R. Leavitt, M. R. Hayden, T. Timmusk, D. Rigamonti and E. Cattaneo (2003). "Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes." Nat Genet **35**(1): 76-83.
- Zuccato, C., M. Valenza and E. Cattaneo (2010). "Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease." Physiol Rev **90**(3): 905-981.

9. ANEXOS

9.1 – Anexo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Investigação do papel do receptor metabotrópico de glutamato tipo 5 (mGluR5) na doença de Huntington", protocolo do CEUA: 234/2016 sob a responsabilidade de Fabiola Mara Ribeiro que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 20/09/2016.

Vigência do Projeto	25/09/2016 a 01/09/2020
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico7
Nº de animais	68
Peso/Idade	30g / 3(meses)
Sexo	feminino
Origem	The Jackson Laboratory
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout8
Nº de animais	34
Peso/Idade	30g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	The Jackson Laboratory
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico9
Nº de animais	85
Peso/Idade	30g / 3(meses)
Sexo	feminino
Origem	Bioterio F2
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico10
Nº de animais	85
Peso/Idade	30g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Bioterio F2
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico11
Nº de animais	13
Peso/Idade	30g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Bioterio F2
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico12
Nº de animais	12
Peso/Idade	30g / 2(meses)
Sexo	feminino

Origem	Bioterio F2
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico13
Nº de animais	13
Peso/Idade	30g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Bioterio F2
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico14
Nº de animais	12
Peso/Idade	30g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Bioterio F2
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico15
Nº de animais	13
Peso/Idade	30g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Bioterio F2
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico16
Nº de animais	12
Peso/Idade	30g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Bioterio F2
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico17
Nº de animais	13
Peso/Idade	30g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Bioterio F2
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico18
Nº de animais	12
Peso/Idade	30g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Bioterio F2

Considerações posteriores:

20/09/2016	<p>Protocolo Aprovado com Recomendação na reunião do dia 19/09/2016. Ressalta-se que a mesma respondeu ao questionamento 3, informando que "Nós não solicitamos 13 machos e 12 fêmeas para cada idade. Nós solicitamos 13 machos no total (para cada grupo), os quais serão submetidos a testes comportamentais dos 2 aos 12 meses e eutanasiados aos 12 meses para a realização dos testes bioquímicos e moleculares. E solicitamos um total de 12 fêmeas (para cada grupo), sendo que 6 serão utilizadas aos 2 meses de idade e 6 serão utilizadas aos 6 meses de idade para os testes moleculares e bioquímicos.". Entretanto, ao se verificar o que foi solicitado no item 3 do Formulário Eletrônico – Grupos de Animais – códigos 0012, 0014 e 0016, foram solicitadas apenas fêmeas com 2 meses de idade e não fêmeas com 2 e 6 meses de idade, como a pesquisadora afirmou na resposta da diligência. Portanto, pede-se maior cuidado em relação à clareza</p>
------------	--

dos grupos experimentais, bem como da correta definição do número de animais por grupo experimental em solicitações futuras, a fim de facilitar a compreensão do desenho experimental pelo avaliador, evitando diligências. Segundo a utilização do princípio dos 3 R's (redução do número de animais, substituição de técnicas e refinamento), recomendadas internacionalmente na pesquisa com uso de animais, adicionalmente, sugere-se a possibilidade de manutenção das fêmeas que não engravidarem e dos filhotes adicionais que nascerão do acasalamento entre os animais da prole 2 na colônia, caso possível, para evitar eutanásia de maior número de animais e haver disponibilidade de animais para outros trabalhos. Solicitamos à pesquisadora responsável, envio do relatório final da pesquisa para a CEUA-UFMG, informando o número real de animais utilizados e também o destino de todos os animais utilizados (incluindo fêmeas que não engravidarem e filhotes adicionais que nascerão do acasalamento entre os animais da prole 2).

Belo Horizonte, 06/10/2016.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2ª Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br