

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E**  
**FARMACOLOGIA**

**Avaliação do efeito da rapamicina sobre a neuroinflamação e neurodegeneração em modelo de excitotoxicidade induzido por injeção intraestriatal de ácido quinolínico**

**SORAYA WILKE SALIBA**

**BELO HORIZONTE**

**2014**

**SORAYA WILKE SALIBA**

**Avaliação do efeito da rapamicina sobre a neuroinflamação e neurodegeneração em modelo de excitotoxicidade induzido por injeção intraestriatal de ácido quinolínico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

**Belo Horizonte**

**2014**

043 Saliba, Soraya Wilke.  
Avaliação do efeito da rapamicina sobre a neuroinflamação e neurodegeneração em modelo de excitotoxicidade induzido por injeção intraestriatal de ácido quinolínico [manuscrito] / Soraya Wilke Saliba. - 2014.

98 f. ; il. ; 29,5 cm.

Orientador: Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Huntington, Doença de - Teses. 2. Rapamicina - Teses. 3. Ácido quinolínico - Teses. 4. Inflamação - Teses. 5. Fator neurotrófico. 6. Alvo da rapamicina em mamíferos. 7. Fisiologia - Teses. I. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

**"AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RAPAMICINA SOBRE A  
NEUROINFLAMAÇÃO E NEURODEGENERAÇÃO EM MODELO DE  
EXCITOTOXICIDADE INDUZIDO POR INJEÇÃO INTRAESTRIATAL  
DE ÁCIDO QUINOLÍNICO"**

**SORAYA WILKE SALIBA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **22 de maio de 2014**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**PROFA. DR<sup>a</sup>. FABIOLA MARA RIBEIRO**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DR<sup>a</sup>. JULIANA CARVALHO TAVARES**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

**Belo Horizonte, 22 de maio de 2014**

## **APOIO FINANCEIRO**

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) –  
Programa Pesquisador Mineiro – Processo número PPM-00372-13;

Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) / UFMG – Programa de Auxílio para a Pesquisa  
dos Recém-Doutores;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) –  
133761/2012-6;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte.”

*Isaac Newton*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, por tudo que me proporcionou até o momento, pelos ensinamentos, conselhos, discussões científicas, indicações, incentivo e confiança depositada em mim.

Ao professor Dr. Antônio Lúcio Teixeira, pelas discussões científicas e por proporcionar a possibilidade de realização dos experimentos descritos neste trabalho.

Aos professores Dr Helton Reis, Dr. Fabrício Moreira, Dra. Daniele Aguiar e Dra. Luciene Vieira, pela receptividade e conhecimentos compartilhados.

Aos professores Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes, Dra. Fabíola Ribeiro e Dr. Cândido Celso Coimbra por disponibilizar o uso de aparelhos nos seus respectivos laboratórios para a realização de alguns experimentos presente neste trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia, em especial a Isabel e Paula, pelo companheirismo, brincadeiras e ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de Neuropsicofarmacologia, Jivago, Pedro, Luara, Thércia e Ana Flávia, pelos cafezinhos, diversões e principalmente pelas discussões e conselhos intelectuais.

Às colegas Aline Miranda e Érica Marciano pelo tempo despendido em ensinamentos e auxílio.

Aos meus familiares, em especial minha mãe que é a minha base e meu incentivo, obrigado pela paciência e apoio. Aos meus irmãos, Leila, Gabriel e Juliana, e minha tia Márcia e Rodrigo, pelo incentivo, conselhos e apoio em todos os momentos da minha vida. Ao meu pai, que mesmo não tendo consciência se faz essencial a minha vida e a minha evolução.

Às amigas Tatiana, Mariana e Tutty, amigas do grupo Bernardão, do grupo Two e do Cefet, meu sincero agradecimento pelo incentivo, apoio, conselho e aos momentos de patuscada.

Aos grandes pesquisadores que me ajudaram a desenvolver o pensamento científico, em especial, ao Dr. Edward de Oliveira, Prof<sup>a</sup>. Jussara Júlia Campos, Prof. Alexandre Ferry, Alisson Luzia, Bruno Pereira, Maira Carneiro.

Aos funcionários técnico-administrativos Cíntia, Nilda, Jorge, Rinaldo, Webster e Wellington, pelo auxílio e atenção.

Ao Departamento de Farmacologia pela oportunidade

As agencias de fomento CNPq, FAPEMIG e PRPq-UFMG, pela concessão de bolsa e auxilio financeiro.

Muito Obrigada!!



## RESUMO

A doença de Huntington (DH) é uma patologia neurodegenerativa, autossômica dominante caracterizada por sintomas atribuídos à morte de neurônios estriatais e corticais. O mecanismo da neurodegeneração na DH parece estar relacionado com excitotoxicidade, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. A injeção intraestriatal de ácido quinolínico é conhecida por produzir alterações neuroquímicas e prejuízo motor similares à observada na DH. O processo excitotóxico pode induzir a produção de mediadores inflamatórios que são regulados por diversas vias de sinalização intracelular, como a via PI3K/mTOR. A ativação da via PI3K/mTOR participa da excitabilidade neuronal e captação de glutamato pelos astrócitos. No entanto, o papel exato de mTOR na excitotoxicidade atualmente não é compreendido. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da inibição do mTOR contra os danos causados no estriado pela administração única e unilateral de AQ (200 nmol) em camundongos. A rapamicina (0,2, 2, 20  $\mu$ M/250 nL volume) foi injetada 15 minutos antes da administração de AQ e avaliados a alteração motora, neurodegeneração e ativação glial (astrócitos e microglia) depois de 2 dias da administração de AQ. Os mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos foram avaliados após 8 horas da administração AQ. Uma única injeção de ácido quinolínico intraestriatal (200 nmol) diminuiu de forma significativa a coordenação motora, aumentou mediadores pró-inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) bem como aumentou a neurodegeneração no estriado ipsilateral quando comparado com o grupo controle negativo. Os resultados do tratamento farmacológico com rapamicina mostraram um perfil distinto entre as doses testadas. No parâmetro de produção de mediadores inflamatórios, todas as doses revertem a expressão de citocinas pró-inflamatórias e ainda a dose de 0,2  $\mu$ M aumentou a expressão da citocina anti-inflamatória, IL-10. Além disso, a menor dose de rapamicina reverteu a diminuição da marcação astrocitária induzida pela administração de AQ, além da melhora do perfil comportamental quando comparado ao grupo AQ. Os resultados do presente estudo demonstram que a inibição desta molécula reverte os efeitos excitotóxicos induzidos pela administração de AQ e sugerem o envolvimento de mTOR na patogenia da doença de Huntington. **Palavras-chave:** doença de Huntington, mTOR, rapamicina, ácido quinolínico, inflamação, fatores neurotróficos.

## ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a autosomal dominant neurodegenerative disorder, characterized by symptoms attributed to the death of striatal and cortical neurons in the brain. The mechanism of neurodegeneration in HD seems to be related to excitotoxicity, oxidative stress and mitochondrial dysfunction. The intrastriatal injection of quinolinic acid is known to produce neurochemical alterations and motor impairment similar to that seen in Huntington's disease. The excitotoxic process may induce the production of inflammatory mediators that are regulated by several signaling pathways, such as activation of the PI3K/mTOR pathway. PI3K/mTOR pathway participates in neuronal excitability and glutamate uptake by astrocytes, events that may contribute to hyperexcitability and neuronal excitotoxicity. However, the exact role of mTOR in excitotoxicity is not currently understood. The objective of this study was to investigate the effects of mTOR inhibition against damage caused by striatal administration of single and unilateral QA (200 nmol) in mice .Rapamycin (0,2, 2, 20  $\mu$ M/250 nL volume) was injected 15 minutes before the administration of QA and it was evaluated motility disorders, neurodegeneration and glial activation (astrocytes and microglia) 2 days after the administration of QA. Inflammatory mediators and neurotrophic factors were evaluated after 8 hours of QA administration. A single intrastriatal injection of QA (200 nmol) led to a significant decrease in motor coordination, increased mediators pro - inflammatory (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and increased neurodegeneration in the ipsilateral striatum compared with the negative control group. The results of pharmacological treatment with rapamycin showed a distinct profile among the tested doses. In inflammatory parameter, all doses reversed the expression of pro - inflammatory cytokines and even the dose of 0.2  $\mu$ M increased the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Furthermore, the lowest dose of rapamycin avoided the reduction of the astrocytic immunoreactivity induced by QA and reversed the motor impairment compared to the QA group. The results of this study provided evidence of the involvement of mTOR in the pathogenesis of Huntington's disease. **Keywords:** Huntington's disease, mTOR, rapamycin, quinolinic acid, inflammation, neurotrophics factors.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Alterações anatômicas cerebrais na DH.

**Figura 2:** Esquema das projeções GABA e glutamatérgicas no gânglio basal.

**Figura 3:** Via de produção do ácido quinolínico pela cascata das quinureninas.

**Figura 4:** Mecanismos do AQ no SNC que culminam na neurotoxicidade.

**Figura 5:** Via PI3K/Akt/mTOR.

**Figura 6:** Estrutura química da rapamicina

**Figura 7:** Local de administração da rapamicina e ácido quinolínico.

**Figura 8:** Programação de estudo da padronização do modelo de Huntington induzida pela administração de ácido quinolínico intraestriatal.

**Figura 9:** Desenho experimental do tratamento farmacológico com rapamicina.

**Figura 10:** Avaliação da alteração motora no 2<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias após administração de AQ (150, 200 ou 250 nmol) ou PBS (N= 7-8 animais/grupo). Valores são expressos como média do percentual do tempo (em segundos) em relação à leitura basal. \*p<0,001 e \*\*\*p<0,05 comparado com PBS (two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

**Figura 11:** Avaliação da alteração do peso corporal no 2<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias após administração de AQ (150, 200 ou 250 nmol) ou PBS (N = 7-8 animais/grupo). Valores são expressos como média do tempo (segundos) e erro padrão da média. Não houve diferença estatística entre os grupos (two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

**Figura 12:** Efeito de rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu$ M sobre a produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no estriado após 8 horas de administração de AQ 200 nmol (N = 6-7 animais / grupo). Valores expressos como média e erro

padrão da média. (A, C e E) Análise quantitativa do estriado contralateral das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , respectivamente. (B, D e F) Análise quantitativa do estriado ipsilateral das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , respectivamente. \*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.05$  comparado com veículo + PBS. #  $p < 0.001$  e ##  $p < 0.01$  comparado com veículo + AQ (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

**Figura 13:** Efeito do tratamento com rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  sobre a produção de interleucina -10 (IL-10) no estriado após 8 horas de administração de AQ 200 nmol (N= 6-7 animais / grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A) Análise quantitativa do estriado contralateral da citocina IL-10. (B) Análise quantitativa do estriado ipsilateral da citocina IL-10. \*\*  $p < 0.01$  comparado com veículo + PBS. ###  $p < 0.05$  comparado com veículo + AQ (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

**Figura 14:** Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  na produção de interleucina -2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-17A (IL-17A) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) no estriado após 8 horas de administração de AQ 200nmol (N= 6-7 animais / grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A, C, E e G) Análise quantitativa do estriado contralateral das citocinas IL-2, IL-4, IL-17A e IFN- $\gamma$ , respectivamente. (B, D, F e H) Análise quantitativa do estriado ipsilateral das citocinas IL-2, IL-4, IL-17A e IFN- $\gamma$ , respectivamente. \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.05$  comparado com veículo + PBS. (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

**Figura 15:** Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  na produção de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do fator de crescimento do nervo (NGF) no estriado após 8 horas de administração de AQ 200 nmol (N= 6-7 animais / grupo). Valores expressos como media e erro padrão da média. (A e C) Análise quantitativa do estriado contralateral de BDNF e NGF, respectivamente. (B e D) Análise quantitativa do estriado ipsilateral de BDNF e NGF, respectivamente. \*\*\* $p < 0.05$  comparado com veículo + PBS. (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

**Figura 16:** Avaliação da alteração motora no tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  (N= 8 animais/grupo). Valores são expressos como média da % do tempo (segundos) em relação ao basal e erro padrão da média. \* $p < 0.001$  e \*\* $p < 0.01$  comparado com veículo + PBS (two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

**Figura 17:** Avaliação da alteração do peso corporal no tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  (N= 8 animais/grupo). Valores são expressos como média do tempo (segundos) e erro padrão da média. Não houve diferença estatística entre os grupos (two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

**Figura 18:** Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  sobre a neurodegeneração estriatal contralateral usando a técnica de FJC (N= 5-8 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

**Figura 19:** Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  sobre a neurodegeneração estriatal ipsilateral usando a técnica de FJC (N= 5-8 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

**Figura 20:** Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  sobre a neurodegeneração estriatal ipsilateral pela análise do número de células por área (N= 5-8 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média \* $p < 0.001$  comparado com veículo + PBS, ## $p < 0.01$  comparado com veículo + AQ e §§ $p < 0.01$  comparado com rapa 2 + AQ (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

**Figura 21:** Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  na ativação de microglia estriatal contralateral (N= 3-4 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A) Fotografia representativa no aumento de 20x do Iba. (B) Análise quantitativa do Iba. Não houve diferença estatística entre os grupos (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

**Figura 22:** Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu$ M na ativação de microglia estriatal ipsilateral (N= 3-4 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A) Fotografia representativa no aumento de 20x do Iba. (B) Análise quantitativa do Iba. Não houve diferença estatística entre os grupos (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

**Figura 23:** Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu$ M na proliferação astrocitária estriatal contralateral (N= 5-8 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A) Fotografia representativa no aumento de 20x do GFAP. (B) Análise quantitativa do GFAP. ###  $p < 0,05$  comparado com veículo + AQ (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

**Figura 24:** Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu$ M na proliferação astrocitária estriatal ipsilateral (N= 5-8 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A) Fotografia representativa no aumento de 20x do GFAP. (B) Análise quantitativa do GFAP. ###  $p < 0,05$  comparado com veículo + AQ (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

**Figura 25:** Avaliação da liberação de glutamato no sinaptossoma estriatal após estímulo com ácido quinolínico nas doses 0,1, 0,5, 5 e 10 mM (N= 2 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. \*\*  $p < 0,01$  comparado com PBS. #  $p < 0,001$  e ##  $p < 0,01$  comparado com AQ 10mM (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

**Figura 26:** Avaliação da liberação de glutamato no sinaptossoma estriatal após tratamento com rapamicina nas doses 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,05, 0,25, 2,5, 25, 100 nM e estímulo com AQ 5 mM (N= 3 -10 sinaptossomas/grupo). Valores expressos como % da média de liberação de glutamato em relação ao AQ e erro padrão da média. #  $p < 0,001$  e ###  $p < 0,01$  comparado com AQ 5 mM. (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Resumo dos resultados obtidos no tratamento com rapamicina seguido do estímulo com AQ em camundongos da linhagem C57Bl/6.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	ácido araquidônico
<b>AAN</b>	Academia Americana de Neurologia
<b>AKT</b>	proteína quinase B
<b>AMPA</b>	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
<b>ANOVA</b>	análise de variância
<b>AQ</b>	ácido quinolínico
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>BDNF</b>	fator neurotróficos derivado do cérebro
<b>BSA</b>	albumina sérica bovina
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	cloreto de cálcio
<b>CAG</b>	citossina-adenina-guanina
<b>CBA</b>	<i>cytometric Bead Array</i>
<b>cdk2</b>	quinase dependente de ciclina
<b>CEBIO</b>	Centro de Bioterismo
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>COX</b>	ciclo-oxigenase
<b>DA</b>	doença de Alzheimer
<b>DH</b>	doença de Huntington
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DP</b>	doença de Parkinson
<b>EAAC1</b>	transportador de aminoácidos excitatórios 1
<b>EAAT1-5</b>	transportador de aminoácidos excitatórios 1
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELA</b>	esclerose lateral amiotrófica
<b>eIF2B</b>	fator de iniciação eucariótica 2B
<b>FJC</b>	fluoro Jade C
<b>FoxO-1</b>	fatores de transcrição "Forkhead"
<b>GABA</b>	ácido gama aminobutírico
<b>GDH</b>	glutamato desidrogenase
<b>GFAP</b>	proteína glial fibrilar ácida



<b>GLAST</b>	transportador de glutamato aspartato
<b>GLT1</b>	transportador de glutamato do tipo 1
<b>GLU</b>	glutamato
<b>GSK-3</b>	glicogênio sintase 3-quinase
<b>GβL</b>	“proteína semelhante a subunidade β da proteína G” ( <i>protein β-subunit-like</i> )
<b>h</b>	hora
<b>htt</b>	proteína huntingtina
<b>Iba-1</b>	molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biológicas
<b>IFN-γ</b>	interferon gama
<b>IGF-1</b>	fator de crescimento semelhante a insulina
<b>IL</b>	interleucina
<b>iNOS</b>	óxido nítrico-sintase induzível
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>KRH</b>	<i>krebs-HEPES-Ringer</i>
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeo
<b>MAPK</b>	proteínas quinases ativadas por mitógeno
<b>mg/kg</b>	miligrama por quilo
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	sulfato de magnésio
<b>mGluR1-7</b>	receptores metabotrópicos
<b>mhtt</b>	proteína mutante
<b>min</b>	minuto
<b>mm</b>	milímetro
<b>mM</b>	milimolar
<b>mPGES-1</b>	prostaglandina E sintase-1 microsomal
<b>mTOR</b>	alvo da rapamicina em mamíferos
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase
<b>NaOH</b>	hidróxido de sódio
<b>NF-κB</b>	fator nuclear kappa B
<b>NGF</b>	fator de crescimento do nervo

<b>nL</b>	nanolitro
<b>nm</b>	nanometro
<b>NMDA</b>	N-metil D-Aspartato
<b>nmol</b>	nanomol
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>PBS</b>	solução tampão de fosfato
<b>pdk</b>	quinase fosfatidilinositol dependente
<b>PFA</b>	paraformaldeído
<b>PG</b>	prostaglandinas
<b>pg/mg</b>	picograma por miligrama
<b>PIP2</b>	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
<b>PIP3</b>	fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
<b>PI3K</b>	fosfatidilinositol 3-quinase
<b>PTEN</b>	fosfatase homóloga a tensina
<b>p70S6K</b>	“ proteína quinase 1 ribossomal S6” ( <i>ribosomal S6 protein kinase 1</i> )
<b>PMSF</b>	fluoreto de fenilmetilsulfonila
<b>Rapa</b>	rapamicina
<b>Raptor</b>	proteína reguladora associada ao mTOR
<b>Rheb</b>	Ras enriquecida no cérebro
<b>Rictor</b>	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
<b>RNA<sub>m</sub></b>	ácido ribonucleico mensageiro
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>Ser</b>	serina
<b>SDH</b>	enzima succinato desidrogenase
<b>Sin1</b>	proteína interativa 1 de proteína quinase ativada por estresse
<b>SNC</b>	sistema nervoso central
<b>TBS</b>	solução tampão tris
<b>Thr</b>	treionina
<b>TNF- α</b>	fator de necrose tumoral alfa
<b>TSC1-2</b>	complexos da esclerose tuberosa
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>µm</b>	micrometro

<b>μM</b>	micromolar
<b>μL</b>	microlitro
<b>°C</b>	graus Celsius
<b>4E-BP1</b>	proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Doença de Huntington .....	22
1.2. Modelo excitotóxico de doença de Huntington pela administração de ácido quinolínico .....	27
1.2.1. Excitotoxicidade .....	27
1.2.2. Ácido quinolínico .....	29
1.3. Neuroinflamação .....	33
1.4. Papel da via PI3K/AKT/mTOR.....	34
1.4.1 Rapamicina .....	38
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivo geral .....	41
2.2. Objetivos específicos.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	43
3.1. Aspectos éticos.....	43
3.2. Animais .....	43
3.3. Drogas .....	43
3.4. Cirurgia estereotáxica para implantação da cânula guia.....	43
3.5. Microinjeção das drogas .....	44
3.6. Testes comportamentais .....	46
3.6.1. Massa corporal .....	46
3.6.2. Rotarod.....	46
3.7. Avaliação bioquímica.....	46
3.7.1 Quantificação dos níveis de fatores neurotróficos e citocinas no estriado.....	46
3.7.2. Imunofluorescência.....	47

3.7.2.1. Retirada e corte do cérebro .....	47
3.7.2.2. Morte neuronal.....	47
3.7.2.3. Ativação de células gliais .....	48
3.8. Sinaptossoma.....	48
3.8.1. Isolamento do sinaptossoma .....	48
3.8.2. Liberação de glutamato no estriado .....	49
3.9. Análise dos dados.....	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1. Padronização do modelo excitotóxico da doença de Huntington induzido por administração unilateral de ácido quinolínico no estriado.....	50
4.2. Avaliação do efeito do tratamento com rapamicina na produção de mediadores inflamatórios.....	52
4.3. Avaliação do efeito do tratamento com rapamicina na produção de fatores neurotróficos .....	57
4.4. Avaliação do efeito do tratamento com rapamicina na alteração motora e peso corporal.....	58
4.5. Efeito da rapamicina na neurodegeneração estriatal.....	59
4.6. Efeito da rapamicina sobre a ativação microglial .....	63
4.7. Efeito do tratamento com rapamicina sobre a ativação astrocitária .....	66
4.8. Padronização do modelo de liberação de glutamato por sinaptossoma induzido por aq.....	69
4.9. Avaliação do tratamento com rapamicina na liberação de glutamato pelo sinaptossoma .....	70
4.10. Resumo dos resultados <i>in vivo</i> .....	71
5. DISCUSSÃO .....	72
6. CONCLUSÃO .....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Doença de Huntington

A doença de Huntington (DH), também conhecida como coréia de Huntington ('*khoreia*' é a palavra grega para "dança"), foi descrita pela primeira vez em 1872 pelo neurologista George Huntington que identificou as características clínicas da doença e o perfil de transmissão familiar. As caracterizações genéticas foram descritas a partir de 1993, quando o grupo *Hereditary Disease Foundation* identificou uma expansão instável do triplete CAG (citosina-adenina-guanina), na região codificante (exon 1) do gene *HD* (do inglês, Huntington's disease) ou *htt* que codifica a proteína huntingtina (*htt*) (Gil-Mohapel et al. 2011, Hall 1954). Assim, DH é caracterizada como uma doença neurodegenerativa autossômica dominante causada pela expansão de poliglutamina (CAG) no gene que codifica a proteína huntingtina.

A proteína *htt*, em condições normais, contribui para transporte vesicular e a transmissão sináptica e, como tal, é altamente expressa em dendritos e terminais nervosos (Kraft et al. 2012). Na DH, a proteína mutante (*mhtt*) contém mais do que 40 repetições de glutamina, sendo que de trinta e seis a 40 repetições de glutamina estão associados a uma progressão mais lenta da patologia. O número de repetições de CAG está diretamente relacionado com a gravidade da doença (Bano et al. 2011). A proteína *mhtt* está associada, direta ou indiretamente, às disfunções intracelulares que levam a neurodegeneração observada na DH, como os mecanismos de excitotoxicidade, desregulação metabólica, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, apoptose e autofagia (Clabough 2013, Gil-Mohapel et al. 2011, Heng et al. 2009, Vonsattel 2008).

Atualmente, a DH é uma doença rara que apresenta uma prevalência de cerca de 2,71 por 100.000 pessoas ao ano (Pringsheim et al. 2012) entre indivíduos entre 35 e 50 anos, sendo que após a manifestação da doença, a média de vida do paciente é de cerca de 15 a 20 anos. Pacientes que apresentam a doença precocemente, isto é, abaixo de 20 anos de idade, chamado de DH juvenil,

apresentam o desenvolvimento dos sinais e sintomas mais rapidamente e levam a morte em cerca de 10 anos (van Dijk et al. 1986).

O diagnóstico da DH é feito através de exame genético que determina o número de repetições de poliglutamina e é complementado com observações dos sinais e sintomas da doença e histórico familiar (Zuhlke and Thies 1996).

Os principais sinais e sintomas de DH são alterações motoras, em que se observam movimentos anormais, involuntários e breves dos braços, das pernas, da face e/ou do tronco (coreia) e, nos estágios mais avançados da doença, observa-se bradicinesia, lentidão anormal dos movimentos voluntários e rigidez intensa. Os pacientes com DH também apresentam alterações cognitivas, envolvendo déficit no aprendizado espacial e memória de trabalho, e psíquicas, como alteração da personalidade e depressão (Bano et al. 2011, Lange et al. 1995, Lawrence et al. 1996, Roze et al. 2011). Além disso, grande parte dos pacientes desenvolve caquexia, estado patológico caracterizado por extrema magreza.

Em um nível celular, a DH é caracterizada principalmente pela degeneração de neurônios estriatais e corticais (Figura 1). Outras áreas cerebrais também são afetadas no decorrer da doença como as áreas do globo pálido, tálamo, hipotálamo, substância nigra e cerebelo (Chen et al. 2013a, Clabough 2013). O conjunto destas áreas é chamado de gânglios da base e estão envolvidos em função motora, cognitiva, associativa e mnemônica (Bolam et al. 2000). A alteração destas estruturas cerebrais na DH podem levar a redução da massa cerebral em cerca de 25 a 30% (Roze et al. 2011).

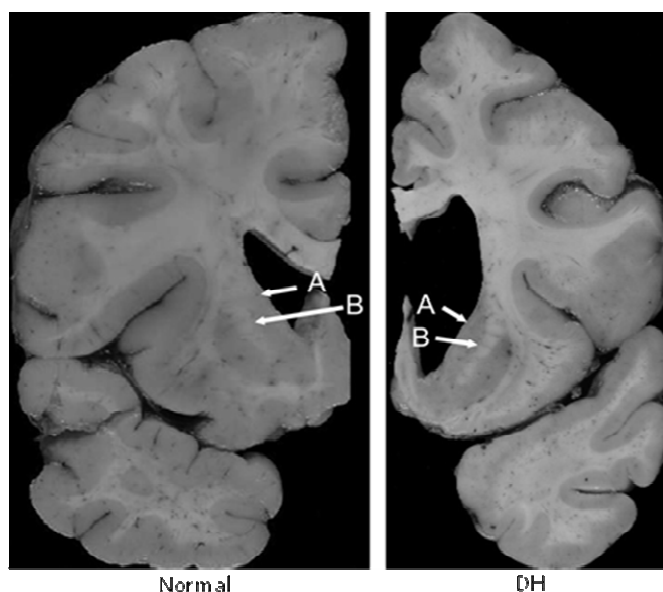


Figura 1: Alterações anatômicas cerebrais na DH. A) Aumento ventricular. B) Diminuição estriatal (Hadzi et al. 2012).

O estriado é constituído em sua maior parte (90 a 95%) por neurônios espinhosos médios que tem como principal neurotransmissor o ácido gama aminobutírico (GABA) e neuropeptídeos encefalina, neurotensina, substância P ou dinorfina (Baez-Mendoza and Schultz 2013, Bolam et al. 2000).

O neurotransmissor GABA, que se encontra diminuído na DH, tem um papel importante na gênese da coreia. Isso ocorre, porque o GABA é um neurotransmissor inibitório, que controla o sistema dopaminérgico. Quando ocorre a diminuição de neurônios GABAérgicos na região estriatal, há um desequilíbrio da atividade dopaminérgica e assim seu reflexo nos movimentos de pacientes com DH. Crossman e colaboradores, em 1988, realizaram um estudo em macacos e observaram que a injeção de bicuculina, um antagonista do GABA, na parte lateral do globo pálido ou na parte medial do putâmen e no núcleo subtalâmico, induzem movimentos coreicos. Baseado neste estudo, esses autores propõem que a interrupção da via gabaérgica estriado-palidal é a causa básica do aparecimento da coréia (Crossman et al. 1988).



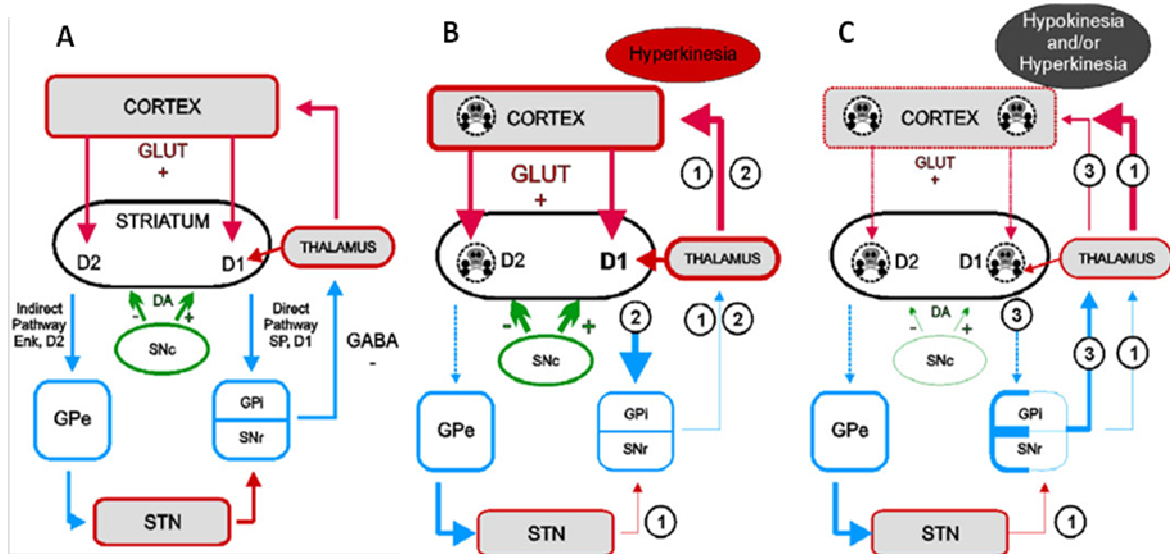


Figura 2: Esquema das projeções GABA e glutamatérgicas no gânglio basal. A) Paciente normal. B) Paciente com DH estágio inicial. C) Paciente com DH estágio avançado. Azul: neurônios GABAérgicos. Vermelho: neurônios glutamatérgicos (GLUT). Verde: neurônios dopaminérgicos (DA). GPe: globo pálido externo. GPi: globo pálido interno. SNc: substância nigra pars compacta. SNr: substância nigra reticulada. STN: núcleo subtalâmico. SP: substância P. Enk: encefalina (Andre, Cepeda and Levine 2010).

Além das projeções GABAérgicas no estriado, esta região também recebe projeções glutamatérgicas (GLU) de todas as áreas corticais e talâmicas (Figura 2). A hiperativação destas projeções glutamatérgicas resulta em excitotoxicidade (Clabough 2013, Miller and Bezprozvanny 2010, Vonsattel 2008).

A função motora é controlada pelo circuito gânglio basal que é dividido em via direta e via indireta (Figura 2A). A harmonia dos movimentos se dá pelo equilíbrio da via direta e da via indireta. A via direta provoca a desinibição do tálamo e, por consequência, o aumento da ativação do córtex motor. A desinibição talâmica é devida à ação inibitória dos neurônios Gabaérgicos do estriado no globo pálido interno e na substância nigra reticular que, então, deixam de inibir o tálamo. Já a via indireta desinibe o núcleo subtalâmico e, assim, inibe o tálamo e diminui a atividade do córtex motor, através da inibição do globo pálido externo pelos neurônios GABAérgicos do estriado. O subtálamo desinibido passa a excitar o globo pálido

interno que tem ação inibitória sobre o tálamo. Assim, o tálamo inibido deixa de ativar o córtex motor e este terá menor atividade. No início de DH (Figura 2B), disfunção cortical induz a liberação excessiva de glutamato no estriado que resulta na perda, principalmente, de neurônios espinhosos médios. A morte destes neurônios leva a um desequilíbrio entre as vias direta e indireta culminando no sintoma de hipercinesia. Nos estágios mais avançados da DH (Figura C), dependendo do estágio da neurodegeneração no estriado ocorre a disfunção das vias direta e indireta, podendo resultar em hipocinesia ou hipercinesia (Andre et al. 2010).

Hoje em dia, não existe cura para a DH e os medicamentos disponíveis apenas atenuam alguns sinais e sintomas da doença. A Academia Americana de Neurologia (AAN) publicou um guia para o tratamento da coreia na DH, no qual são propostos o uso de inibidores do transportador de monoaminas vesicular que ocasionam a depleção sináptica de catecolaminas como a tetrabenazina e clozapina; os antagonistas de receptores glutamatérgicos, como amantadina ou o inibidor da liberação de glutamato, como riluzol. Também são prescritos benzodiazepínicos e antidepressivos para as alterações psíquicas, como risperidona, olanzapina, haloperidol e aripiprazol e medicamentos que alteram o metabolismo energético como coenzima Q10. Efeitos secundários podem aparecer no decorrer do uso destes medicamentos como sedação e diminuição do funcionamento cognitivo (Armstrong and Miyasaki 2012, Reilmann 2013).

Uma vez que o tratamento atual da DH é apenas para amenizar os sintomas, a busca de novos alvos farmacológicos vem sendo estudada. Assim, modelos *in vitro* e *in vivo* por alteração genéticos ou administração de substâncias químicas são utilizados para investigar os mecanismos patológicos da DH, a fim de se obter uma melhor compreensão da doença (Ramaswamy, McBride and Kordower 2007, Ribeiro et al. 2013, Schlachetzki, Saliba and de Oliveira 2013).

Os modelos animais genéticos são usados para a investigação da expressão anormal da proteína mhtt nos processos fisiológicos. Assim, são manipulados animais com alteração genética da proteína mhtt que variam o número de

poliglutaminas, por exemplo, os modelos com os animais R6/2 (115-156 CAG), N171-82Q (82 CAG), YAC128 (128 CAG) e BACHD (97 CAG), e animais knock-in, como Hdh<sup>Q97/Q97</sup>, Hdh<sup>Q111/Q111</sup> e Hdh<sup>Q150/Q150</sup>, com 97, 111 e 150 repetições respectivamente (Bates et al. 1997, Ribeiro et al. 2013).

Modelos não genéticos, que visam a investigação de processo bioquímico decorrente da doença também são usados para melhor compreensão da DH. Tanto em cultura neuronal quanto a administração local em animais, a injeção aguda das substâncias químicas 3-nitropropiónico, uma toxina mitocondrial exógena, e ácido quinolínico, um agonista de receptor N-metil D-Aspartato (NMDA) endógeno, podem mimetizar algumas mudanças neuroanatômicas e induzir o déficit comportamental verificado nesta doença neurológica (Schlachetzki et al. 2013).

## **1.2. Modelo excitotóxico de doença de Huntington pela administração de ácido quinolínico**

### **1.2.1. Excitotoxicidade**

A excitotoxicidade é um importante processo biológico que é caracterizado pela intensa estimulação neuronal por glutamato. Esta estimulação exagerada por glutamato induz um excessivo influxo de íons cálcio, desencadeando a ativação de diversas enzimas, e como consequência, morte celular. O processo de excitotoxicidade está associado a algumas doenças como em acidente vascular cerebral, lesão cerebral traumática, esclerose múltipla, DA, epilepsia, DP e DH (Gasparini and Griffiths 2013, Lynch and Guttman 2002, Miller and Bezprozvanny 2010, Schwarcz, Whetsell and Mangano 1983).

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no cérebro (Gasparini and Griffiths 2013) e está envolvido em uma variedade de processos fisiológicos, tais como aprendizado, memória e formação de redes neuronais durante o desenvolvimento (Kumar, Kalonia and Kumar 2010, Ozawa, Kamiya and Tsuzuki 1998, Simeone, Sanchez and Rho 2004). Os efeitos do glutamato são mediados por receptores ionotrópicos ou metabotrópicos tais como do tipo cainato, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) e N-metil D-Aspartato (NMDA). O processo excitotóxico é resultante de uma cascata de eventos que levam a morte

neuronal e é desencadeada pela excessiva ativação dos receptores de NMDA, em sua grande maioria, ou AMPA.

A excitotoxicidade se inicia quando o glutamato é liberado pelos neurônios pré-sinápticos que ativam os receptores ionotrópicos de glutamato presentes no neurônio pós-sinápticos, resultando no influxo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  na célula. Com isso, ocorre a despolarização da membrana, abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes, liberando assim, mais glutamato e diminuindo ou inibindo a recaptação de glutamato por seu transportador. A liberação excessiva do neurotransmissor glutamatérgico leva a ativação de receptores metabotrópicos (mGluR1-7) que também aumentam o cálcio intracelular, via retículo endoplasmático. A entrada de íons sódio contribui ainda mais para o influxo de cálcio ao estimular a bomba sódio-cálcio. O influxo excessivo de cálcio gera uma disfunção mitocondrial e subsequente formação de radicais livres. Todos estes mecanismos culminam na morte neuronal (Colton et al. 2010).

Diferentes estudos demonstram que na DH ocorre um aumento de glutamato na região estriatal devido à redução da recaptação de glutamato pela glia, especificamente pela baixa regulação do transportador de glutamato do tipo 1 GLT1, presente principalmente em astrócitos (Arzberger et al. 1997, Behrens et al. 2002, Comings et al. 1981, Hassel et al. 2008, Lievens et al. 2005, Lievens et al. 2001, Mangano and Schwarcz 1981). Além disso, ocorre diminuição da expressão de glutamina sintetase, enzima que converte glutamato em glutamina na glia (Behrens et al. 2002, Lievens et al. 2001) e alteração da expressão de receptores de glutamato (Cha et al. 1999, Cha et al. 1998, Greenamyre et al. 1985).

Coyle (1976) e McGeer (1976) e seus colaboradores desenvolveram os primeiros modelos de DH por excitotoxicidade, em que examinaram os efeitos de injeção intraestriatal de ácido caínico em ratos, agonista glutamatérgico (Coyle and Schwarcz 1976, McGeer and McGeer 1976). Esta injeção causou alterações neuroquímicas, histológicas e comportamentais semelhantes aquelas presente em pacientes em HD. As lesões no estriado podem ser induzidas por meio de outros análogos de glutamato, tais como ácido ibotênico e ácido quinolínico (Beal et al. 1986, Isacson et al. 1984, Schwarcz et al. 1981).

### 1.2.2. Ácido quinolínico

O ácido quinolínico (AQ), ou ácido piridina 2,3-dicarboxílico, é um metabólito do triptofano pela via das quinureninas (Figura 3). No sistema nervoso central (SNC), está presente principalmente nas células microgliais na concentração de nanomolar (Chen and Guillemin 2009, Lugo-Huitron et al. 2013, Perez-De La Cruz, Carrillo-Mora and Santamaria 2012, Schwarcz and Pellicciari 2002). Elevadas concentrações de AQ induzem excitotoxicidade e morte neuronal, bem como alterações na produção de fatores neurotróficos e mediadores inflamatórios. O AQ tem sido associado com a patogênese de determinadas doenças e distúrbios neurodegenerativos, incluindo a DA, ELA, DH, autismo e depressão (Lugo-Huitron et al. 2013).

A primeira evidência de que quinureninas podem exercer um papel neurotóxico no cérebro foi descrita por Lapin em 1978, que observou convulsões em ratos após a injeção intracerebroventricular de AQ (Lapin 1978). Em 1981, Stone e Perkins demonstraram que AQ exerce um papel excitatório no SNC, agindo como um agonista do receptor NMDA (Stone and Perkins 1981).

A primeira correlação entre AQ e a DH foi observada por Schwarcz e colaboradores (1983) que demonstraram que AQ produzia lesões neuronais no estriado resultando em alterações neuroquímica, comportamental e patológica semelhantes à DH (Schwarcz et al. 1983). Estudo *post mortem* de cérebros de pacientes com DH mostrou um aumento da enzima conversora da quinurenina para AQ, ácido 3-hidroxiantranílico oxigenase (Kohler et al. 1988). Trabalhos posteriores também relataram o aumento nas concentrações de intermediários da via da quinurenina no cérebro de pacientes acometidos com a DH (Connick et al. 1989, Connick et al. 1988, Pearson and Reynolds 1992, Schwarcz et al. 1988).

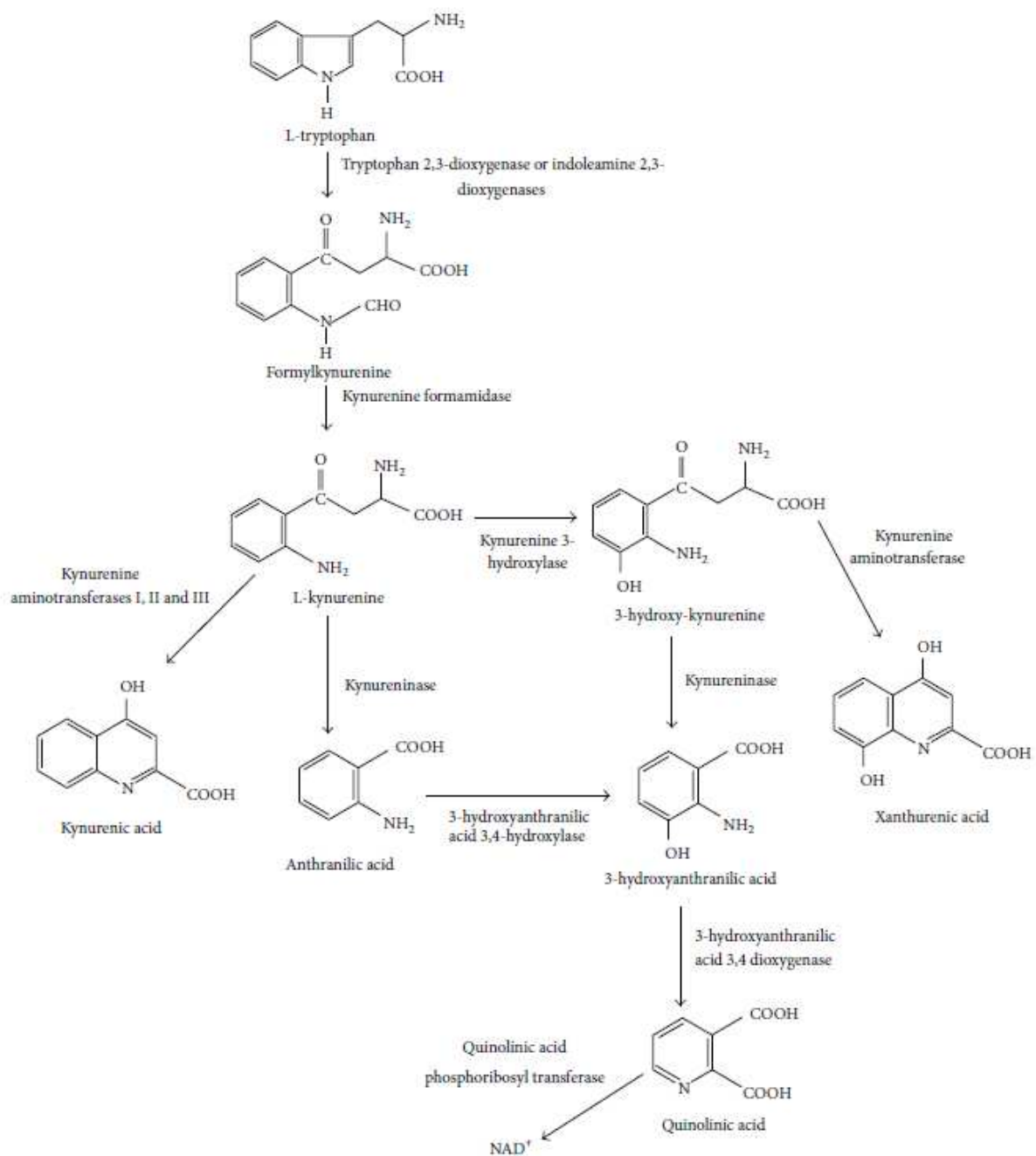


Figura 3: Via de produção do ácido quinolínico pela cascata das quinureninas (Lugo-Huitrón et al., 2013).

Considerando que o AQ é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Lugo-Huitrón et al., 2013), nos modelos experimentais de DH, o AQ é administrado diretamente no estriado. A administração bilateral de AQ em ratos induz alterações motoras e cognitivas, bem como a atrofia do tecido estriatal e a dilatação ventricular

(Shear et al. 1998, Block, Kunkel and Schwarz 1993, Sanberg et al. 1989, Popoli et al. 1994). A administração unilateral de AQ em ratos também demonstra perda neuronal na área estriatal e alterações comportamentais (Macaya and Burke 1992, Topper et al. 1993, Vecsei and Beal 1991, Kalonia and Kumar 2011, Kalonia, Kumar and Kumar 2011b, Kalonia, Kumar and Kumar 2011a). Além disso, AQ induz a perda de neurônios GABAérgicos, pois afeta os neurônios espinhosos médios do estriado, reproduzindo o que se observa na DH. Assim, a injeção intraestriatal de AQ tem sido utilizada como um bom modelo de neurotoxicidade para a DH, mimetizando os sintomas observados no estágio inicial da doença, como a hiperatividade.

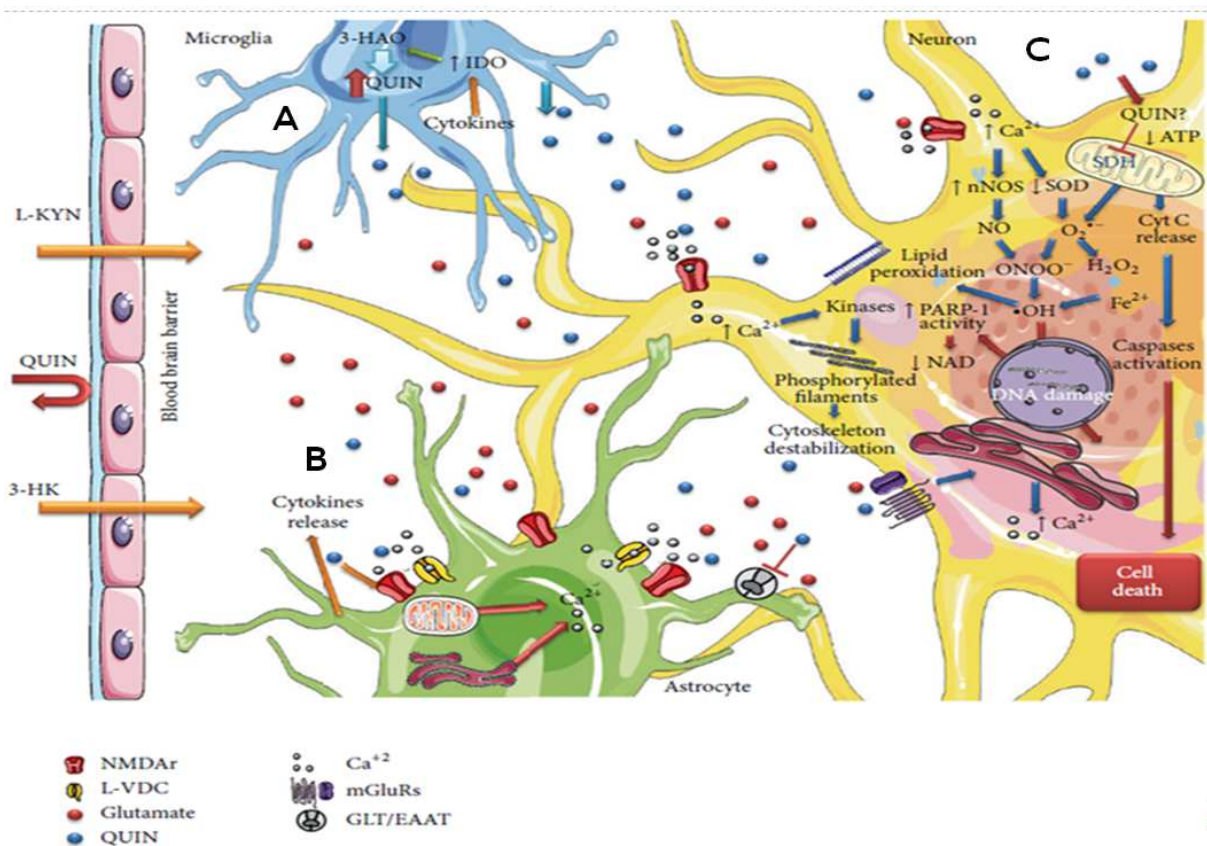


Figura 4: Mecanismos do AQ no SNC que culminam na neurotoxicidade. A) Síntese de AQ no SNC pela microglia. B) AQ liberado no SNC leva a inibição da recaptação de glutamato e liberação de citocinas por astrócitos. C) AQ liberado no SNC leva a disfunção mitocondrial que resulta na ativação de caspases e produção de radicais livres que culminam na morte neuronal (Lugo-Huitrón et al., 2013).

O AQ atua como agonista de receptor glutamatérgico do subtipo NMDA (de Carvalho, Bochet and Rossier 1996), A ativação destes receptores pelo AQ induz um aumento da liberação de glutamato e intenso aumento de influxo de cálcio em neurônios e astrócitos. Além do efeito excitotóxico de AQ (Figura 4), esta substância também está envolvida na inibição da recaptção de glutamato por astrócitos (Arzberger et al. 1997, Behrens et al. 2002, Comings et al. 1981, Connick and Stone 1988, Hassel et al. 2008, Lievens et al. 2005, Lievens et al. 2001, Mangano and Schwarcz 1981, Schwarcz et al. 1981, Tavares et al. 2002).

A remoção do glutamato na fenda sináptica é realizada por proteínas transportadoras de glutamato que estão presentes em diferentes células do SNC como neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células endoteliais. Cinco subtipos de transportadores de glutamato foram identificados: o transportador de aminoácidos excitatórios 1 (EAAT1) ou transportador de glutamato - aspartato (GLAST) (Storck et al., 1992); o EAAT2 ou transportador de glutamato -1 (GLT-1) (Pines et al., 1992); o EAAT3 ou EAAC1 (Kanai e Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman et al., 1995) e EAAT5 (Arriza et al., 1997). Porém, os principais transportadores de glutamato são EAAT1/GLAST e EAAT2/GLT-1 expressos em astrócitos, que contribuem para cerca de 90% da recaptção de glutamato. Assim, como descrito anteriormente, o AQ inibe a recaptção de glutamato na fenda sináptica, por inibir os transportadores em astrócito.

Dados na literatura mostram que a injeção intraestriatal de AQ altera o metabolismo energético pelo influxo excessivo de cálcio. Assim ocorre a disfunção mitocondrial em que diminui o processo da respiração celular, reduzindo principalmente a atividade dos complexos II, II-III e III e inibindo a enzima succinato desidrogenase (SDH). Além disso, também diminuiu os níveis de ATP e aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica (Behan et al. 1999, Rios and Santamaria 1991).

Eventos inflamatórios também estão associados à toxicidade induzida por AQ. A microglia, célula responsável por respostas inflamatórias no SNC, também produz e secreta AQ. Durante o processo inflamatório, os níveis de AQ aumentam



principalmente devido ao aumento na taxa de síntese. Assim, o contrário também ocorre, isto é, o insulto excitotóxico de AQ pode desencadear a ativação de microglia e por consequência, a produção de mediadores inflamatórios e alteração nos fatores neurotróficos. Estudos mostram que a administração intraestriatal de AQ em modelos de ratos induz a expressão das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 que podem ser atenuados através da inibição da COX-2 (Kalonia and Kumar 2011, Kalonia et al. 2011a, Kalonia et al. 2011b, Kalonia, Mishra and Kumar 2012, Schiefer et al. 1998).

Assim, todos esses eventos decorrentes da substância neurotóxica AQ estão de alguma forma intimamente relacionados e também agem sinergicamente culminando na neurodegeneração.

### **1.3. Neuroinflamação**

A neuroinflamação é um importante processo na resolução ou progressão de condições patológicas. A resposta inflamatória é caracterizada pela vasodilatação local, o aumento da permeabilidade capilar e a infiltração de células de defesa. No SNC, a resposta inflamatória é mediada por células gliais, em especial a microglia (Bettcher and Kramer 2013, Wyss-Coray and Mucke 2002, Honig 2000). Durante um insulto no SNC, estas células adquirem uma morfologia amebóide com capacidade de migrar, proliferar e fagocitar. A microglia ativada é responsável pela liberação de quimiocinas, citocinas e fatores neurotróficos. Em seu estado inativo, a microglia apresenta várias ramificações com prolongamentos irregulares e reduzido corpo celular (Kettenmann et al. 2011, Ginhoux et al. 2013).

Estímulos como infecção, lesão ou degeneração no SNC desencadeiam a ativação e proliferação microglial que liberam fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos, incluindo citocinas, radicais livres, óxido nítrico e eicosanóides. O objetivo inicial desta ativação é reparar o dano. Porém, a ativação contínua da microglia no SNC pode levar a lesão subsequente de neurônios e células gliais (Hurley and Tizabi 2013).

Existem crescentes evidências na literatura que a inflamação no SNC está envolvida na patogênese das doenças neurodegenerativas como ELA, DA, DH e DP (Jha, Jeon and Suk 2012, Lima et al. 2012).

Em modelos animais de DH, a ativação microglial e a alteração da expressão de mediadores inflamatórios vêm sendo relatada e associada com a progressão subclínica da doença (Tai et al. 2007, Topper et al. 1993, Leaver et al. 2012, Pavese et al. 2006, Kraft et al. 2012, Bethea et al. 1999, Fouda et al. 2013, Ryu, Choi and McLarnon 2005, Ryu, Choi and McLarnon 2006, Sharma et al. 2011).

O envolvimento da neuroinflamação no modelo animal de DH vem sendo comprovada pelos estudos com inibidores de ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, que mostram que o tratamento com estes anti-inflamatórios melhoram as alterações do peso corporal, comportamento e bioquímicas geradas pela administração de ácido quinolínico (Kalaria et al. 2010, Kalaria et al. 2009b, Kalaria et al. 2009a, Dairam, Muller and Daya 2007, Dairam, Chetty and Daya 2006, Salzberg-Brenhouse et al. 2003, Kalaria and Kumar 2011, Kalaria et al. 2011b).

#### **1.4. Papel da via PI3K/Akt/mTOR**

As fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) são uma família de proteínas envolvidas nos processos de regulação do crescimento celular, metabolismo, proliferação, homeostase da glicose, no tráfico de vesícula e inflamação (Carracedo and Pandolfi 2008).

A ativação da enzima PI3K (Figura 5), por diversos estímulos como o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), leva a fosforilação de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) para gerar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Em sequência, PIP3 se liga à uma das isoformas da Akt (também conhecida com PKB) e facilita a sua fosforilação no terminal treonina (Thr<sup>308/309/305</sup>) e serina (Ser<sup>273/474/472</sup>), respectivamente da Akt1, Akt2 ou Akt3, pela quinase fosfatidilinositol dependente (PDK) 1 e 2 (Wang, Pan and Chen 2012). Uma vez ativada, a Akt é capaz de fosforilar e inibir o glicogênio sintase 3-quinase (GSK-3), levando ao aumento da

síntese protéica por aumentar a atividade do fator de iniciação eucariótica 2B (eIF2B).

A Akt inibe os complexos da esclerose tuberosa (TSC) 1 e 2 que por sua vez inibe o Ras enriquecida no cérebro (Rheb), levando a ativação do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Ao ser ativada, a mTOR se associa a proteína reguladora associada ao *mTOR* (raptor) e a “proteína semelhante a subunidade  $\beta$  da proteína G” (*G protein  $\beta$ -subunit-like protein* - G $\beta$ L) formando o complexo mTORC1, que ativa “proteína quinase 1 ribossomal S6” (*ribosomal S6 protein kinase 1 - p70S6K*) e inibe proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1) . A mTOR ativada também pode se associar com rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) e Sin1 (proteína interativa 1 de proteína quinase ativada por estresse ) formando o complexo mTORC2 que tem como principal alvo a Akt e Rho (Dello Russo et al. 2013).

A regulação da atividade da via PI3K ocorre através da conversão de PIP2 em PIP3 pela PTEN (fosfatase homóloga a tensina) (Dello Russo et al. 2013).

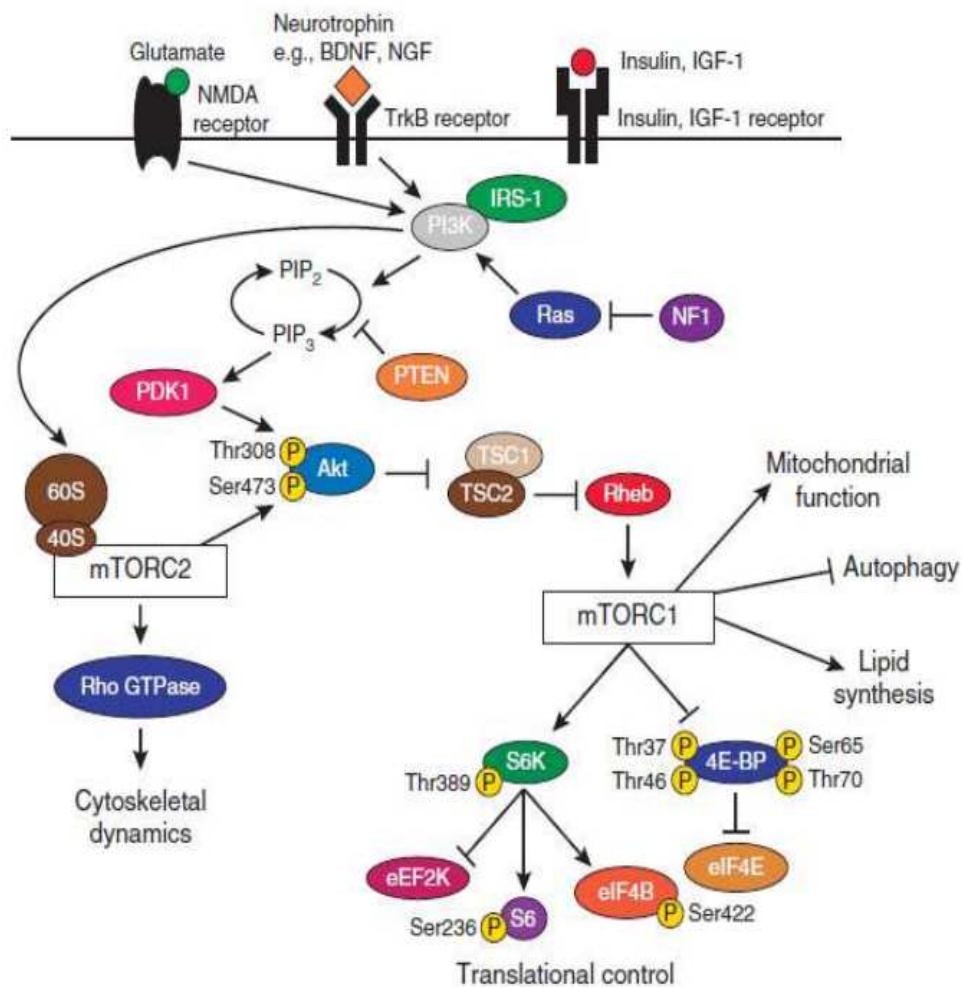


Figura 5: Via PI3K/Akt/mTOR (Costa-Mattioli and Monteggia 2013).

A via PI3K/Akt/mTOR está envolvida no controle de metabolismo de energia, sendo considerada relevante para a longevidade e indução da biogênese mitocondrial (Wang et al. 2012), e sobrevivência das células em resposta aos fatores de crescimento, estresse oxidativo e privação de nutrientes. Além disso, esta via está relacionada com a ativação microglial e também poderia contribuir para a captação de glutamato (Wu et al. 2010). O descontrole dessa via está envolvida na causa de algumas doenças como câncer, diabetes, neurodegeneração.

O alvo de mamífero de rapamicina (mTOR) é uma serina / treonina proteína quinase, que participa na regulação do crescimento e proliferação celular, metabolismo e vários processos intracelulares, tais como a transcrição e tradução do RNA mensageiro, autofagia e organização citoesquelética. Além disso, desempenha

papel numa série de mecanismos específicos do cérebro, como plasticidade sináptica, aprendizado e desenvolvimento cortical (Jaworski and Sheng 2006, Lin et al. 2001, Tang et al. 2002). mTOR está envolvida na fisiopatologia de várias doenças, tais como a hipertrofia cardíaca, diabetes, obesidade e desordens neurodegenerativas. Além disso, estudos mostram que no câncer e diabetes há o aumento da atividade desta proteína e assim é um alvo farmacológico no tratamento destas doenças (Zoncu, Efeyan and Sabatini 2011, Liu et al. 2009).

O envolvimento de mTOR nos processos inflamatório e excitotóxico vem mostrando que esta proteína ativa a microglia (Dello Russo et al. 2009), e regula a expressão do receptor de glutamato em astrócitos GLT1 (Wu et al. 2010).

Estudos em modelos de camundongo de DH mostram que mTOR está envolvido na agregação da proteína mhtt e inibidor de mTOR pode melhorar a autofagia e, conseqüentemente, reduzir o acúmulo de mhtt e morte neuronal (Wong 2013, Ravikumar et al. 2004). Além disso, estudos vêm mostrando o papel neuroprotetor da via PI3K/Akt/mTOR em modelo celular com administração de ácido quinolínico (Jang et al. 2010) e em modelos *in vivo* genético de DH (Humbert et al. 2002, Gines et al. 2003).

### 1.4.1 Rapamicina

A rapamicina ou sirolimo (Figura 6) é um produto da fermentação da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, que inibe a proteína alvo da rapamicina dos mamíferos (mTOR). Foi descoberta na década de 1960 em bactérias coletadas do solo na Ilha de Páscoa (nome da droga vem do nome nativo da ilha, *Rapa Nui*) (Sehgal 2003).

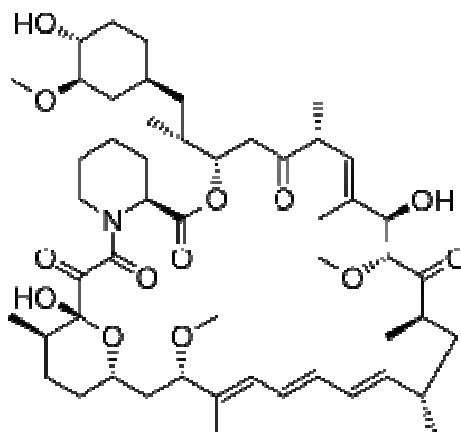


Figura 6: Estrutura química da rapamicina

A rapamicina é um fármaco usado na clínica para a imunossupressão pós-transplantes e vem sendo utilizada na oncologia para o tratamento do câncer renal e hepatocelular e linfomas de células do manto.

O mecanismo de ação da rapamicina envolve a inibição seletiva da atividade de mTORC1 através da formação de um complexo trimolecular com mTOR e FKBP12. A inibição do mTOR bloqueia a progressão do ciclo celular na transição das fases G1 para S. Sequencialmente, a rapamicina afeta a fosforilação / ativação da quinase p70 S6 (p70S6K), um evento precoce da resposta mitogênica. Ao inibir esta enzima, cujo substrato importante é a subunidade ribossomal 40S da proteína S6, a rapamicina reduz a tradução da codificação de RNAm para certas proteínas ribossomais e fatores de alongamento, diminuindo desse modo a síntese da proteína. Além disso, a rapamicina inibe a atividade enzimática da quinase dependente de ciclina (cdk2), que funciona como um regulador fundamental da transição de G1 - S. No entanto, a inibição de p70s6k e cdk2 não são um efeito direto

do complexo FKBP – rapamicina (Dumont and Su 1996, Huang, Bjornsti and Houghton 2003, Crespo and Hall 2002, Price et al. 1992). Além disso, vem sendo proposto que a rapamicina inibe mTOR pela desestabilização do complexo mTOR-Raptor (Ballou and Lin 2008).

Quando em altas concentrações e em tratamentos crônicos, a rapamicina também interfere na regulação de mTORC2 (Garellick and Kennedy 2011, Georgakis and Younes 2006, Sarbassov, Ali and Sabatini 2005, Dello Russo et al. 2013).

Estudos mostram que a inibição de mTOR aumenta a autofagia. A autofagia é importante processo de eliminação das organelas defeituosas em que estas são englobadas e decompostas, corrigindo assim um defeito, sem ter que destruir a célula. O processo autofágico é regulado através da formação de um complexo entre as proteínas quinases APG1, APG13 e APG17, chamado complexo APG. O mecanismo de inibidores de mTOR e a autofagia está relacionada com a desfosforilação da proteína quinase APG13 que aumenta sua afinidade a proteína APG1, aumentando a atividade do complexo APG1 (Kamada, Sekito and Ohsumi 2004, Kamada et al. 2000, Matsuura et al. 1997, Funakoshi et al. 1997).

Mais ainda, a rapamicina também demonstrou alterar o processo inflamatório. O seu efeito ainda é contraditório, o estudo feito por de Oliveira e colaboradores mostraram que a inibição de mTOR em culturas de microglia aumenta a produção de COX-2 e mPGES-1 após estímulo com LPS (de Oliveira et al. 2012); em monócitos do sangue periférico, a rapamicina é capaz de aumentar a liberação de citocina pró-inflamatória IL-12 e reduzir a citocina anti-inflamatória IL-10 estimuladas por LPS (Schmitz et al. 2008). Por outro lado, em cultura de microglia estimulada por LPS, a rapamicina reduziu a expressão de NO sintase e COX (Dello Russo et al. 2009, Jang et al. 2005). Em estudo in vivo, uma única dose de rapamicina, administrado quatro horas após traumatismo craniano em camundongos, reduziu o número de microglia/macrófagos ativados na região cortical próximo ao local da lesão (Erllich et al. 2007).

Na DH, a rapamicina vem mostrando induzir a autofagia (Williams et al. 2008, Zheng et al. 2010, Thoreen and Sabatini 2004, Sarkar and Rubinsztein 2008, Mealer

et al. 2014, Sarkar et al. 2008), resultando na redução da neurotoxicidade da proteína mhtt, por diminuir o número de poliglutaminas.

Tendo em vista o envolvimento paradoxal da rapamicina no processo inflamatório e sua implicação em alguns processos da doença de Huntington, o estudo no modelo excitotóxico de DH poderia fornecer informações relevantes sobre a fisiopatologia da doença, bem como para elucidar o papel exato da mTOR em seu mecanismo fisiopatológico.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar a participação da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) no processo de neuroinflamação e neurodegeneração utilizando um modelo murino de excitotoxicidade de doença de Huntington.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Padronizar o modelo excitotóxico da doença de Huntington (HD) induzido pela administração estriatal de ácido quinolínico em camundongos C57Bl/6;
- Avaliar as alterações motoras induzidas pela administração estriatal de AQ durante 2, 7 e 14 dias após AQ;
- Testar a hipótese de que o tratamento com rapamicina altera os níveis de fatores neurotróficos e mediadores inflamatórios induzido pela administração de AQ unilateral no estriado, após 8 horas de AQ, em camundongos C57Bl/6;
- Testar a hipótese de que o tratamento com rapamicina altera o perfil motor observado após a injeção de AQ unilateral no estriado, após 2 dias de AQ em camundongos C57Bl/6;
- Testar a hipótese de que o tratamento com rapamicina altera a neurodegeneração estriatal induzida pela administração de AQ unilateral no estriado, após 2 dias de AQ em camundongos C57Bl/6;
- Testar a hipótese de que o tratamento com rapamicina altera a ativação microglial induzida pela administração de AQ unilateral no estriado, após 2 dias de AQ em camundongos C57Bl/6;
- Testar a hipótese de que o tratamento com rapamicina altera a proliferação astrocitária induzida pela administração de AQ unilateral no estriado, após 2 dias de AQ em camundongos C57Bl/6;

- Testar a hipótese de que o tratamento com rapamicina altera a liberação de glutamato do sinaptossoma estriatal de camundongos C57Bl/6 induzida por AQ.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos éticos**

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o número de protocolo CEUA n° 327/2012.

#### **3.2. Animais**

Os animais usados no estudo foram camundongos machos da linhagem C57BL/6 (10 a 12 semanas de idade) provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG). Os animais tiveram livre acesso à água e ração sendo mantidos em ciclo claro/escuro com duração de 12 horas cada e temperatura local de 24°C. Os animais permaneceram na sala de comportamento por 30 minutos antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados no período entre 8h00 e 17h00.

#### **3.3. Drogas**

Rapamicina (LC Laboratories, Woburn, MA, USA), inibidor de mTOR, foi inicialmente dissolvida em DMSO 100% (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo USA) resultando em uma solução estoque 10 mM e foi posteriormente diluída em salina e administrada por via intraestriatal nas doses  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  e  $5 \times 10^{-3}$  nmol em 250 nL. Ácido quinolínico (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo USA) foi dissolvido em solução tampão de fosfato (PBS, pH final de 7,0) e administrado de forma unilateral no estriado (150 ou 200 ou 250 nmol em 250 nL).

#### **3.4. Cirurgia estereotáxica para implantação da cânula guia**

Os animais foram anestesiados com administração intraperitoneal (i.p.) de uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), sendo, em seguida, submetidos a tricotomia do escalpo e seu crânio fixado a um aparelho estereotáxico (Insight®). Em seguida, foi realizada a assepsia do escalpo com álcool iodado, seguida de uma incisão sagital para a exposição e limpeza da calota craniana. Após o nivelamento da calota craniana no equipamento, dois parafusos foram fixados no

crânio e uma cânula guia de 7 mm foi implantada no estriado direito seguindo as coordenadas: anterior/posterior +0,6 mm, médio/lateral -2,1 mm e dorso/ventral -2,2 mm em relação ao bregma baseando no atlas Paxinos and Watson (2001) (Figura 7). Para evitar a oclusão da cânula e contaminação, a mesma foi vedada com auxílio de um mandril de aço inoxidável. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em aquecimento, com o auxílio de uma lâmpada, até completa recuperação da cirurgia. Para realização dos experimentos futuros, os animais operados se recuperaram por, no mínimo, 7 dias antes da realização dos experimentos.

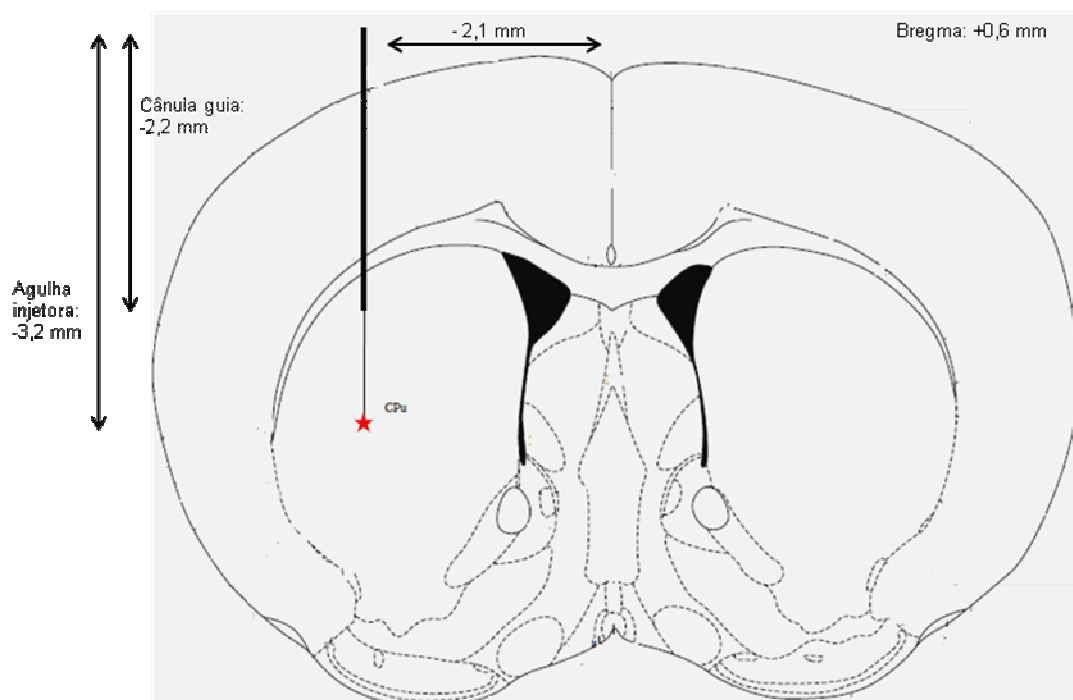


Figura 7: Local de administração da rapamicina e ácido quinolínico (modificado de Paxinos 2001).

### 3.5. Microinjeção das drogas

Para a realização da injeção das drogas, o mandril foi retirado da cânula guia e uma agulha odontológica gengival 30 G (8 mm) foi inserida. A agulha foi conectada a uma seringa Hamilton® de 25  $\mu$ L com o auxílio de um polietileno (P10). Para a padronização do modelo, foi administrado 250 nL de AQ (dose de 150 ou 200 ou 250 nmol) ou PBS, a uma taxa de infusão de 0,08  $\mu$ L/min, aguardando-se um minuto após a infusão para difusão da droga, evitando também o refluxo da substância. A

avaliação do comportamento e as análises bioquímicas foram programadas conforme mostrado na Figura 8.

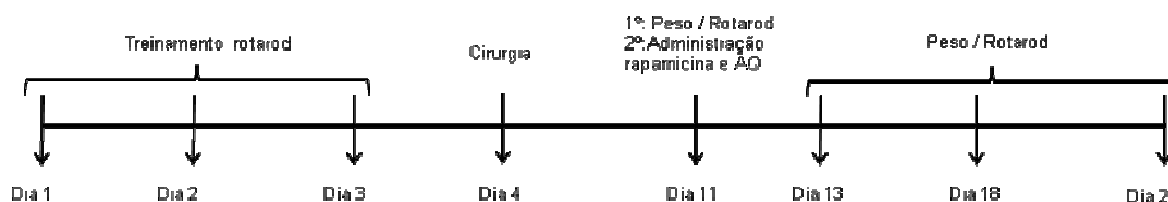


Figura 8: Programação de estudo da padronização do modelo de Huntington induzida pela administração de ácido quinolínico intraestriatal.

Para a avaliação do efeito da inibição de mTOR sobre diferentes parâmetros associados à excitotoxicidade induzida por AQ, rapamicina ou veículo (5% DMSO em salina) foram injetados em um volume de 250 nL, 15 min antes da administração de AQ ou PBS. Ao longo do texto, as doses de rapamicina serão representadas em concentração molar, sendo que  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  e  $5 \times 10^{-3}$  nmol correspondem a 0,2, 2 ou 20  $\mu$ M respectivamente.

Os animais foram divididos em seis grupos: Grupo 1, veículo + PBS; Grupo 2, veículo + AQ 200 nmol; Grupo 3, Rapamicina 0,2  $\mu$ M + PBS; Grupo 4, Rapamicina 0,2  $\mu$ M + AQ 200 nmol, Grupo 5, Rapamicina 2  $\mu$ M + AQ 200 nmol, Grupo 6, Rapamicina 20  $\mu$ M + AQ 200 nmol. A avaliação do comportamento e as análises bioquímicas foram programadas conforme mostrado na Figura 9.

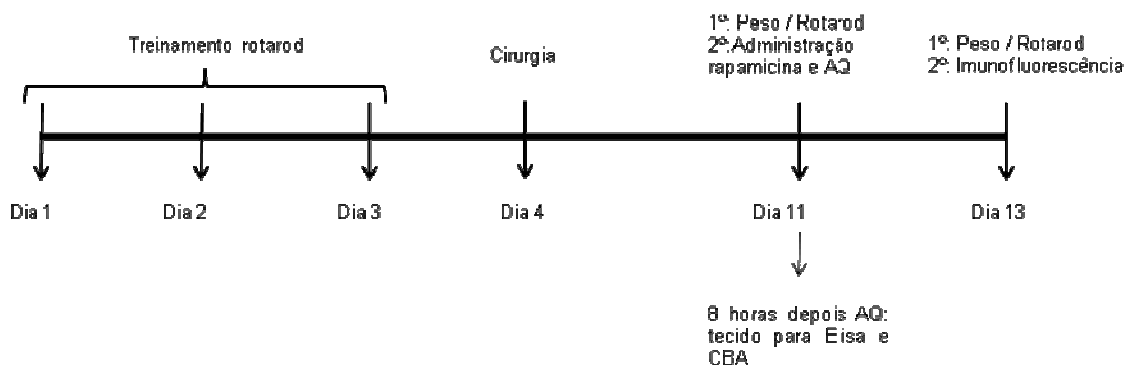


Figura 9: Desenho experimental do tratamento farmacológico com rapamicina.

### **3.6. Testes comportamentais**

#### **3.6.1. Massa corporal**

A massa corporal dos animais foi avaliada antes da administração de AQ e nos dias 2, 7 e 14 dias para a padronização do modelo e no tratamento com rapamicina no segundo dia após administração de AQ.

#### **3.6.2. Rotarod**

O aparelho rotarod (Insight®) foi utilizado para avaliar a coordenação motora e equilíbrio do animal. O desempenho no rotarod é avaliado pelo tempo de permanência do animal sobre a haste girante. Antes da cirurgia para introdução da cânula guia, foi realizado o treinamento dos animais no aparelho, na qual os animais foram colocados na haste girante por 3 minutos nas baixas velocidades de rotação (14, 17, 20 e 24 rpm), sendo realizado três dias consecutivos. Após 7 dias da cirurgia para introdução da cânula guia, os animais foram submetidos a leitura basal no aparelho, em que foram colocados na haste giratoria na rotação inicial de 14 rpm e no módulo acelerar de 14 – 37 rpm, sendo cronometrado o tempo permanente, de cada animal, na haste (tempo máximo 5 minutos) (Hunter et al. 2009). A leitura foi realizada em triplicata e a média dos valores estabelecida como leitura basal. Após administração de AQ ou PBS, os animais foram submetidos novamente a leitura no aparelho, em triplicata.

### **3.7. Avaliação bioquímica**

#### **3.7.1 Quantificação dos níveis de fatores neurotróficos e citocinas no estriado**

Após 8 horas da administração de AQ ou PBS, os estriados direito e esquerdo dos camundongos foram dissecados e estocados separadamente a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para a extração de citocinas, os tecidos foram homogeneizados em 200  $\mu\text{L}$  de solução inibidora de proteases [NaCl 0,4 M; Tween 20 (Synth) 0,05%; Bovine Serum Albumin (BSA) (Inlab Confiança) 0,5%; fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) (Calbiochem) 0,1 mM; cloreto de benzetônio (Vetec) 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina (Sigma), diluídos em PBS]. O homogenato foi centrifugado e aliquoteado. Os níveis do fator neurotróficos derivado do cérebro (BDNF), do fator de crescimento do nervo

(NGF) e da interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) foram quantificados através do kit de Elisa (R&D Systems, Abingdon, UK) de acordo com o protocolo do fabricante. A interleucina 2 (IL-2), IL-4, IL-6, interferon- $\gamma$  (INF-  $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-10 e IL-17A foram quantificadas utilizando o kit Th1/Th2 (BD Pharmigen, CA, USA) por *Cytometric Bead Array* (CBA) de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante. As proteínas totais das amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) (Bio-Rad). O resultado foi expresso em pg/mg de proteína total.

### **3.7.2. Imunofluorescência**

#### **3.7.2.1. Retirada e corte do cérebro**

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), e posteriormente submetidos a perfusão cardíaca utilizando PBS 1x seguido de paraformaldeído (PFA) 4%. O cérebro foi cuidadosamente retirado e imediatamente fixado em PFA 4% por 24h a 4°C, e posteriormente crioprotelado com uma solução de 30% de sacarose em PBS por 2 dias a 4 °C. Em seguida o cérebro foi congelado utilizando isopentano e armazenados a – 80 °C.

Os cérebros foram seccionados em 30  $\mu$ m com o auxílio do criostato (Leica Biosystem, USA), na temperatura de –20°C, sendo separados em porções do estriado anterior, medial e posterior. A porção medial foi utilizada para realização da técnica de imunofluorescência.

#### **3.7.2.2. Morte neuronal**

A técnica de Fluoro Jade C (FJC) foi usada para quantificar o número de neurônios estriatais em processo de neurodegeneração. Cortes do estriado medial foram montados em lâminas gelatinizadas e secas ao ar livre. As lâminas foram imersas em solução 1% de hidróxido de sódio (NaOH) em 80% de etanol por 5 min. Em seguida, imersas por 2 min em 70% etanol e por 2 min em água destilada, e então incubada em solução de permanganato de potássio 0,06% por 20 min. A seguir, foram posteriormente imersas em água por 2 min e incubada em solução de FJC 0,0001% por 20 min. As lâminas foram imersas duas vezes em água destilada

por 1 min e secas em estufa a 37°C. Após 10 min, as lâminas secas foram imersas em xilol por 1 min. Os cortes foram visualizados em microscópio de fluorescência (Zeiss, Oberkochen, Germany) usando o comprimento de onda de 488 nm. A análise quantitativa das imagens foi realizada no *software livre Image J*. As imagens foram analisadas pela contagem manual de células por área.

### **3.7.2.3. Ativação de células gliais**

A ativação glial foi determinada por imunomarcação de *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba-1), para marcação de micróglia, e *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) para marcação de astrócitos. Em resumo, as fatias do estriado medial (30 µm) foram lavadas 3 vezes em solução tampão tris (TBS) e depois bloqueadas com 4% BSA contendo 0,05% triton em TBS, posteriormente lavadas e incubadas com anticorpos primários (1:400 Anti-Iba1 da WAKO ou 1:1000 GFAP da Santa Cruz Biotechnology), durante a noite a 4°C. Após lavagem, os cortes foram incubados com anticorpo secundário por 1 h a temperatura ambiente [AlexaFluor 488 para GFAP e AlexaFluor 594 para anti-Iba-1, 1:1000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)]. Os cortes foram visualizados em microscópio de fluorescência (Zeiss, Oberkochen, Germany) e quantificados usando o programa Image-J pela intensidade dos pixels por região selecionada.

## **3.8. Sinaptossoma**

### **3.8.1. Isolamento do sinaptossoma**

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 (10 a 12 semanas de idade) foram decapitados e o estriado removido e homogeneizado em solução de sacarose 0,32 M contendo ditiotreitol (0,25 mM) e EDTA (1 mM). O homogenato foi então submetido à centrifugação a baixa velocidade (1000 x g x 10 min) e o sinaptossoma foi purificado a partir do sobrenadante através da centrifugação por gradiente descontínuo de Percoll (Dunkley et al. 1988). Os sinaptossomas isolados foram novamente suspensos em solução de Krebs-Ringer - HEPES (KRH: NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, glicose 10 mM, HEPES 25 mM, pH 7,4), sem adição de CaCl<sub>2</sub>, e mantidos em gelo até ser utilizado para a quantificação de liberação de glutamato.



### **3.8.2. Liberação de glutamato no estriado**

O teste de liberação de glutamato foi realizado de acordo com o aumento na fluorescência, devido à produção de  $\text{NADPH}^+$  na presença de glutamato desidrogenase e  $\text{NADP}^+$  (Nicholls, Sihra and Sanchez-Prieto 1987). Na placa de Elisa foi adicionado 300  $\mu\text{L}$ /poço da mistura de sinaptossomas,  $\text{CaCl}_2$  (concentração final 1 mM) e  $\text{NADP}^+$  (concentração final 1 mM) em KRH e realizado a leitura de fluorescência no espectrofluorímetro (Biotek Synergy 2), a 37 °C, sob agitação constante durante um tempo de leitura de 2 minutos. Foi adicionada aos poços a glutamato desidrogenase - GDH (35 unidades para um volume final de 300  $\mu\text{L}$ ) e após 5 minutos de leitura, adicionou-se AQ ou PBS ou KCL nos respectivos poços, num tempo de leitura de 10 minutos. A calibração foi realizada por adição de quantidade conhecida de glutamato padrão. Realizou-se inicialmente a padronização da concentração de ácido quinolínico por meio de uma curva x resposta com as seguintes concentrações: 0,1 mM, 0,5 mM, 5 mM e 10 mM. Em outro protocolo experimental, rapamicina foi testada as concentrações 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,05, 0,25, 2,5, 25, 100 nM, sendo adicionada antes de colocar o GDH e realizada uma leitura de 15 minutos. Poços com controle negativo contendo sinaptossomas não tratados e também veículo foram testados. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 360 nm e o comprimento de onda de emissão de 450 nm.

### **3.9. Análise dos dados**

Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando o programa *Graph Pad Prism* (Graph Pad Software, San Diego, CA). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguido do teste de Newman-Keuls ou de duas vias (two-way ANOVA) seguido do teste Bonferroni. Os valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Padronização do modelo excitotóxico da doença de Huntington induzido por administração unilateral de ácido quinolínico no estriado

Inicialmente foi padronizado o modelo murino de doença de Huntington induzido por injeção intraestriatal de AQ. Para isso, foi avaliada a alteração motora pelo teste no aparelho rotarod e o peso corporal utilizando três doses de AQ (150, 200 ou 250 nmol em 250 nL). Conforme demonstrado na Figura 10, a administração de AQ nas diferentes doses reduziu o tempo sobre a haste giratória após dois e sete dias da administração de AQ. Porém, no 14º dia apenas as doses de 200 e 250 nmol diferiram de forma estatística do grupo controle (Figura 10).

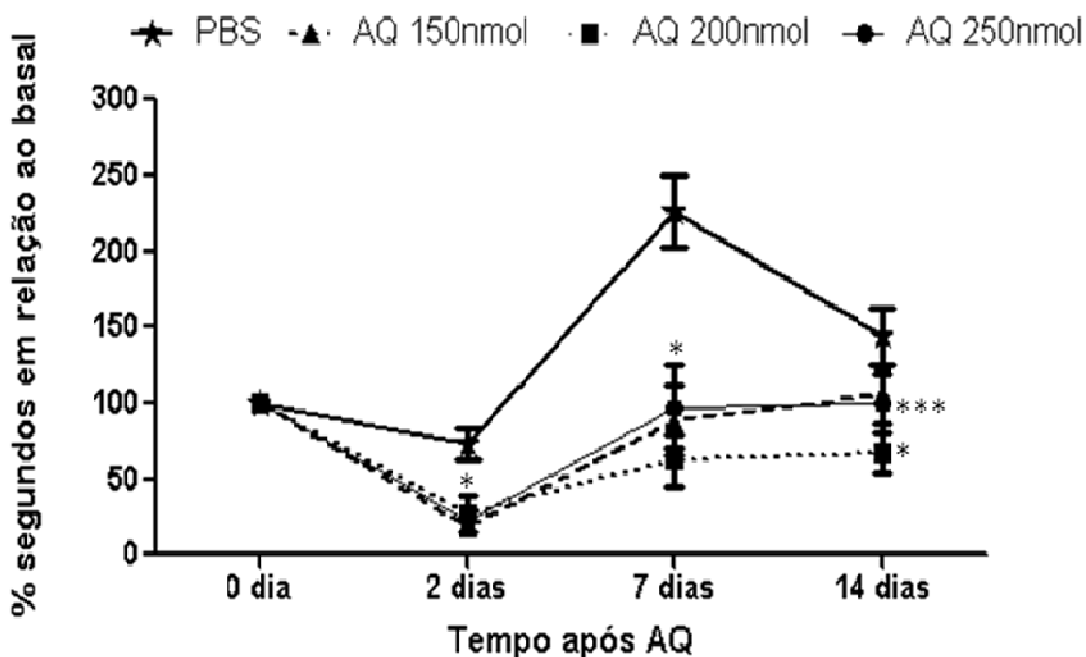


Figura 10: Avaliação da alteração motora no 2º, 7º e 14º dias após administração de AQ (150, 200 ou 250 nmol) ou PBS (N= 7-8 animais/grupo). Valores são expressos como média do percentual do tempo (em segundos) em relação à leitura basal. \*p<0,001 e \*\*\*p<0,05 comparado com PBS (two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

Em relação à alteração do peso corporal (Figura 11), não houve diferença estatística entre as três doses de ácido quinolínico (150, 200 e 250 nmol) e nem no decorrer dos dias analisados. Além disso, não houve morte dos animais em nenhuma das três doses de ácido quinolínico (150, 200 e 250 nmol) ou PBS.

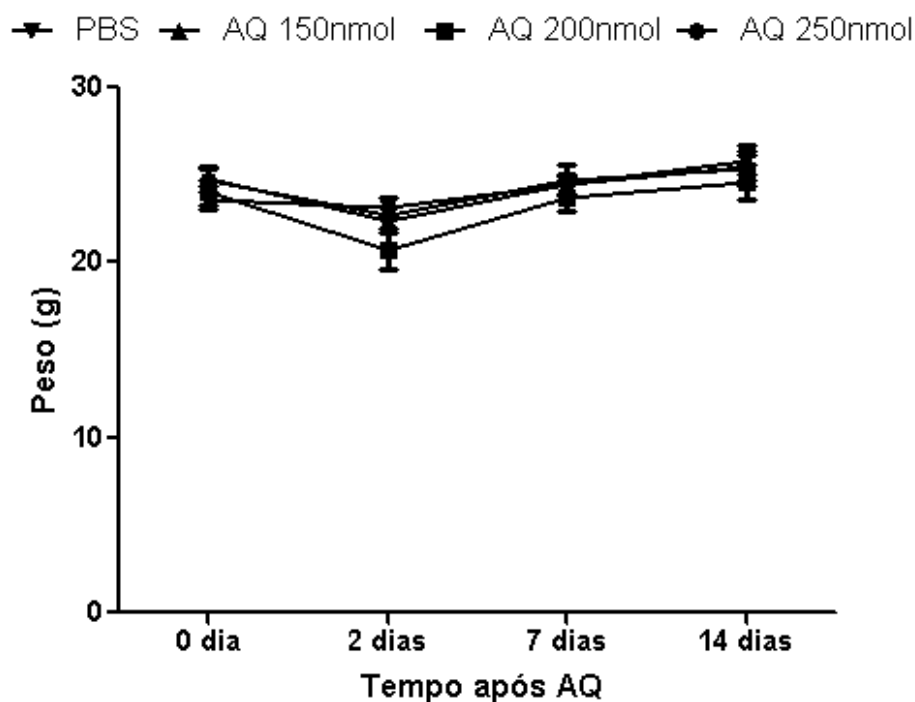


Figura 11: Avaliação da alteração do peso corporal no 2º, 7º e 14º dias após administração de AQ (150, 200 ou 250 nmol) ou PBS (N = 7-8 animais/grupo). Valores são expressos como média do tempo (segundos) e erro padrão da média. Não houve diferença estatística entre os grupos (two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

Diante destes resultados e com o objetivo de realizar um estudo que avalie as alterações agudas da administração de ácido quinolínico, resolvemos definir o tempo de 2 dias após administração de ácido quinolínico para realizar os posteriores testes, visto que nesse momento ocorre alteração motora em todas doses testadas. Utilizou-se a dose de 200 nmol/250, tendo em vista que esta foi a menor dose capaz de manter um padrão de redução do tempo na haste rolante durante todos os dias testados.

#### **4.2. Avaliação do efeito do tratamento com rapamicina na produção de mediadores inflamatórios**

Inicialmente foi avaliado o efeito de rapamicina sobre a produção de mediadores inflamatórios 8 h após a administração de AQ. Observa-se que a administração de AQ (200 nmol/250 nL) aumentou significativamente a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em relação ao controle (veículo + PBS). O tratamento com rapamicina (0,2, 2 e 20  $\mu$ M) diminuiu a produção destas citocinas no lado ipsilateral (Figura 12 B, 12D e 12F).

No hemisfério contralateral, observa-se redução da expressão de IL-1 $\beta$  nas três doses de rapamicina associadas ao AQ (Figura 12A) e de TNF- $\alpha$  nas doses de 2 e 20  $\mu$ M de rapamicina (Figura 12E). Além disso, observa-se um aumento de IL-6 na dose de 2  $\mu$ M de rapamicina quando comparado com o controle + PBS (Figura 12C).

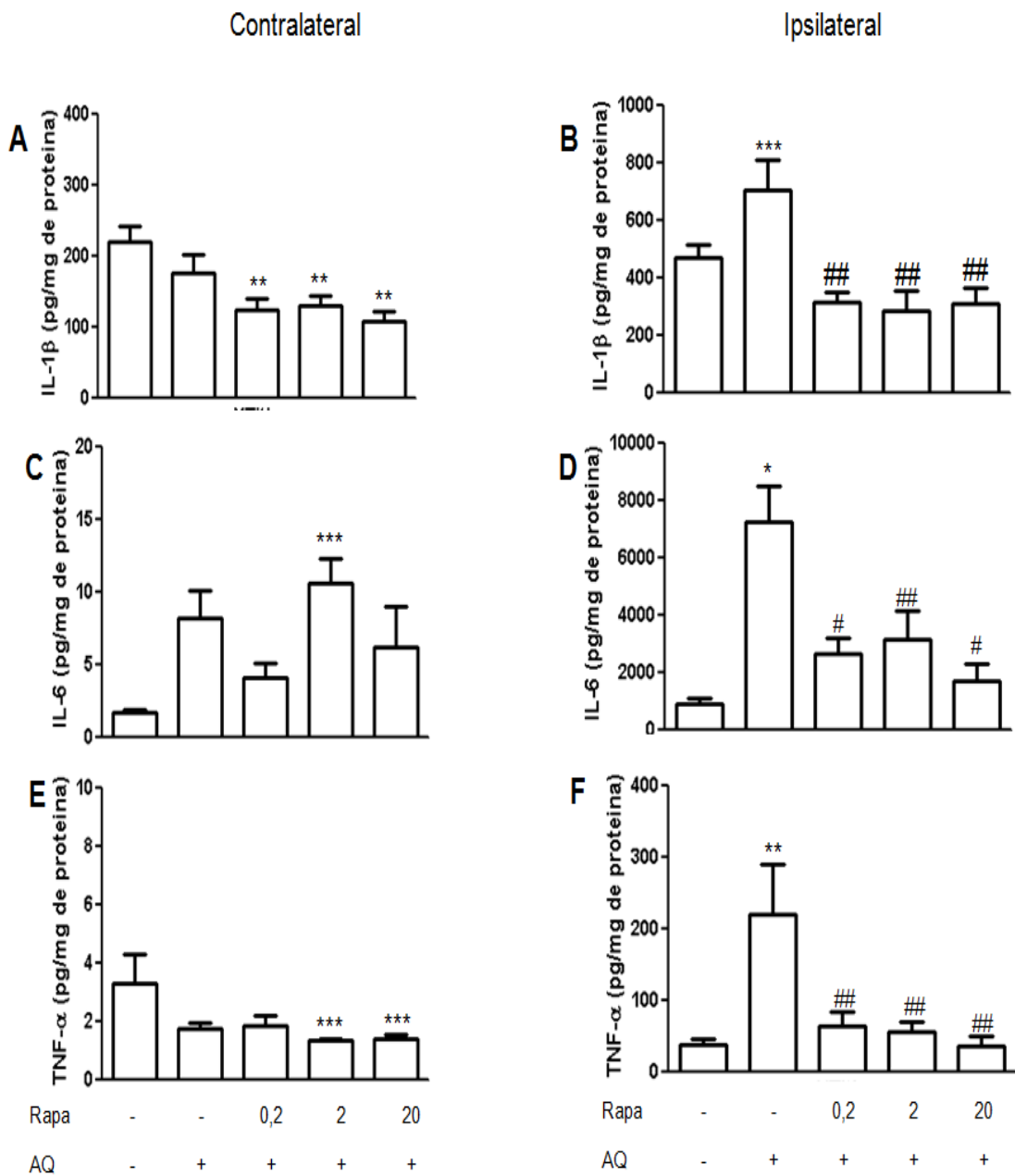


Figura 12: Efeito de rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu$ M sobre a produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no estriado ap3s 8 horas de administração de AQ 200 nmol (N = 6-7 animais / grupo). Valores expressos como m3dia e erro padr3o da m3dia. (A, C e E) An3lise quantitativa do estriado contralateral das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , respectivamente. (B, D e F) An3lise quantitativa do estriado ipsilateral das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , respectivamente. \* p<0.001, \*\* p<0.01 e \*\*\* p<0.05 comparado com ve3culo + PBS. # p<0.001 e ## p<0.01 comparado com ve3culo + AQ (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Conforme mostrado na figura 13, o tratamento com rapamicina 0.2  $\mu\text{M}$  aumentou estatisticamente a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 quando comparada com todos os outros grupos (Figura 13B). No lado contralateral, não é observada diferença estatística entre os grupos (Figura 13A).

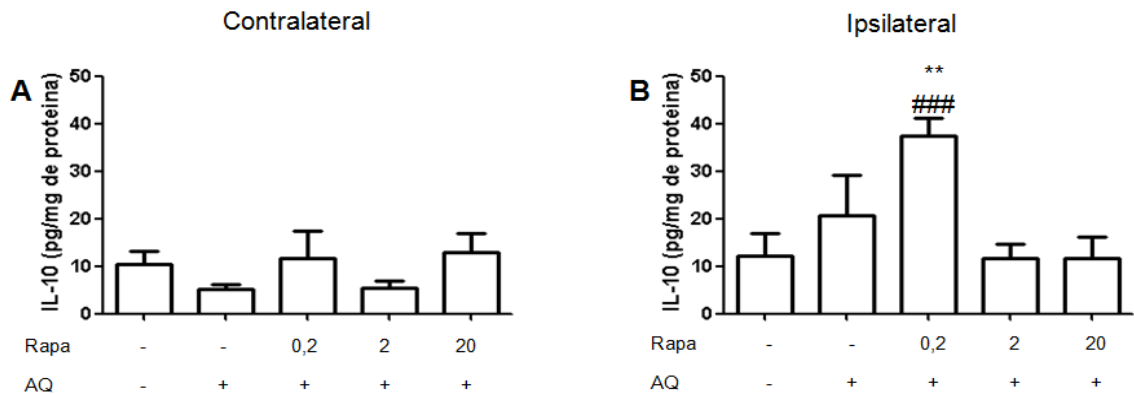


Figura 13: Efeito do tratamento com rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  sobre a produção de interleucina -10 (IL-10) no estriado após 8 horas de administração de AQ 200 nmol (N= 6-7 animais / grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A) Análise quantitativa do estriado contralateral da citocina IL-10. (B) Análise quantitativa do estriado ipsilateral da citocina IL-10. \*\*  $p < 0.01$  comparado com veículo + PBS. ###  $p < 0.05$  comparado com veículo + AQ (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-17A e IFN- $\gamma$  são menores quando comparados com IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ . Nos resultados da figura 14H, observam-se uma redução estatística de IFN- $\gamma$  no grupo veículo + AQ e nos grupos do tratamento com rapamicina quando comparado com o controle (veículo + PBS). Porém, em relação aos valores das outras citocinas (IL-2, IL-4, IL-17A), o grupo veículo + AQ não alterou a expressão das mesmas. Já no tratamento com rapamicina, observa-se uma redução também das citocinas IL-2, nas doses de 2 e 20  $\mu$ M de rapamicina (Figura 14B), e de IL-4, na dose de rapamicina 20  $\mu$ M, quando comparado com o controle (veículo + PBS) (Figura 14D). Por outro lado, rapamicina não altera os níveis de IL-17A (Figura 14F).

No lado contralateral, não é observada diferença estatística entre os grupos, exceto a IFN- $\gamma$ , que foi reduzida pela maior dose de rapamicina quando comparada com o grupo controle negativo (veículo + PBS) (Figura 14G).

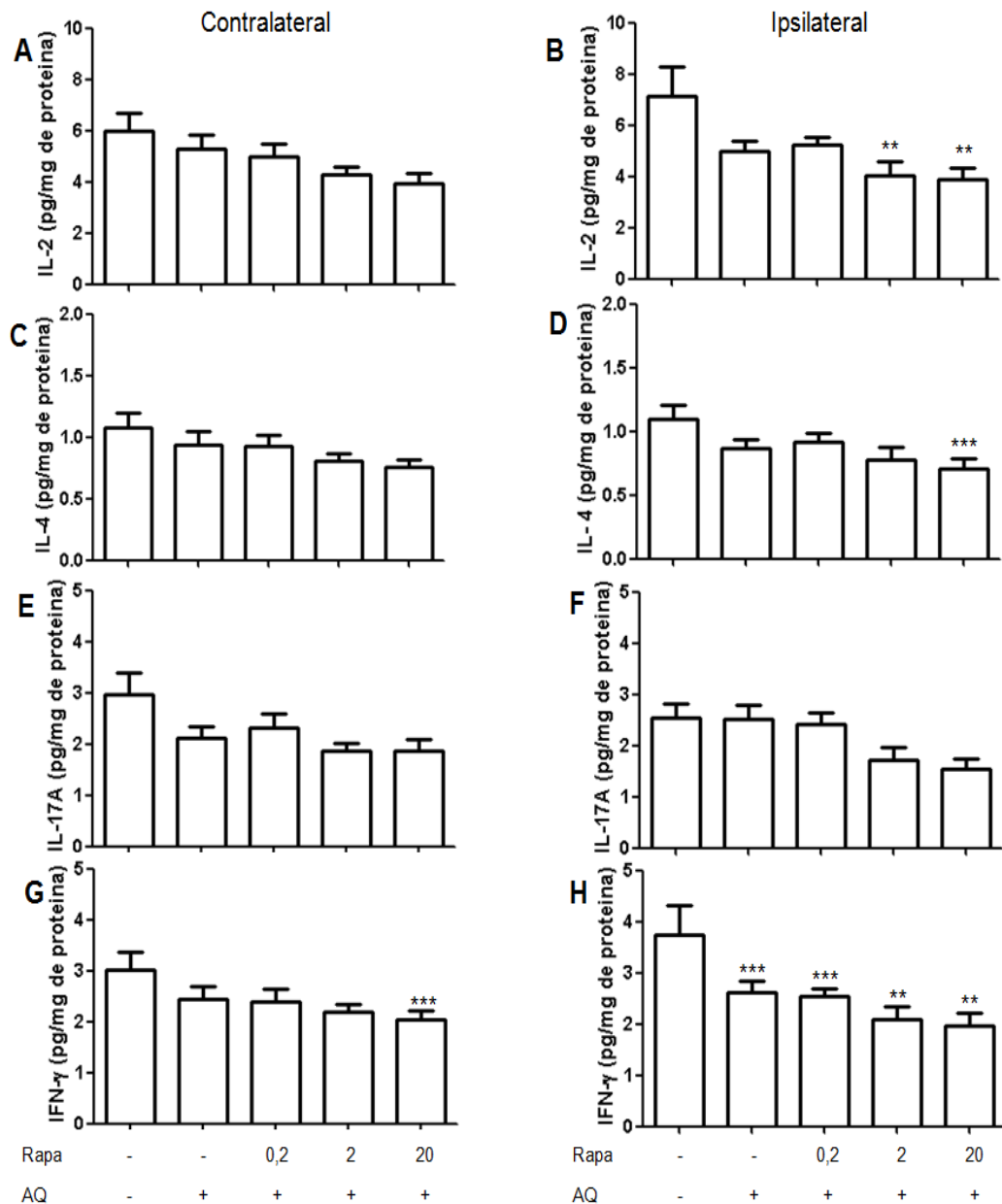


Figura 14: Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu$ M na produção de interleucina -2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-17A (IL-17A) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) no estriado após 8 horas de administração de AQ 200nmol (N= 6-7 animais / grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A, C, E e G) Análise quantitativa do estriado contralateral das citocinas IL-2, IL-4, IL-17A e IFN- $\gamma$ , respectivamente. (B, D, F e H) Análise quantitativa do estriado ipsilateral das citocinas IL-2, IL-4, IL-17A e IFN- $\gamma$ , respectivamente. \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.05$  comparado com veículo + PBS. (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).



### 4.3. Avaliação do efeito do tratamento com rapamicina na produção de fatores neurotróficos

A seguir, avaliamos o efeito de rapamicina sobre a produção de fatores neurotróficos. Observa-se na figura 15 (B e D) que o AQ não altera a produção de BDNF ( $p=0,17$ ) e NGF ( $p=0,43$ ) no lado ipsilateral. Além disso, o tratamento não altera os níveis desses fatores neurotróficos.

No hemisfério contralateral, observa-se uma redução estatística de BDNF no tratamento com rapamicina 20  $\mu\text{M}$  (Figura 15A).

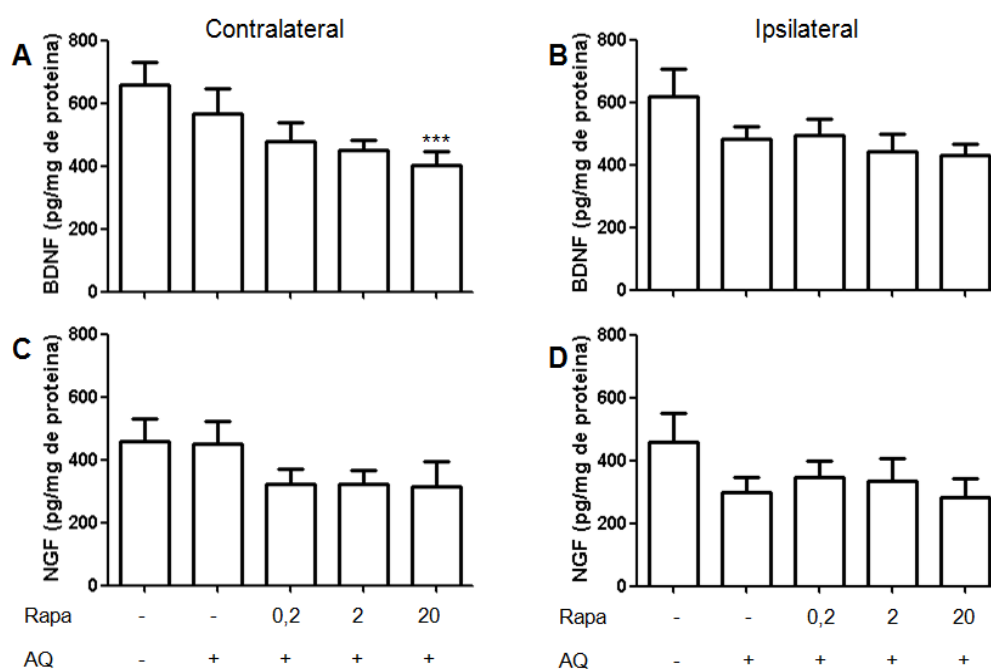


Figura 15: Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  na produção de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do fator de crescimento do nervo (NGF) no estriado após 8 horas de administração de AQ 200 nmol (N= 6-7 animais / grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A e C) Análise quantitativa do estriado contralateral de BDNF e NGF, respectivamente. (B e D) Análise quantitativa do estriado ipsilateral de BDNF e NGF, respectivamente. \*\*\* $p<0.05$  comparado com veículo + PBS. (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

#### 4.4. Avaliação do efeito do tratamento com rapamicina na alteração motora e peso corporal

A avaliação do efeito do tratamento com rapamicina na alteração motora foi feita pelo teste no aparelho rotarod após 2 dias de administração de AQ (Figura 16). Observa-se que os grupos veículo + AQ, rapa 2 + AQ e rapa 20 + AQ reduziram estatisticamente o tempo de permanência do animal na haste do rotarod quando comparado com os controles (veículo + PBS, rapa 0,2 + PBS) e o tratamento rapa 0,2 + AQ (2 dias: veículo + PBS: 110,29% ± 13,98; rapa 0,2 + PBS: 114,43% ± 13,71; veículo + AQ: 64,43% ± 8,77; rapa 0,2 + AQ: 91,40% ± 15,85; rapa 2 + AQ: 52,28% ± 11,46; rapa 20 + AQ: 76,02% ± 22,12). O tratamento com rapamicina na dose de 0,2 µM apresenta uma reversão do efeito causado pelo AQ.

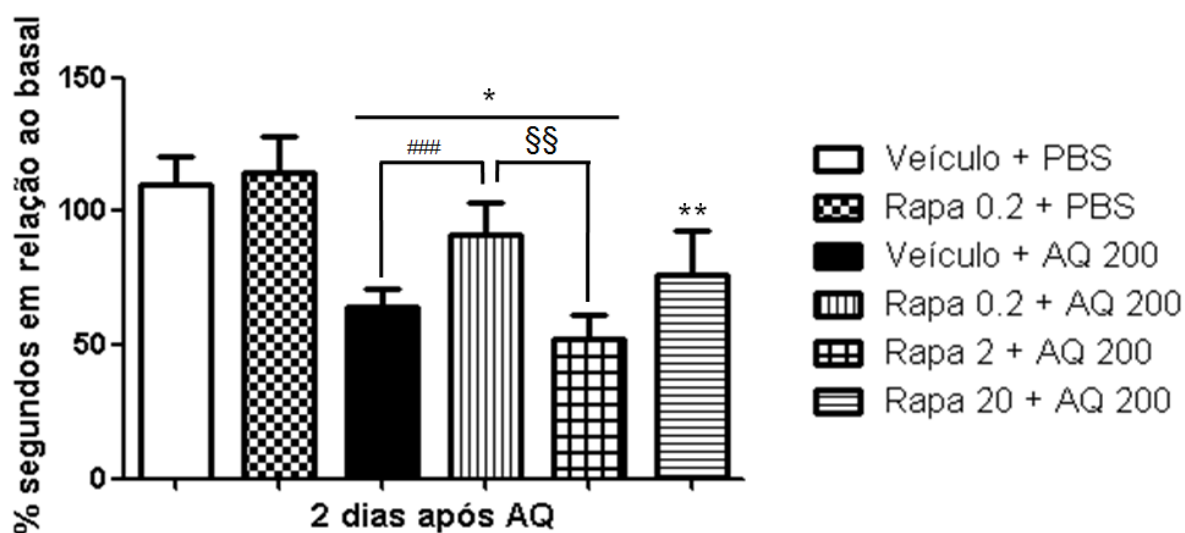


Figura 16: Avaliação da alteração motora no tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20 µM (N= 8 - 15 animais/grupo). Valores são expressos como média da % do tempo (segundos) em relação ao basal e erro padrão da média. \*p<0.001 e \*\*p<0.01 comparado com veículo + PBS. ###p<0.05 comparado com veículo + AQ. §§p<0.01 comparado com rapa 2 + AQ (two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

Não houve diferença na massa corporal entre os diferentes grupos dois dias após a administração das drogas (Figura 17). Além disso, não houve morte de animais em nenhum dos grupos.

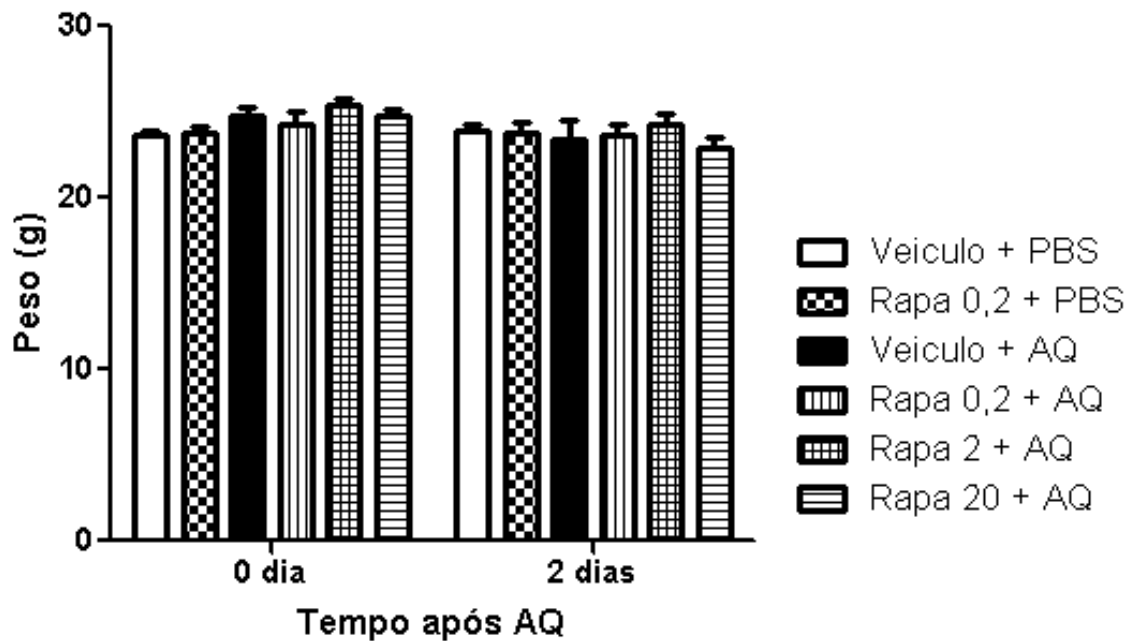


Figura 17: Avaliação da alteração do peso corporal no tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  (N= 8 animais/grupo). Valores são expressos como média do tempo (segundos) e erro padrão da média. Não houve diferença estatística entre os grupos (two-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

#### 4.5. Efeito da rapamicina na neurodegeneração estriatal

No lado contralateral, não há marcação de morte neuronal entre os grupos (Figura 18). A administração de Aβ aumentou a morte neuronal no estriado ipsilateral como demonstrado pela imunomarcagem com Fluoro Jade C (Figura 19 e 20). E o tratamento com rapamicina na dose de 0,2  $\mu\text{M}$  reduziu estatisticamente a morte neuronal quando comparado com os grupos veículo + Aβ e rapa 2 + Aβ. Também é notada uma alteração na morfologia do tecido nos grupos com administração de Aβ, aparentando perda tecidual (Figura 19).

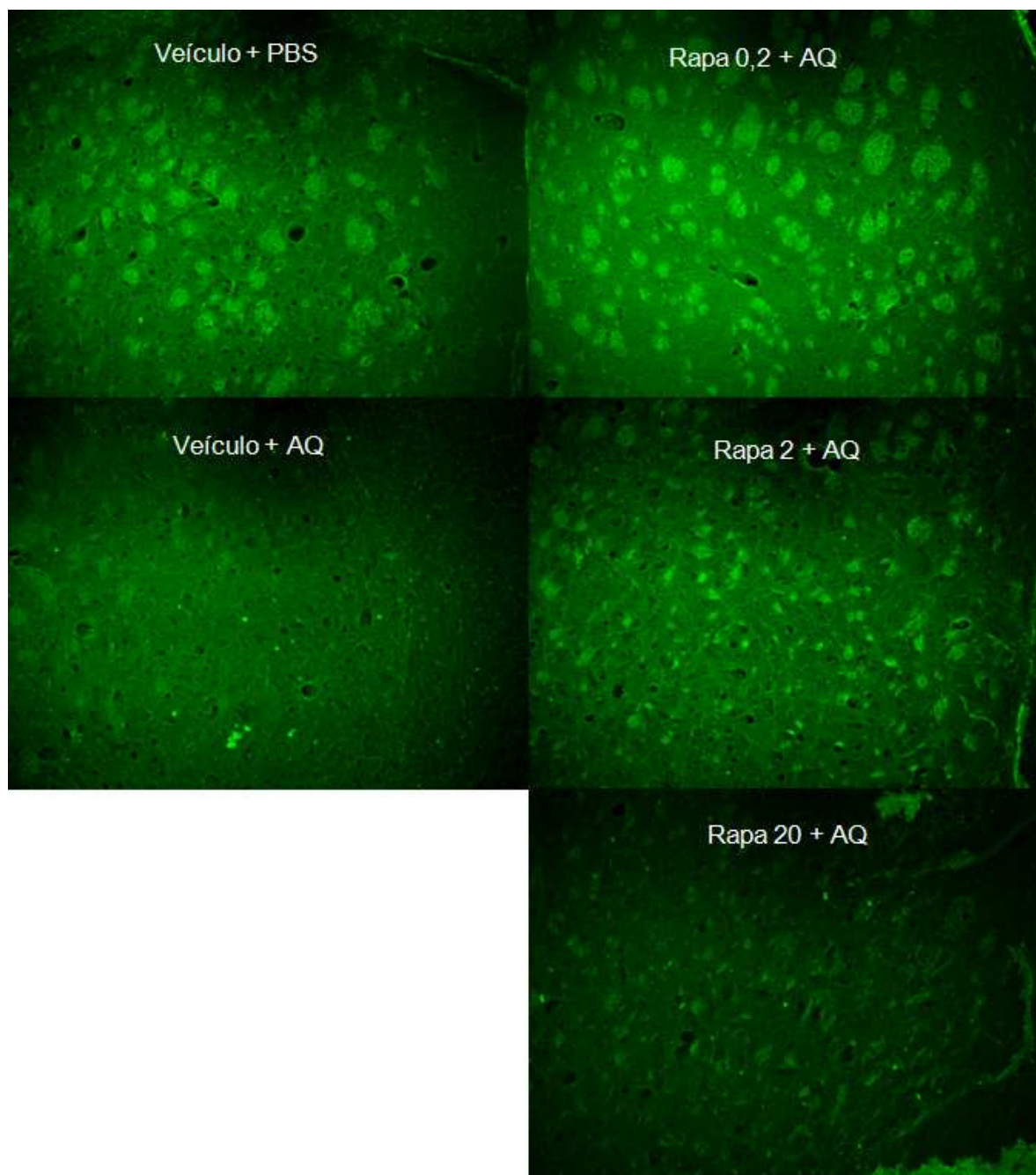


Figura 18: Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  sobre a neurodegeneração estriatal contralateral usando a técnica de FJC (N= 5-8 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

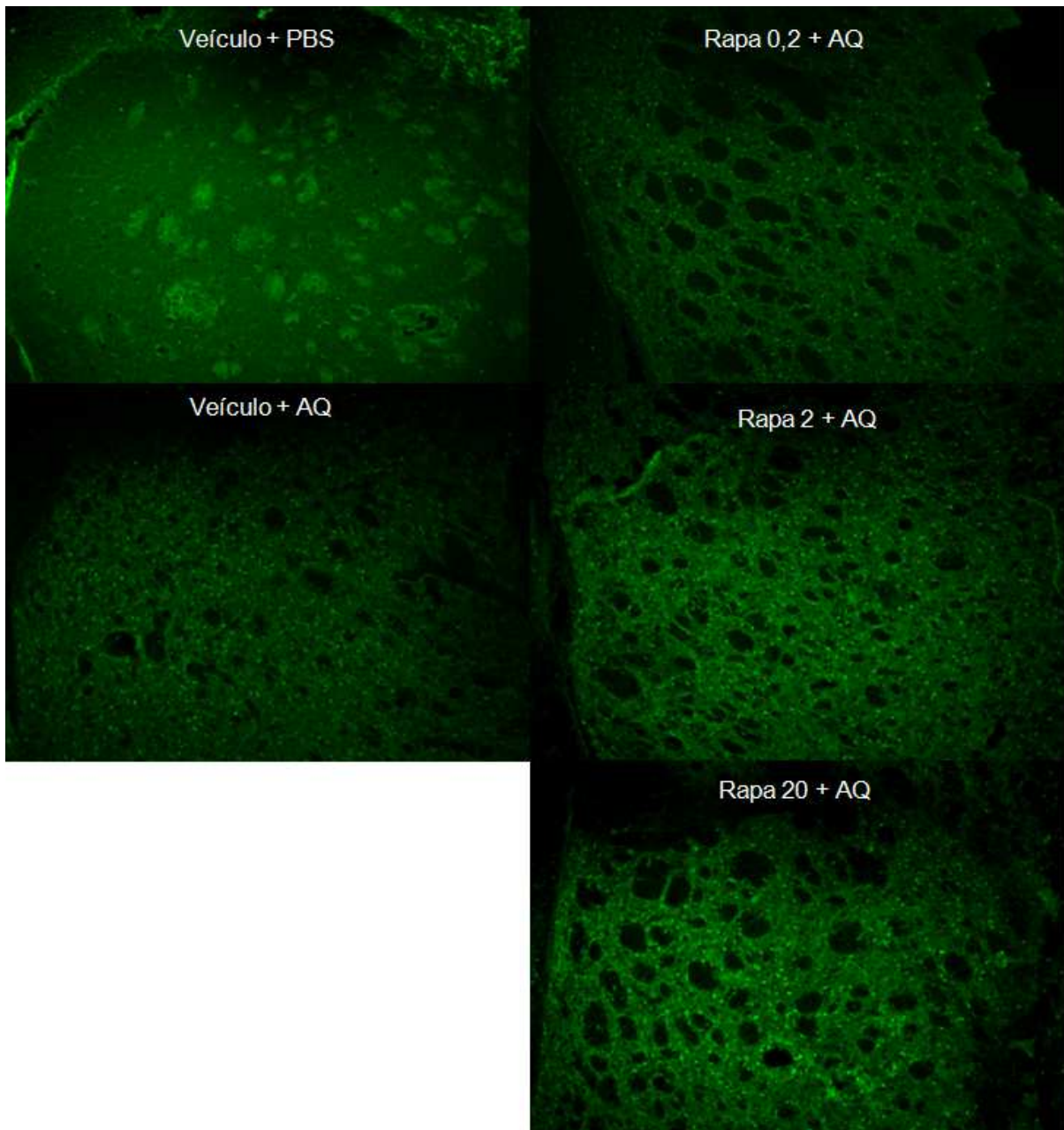


Figura 19: Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  sobre a neurodegeneração estriatal ipsilateral usando a técnica de FJC (N= 5-8 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

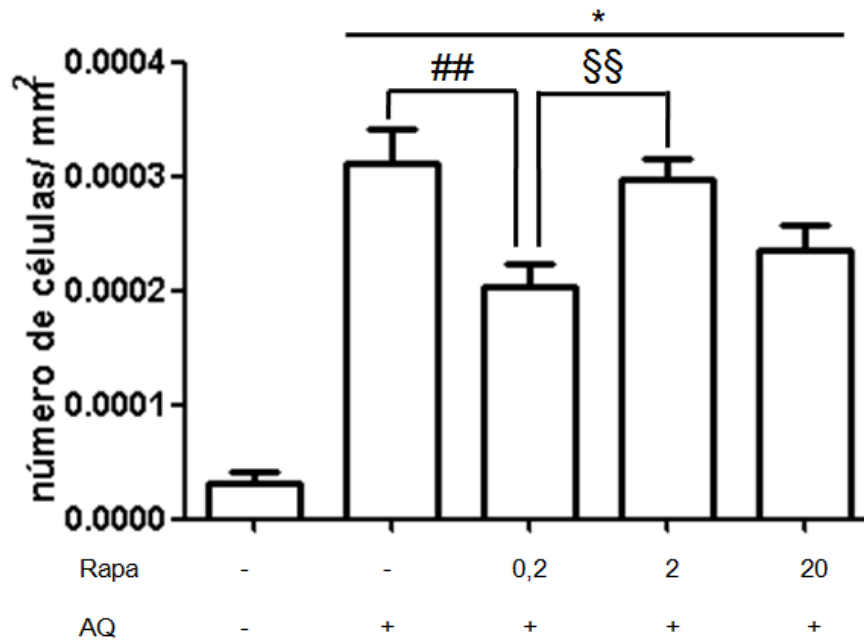


Figura 20: Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu$ M sobre a neurodegeneração estriatal ipsilateral pela análise do número de células por área (N= 5-8 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média \* $p < 0.001$  comparado com veículo + PBS, ## $p < 0.01$  comparado com veículo + AQ e §§ $p < 0.01$  comparado com rapa 2 + AQ (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

#### **4.6. Efeito da rapamicina sobre a ativação microglial**

Os resultados de marcação de microglia (Figura 21B e 22B) mostram que ambos os hemisférios não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos. Porém no hemisfério ipsilateral, observa-se uma tendência de aumento nos grupos veículo + AQ, rapamicina 0,2  $\mu$ M + AQ e rapamicina 2  $\mu$ M + AQ quando comparados com o controle, veículo + PBS, e rapamicina 20  $\mu$ M + AQ.

Além disso, é observada uma diferença no formato da microglia quando se compara os hemisférios, sendo que no lado contralateral essas células apresentam ramificações (Figura 21A), indicando seu estado inativo, e no ipsilateral um formato amebóide e robusto, indicando um processo de ativação (Figura 22A).

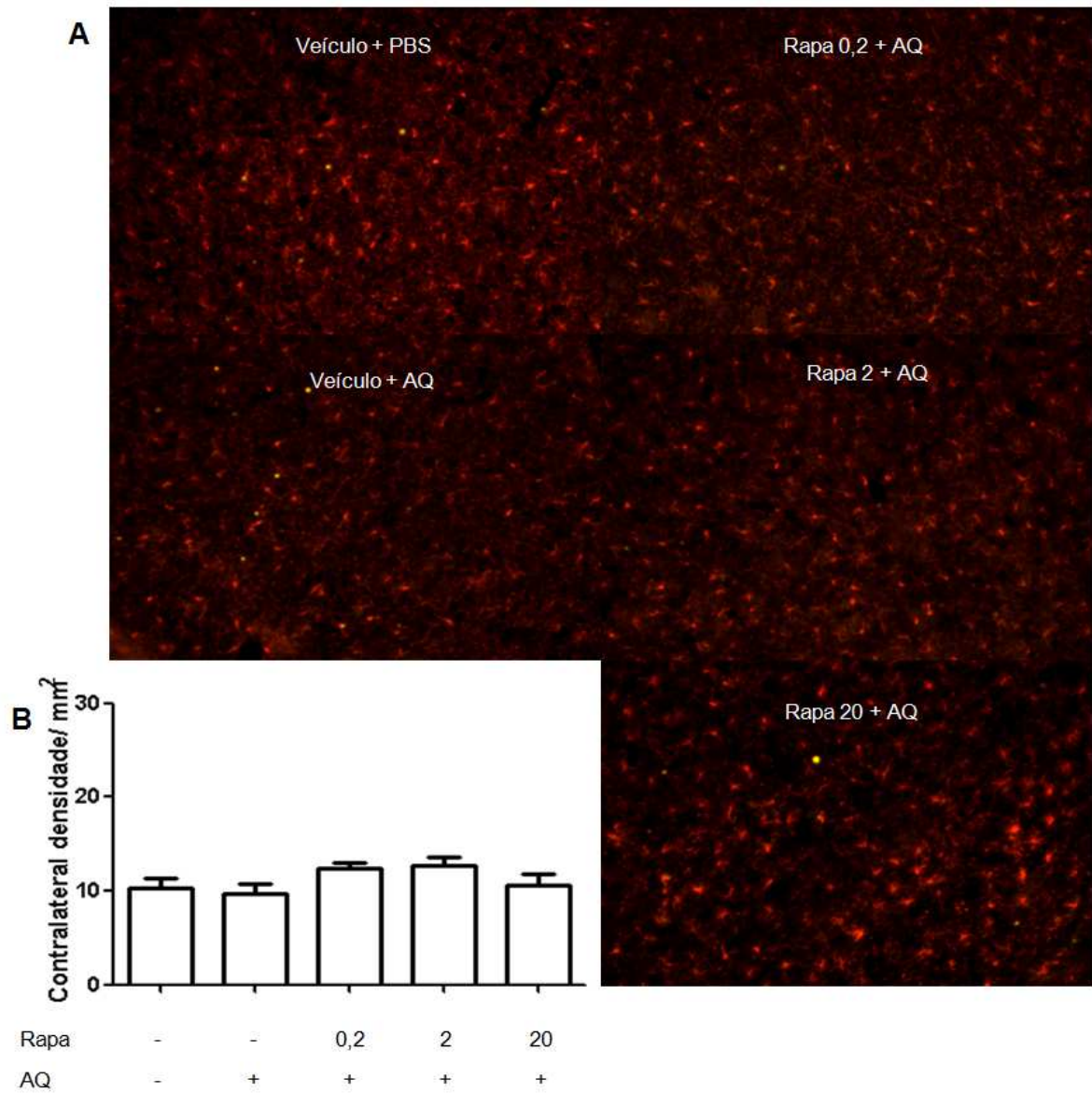


Figura 21: Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  na ativação de microglia estriatal contralateral (N= 3-4 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A) Fotografia representativa no aumento de 20x do Iba. (B) Análise quantitativa do Iba. Não houve diferença estatística entre os grupos (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).



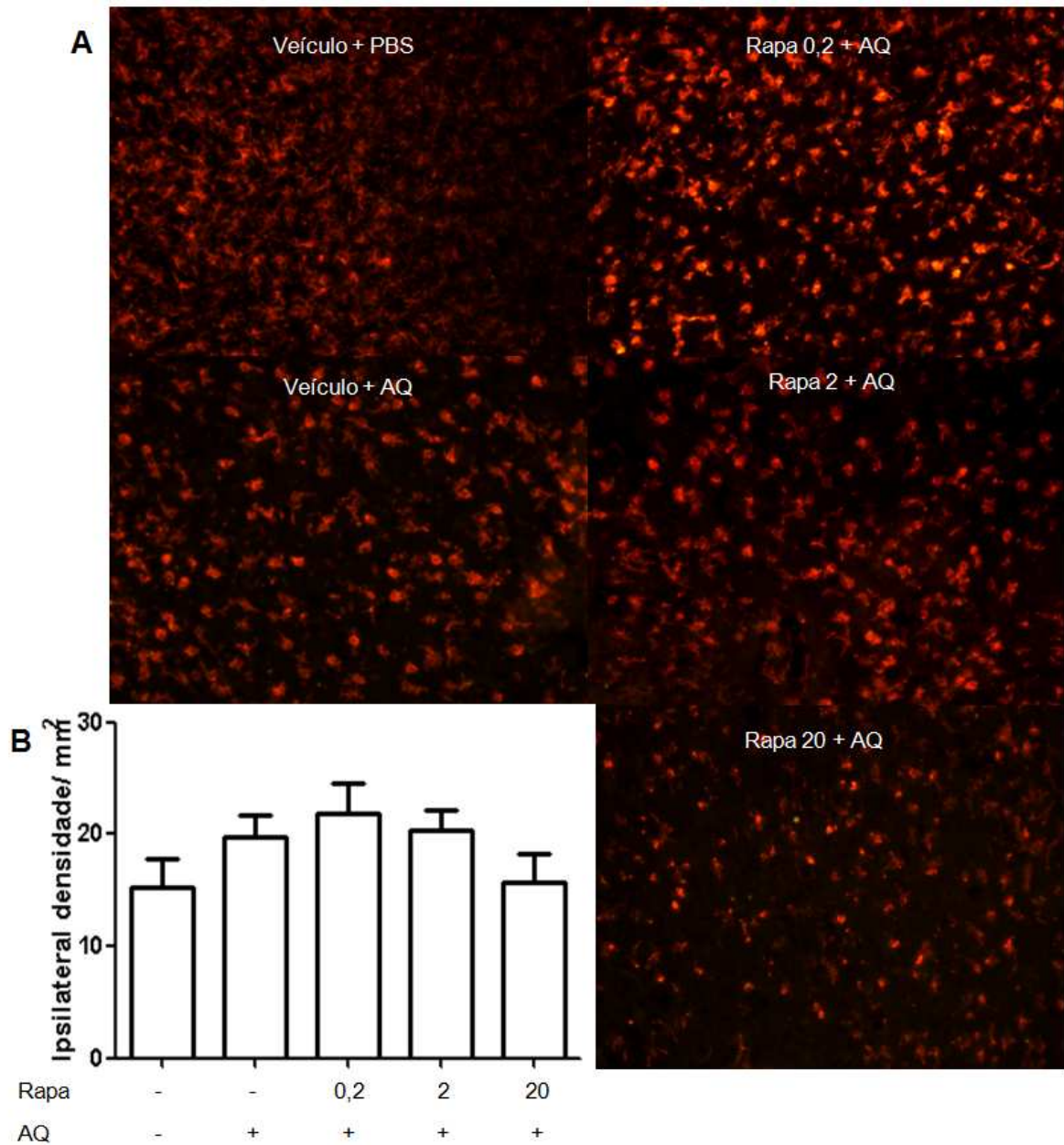


Figura 22: Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  na ativação de microglia estriatal ipsilateral (N= 3-4 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A) Fotografia representativa no aumento de 20x do Iba. (B) Análise quantitativa do Iba. Não houve diferença estatística entre os grupos (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

#### **4.7. Efeito do tratamento com rapamicina sobre a ativação astrocitária**

Não houve diferença estatística entre os grupos no hemisfério contralateral (Figura 23 A e 23B).

Os resultados (Figura 24A e 24B) mostram que no hemisfério ipsilateral o grupo tratado com rapamicina 0,2  $\mu$ M + AQ apresenta um aumento estatístico na marcação de astrócitos quando comparado com o controle positivo, veículo + AQ.

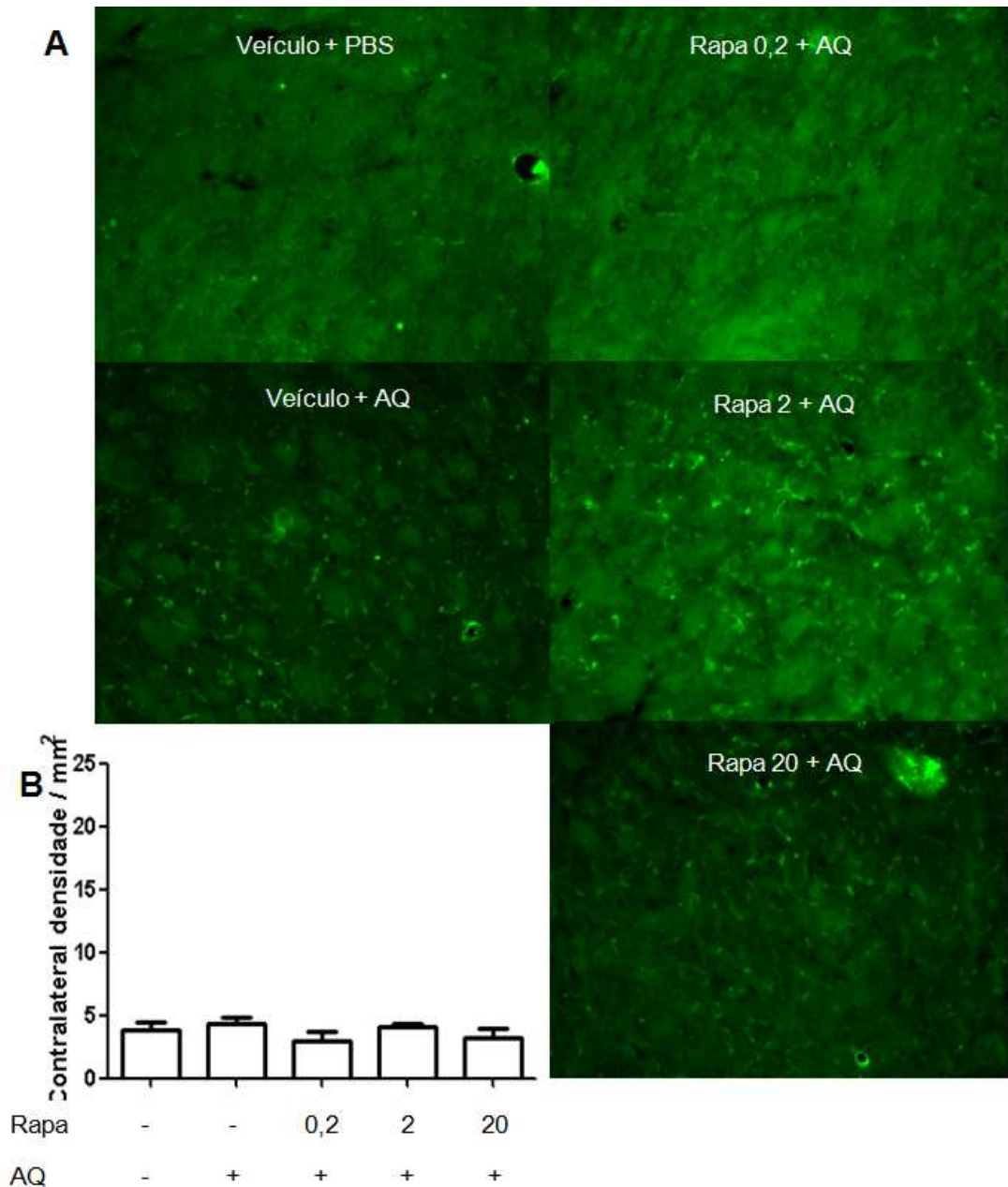


Figura 23: Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  na ativação astrocitária estriatal contralateral (N= 5-8 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A) Fotografia representativa no aumento de 20x do GFAP. (B) Análise quantitativa do GFAP. ###  $p < 0,05$  comparado com veículo + AQ (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

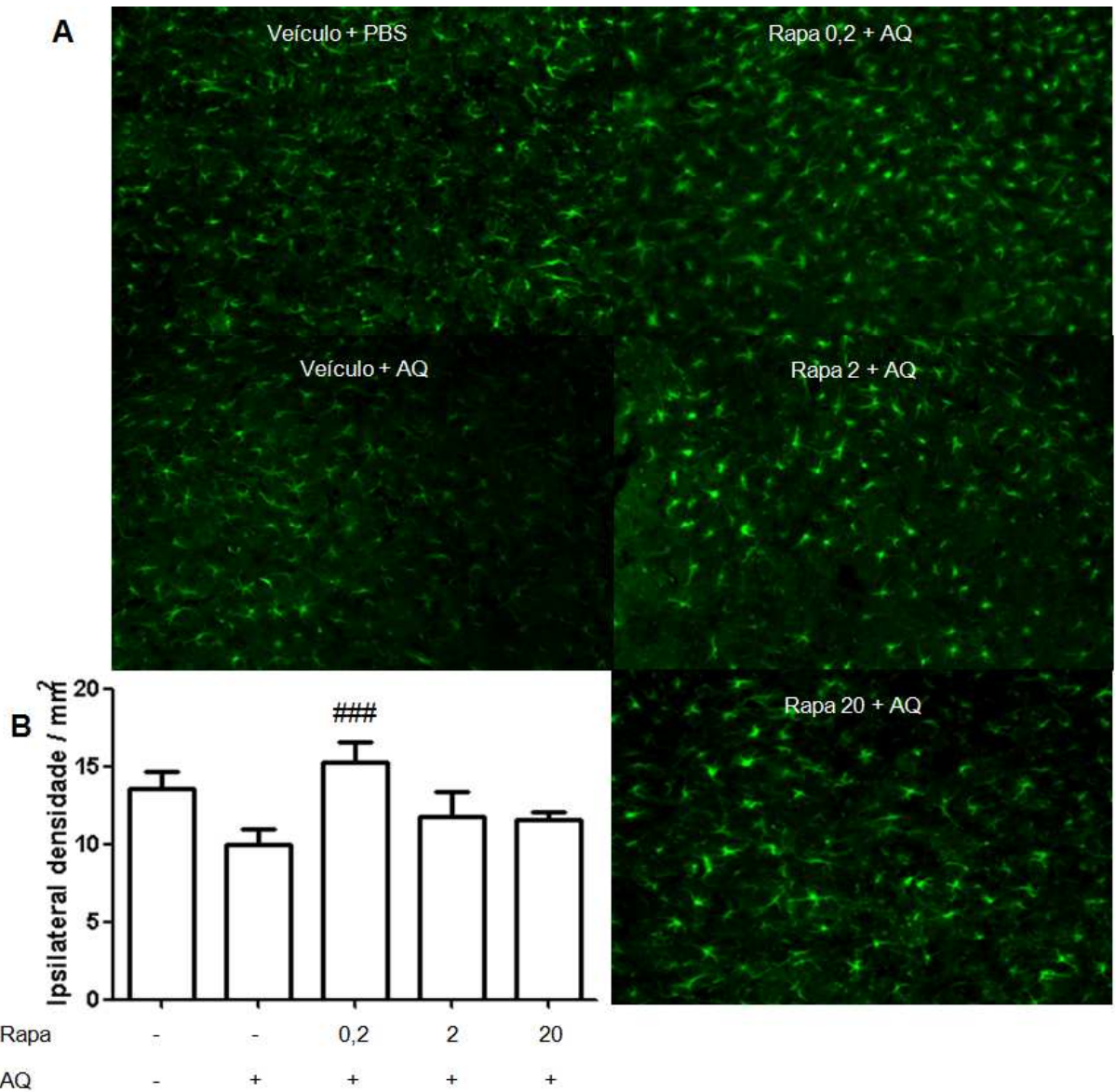


Figura 24: Efeito do tratamento rapamicina nas doses de 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$  na ativação astrocitária estriatal ipsilateral (N= 5-8 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. (A) Fotografia representativa no aumento de 20x do GFAP. (B) Análise quantitativa do GFAP. ###  $p < 0,05$  comparado com veículo + AQ (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

#### 4.8. Padronização do modelo de liberação de glutamato por sinaptossoma induzido por AQ

O AQ aumenta a liberação de glutamato em sinaptossoma de camundongo C57Bl/6 nas concentrações de AQ 10 mM e 5 mM, quando comparado com todos os grupos e com os controles PBS e KCl, respectivamente (Figura 25).

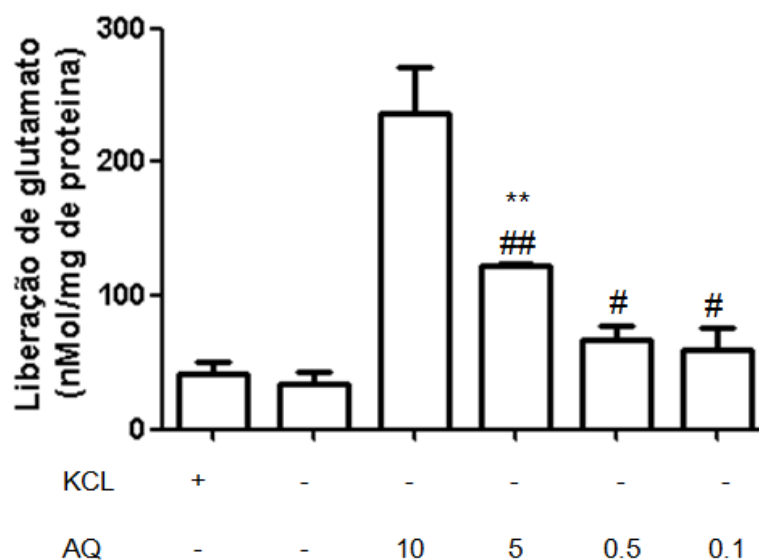


Figura 25: Avaliação da liberação de glutamato no sinaptossoma estriatal após estímulo com ácido quinolínico nas doses 0,1, 0,5, 5 e 10 mM (N= 2 animais/grupo). Valores expressos como média e erro padrão da média. \*\* p<0,01 comparado com PBS. #p<0,001 e ## p<0,01 comparado com AQ 10mM (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

A concentração de 5 mM foi utilizada nas análises posteriores, tendo em vista que apresenta um perfil intermediário de liberação de glutamato, efeito que poderia ser aumentado ou diminuído pela rapamicina.

#### 4.9. Avaliação do tratamento com rapamicina na liberação de glutamato pelo sinaptossoma

Os resultados da investigação do efeito de rapamicina na liberação de glutamato em sinaptossoma estriatal de camundongo C57Bl/6 mostrou um perfil diferente dependente da dose, isto é, nas maiores concentrações a rapamicina induz um aumento de liberação de glutamato (acima de 0,05 nM) quando comparado com o controle positivo (veículo + AQ 5 mM) e em concentrações mais baixas induz uma liberação menor que o controle positivo (Figura 26). Todas as concentrações testadas foram diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos controles KCl, PBS e Rapa 100 mM, menos o grupo de menor concentração de rapamicina (0,0001 nM).

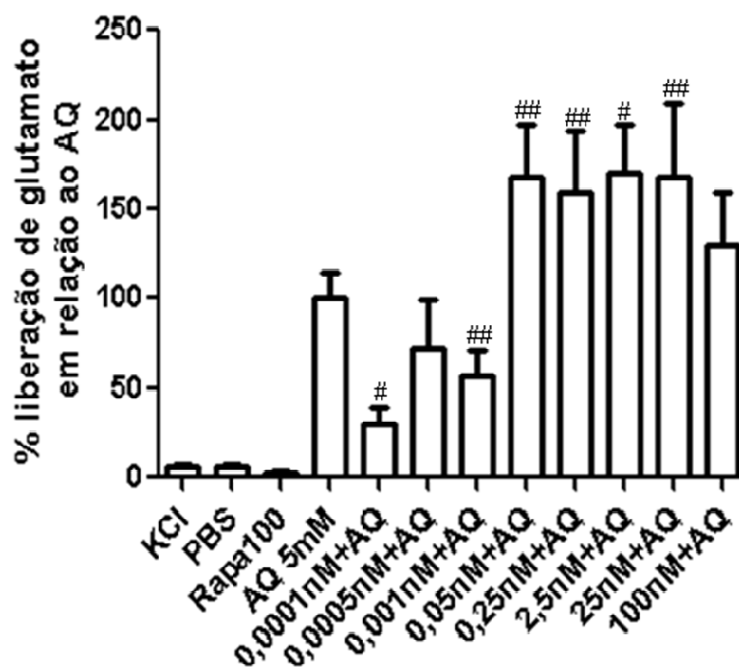


Figura 26: Avaliação da liberação de glutamato no sinaptossoma estriatal após tratamento com rapamicina nas doses 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,05, 0,25, 2,5, 25, 100 nM e estímulo com AQ 5 mM (N= 3 -10 sinaptossomas/grupo). Valores expressos como % da média de liberação de glutamato em relação ao AQ e erro padrão da média. #  $p < 0,001$  e ##  $p < 0,01$  comparado com AQ 5 mM. (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls).

#### 4.10. Resumo dos resultados *in vivo*

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos no tratamento com rapamicina seguido do estímulo com AQ em camundongos da linhagem C57Bl/6.

Tratamento	Parâmetros inflamatórios	Ativação microglial	Morte neuronal	Ativação astrocitária	Alteração motora
PBS	-	-	-	-	-
AQ	↑ IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ↓ INF $\gamma$	-	↑	-	↓
Rapa 0,2 $\mu$ M	↓ IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ e INF $\gamma$ ↑ IL-10	-	↓	↑	↑
Rapa 2 $\mu$ M	↓ IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ e INF $\gamma$	-	-	-	↓
Rapa 20 $\mu$ M	↓ IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ e INF $\gamma$	-	-	-	↓

## 5. DISCUSSÃO

O ácido quinolínico é um dos principais produtos da via da quinurenina (Stone and Perkins 1981, Chen and Guillemain 2009, Lugo-Huitron et al. 2013, Perez-De La Cruz et al. 2012, Schwarcz and Pellicciari 2002). Esta molécula produz excitação (Stone and Perkins 1981) e dano neuronal (Schwarcz et al. 1983), parte pela ativação dos receptores de NMDA e, outra parte, pela geração de estresse oxidativo (Behan et al. 1999, Rios and Santamaria 1991). Na doença de Huntington, os níveis endógenos de ácido quinolínico são aumentados. Assim, modelos que utilizam a administração de AQ vêm sendo utilizados para investigar os mecanismos intracelulares da DH (Macaya and Burke 1992, Topper et al. 1993, Vecsei and Beal 1991, Kalonia and Kumar 2011, Kalonia et al. 2011b, Kalonia et al. 2011a).

No presente estudo, utilizamos o modelo de doença de Huntington induzido por excitotoxicidade pelo estímulo de ácido quinolínico em camundongos C57Bl/6. Kalonia e colaboradores demonstraram que a administração bilateral de AQ (300 nmol em 4 µL) em ratos Wistar reduz o tempo de permanência do animal na haste giratória no teste do rotarod, bem como diminui o peso corporal dos animais após 7, 14 e 21 dias (Kalonia and Kumar 2011, Kalonia et al. 2011b). Nos nossos resultados, a administração unilateral de AQ também mostrou um perfil de diminuição do tempo na haste giratória em todas as doses de AQ (150, 200 e 250 nmol em 250 nL), mas não se observou uma redução do peso corporal dos animais. Essa diferença pode ser devida à administração unilateral de AQ, à espécie e também possivelmente as doses testadas não são suficientes para alterar o metabolismo energético do animal.

Além da alteração motora, o AQ também induz um processo inflamatório, ativa células gliais e altera a produção de neurotrofinas (Kalonia and Kumar 2011, Kalonia et al. 2011a, Kalonia et al. 2011b, Kalonia et al. 2012, Schiefer et al. 1998). A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR tem um importante papel na modulação do processo inflamatório (de Oliveira et al. 2008, de Oliveira et al. 2012). Em modelo *in vitro*, a via PI3K demonstrou um papel neuroprotetor diante do estímulo excitotóxico de AQ (Jang et al. 2010). Assim, neste estudo investigamos os efeitos da inibição de



mTOR pela rapamicina em um modelo excitotóxico de doença de Huntington em camundongos C57Bl/6, avaliando diferentes parâmetros, tais como alteração motora, produção de mediadores neurotróficos e inflamatórios, ativação microglial, proliferação astrocitária, neurodegeneração e liberação de glutamato.

Além do excesso de glutamato extracelular que ocasiona o processo excitotóxico, a inflamação aparece como um elemento-chave no processo neurodegenerativo. O envolvimento do processo inflamatório no modelo excitotóxico de DH pela administração de AQ é pouco descrito na literatura. Em 1998, Schiefer e colaboradores mostraram que a administração de AQ 240 nmol unilateral no estriado de ratos Wistar aumentou a produção da citocina IL-6 após 3 horas da injeção de AQ, tendo um pico máximo 6 h após o estímulo, sendo este reduzido após 24h (Schiefer et al. 1998). No estriado (Silvestroni et al. 2009) e no plasma de pacientes com DH também foi relatado uma super expressão de IL-6 (Dalrymple et al. 2007, Bjorkqvist et al. 2008). Também é observado um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  (Block and Schwarz 1994), bem como o aumento da expressão de IL-1 $\beta$  (Ellrichmann et al. 2013). Estas citocinas apresentam um perfil pró-inflamatório e a sua produção é também resultado, não exclusivamente, da ativação microglial.

Assim, nossos dados são condizentes com os achados de que no modelo de DH ocorre um aumento da produção dos mediadores inflamatórios IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no grupo com administração de AQ. Também demonstramos que o tratamento com rapamicina no modelo de excitotoxicidade induzida por AQ em camundongos diminui a produção destas citocinas. Além disso, o tratamento com rapamicina na menor dose (0,2  $\mu$ M) aumentou a expressão de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, que vem demonstrando um papel neuroprotetor (Fouda et al. 2013, Chen et al. 2013b, Sharma et al. 2011, Bethea et al. 1999), (Lu et al. 2014). O efeito de inibição da produção de citocinas já foi demonstrado em outros modelos. Em cultura de micróglia estimuladas com LPS, rapamicina diminuiu a produção de IL-6 e IL-1  $\beta$  (Han et al. 2013) e a liberação de IL-1 beta e TNF- $\alpha$  em cultura de astrócitos de ratos, expostos à isquemia (Gabryel et al. 2004).

A produção de mediadores inflamatórios pode ser modulada pela ativação de microglia. Um estudo *post mortem* do cérebro de paciente com DH mostrou um acúmulo significativo de microglia ativada em regiões que são afetadas pela DH como gânglios da base e córtex frontal (Sapp et al. 2001). Em modelos animais de DH, a ativação microglial também vem sendo relatada como um evento precoce nos processos patogênicos de DH e está associada com a progressão subclínica da doença (Tai et al. 2007, Topper et al. 1993, Leaver et al. 2012, Pavese et al. 2006, Kraft et al. 2012). Ryu e colaboradores mostraram a ativação microglial após 48 h e 7 dias de administração de AQ (60 nmol em 1µL) unilateral no estriado em ratos Sprague–Dawley (Ryu et al. 2005, Ryu et al. 2006).

Nos nossos resultados, para quantificação da microglia foi realizada uma análise de densidade microglial por área que mostrou não haver diferença estatística entre os grupos. Porém, observa-se uma diferença na morfologia destas células no controle positivo (veículo + AQ) em que a microglia apresenta um aspecto mais amebóide, indicando um processo de ativação.

Estudos mostram que a inibição de mTOR diminui a ativação microglial. Um estudo em cultura de microglia de rato usando o estímulo de mistura de citocinas mostrou que a inibição da quinase mTOR pela droga RAD001 reduziu a ativação microglial e os níveis intracelulares de ciclo-oxigenase (Dello Russo et al. 2009). Em modelo de epilepsia, a inibição de mTORC1 pela rapamicina atenuou a microgliose induzida pela pilocarpina (Brewster et al. 2013). Rapamicina também diminuiu a ativação microglial em modelo murino de DA (Majumder et al. 2011). Em nossos resultados, não houve diferença estatística entre os grupos, mas morfologicamente, a dose de 20 µM de rapamicina apresenta um aspecto similar ao controle negativo. Além disso, foi realizada apenas uma administração de rapamicina, sendo que a ativação de microglia foi avaliada apenas 48h depois da administração de AQ.

O descontrole do processo inflamatório, bem como o processo excitotóxico causado pela administração de ácido quinolínico, promovem a morte neuronal no local administrado (Hansson et al. 1999, Velloso et al. 2009, Zeron et al. 2002). Conforme estudos mostrados na literatura, nossos resultados confirmam o aumento

de morte neuronal após a administração de AQ intraestriatal quando comparado com o controle negativo. Porém, em relação ao tratamento com rapamicina, o grupo com a menor dose de rapamicina (0,2  $\mu$ M) é observada uma diminuição estatística da morte neuronal estriatal quando comparado ao grupo AQ. Um estudo recente investigou o efeito do mecanismo autofágico na neuroproteção contra o insulto excitotóxico do glutamato em cultura de células hipocampais, demonstrando que a rapamicina foi capaz de reduzir o efeito neurotóxico do glutamato, através da autofagia (Kulbe et al. 2014). A autofagia é um importante processo para a remoção de organelas danificadas e proteínas agregadas, podendo aumentar a sobrevivência celular ou causar a morte. mTOR induz a autofagia por inibir o complexo mTORC1 e as proteínas subsequentes (Ghavami et al. 2014). Além destas observações, também foi notada uma alteração na estrutura do tecido estriatal, em que se observa perda tecidual após a administração de AQ.

Os fatores neurotróficos, como BDNF e NGF, promovem a sobrevivência neuronal, bem como a proliferação celular e diferenciação de neurônios (Hagg 2005). No estriado, BDNF é importante para sua atividade e sobrevivência neuronal, sendo que cerca de 95% do BDNF estriatal é de origem cortical e o restante de origem na substância nigra (Zuccato and Cattaneo 2007). Estudos mostram que na DH, os níveis de BDNF encontram-se diminuídos (Strand et al. 2007, Zuccato and Cattaneo 2007, Giampa et al. 2009). Um estudo em modelo murino de DH mostrou que a administração de BDNF reverte os efeitos da doença (Canals et al. 2004). Na DH, também é relatada a diminuição dos níveis de NGF no plasma de pacientes com a doença (Tasset et al. 2012, Lorigados, Soderstrom and Ebendal 1992, Lorigados et al. 1998). No presente trabalho, entretanto, não foram encontradas alterações nos níveis de BDNF e NGF, nem após a injeção de AQ e nem no tratamento farmacológico com rapamicina. Uma possível explicação para a ausência de efeito da administração de AQ sobre BDNF e NGF é o momento escolhido para a determinação dos níveis destas neurotrofinas.

A morte neuronal induzida pela administração de AQ é devida, principalmente, ao processo excitotóxico. A captação do neurotransmissor da fenda sináptica é feita principalmente pelos astrócitos. O estímulo excitotóxico de AQ pode

induzir tanto um aumento quanto uma diminuição da proliferação astrocitária (astroglíose) (Ryu and McLarnon 2008), dependendo da dose (Ting, Brew and Guillemin 2009) e do tempo (Dihne et al. 2001).

No presente trabalho, não observamos a avaliação astrocitária não mostrou um aumento de astroglíose no grupo AQ como relatado na literatura, possivelmente devido ao tempo e a dose escolhida. O tratamento com rapamicina na dose mais baixa, 0,2  $\mu\text{M}$ , mostrou uma maior marcação astrocitária.

O aumento do número de astrócitos observado no tratamento de rapamicina 0,2  $\mu\text{M}$  possibilitaria o aumento da recaptação de glutamato presente e possivelmente diminuiria seus efeitos no local. Estudos mostram que a administração de AQ aumenta a liberação de glutamato, bem como inibe esta enzima que auxilia na reciclagem do neurotransmissor, aumentando a disponibilidade de glutamato na fenda sináptica, aumentando assim os efeitos excitotóxicos do neurotransmissor (Arzberger et al. 1997, Behrens et al. 2002, Comings et al. 1981, Connick and Stone 1988, Hassel et al. 2008, Lievens et al. 2005, Lievens et al. 2001, Mangano and Schwarcz 1981, Schwarcz et al. 1981, Tavares et al. 2002).

A avaliação da liberação de glutamato em sinaptossoma estriatal mostrou que nossos resultados condizem com o descrito na literatura, em que ocorre o aumento da liberação de glutamato após estímulo com AQ. Também foi observado que o tratamento farmacológico com a rapamicina apresenta um efeito dependente da concentração sobre a liberação de glutamato após estímulo com AQ, isto é, em reduzidas concentrações (abaixo de 0,05 nM), a rapamicina diminui a liberação de glutamato induzida pelo AQ. Porém, em concentrações mais elevadas (acima de 0,05 nM) a rapamicina aumenta a liberação de glutamato induzida por AQ. Este efeito pode estar relacionado a ativação ou inibição de diferentes proteínas ou alteração do influxo de cálcio. Acreditamos que o diferente efeito da rapamicina envolve além da inibição do complexo mTORC1 a participação de mTORC2. Um estudo utilizando glomérulo isolado mostrou que a rapamicina na concentração de 40  $\mu\text{M}$  induziu a inibição de mTORC2 quando mesurado o seu principal alvo, a

fosforilação de Akt Ser473. Além disso, os pesquisadores inibiram a sinalização de cálcio e verificaram que a atividade da Akt diminui, sugerindo que a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  também está envolvida com mTORC2 (Vassiliadis et al. 2011).

O sintoma mais acentuado na DH é a alteração motora, o que pode ser observado em modelos murinos da doença (Kalonia and Kumar 2011, Kalonia et al. 2011b). Zhang e colaboradores mostraram que a ingestão de rapamicina melhora o quadro de envelhecimento em camundongos C57Bl/6 e melhora o desempenho motor dos camundongos avaliado pelo aparelho rotarod tanto em animais machos quanto em fêmeas (Zhang et al. 2014). Em estudo murino genético de DH, também mostrou uma melhora no perfil motor após tratamento com rapamicina (Ravikumar et al. 2004).

Na avaliação da alteração motora, pelo rotarod, foi observada uma reversão do efeito de ácido quinolínico na dose de 0,2  $\mu\text{M}$  de rapamicina, enquanto que nas doses de 2 e 20  $\mu\text{M}$  de rapamicina o efeito se assemelha ao observado no ácido quinolínico. Essa melhora no comportamento da dose de 0,2  $\mu\text{M}$  de rapamicina pode ser devido às alterações observadas nos mediadores inflamatórios, aumento da IL-1 $\beta$ , bem como a diminuição de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , além do aumento do número de astrócito, células de defesa do SNC e diminuição da morte neuronal estriatal. Os resultados do presente estudo demonstram que a inibição desta molécula reverte os efeitos excitotóxicos induzidos pela administração de AQ e sugerem o envolvimento de mTOR na patogenia da doença de Huntington.

## **6. CONCLUSÃO**

Diante dos resultados obtidos no trabalho proposto, podemos concluir que a micro-injeção intraestriatal de AQ causa uma neurotoxicidade, induzindo uma piora no comportamento motor, bem como nos parâmetros inflamatórios e neurodegenerativo. O tratamento farmacológico com o inibidor de mTOR, rapamicina, melhora os parâmetros inflamatório e comportamental com a menor dose. Além disso, a rapamicina apresenta um efeito dual sobre a liberação de glutamato em comparação ao AQ. Assim, estudos posteriores são necessários para se entender melhor o mecanismo da rapamicina sobre processos de excitotoxicidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andre, V. M., C. Cepeda & M. S. Levine (2010) Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act. *CNS Neurosci Ther*, 16, 163-78.
- Armstrong, M. J. & J. M. Miyasaki (2012) Evidence-based guideline: pharmacologic treatment of chorea in Huntington disease: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 79, 597-603.
- Arzberger, T., K. Krampfl, S. Leimgruber & A. Weindl (1997) Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease--an in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56, 440-54.
- Baez-Mendoza, R. & W. Schultz (2013) The role of the striatum in social behavior. *Front Neurosci*, 7, 233.
- Ballou, L. M. & R. Z. Lin (2008) Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol*, 1, 27-36.
- Bano, D., F. Zanetti, Y. Mende & P. Nicotera (2011) Neurodegenerative processes in Huntington's disease. *Cell Death Dis*, 2, e228.
- Bates, G. P., L. Mangiarini, A. Mahal & S. W. Davies (1997) Transgenic models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 6, 1633-7.
- Beal, M. F., N. W. Kowall, D. W. Ellison, M. F. Mazurek, K. J. Swartz & J. B. Martin (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*, 321, 168-71.

- Behan, W. M., M. McDonald, L. G. Darlington & T. W. Stone (1999) Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br J Pharmacol*, 128, 1754-60.
- Behrens, P. F., P. Franz, B. Woodman, K. S. Lindenberg & G. B. Landwehrmeyer (2002) Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain*, 125, 1908-22.
- Bethea, J. R., H. Nagashima, M. C. Acosta, C. Briceno, F. Gomez, A. E. Marcillo, K. Loor, J. Green & W. D. Dietrich (1999) Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, 16, 851-63.
- Bettcher, B. M. & J. H. Kramer (2013) Inflammation and clinical presentation in neurodegenerative disease: a volatile relationship. *Neurocase*, 19, 182-200.
- Block, F., M. Kunkel & M. Schwarz (1993) Quinolinic acid lesion of the striatum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats. *Neurosci Lett*, 149, 126-8.
- Block, F. & M. Schwarz (1994) Expression of GFAP in the striatum and its projection areas in response to striatal quinolinic acid lesion in rats. *Neuroreport*, 5, 2237-40.
- Bolam, J. P., J. J. Hanley, P. A. Booth & M. D. Bevan (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat*, 196 ( Pt 4), 527-42.
- Brewster, A. L., J. N. Lugo, V. V. Patil, W. L. Lee, Y. Qian, F. Vanegas & A. E. Anderson (2013) Rapamycin reverses status epilepticus-induced memory deficits and dendritic damage. *PLoS One*, 8, e57808.
- Canals, J. M., J. R. Pineda, J. F. Torres-Peraza, M. Bosch, R. Martin-Ibanez, M. T. Munoz, G. Mengod, P. Ernfors & J. Alberch (2004) Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with



- enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci*, 24, 7727-39.
- Carracedo, A. & P. P. Pandolfi (2008) The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*, 27, 5527-41.
- Cha, J. H., A. S. Frey, S. A. Alsdorf, J. A. Kerner, C. M. Kosinski, L. Mangiarini, J. B. Penney, Jr., S. W. Davies, G. P. Bates & A. B. Young (1999) Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354, 981-9.
- Cha, J. H., C. M. Kosinski, J. A. Kerner, S. A. Alsdorf, L. Mangiarini, S. W. Davies, J. B. Penney, G. P. Bates & A. B. Young (1998) Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6480-5.
- Chen, J. Y., E. A. Wang, C. Cepeda & M. S. Levine (2013a) Dopamine imbalance in Huntington's disease: a mechanism for the lack of behavioral flexibility. *Front Neurosci*, 7, 114.
- Chen, X., X. S. Duan, L. J. Xu, J. J. Zhao, Z. F. She, W. W. Chen, Z. J. Zheng & G. D. Jiang (2013b) Interleukin-10 mediates the neuroprotection of hyperbaric oxygen therapy against traumatic brain injury in mice. *Neuroscience*, 266C, 235-243.
- Chen, Y. & G. J. Guillemin (2009) Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. *Int J Tryptophan Res*, 2, 1-19.
- Clabough, E. B. (2013) Huntington's disease: the past, present, and future search for disease modifiers. *Yale J Biol Med*, 86, 217-33.
- Colton, C. K., Q. Kong, L. Lai, M. X. Zhu, K. I. Seyb, G. D. Cuny, J. Xian, M. A. Glicksman & C. L. Lin (2010) Identification of translational activators of glial glutamate transporter EAAT2 through cell-based high-throughput screening: an approach to prevent excitotoxicity. *J Biomol Screen*, 15, 653-62.

- Comings, D. E., I. E. Goetz, J. Holden & J. Holtz (1981) Huntington disease and Tourette syndrome. II. Uptake of glutamic acid and other amino acids by fibroblasts. *Am J Hum Genet*, 33, 175-86.
- Connick, J. H., V. Carla, F. Moroni & T. W. Stone (1989) Increase in kynurenic acid in Huntington's disease motor cortex. *J Neurochem*, 52, 985-7.
- Connick, J. H. & T. W. Stone (1988) Excitatory amino acid antagonists and endogenous aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol*, 93, 863-7.
- Connick, J. H., T. W. Stone, V. Carla & F. Moroni (1988) Increased kynurenic acid levels in Huntington's disease. *Lancet*, 2, 1373.
- Costa-Mattioli, M. & L. M. Monteggia (2013) mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 16, 1537-43.
- Coyle, J. T. & R. Schwarcz (1976) Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 263, 244-6.
- Crespo, J. L. & M. N. Hall (2002) Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 579-91, table of contents.
- Crossman, A. R., I. J. Mitchell, M. A. Sambrook & A. Jackson (1988) Chorea and myoclonus in the monkey induced by gamma-aminobutyric acid antagonism in the lentiform complex. The site of drug action and a hypothesis for the neural mechanisms of chorea. *Brain*, 111 ( Pt 5), 1211-33.
- Dairam, A., P. Chetty & S. Daya (2006) Non-steroidal anti-inflammatory agents, tolmetin and sulindac, attenuate oxidative stress in rat brain homogenate and reduce quinolinic acid-induced neurodegeneration in rat hippocampal neurons. *Metab Brain Dis*, 21, 221-33.

- Dairam, A., A. C. Muller & S. Daya (2007) Non-steroidal anti-inflammatory agents, tolmetin and sulindac attenuate quinolinic acid (QA)-induced oxidative stress in primary hippocampal neurons and reduce QA-induced spatial reference memory deficits in male Wistar rats. *Life Sci*, 80, 1431-8.
- de Carvalho, L. P., P. Bochet & J. Rossier (1996) The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits. *Neurochem Int*, 28, 445-52.
- de Oliveira, A. C., E. Candelario-Jalil, H. S. Bhatia, K. Lieb, M. Hull & B. L. Fiebich (2008) Regulation of prostaglandin E2 synthase expression in activated primary rat microglia: evidence for uncoupled regulation of mPGES-1 and COX-2. *Glia*, 56, 844-55.
- de Oliveira, A. C., E. Candelario-Jalil, J. Langbein, L. Wendeburg, H. S. Bhatia, J. C. Schlachetzki, K. Biber & B. L. Fiebich (2012) Pharmacological inhibition of Akt and downstream pathways modulates the expression of COX-2 and mPGES-1 in activated microglia. *J Neuroinflammation*, 9, 2.
- Dello Russo, C., L. Lisi, D. L. Feinstein & P. Navarra (2013) mTOR kinase, a key player in the regulation of glial functions: relevance for the therapy of multiple sclerosis. *Glia*, 61, 301-11.
- Dello Russo, C., L. Lisi, G. Tringali & P. Navarra (2009) Involvement of mTOR kinase in cytokine-dependent microglial activation and cell proliferation. *Biochem Pharmacol*, 78, 1242-51.
- Dihne, M., F. Block, H. Korr & R. Topper (2001) Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury. *Brain Res*, 902, 178-89.
- Dumont, F. J. & Q. Su (1996) Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci*, 58, 373-95.
- Dunkley, P. R., J. W. Heath, S. M. Harrison, P. E. Jarvie, P. J. Glenfield & J. A. Rostas (1988) A rapid Percoll gradient procedure for isolation of

synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res*, 441, 59-71.

Ellrichmann, G., C. Reick, C. Saft & R. A. Linker (2013) The role of the immune system in Huntington's disease. *Clin Dev Immunol*, 2013, 541259.

Erlich, S., A. Alexandrovich, E. Shohami & R. Pinkas-Kramarski (2007) Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*, 26, 86-93.

Fouda, A. Y., A. Kozak, A. Alhusban, J. A. Switzer & S. C. Fagan (2013) Anti-inflammatory IL-10 is upregulated in both hemispheres after experimental ischemic stroke: Hypertension blunts the response. *Exp Transl Stroke Med*, 5, 12.

Funakoshi, T., A. Matsuura, T. Noda & Y. Ohsumi (1997) Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 192, 207-13.

Gabryel, B., K. Labuzek, A. Malecki & Z. S. Herman (2004) Immunophilin ligands decrease release of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNF-alpha and IL-2 in rat astrocyte cultures exposed to simulated ischemia in vitro. *Pol J Pharmacol*, 56, 129-36.

Garelick, M. G. & B. K. Kennedy (2011) TOR on the brain. *Exp Gerontol*, 46, 155-63.

Gasparini, C. F. & L. R. Griffiths (2013) The biology of the glutamatergic system and potential role in migraine. *Int J Biomed Sci*, 9, 1-8.

Georgakis, G. V. & A. Younes (2006) From Rapa Nui to rapamycin: targeting PI3K/Akt/mTOR for cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*, 6, 131-40.

Ghavami, S., S. Shojaei, B. Yeganeh, S. R. Ande, J. R. Jangamreddy, M. Mehrpour, J. Christoffersson, W. Chaabane, A. R. Moghadam, H. H. Kashani, M.

- Hashemi, A. A. Owji & M. J. Los (2014) Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*, 112, 24-49.
- Giampa, C., S. Patassini, A. Borreca, D. Laurenti, F. Marullo, G. Bernardi, F. S. Menniti & F. R. Fusco (2009) Phosphodiesterase 10 inhibition reduces striatal excitotoxicity in the quinolinic acid model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, 34, 450-6.
- Gil-Mohapel, J., J. M. Simpson, M. Ghilan & B. R. Christie (2011) Neurogenesis in Huntington's disease: can studying adult neurogenesis lead to the development of new therapeutic strategies? *Brain Res*, 1406, 84-105.
- Gines, S., E. Ivanova, I. S. Seong, C. A. Saura & M. E. MacDonald (2003) Enhanced Akt signaling is an early pro-survival response that reflects N-methyl-D-aspartate receptor activation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *J Biol Chem*, 278, 50514-22.
- Ginhoux, F., S. Lim, G. Hoeffel, D. Low & T. Huber (2013) Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci*, 7, 45.
- Greenamyre, J. T., J. B. Penney, A. B. Young, C. J. D'Amato, S. P. Hicks & I. Shoulson (1985) Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Science*, 227, 1496-9.
- Hadzi, T. C., A. E. Hendricks, J. C. Latourelle, K. L. Lunetta, L. A. Cupples, T. Gillis, J. S. Mysore, J. F. Gusella, M. E. MacDonald, R. H. Myers & J. P. Vonsattel (2012) Assessment of cortical and striatal involvement in 523 Huntington disease brains. *Neurology*, 79, 1708-15.
- Hagg, T. (2005) Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci*, 28, 589-95.
- Hall, M. (1954) Huntington's chorea; a review of four cases in one family. *Can Med Assoc J*, 71, 493-4.

- Han, H. E., T. K. Kim, H. J. Son, W. J. Park & P. L. Han (2013) Activation of Autophagy Pathway Suppresses the Expression of iNOS, IL6 and Cell Death of LPS-Stimulated Microglia Cells. *Biomol Ther (Seoul)*, 21, 21-8.
- Hansson, O., A. Petersen, M. Leist, P. Nicotera, R. F. Castilho & P. Brundin (1999) Transgenic mice expressing a Huntington's disease mutation are resistant to quinolinic acid-induced striatal excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8727-32.
- Hassel, B., S. Tessler, R. L. Faull & P. C. Emson (2008) Glutamate uptake is reduced in prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurochem Res*, 33, 232-7.
- Heng, M. Y., P. J. Detloff, P. L. Wang, J. Z. Tsien & R. L. Albin (2009) In vivo evidence for NMDA receptor-mediated excitotoxicity in a murine genetic model of Huntington disease. *J Neurosci*, 29, 3200-5.
- Honig, L. S. (2000) Inflammation in neurodegenerative disease: good, bad, or irrelevant? *Arch Neurol*, 57, 786-8.
- Huang, S., M. A. Bjornsti & P. J. Houghton (2003) Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biol Ther*, 2, 222-32.
- Humbert, S., E. A. Bryson, F. P. Cordelieres, N. C. Connors, S. R. Datta, S. Finkbeiner, M. E. Greenberg & F. Saudou (2002) The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell*, 2, 831-7.
- Hunter, R. L., B. Cheng, D. Y. Choi, M. Liu, S. Liu, W. A. Cass & G. Bing (2009) Intrastratial lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice. *J Neurosci Res*, 87, 1913-21.
- Hurley, L. L. & Y. Tizabi (2013) Neuroinflammation, neurodegeneration, and depression. *Neurotox Res*, 23, 131-44.

- Isacson, O., P. Brundin, P. A. Kelly, F. H. Gage & A. Bjorklund (1984) Functional neuronal replacement by grafted striatal neurones in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. *Nature*, 311, 458-60.
- Jang, B. C., J. H. Paik, S. P. Kim, D. H. Shin, D. K. Song, J. G. Park, M. H. Suh, J. W. Park & S. I. Suh (2005) Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of NF-kappaB, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. *Cell Signal*, 17, 625-33.
- Jang, S., H. S. Jeong, J. S. Park, Y. S. Kim, C. Y. Jin, M. B. Seol, B. C. Kim & M. C. Lee (2010) Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate against quinolinic acid-induced excitotoxicity via PI3K pathway and NO inhibition. *Brain Res*, 1313, 25-33.
- Jaworski, J. & M. Sheng (2006) The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Mol Neurobiol*, 34, 205-19.
- Jha, M. K., S. Jeon & K. Suk (2012) Glia as a Link between Neuroinflammation and Neuropathic Pain. *Immune Netw*, 12, 41-7.
- Kalonia, H. & A. Kumar (2011) Suppressing inflammatory cascade by cyclooxygenase inhibitors attenuates quinolinic acid induced Huntington's disease-like alterations in rats. *Life Sci*, 88, 784-91.
- Kalonia, H., P. Kumar & A. Kumar (2011a) Attenuation of proinflammatory cytokines and apoptotic process by verapamil and diltiazem against quinolinic acid induced Huntington like alterations in rats. *Brain Res*, 1372, 115-26.
- Kalonia, H., P. Kumar & A. Kumar (2011b) Licofelone attenuates quinolinic acid induced Huntington like symptoms: possible behavioral, biochemical and cellular alterations. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35, 607-15.
- Kalonia, H., P. Kumar, A. Kumar & B. Nehru (2009a) Effect of caffeic acid and rofecoxib and their combination against intrastriatal quinolinic acid induced

- oxidative damage, mitochondrial and histological alterations in rats. *Inflammopharmacology*, 17, 211-9.
- Kalonia, H., P. Kumar, A. Kumar & B. Nehru (2009b) Effects of caffeic acid, rofecoxib, and their combination against quinolinic acid-induced behavioral alterations and disruption in glutathione redox status. *Neurosci Bull*, 25, 343-52.
- Kalonia, H., P. Kumar, A. Kumar & B. Nehru (2010) Protective effect of rofecoxib and nimesulide against intra-striatal quinolinic acid-induced behavioral, oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rats. *Neurotoxicology*, 31, 195-203.
- Kalonia, H., J. Mishra & A. Kumar (2012) Targeting neuro-inflammatory cytokines and oxidative stress by minocycline attenuates quinolinic-acid-induced Huntington's disease-like symptoms in rats. *Neurotox Res*, 22, 310-20.
- Kamada, Y., T. Funakoshi, T. Shintani, K. Nagano, M. Ohsumi & Y. Ohsumi (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, 150, 1507-13.
- Kamada, Y., T. Sekito & Y. Ohsumi (2004) Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 279, 73-84.
- Kettenmann, H., U. K. Hanisch, M. Noda & A. Verkhratsky (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91, 461-553.
- Kohler, C., L. G. Eriksson, P. R. Flood, J. A. Hardie, E. Okuno & R. Schwarcz (1988) Quinolinic acid metabolism in the rat brain. Immunohistochemical identification of 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase and quinolinic acid phosphoribosyltransferase in the hippocampal region. *J Neurosci*, 8, 975-87.
- Kraft, A. D., L. S. Kaltenbach, D. C. Lo & G. J. Harry (2012) Activated microglia proliferate at neurites of mutant huntingtin-expressing neurons. *Neurobiol Aging*, 33, 621 e17-33.



- Kulbe, J. R., J. M. Mulcahy Levy, S. J. Coultrap, A. Thorburn & K. U. Bayern (2014) Excitotoxic glutamate insults block autophagic flux in hippocampal neurons. *Brain Res*, 1542, 12-9.
- Kumar, P., H. Kalonia & A. Kumar (2010) Huntington's disease: pathogenesis to animal models. *Pharmacol Rep*, 62, 1-14.
- Lange, K. W., B. J. Sahakian, N. P. Quinn, C. D. Marsden & T. W. Robbins (1995) Comparison of executive and visuospatial memory function in Huntington's disease and dementia of Alzheimer type matched for degree of dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 58, 598-606.
- Lapin, I. P. (1978) Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. *J Neural Transm*, 42, 37-43.
- Lawrence, A. D., B. J. Sahakian, J. R. Hodges, A. E. Rosser, K. W. Lange & T. W. Robbins (1996) Executive and mnemonic functions in early Huntington's disease. *Brain*, 119 ( Pt 5), 1633-45.
- Leaver, K. R., A. Reynolds, S. Bodard, D. Guilloteau, S. Chalon & M. Kassiou (2012) Effects of translocator protein (18 kDa) ligands on microglial activation and neuronal death in the quinolinic-acid-injected rat striatum. *ACS Chem Neurosci*, 3, 114-9.
- Lievens, J. C., T. Rival, M. Iche, H. Chneiweiss & S. Birman (2005) Expanded polyglutamine peptides disrupt EGF receptor signaling and glutamate transporter expression in *Drosophila*. *Hum Mol Genet*, 14, 713-24.
- Lievens, J. C., B. Woodman, A. Mahal, O. Spasic-Bosovic, D. Samuel, L. Kerkerian-Le Goff & G. P. Bates (2001) Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis*, 8, 807-21.
- Lima, I. V., L. F. Bastos, M. Limborco-Filho, B. L. Fiebich & A. C. de Oliveira (2012) Role of prostaglandins in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Mediators Inflamm*, 2012, 946813.

- Lin, C. H., S. H. Yeh, K. T. Lu, T. H. Leu, W. C. Chang & P. W. Gean (2001) A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron*, 31, 841-51.
- Liu, P., H. Cheng, T. M. Roberts & J. J. Zhao (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 8, 627-44.
- Lorigados, L., N. Pavon, T. Serrano & M. A. Robinson (1998) [Nerve growth factor and neurological diseases]. *Rev Neurol*, 26, 744-8.
- Lorigados, L., S. Soderstrom & T. Ebendal (1992) Two-site enzyme immunoassay for beta NGF applied to human patient sera. *J Neurosci Res*, 32, 329-39.
- Lu, Q., L. Gao, L. Huang, L. Ruan, J. Yang, W. Huang, Z. Li, Y. Zhang, K. Jin & Q. Zhuge (2014) Inhibition of mammalian target of rapamycin improves neurobehavioral deficit and modulates immune response after intracerebral hemorrhage in rat. *J Neuroinflammation*, 11, 44.
- Lugo-Huitron, R., P. Ugalde Muniz, B. Pineda, J. Pedraza-Chaverri, C. Rios & V. Perez-de la Cruz (2013) Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 104024.
- Lynch, D. R. & R. P. Guttman (2002) Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 300, 717-23.
- Macaya, A. & R. E. Burke (1992) Effect of striatal lesion with quinolinate on the development of substantia nigra dopaminergic neurons: a quantitative morphological analysis. *Dev Neurosci*, 14, 362-8.
- Majumder, S., A. Richardson, R. Strong & S. Oddo (2011) Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits. *PLoS One*, 6, e25416.
- Mangano, R. M. & R. Schwarcz (1981) Platelet glutamate and aspartate uptake in Huntington's disease. *J Neurochem*, 37, 1072-4.

- Matsuura, A., M. Tsukada, Y. Wada & Y. Ohsumi (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 192, 245-50.
- McGeer, E. G. & P. L. McGeer (1976) Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature*, 263, 517-9.
- Mealer, R. G., A. J. Murray, N. Shahani, S. Subramaniam & S. H. Snyder (2014) Rhes, a striatal-selective protein implicated in Huntington disease, binds beclin-1 and activates autophagy. *J Biol Chem*, 289, 3547-54.
- Miller, B. R. & I. Bezprozvanny (2010) Corticostriatal circuit dysfunction in Huntington's disease: intersection of glutamate, dopamine and calcium. *Future Neurol*, 5, 735-756.
- Nicholls, D. G., T. S. Sihra & J. Sanchez-Prieto (1987) Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem*, 49, 50-7.
- Ozawa, S., H. Kamiya & K. Tsuzuki (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, 54, 581-618.
- Pavese, N., A. Gerhard, Y. F. Tai, A. K. Ho, F. Turkheimer, R. A. Barker, D. J. Brooks & P. Piccini (2006) Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. *Neurology*, 66, 1638-43.
- Pearson, S. J. & G. P. Reynolds (1992) Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease. *Neurosci Lett*, 144, 199-201.
- Perez-De La Cruz, V., P. Carrillo-Mora & A. Santamaria (2012) Quinolinic Acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *Int J Tryptophan Res*, 5, 1-8.

- Popoli, P., A. Pezzola, M. R. Domenici, S. Sagratella, G. Diana, M. G. Caporali, E. Bronzetti, J. Vega & A. Scotti de Carolis (1994) Behavioral and electrophysiological correlates of the quinolinic acid rat model of Huntington's disease in rats. *Brain Res Bull*, 35, 329-35.
- Price, D. J., J. R. Grove, V. Calvo, J. Avruch & B. E. Bierer (1992) Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science*, 257, 973-7.
- Pringsheim, T., K. Wiltshire, L. Day, J. Dykeman, T. Steeves & N. Jette (2012) The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*, 27, 1083-91.
- Ramaswamy, S., J. L. McBride & J. H. Kordower (2007) Animal models of Huntington's disease. *ILAR J*, 48, 356-73.
- Ravikumar, B., C. Vacher, Z. Berger, J. E. Davies, S. Luo, L. G. Oroz, F. Scaravilli, D. F. Easton, R. Duden, C. J. O'Kane & D. C. Rubinsztein (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*, 36, 585-95.
- Reilmann, R. (2013) Pharmacological treatment of chorea in Huntington's disease—good clinical practice versus evidence-based guideline. *Mov Disord*, 28, 1030-3.
- Ribeiro, F. M., E. R. Camargos, L. C. de Souza & A. L. Teixeira (2013) Animal models of neurodegenerative diseases. *Rev Bras Psiquiatr*, 35 Suppl 2, S82-91.
- Rios, C. & A. Santamaria (1991) Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res*, 16, 1139-43.
- Roze, E., E. Cahill, E. Martin, C. Bonnet, P. Vanhoutte, S. Betuing & J. Caboche (2011) Huntington's Disease and Striatal Signaling. *Front Neuroanat*, 5, 55.

- Ryu, J. K., H. B. Choi & J. G. McLarnon (2005) Peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 reduces microglial activation and neuronal death in quinolinic acid-injected rat striatum. *Neurobiol Dis*, 20, 550-61.
- Ryu, J. K., H. B. Choi & J. G. McLarnon (2006) Combined minocycline plus pyruvate treatment enhances effects of each agent to inhibit inflammation, oxidative damage, and neuronal loss in an excitotoxic animal model of Huntington's disease. *Neuroscience*, 141, 1835-48.
- Ryu, J. K. & J. G. McLarnon (2008) VEGF receptor antagonist Cyclo-VEGI reduces inflammatory reactivity and vascular leakiness and is neuroprotective against acute excitotoxic striatal insult. *J Neuroinflammation*, 5, 18.
- Salzberg-Brenhouse, H. C., E. Y. Chen, D. F. Emerich, S. Baldwin, K. Hogeland, S. Ranelli, D. Lafreniere, B. Perdomo, L. Novak, T. Kladis, K. Fu, A. S. Basile, J. H. Kordower & R. T. Bartus (2003) Inhibitors of cyclooxygenase-2, but not cyclooxygenase-1 provide structural and functional protection against quinolinic acid-induced neurodegeneration. *J Pharmacol Exp Ther*, 306, 218-28.
- Sanberg, P. R., S. F. Calderon, M. Giordano, J. M. Tew & A. B. Norman (1989) The quinolinic acid model of Huntington's disease: locomotor abnormalities. *Exp Neurol*, 105, 45-53.
- Sapp, E., K. B. Kegel, N. Aronin, T. Hashikawa, Y. Uchiyama, K. Tohyama, P. G. Bhide, J. P. Vonsattel & M. DiFiglia (2001) Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60, 161-72.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali & D. M. Sabatini (2005) Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 596-603.

- Sarkar, S., G. Krishna, S. Imarisio, S. Saiki, C. J. O'Kane & D. C. Rubinsztein (2008) A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet*, 17, 170-8.
- Sarkar, S. & D. C. Rubinsztein (2008) Huntington's disease: degradation of mutant huntingtin by autophagy. *FEBS J*, 275, 4263-70.
- Schiefer, J., R. Topper, W. Schmidt, F. Block, P. C. Heinrich, J. Noth & M. Schwarz (1998) Expression of interleukin 6 in the rat striatum following stereotaxic injection of quinolinic acid. *J Neuroimmunol*, 89, 168-76.
- Schlachetzki, J. C., S. W. Saliba & A. C. de Oliveira (2013) Studying neurodegenerative diseases in culture models. *Rev Bras Psiquiatr*, 35 Suppl 2, S92-100.
- Schmitz, F., A. Heit, S. Dreher, K. Eisenacher, J. Mages, T. Haas, A. Krug, K. P. Janssen, C. J. Kirschning & H. Wagner (2008) Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. *Eur J Immunol*, 38, 2981-92.
- Schwarcz, R., C. Kohler, R. M. Mangano & A. N. Neophytides (1981) Glutamate-induced neuronal degeneration: studies on the role of glutamate re-uptake. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 27, 403-12.
- Schwarcz, R., E. Okuno, R. J. White, E. D. Bird & W. O. Whetsell, Jr. (1988) 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington disease victims. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 4079-81.
- Schwarcz, R. & R. Pellicciari (2002) Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 1-10.
- Schwarcz, R., W. O. Whetsell, Jr. & R. M. Mangano (1983) Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 219, 316-8.

- Sehgal, S. N. (2003) Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc*, 35, 7S-14S.
- Sharma, S., B. Yang, X. Xi, J. C. Grotta, J. Aronowski & S. I. Savitz (2011) IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways. *Brain Res*, 1373, 189-94.
- Shear, D. A., J. Dong, C. D. Gundy, K. L. Haik-Creguer & G. L. Dunbar (1998) Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 22, 1217-40.
- Simeone, T. A., R. M. Sanchez & J. M. Rho (2004) Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *J Child Neurol*, 19, 343-60; discussion 361.
- Stone, T. W. & M. N. Perkins (1981) Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol*, 72, 411-2.
- Strand, A. D., Z. C. Baquet, A. K. Aragaki, P. Holmans, L. Yang, C. Cleren, M. F. Beal, L. Jones, C. Kooperberg, J. M. Olson & K. R. Jones (2007) Expression profiling of Huntington's disease models suggests that brain-derived neurotrophic factor depletion plays a major role in striatal degeneration. *J Neurosci*, 27, 11758-68.
- Tai, Y. F., N. Pavese, A. Gerhard, S. J. Tabrizi, R. A. Barker, D. J. Brooks & P. Piccini (2007) Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain*, 130, 1759-66.
- Tang, S. J., G. Reis, H. Kang, A. C. Gingras, N. Sonenberg & E. M. Schuman (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 467-72.

- Tasset, I., F. Sanchez-Lopez, E. Aguera, R. Fernandez-Bolanos, F. M. Sanchez, A. Cruz-Guerrero, F. Gascon-Luna & I. Tunez (2012) NGF and nitrosative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurol Sci*, 315, 133-6.
- Tavares, R. G., C. I. Tasca, C. E. Santos, L. B. Alves, L. O. Porciuncula, T. Emanuelli & D. O. Souza (2002) Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem Int*, 40, 621-7.
- Thoreen, C. C. & D. M. Sabatini (2004) Huntingtin aggregates ask to be eaten. *Nat Genet*, 36, 553-4.
- Ting, K. K., B. J. Brew & G. J. Guillemin (2009) Effect of quinolinic acid on human astrocytes morphology and functions: implications in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 6, 36.
- Topper, R., J. Gehrmann, M. Schwarz, F. Block, J. Noth & G. W. Kreutzberg (1993) Remote microglial activation in the quinolinic acid model of Huntington's disease. *Exp Neurol*, 123, 271-83.
- van Dijk, J. G., E. A. van der Velde, R. A. Roos & G. W. Bruyn (1986) Juvenile Huntington disease. *Hum Genet*, 73, 235-9.
- Vassiliadis, J., C. Bracken, D. Matthews, S. O'Brien, S. Schiavi & S. Wawersik (2011) Calcium mediates glomerular filtration through calcineurin and mTORC2/Akt signaling. *J Am Soc Nephrol*, 22, 1453-61.
- Vecsei, L. & M. F. Beal (1991) Comparative behavioral and neurochemical studies with striatal kainic acid- or quinolinic acid-lesioned rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 39, 473-8.
- Velloso, N. A., G. D. Dalmolin, G. M. Gomes, M. A. Rubin, P. M. Canas, R. A. Cunha & C. F. Mello (2009) Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease. *Neurobiol Learn Mem*, 92, 574-80.



- Vonsattel, J. P. (2008) Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*, 115, 55-69.
- Wang, G., J. Pan & S. D. Chen (2012) Kinases and kinase signaling pathways: potential therapeutic targets in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 98, 207-21.
- Williams, A., S. Sarkar, P. Cuddon, E. K. Tfofi, S. Saiki, F. H. Siddiqi, L. Jahreiss, A. Fleming, D. Pask, P. Goldsmith, C. J. O'Kane, R. A. Floto & D. C. Rubinsztein (2008) Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol*, 4, 295-305.
- Wong, M. (2013) Mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways in neurological diseases. *Biomed J*, 36, 40-50.
- Wu, X., T. Kihara, A. Akaike, T. Niidome & H. Sugimoto (2010) PI3K/Akt/mTOR signaling regulates glutamate transporter 1 in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 393, 514-8.
- Wyss-Coray, T. & L. Mucke (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron*, 35, 419-32.
- Zeron, M. M., O. Hansson, N. Chen, C. L. Wellington, B. R. Leavitt, P. Brundin, M. R. Hayden & L. A. Raymond (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron*, 33, 849-60.
- Zhang, Y., A. Bokov, J. Gelfond, V. Soto, Y. Ikeno, G. Hubbard, V. Diaz, L. Sloane, K. Maslin, S. Treaster, S. Rendon, H. van Remmen, W. Ward, M. Javors, A. Richardson, S. N. Austad & K. Fischer (2014) Rapamycin extends life and health in C57BL/6 mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69, 119-30.
- Zheng, S., E. B. Clabough, S. Sarkar, M. Futter, D. C. Rubinsztein & S. O. Zeitlin (2010) Deletion of the huntingtin polyglutamine stretch enhances neuronal autophagy and longevity in mice. *PLoS Genet*, 6, e1000838.

Zoncu, R., A. Efeyan & D. M. Sabatini (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 21-35.

Zuccato, C. & E. Cattaneo (2007) Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog Neurobiol*, 81, 294-330.

Zuhlke, C. & U. Thies (1996) [Huntington chorea. Molecular genetic principles, mutation detection and predictive diagnosis]. *Nervenarzt*, 67, 25-35.