

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Toniana Gonçalves de Carvalho

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DO MGLUR5 NO PROCESSO INFLAMATÓRIO
ASSOCIADO À DOENÇA DE HUNTINGTON**

Belo Horizonte
2018

Toniana Gonçalves de Carvalho

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DO MGLUR5 NO PROCESSO INFLAMATÓRIO
ASSOCIADO À DOENÇA DE HUNTINGTON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola M. Ribeiro

Coorientadora: Aline Silva de Miranda

Belo Horizonte

2018

043

Carvalho, Toniana Gonçalves de.

Caracterização do papel do mglur5 no processo inflamatório associado à doença de huntington [manuscrito] / Toniana Gonçalves de Carvalho. – 2023.

61 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Fabíola Mara Ribeiro. Coorientador: Aline Silva de Miranda

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e Imunologia. 2. Doença de Huntington. 3. Inflamação. 4. Receptor de Glutamato Metabotrópico. I. Ribeiro, Fabíola Mara. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE TONIANA GONCALVES DE CARVALHO. Aos vinte e três dias do mês de fevereiro de 2018 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "" Caracterização do papel do mGluR5 no processo inflamatório associado à Doença de Huntington"", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica . Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Fabíola Mara Ribeiro, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Ana Maria Caetano de Faria (Dra Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Aline Silva de Miranda - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Fabíola Mara Ribeiro - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2018.

Ana Maria Caetano de Faria

Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)

Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira (UFMG)

Aline Silva de Miranda

Dra. Aline Silva de Miranda - Coorientador (UFMG)

Fabíola Mara Ribeiro

Dr. Fabíola Mara Ribeiro - Orientadora (UFMG)

Jader dos Santos Cruz
 Profº Jader dos Santos Cruz
 Sub Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais pelo amor, apoio e confiança. Agradeço aos amigos que conquistei na UFMG pela companhia, conselhos e pela excelente convivência durante o período do mestrado. Agradeço à Jaque, Lari e Sarinha pela amizade e por dividirem comigo um lar harmonioso e acolhedor. Gostaria de agradecer também meu namorado Pedro pelo amor incondicional, carinho, paciência, cuidado e pela companhia nos finais de semana, seja nos estudos ou nas horas vagas.

No laboratório de Neurobioquímica agradeço, principalmente, à Prof^a Fabíola pelos ensinamentos, conselhos, paciência e pelas oportunidades que sempre me proporcionou desde a iniciação científica. À minha amiga Jéssica, agradeço pela amizade verdadeira, pela confiança, pelas conversas diárias, conhecimentos trocados e tudo que vivemos juntas desde a graduação. Agradeço à Ju pela amizade e que, mesmo de longe, sempre me aconselhou, me ouviu e compartilhou todos os momentos comigo. Obrigada também Isabella, você sempre me ajudou com os experimentos e, além de parceira nos projetos, partilhou comigo sua amizade e sua alegria. Agradeço à Jumps, por ser minha mãe no laboratório e me aconselhar sempre que precisei. Agradeço a todos alunos, Pablo, Iza, Nathália, Ester, Priscila e Ana Luiza por contribuírem diretamente com meu trabalho e me ajudarem a prosseguir.

Obrigado, Lab. RNAi pela convivência excelente, pela amizade, conselhos e conversas. Serei eternamente grata por ter dividido o Lab. com vocês.

RESUMO

A doença de Huntington (DH) é uma desordem neurodegenerativa de caráter autossômico dominante, caracterizada por movimentos involuntários, distúrbios psiquiátricos, cognitivos e que culminam, inevitavelmente, na morte. A causa da DH é uma expansão poliglutamínica (CAG) no éxon 1 do gene que codifica a proteína huntingtina. O número de repetições é um fator determinante para a idade de início dos sintomas e reflete sua gravidade. A doença é marcada pela morte de neurônios, principalmente, do núcleo caudado, putâmem e neocórtex. Além da neurodegeneração, eventos como a neuroinflamação parecem colaborar para a patologia da DH. Aumento de células do sistema imune bem como de mediadores inflamatórios, como citocinas, já foram observados em estudos *post-mortem* de cérebros de pacientes com DH. O receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5) desempenha papel na regulação de vias intracelulares que estão alteradas na DH e, ainda, exerce um papel dinâmico na regulação da expressão gênica. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se o mGluR5 desempenha também um papel no processo inflamatório associado à DH. Para isso, foi realizado a deleção do gene do mGluR5 em camundongos modelo da DH (BACHD). Nossos resultados demonstraram um aumento de micróglia e astrócitos no córtex de camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. Além disso, houve neurodegeneração nos animais BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade na região cortical e estriatal. Por outro lado, nenhuma alteração no perfil de citocinas inflamatórias foi verificada nesses animais. Porém, a fractalquina ou CX3CL1 foi significativamente menos expressa no córtex de camundongos BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade, o que demonstra sua possível participação nos eventos associados à neuroinflamação. Ademais, o antagonista do mGluR5 MPEP foi capaz de aumentar a expressão de CX3CL1 em cultura primária de neurônio do córtex. Em conjunto, os trabalhos aqui demonstrados corroboram a participação do mGluR5 nos processos inflamatórios na DH. Por isso, se torna importante elucidar as vias intracelulares associadas aos processos inflamatórios que podem ser modificadas através do mGluR5.

Palavras-chave: Doença de Huntington, neuroinflamação, mGluR5 e fractalquina

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder characterized by involuntary movements, psychiatric and cognitive disorders leading ultimately to death. The cause of HD is an expanded polyglutamine (CAG) repeat in the exon 1 of the gene encoding the huntingtin protein. The number of CAG repeats is a major factor determining disease onset and gravity. HD affects certain brain areas with the death of neurons especially taking place in the striatum and neocortex. In addition to neurodegeneration, other events such as neuroinflammation seem to contribute to HD pathology. Both increased infiltration of immune cells and inflammatory cytokines have already been seen in post-mortem brains of HD patients. The metabotropic glutamate 5 receptor (mGluR5) plays a role in the regulation of intracellular pathways that were shown to be altered in HD and plays a dynamic role in the regulation of gene expression. The aim of this study was to evaluate whether mGluR5 also plays a role in the inflammatory process associated with HD. For this, the deletion of the mGluR5 gene was performed in a mouse model of HD (BACHD). Our results showed an increase in the number of microglia and astrocytes in the cortex of BACHD, mGluR5^{-/-} and BACHD/mGluR5^{-/-} mice at 12 months of age. In addition, neurodegeneration was observed in the cortex and striatum of BACHD, mGluR5^{-/-} and BACHD/mGluR5^{-/-} animals at 12 months of age. On the other hand, no changes in the inflammatory cytokine profile were observed in these animals. However, fractalkine or CX3CL1 was significantly less expressed in the cortex of BACHD/mGluR5^{-/-} mice at 12 months of age, as compared to control mice, which demonstrates its participation in the events associated with neuroinflammation. In addition, the mGluR5 antagonist MPEP was able to increase the expression of CX3CL1 in primary cortical neuronal culture. Taken together, the studies presented here indicate that mGluR5 participates in the inflammatory processes that take place in HD. Therefore, these results highlights the importance to elucidate the neuroinflammatory pathways that can be modified through mGluR5.

Key-words: Huntington disease, neuroinflammation, mGluR5 and fractalkine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel de agarose para genotipagem dos camundongos BACHD.	24
Figura 2. Genotipagem de camundongos mutantes para o gene mGluR5.....	25
Figura 3. Não há diferença no número de micróglia no estriado dos camundongos WT, BACHD, mGluR5 ^{-/-} e BACHD/mGluR5 ^{-/-} com 2, 6 ou 12 meses de idade.	32
Figura 4. Há microgliose no córtex de BACHD, mGluR5 ^{-/-} e BACHD/ mGluR5 ^{-/-} com 12 meses de idade.	33
Figura 5. Não há diferença no número de astrócitos no estriado dos camundongos WT, BACHD, mGluR5 ^{-/-} e BACHD/mGluR5 ^{-/-} com 2, 6 ou 12 meses de idade.	34
Figura 6. O número de astrócitos encontra-se aumentado na região do córtex dos animais mGluR5 ^{-/-} com 6 meses de idade e em animais BACHD, mGluR5 ^{-/-} e BACHD/mGluR5 ^{-/-} com 12 meses de idade.	35
Figura 7. Camundongos BACHD, mGluR5 ^{-/-} e BACHD/mGluR5 ^{-/-} apresentam perda neuronal com 12 meses de idade na região do corpo estriado.	36
Figura 8. Camundongos BACHD, mGluR5 ^{-/-} e BACHD/mGluR5 ^{-/-} apresentam perda neuronal com 12 meses de idade na região cortical.	37
Figura 9. Não há diferença nos níveis de TNF, IL-6 e IL-10 em Córtex de camundongos com 12 meses de idade.	38
Figura 10. Não há diferença na expressão de TNF, IL-1 β , MCP-1, C3 e C4b na região do córtex nos camundongos WT, BACHD, mGluR5 ^{-/-} e BACHD/mGluR5 ^{-/-} com 12 meses de idade....	40
Figura 11. Camundongos BACHD/mGluR5 ^{-/-} apresentam diminuição dos níveis de RNAm de CX3CL1 quando comparados ao grupo WT.	42
Figura 12. Não há diferença nos níveis de RNAm para o receptor de CX3CL1 nos camundongos WT, BACHD, mGluR5 ^{-/-} e BACHD/mGluR5 ^{-/-} com 12 meses de idade.	43
Figura 13. O antagonista do mGluR5 (MPEP) aumentou a expressão de CX3CL1 em cultura primária de neurônios corticais.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Iniciadores utilizados no PCR convencional para htt.	23
Tabela 2- Iniciadores utilizados no PCR convencional para mGluR5.	25
Tabela 3- Características dos iniciadores utilizados nas reações de qPCR.	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclase
AMPA: ácido aminopropiônico
AMPc: adenosina monofosfato cíclico
BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE: barreira hematoencefálica
C3: componente 3 do complemento
C4: componente 4 do complemento
CCL2: ligante de quimiocina (motivo C-C)
CDPPB: 3-ciano-N-(1,3-difenil-1H-pirazol-5-il) benzamida
CX3CL1: C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1
DA: doença de Alzheimer
DAG: 1,2,-diacilglicerol
DH: doença de Huntington
DNA: ácido desoxirribonucleico
ERK: quinase regulada por sinais extracelulares
GPCR: proteína G acoplada ao receptor metabotrópico
 α - β γ : subunidade alfa, beta e gama da proteína G
htt: proteína huntingtina
httm: proteína huntingtina mutada
IBA-1: molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1
IL-10: interleucina 10
IL-6: interleucina 6
IL-8: interleucina 8
IP3: inositol 1,4,5 trifosfato
kDa: kiloDaltons
M: molar
MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógenos
mGluR: receptor metabotrópico glutamatérgico
mM: milimolar
MMP-9: matrix metalloproteinase 9
MPEP: 2-metil-6(feniletinil) piridina
 μ g: microgramas

μL : microlitros

μM : micromolar

NF- κB : fator nuclear κB

nm: nanômetro

NMDA: N-metil d-aspartato

NMDAR: receptor N-metil d-aspartado

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKA: proteína quinase A

PKC: proteína quinase C

PLC: fosfolipase C

REST: fator de transcrição que silencia o elemento repressor 1

RNA: ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Doença de Huntington	11
1.2 Modelos animais para Doença de Huntington	13
1.3 A neuroinflamação na Doença de Huntington	14
1.4 O Receptor Metabotrópico de Glutamato 5	16
1.5 mGluR5 e a Doença de Huntington	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 MATERIAIS	21
4 MÉTODOS	22
4.1 Modelos animais	22
4.2 Genotipagem	22
4.2.1 Extração de DNA	22
4.2.2 Amplificação do DNA para identificação da huntingtina mutante	23
4.2.3 Amplificação do DNA para identificação do mGluR5	24
4.3 Transcrição reversa e PCR quantitativo (RT-qPCR)	26
4.4 Imunohistoquímica	27
4.5 Extração de proteína	28
4.6 <i>Cytometric Bread Array</i> ® (CBA)	28
4.7 Cultura primária de neurônios	29
4.8 Estimulação dos neurônios	29
4.9 Análise estatística	30
5 RESULTADOS	31
5.1 Há aumento do número de micróglia no córtex dos camundongos BACHD, mGluR5 ^{-/-} e BACHD/ mGluR5 ^{-/-} com 12 meses de idade.	31
5.2 O córtex de camundongos BACHD, mGluR5 ^{-/-} e BACHD/mGluR5 ^{-/-} apresenta astrogliose com 12 meses de idade.	33
5.3 Camundongos BACHD, mGluR5 ^{-/-} e BACHD/mGluR5 ^{-/-} apresentam perda neuronal com 12 meses de idade na região cortical e estriatal	35

5.4 Não há diferença nos níveis de citocinas no córtex de camundongos WT, BACHD, mGluR5 ^{-/-} e BACHD/mGluR5 ^{-/-} com 12 meses de idade	37
5.5 Há diminuição dos níveis da quimiocina CX3CL1 no córtex dos camundongos BACHD/mGluR5 ^{-/-} com 12 meses de idade	41
5.6 O antagonista do mGluR5 (MPEP) foi capaz de aumentar a expressão de CX3CL1 em cultura primária de neurônio	44
6 DISCUSSÃO	46
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Huntington

A Doença de Huntington (DH) é uma desordem hereditária, neurodegenerativa, progressiva e possui caráter autossômico dominante (Vonsattel *et al.*, 1985; Macdonald *et al.*, 1993). A causa da DH consiste em uma mutação localizada no braço curto do cromossomo 4 (4p16.3) (Gusella *et al.*, 1983). Trata-se de uma expansão das repetições de glutamina (CAG) no éxon 1 do gene IT15 que codifica a proteína huntingtina (htt), descrito pela primeira vez por Macdonald *et al.* (1993).

A idade média de início dos sintomas é de 40 anos e o óbito do paciente ocorre 15-20 anos após o início da DH, como revisado por (Ross e Tabrizi, 2011). O número de repetições de CAG é inversamente proporcional à idade de início dos sintomas, sendo que o número dessas repetições de CAG mostram-se instáveis, com aumentos e diminuições de tamanho entre uma geração e a próxima e com os maiores aumentos ocorrendo nas transmissões paternas (Duyao *et al.*, 1993). Alelos com 34 repetições de CAG ou menos não produzem sintomas. Alelos que possuem de 35 a 39 repetições apresentam penetrância incompleta, enquanto os que possuem mais de 40 repetições de CAG são considerados totalmente penetrantes, como revisado por Wexler *et al.* (2004). O fato de indivíduos com o mesmo número de repetições, frequentemente, apresentarem idades de início diferentes corrobora o envolvimento de outros fatores, como modificações genéticas e fatores ambientais, para o surgimento dos sintomas (Duyao *et al.*, 1993).

Embora tanto a htt selvagem quanto mutada sejam expressas em todas as células do corpo (Walker, 2007), a neuropatologia da DH é região específica, marcada principalmente pela atrofia do córtex e dos núcleos caudado e putâmem (estriado em camundongos), como mostrado por De La Monte *et al.* (1988). A diminuição do volume do caudado e putâmem se deve à perda preferencial dos neurônios espinhosos médios que constituem cerca de 95% da população neuronal nessa região (Waldvogel *et al.*, 2015). Outras regiões também são acometidas em menores proporções durante o curso da doença, como o hipocampo, o hipotálamo e o tálamo. O cerebelo é relativamente poupado na DH (Walker, 2007; Waldvogel *et al.*, 2015). A proteína htt mutada (htt^m) pode, ainda, ter seus fragmentos

acumulados em corpos de inclusão intranucleares ou intracitoplasmáticos. Entretanto, ainda é alvo de debate se os agregados podem ser deletérios ou protetores para os neurônios, evitando o acúmulo de formas solúveis que poderiam ser mais tóxicas (Davies *et al.*, 1997; Arrasate *et al.*, 2004).

A neuropatologia culmina em uma tríade de sintomas típicos da DH, composta por uma desordem motora progressiva, por distúrbios cognitivos, resultando em demência, e distúrbios psiquiátricos, incluindo depressão, ansiedade, apatia, comportamentos obsessivo-compulsivos, vícios e, ocasionalmente, psicose (Dayalu e Albin, 2015). De maneira geral, a DH pode ser dividida em três estágios (Nance M *et al.*, 2013). A fase inicial, quando os indivíduos são em grande parte funcionais e podem, ainda, trabalhar e viver de forma independente. Os sintomas podem incluir movimentos involuntários menores, perda sutil de coordenação, dificuldade em pensar em problemas complexos e, eventualmente, depressão, irritabilidade e ansiedade (Walker, 2007; Nance M *et al.*, 2013). Na fase intermediária da DH, os indivíduos perdem a capacidade de realizar as atividades rotineiras sem assistência, e a coreia, principal sintoma da doença, pode ser proeminente, compreendendo movimentos involuntários menores, vistos mais nas extremidades do corpo. Com o passar do tempo, a coreia se torna mais evidente, com movimentos involuntários mais grosseiros, envolvendo músculos proximais (Dayalu e Albin, 2015). Pessoas nessa fase da DH tem complicações crescentes com tarefas motoras voluntárias, havendo dificuldades de deglutição. Na fase final da DH, os pacientes necessitam de assistência para realizar todas as atividades. A coreia pode ser grave, mas, frequentemente, é substituída por rigidez, distonia e bradicinesia (Nance M *et al.*, 2013). Sintomas psiquiátricos podem ocorrer. À medida que os distúrbios motores e cognitivos se tornam graves, os pacientes eventualmente evoluem para óbito, geralmente por complicações de quedas, inanição, disfagia ou aspiração (Walker, 2007).

A prevalência da DH é maior na Europa, América do Norte e Austrália, apresentando em média 5,70 acometidos por 100.000 habitantes, enquanto é menor na população asiática, com valor médio de 0,40 por 100.000 habitantes (Pringsheim *et al.*, 2012). Um estudo feito por Fisher e Hayden (2014) mostrou que o Canadá possui uma prevalência estimada em 13,7 por 100.000 na população geral. Entretanto, existem regiões de maior acúmulo de indivíduos acometidos, como na região do lago Maracaibo na Venezuela, descrito pela primeira vez por Negrette

(1955). Em 2004, um estudo mostrou que, vivendo na região do lago Maracaibo e na área urbana de Maracaibo, existem cerca de 15.000 indivíduos com DH proveniente de um único fundador (Wexler *et al.*, 2004).

1.2 Modelos animais para Doença de Huntington

Ao contrário da Doença de Alzheimer (DA) e da Doença de Parkinson (DP), a DH possui causa genética única e definida, o que facilitou o desenvolvimento de modelos animais para o estudo da doença. O primeiro modelo para DH foi desenvolvido por Coyle e Schwarcz (1976) utilizando injeções de ácido caínico no corpo estriado de camundongos induzindo neurodegeneração. No entanto, após a descoberta do gene que codifica a httm (Macdonald *et al.*, 1993), diversos modelos surgiram a fim de tornar os mecanismos moleculares e modificações comportamentais mais próximos possíveis dos que ocorrem em um paciente com DH.

Entre os modelos mais usados estão os modelos murinos *Knock-in* e transgênicos. Os *knock-in* são gerados fazendo uma substituição direcionada do gene endógeno da htt dos camundongos. Esses camundongos apresentam uma inserção do éxon 1 da htt humana mutada ou uma inserção das repetições expandidas de CAG (Menalled, 2005). Embora os camundongos *knock-in* reproduzam com exatidão o defeito genético da DH, de maneira geral, eles não exibem o déficit motor robusto e a perda neuronal observada em pacientes com a DH, como observado em camundongos Hdh(Q111/Q111) (Ribeiro *et al.*, 2013; Ribeiro, Devries, *et al.*, 2014). Por outro lado, os camundongos *knock-in* Hdh(Q150/Q150) apresentam fenótipo mais grave quando comparado a outros modelos com repetições menores de CAG. O modelo Hdh(Q150/Q150) apresenta alterações neurológicas robustas como agregados de httm iniciando aos 10 meses de idade e diminuição do volume cerebral e gliose aos 12 meses de idade (Lin *et al.*, 2001). Além disso, este modelo apresenta déficits motores iniciando aos 4 meses de idade, perda de força muscular e diminuição de peso corporal aos 10 meses (Brooks *et al.*, 2012).

Entre os modelos transgênicos mais utilizados estão o R6/2, expressando apenas a porção amino-terminal da htt mutada humana, o YAC128 e o BACHD com a inserção completa do gene da htt humana, com 128 e 97 repetições de CAG,

respectivamente (Ramaswamy *et al.*, 2007; Gray *et al.*, 2008). Diferentemente dos modelos *knock-in*, os transgênicos possuem o gene mutante completo, ou parte dele, inserido aleatoriamente no seu genoma, levando à expressão de uma proteína mutante em adição à htt endógena normal do camundongo (Menalled e Chesselet, 2002). O camundongo R6/2 é um modelo robusto, com déficits neurológicos e comportamentais agressivos com início na 9ª semana de idade e morte ocorrendo entre 10ª e 13ª semana, o que o torna pouco usual para acompanhamento da progressão da doença (Mangiarini *et al.*, 1996).

No presente estudo foi utilizado o camundongo BACHD, que expressa a htt humana completa com adição de 97 repetições de CAA-CAG no éxon 1 (Gray *et al.*, 2008). O BACHD recapitula várias características fenotípicas chaves da DH, incluindo déficits motores com início aos 2 meses de idade, alterações cognitivas e diminuição da atividade sináptica iniciando aos 6 meses e neurodegeneração e agregados de httm aos 12 meses de idade no córtex e estriado (Gray *et al.*, 2008; Menalled *et al.*, 2009; Doria *et al.*, 2015).

1.3 A neuroinflamação na Doença de Huntington

A fisiopatologia da DH é definitivamente causada pela presença da httm (Macdonald *et al.*, 1993). Embora, ainda não tenha sido explicada a morte celular seletiva, principalmente, de neurônios do caudado e putâmem, já se sabe que outros mecanismos contribuem para a progressão da DH e para a neurodegeneração (Crotti e Glass, 2015). Neste contexto, o termo neuroinflamação, que antes era atribuído apenas a eventos com infiltrados de células imunes periféricas, como em infecções bacterianas ou virais, tem sido apontado como fator crítico em doenças neurodegenerativas como DP, DA e DH (Crotti e Glass, 2015; Zeineh *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Keren-Shaul *et al.*, 2017; Taipa *et al.*, 2017).

As micróglias e os astrócitos são células residentes no sistema nervoso central (SNC) cruciais para a homeostasia cerebral. No cérebro normal essas células, também chamadas de células da glia, promovem eliminação de detritos, sustentabilidade estrutural para neurônios, regulação de respostas inflamatórias exacerbadas e desempenham um importante papel no funcionamento das sinapses no cérebro adulto e em desenvolvimento (Schafer *et al.*, 2012; Aguzzi *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2015). No entanto, essas células são capazes de responder a

estímulos e, sob condições de infecção, lesão ou neurodegeneração, essas células se tornam "ativadas", em um processo caracterizado pela liberação de mediadores que promovem inflamação, alterações na morfologia e, em alguns casos, divisão celular, resultando em aumento do número de células ou "gliose" (Crotti e Glass, 2015; Rocha *et al.*, 2016).

As micróglia, principais regentes nos processos inflamatórios, são macrófagos residentes do cérebro e constituem 10% das células no SNC (Aguzzi *et al.*, 2013). Essas células estão presentes em todo o cérebro e com distribuição heterogênea entre as regiões, como mostrado por Lawson *et al.* (1990). A micróglia é originada a partir de um progenitor mielóide durante a hematopoese (Ginhoux e Prinz, 2015). No embrião de camundongo, a micróglia migra do saco vitelino para o SNC no 8º e 9º dia embrionário, passando por um desenvolvimento gradual que é sincronizado com o processo de desenvolvimento cerebral e, posteriormente, adquire um fenótipo estável essencial para a proteção do cérebro (Ginhoux *et al.*, 2010; Aguzzi *et al.*, 2013; Ginhoux e Prinz, 2015).

Na DH, através de tomografia de emissão de pósitron, a ativação microglial foi mostrada em indivíduos pré-sintomáticos e sintomáticos, tanto nos núcleos caudado e putâmem como na região cortical, sendo que essa ativação microglial foi correlacionada ao aumento de marcadores de disfunção neuronal (Tai *et al.*, 2007b) (Tai *et al.*, 2007a). Foi demonstrada também ativação microglial junto à atrofia estriatal e cortical em pacientes sintomáticos (Politis *et al.*, 2011). Além disso, foi visto aumento do número de micróglia marcadas com anti-IBA-1 em cérebros *post-mortem* de pacientes e camundongos R6/2 a partir de 8 semanas de idade (Simmons *et al.*, 2007).

Silvestroni *et al.* (2009) demonstraram, através de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), o nível de expressão de RNAm de genes associados à neuroinflamação no caudado, putâmem, córtex e cerebelo de amostras provenientes de cérebros *post-mortem* de pacientes com DH. Foi encontrada expressão aumentada de vários mediadores, incluindo ligante de quimiocina (motivo C-C) (CCL2), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 10 (IL-10), no caudado e putâmem e aumento de interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e matrix metallopeptidase 9 (MMP-9), no córtex. Além disso, o perfil de citocinas inflamatórias se mostrou alterado no plasma de pacientes em diferentes estágios da doença (Bjorkqvist *et al.*, 2008).

Monócitos provenientes do sangue periférico de pacientes pré-sintomáticos e de camundongos R6/2 e YAC128 foram hiper-reativos quando estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) comparados aos respectivos grupos controles (Bjorkqvist *et al.*, 2008), sugerindo que a própria httm desencadeia uma ativação imune autônoma na célula. Corroborando essa hipótese, Crotti *et al.* (2014) utilizaram linhagens de micróglia expressando os primeiros 548 aa N-terminais da httm ou selvagem para mostrar que, mesmo na ausência de estimulação, a micróglia que expressava a httm apresentava maior nível de mRNAs que codificam fatores pró-inflamatórios comparada com as células que expressavam a htt selvagem.

Vias de sinalização intracelular regulam a expressão de genes relacionados à processos de resposta imune, inflamação, entre outros. Khoshnan *et al.* (2004) mostraram que a htt interage diretamente com a proteína IKKgama (IKK γ), ativando a quinase IKK e aumentando o deslocamento do fator nuclear kappa B (NF- κ B) para o núcleo, levando ao aumento de expressão de genes inflamatórios. Ademais, foi visto que astrócitos provenientes de camundongos modelos para a DH (R6/2) também possuem maior atividade de IKK, causando ativação do NF- κ B. Estes astrócitos também produziram um efeito mais prejudicial nos neurônios em culturas primárias de R6/2 do que os astrócitos selvagens durante a inflamação. Ainda, o bloqueio de IKK reduziu a toxicidade neuronal causada pelos astrócitos (Hsiao *et al.*, 2013). É válido ressaltar que os astrócitos são as células da glia mais abundantes no cérebro (Panatier e Robitaille, 2016) e que o seu aumento já foi visto em cérebros de paciente com DH (Myers *et al.*, 1991).

Na DH, tanto as micróglia quanto os astrócitos expressam a httm (Hsiao *et al.*, 2013; Crotti *et al.*, 2014). A neuroinflamação na DH parece ser então um evento adjacente à neurodegeneração, mas também agravado pela presença da httm nas células do sistema imune do cérebro. Assim, mais estudos são necessários para elucidar o cenário da neuroinflamação na DH e propor novas alternativas terapêuticas.

1.4 O receptor metabotrópico de glutamato 5

O aminoácido glutamato tem sido estudado há décadas, não só pela importância no metabolismo celular, mas, também, pelo seu papel na neurotransmissão (Amchova-Prazakova, 1955; Roberts, 1974). Reconhecido como

principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos, desempenha importante função no aprendizado, memória e plasticidade sináptica (Willard e Koochekpour, 2013). Há anos o glutamato foi implicado na neurotoxicidade (Choi, 1985; 1987; Choi *et al.*, 1988), ganhando destaque nos estudos das doenças neurodegenerativas (Greenamyre *et al.*, 1985; Difiglia, 1990).

O glutamato age através de dois tipos de receptores: Os receptores ionotrópicos (iGluRs) e os metabotrópicos (mGluRs), como revisado por (Ribeiro *et al.*, 2017). Os iGluRs são canais iônicos dependentes do ligante e medeiam a neurotransmissão excitatória rápida, incluindo receptores de N-metil D-Aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e os de cainato. Os mGluRs são receptores que iniciam sua cascata de sinalização após o desacoplamento da proteína $G\alpha\text{-}\beta\gamma$ (Willard e Koochekpour, 2013).

Todos os mGluRs compartilham uma arquitetura básica: Um domínio amino-terminal para ligação do glutamato; um domínio rico em cisteína crítico para dimerização e ativação; sete alças transmembranares e uma extremidade C-terminal (Seebahn *et al.*, 2013). Com base na homologia de sequência e sinalização intracelular via segundos mensageiros, os mGluRs são categorizados nos grupos I, II e III. O grupo I inclui mGluRs 1 e 5, o grupo II inclui mGluRs 2 e 3 e, finalmente, o grupo III inclui mGluRs 4, 6, 7 e 8 (Panatier e Robitaille, 2016; Ribeiro *et al.*, 2017).

O mGluR5 é acoplado à proteína $G\alpha_{q/11}$ e, uma vez acionado, leva à ativação da proteína fosfolipase C (PLC) que hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), levando à liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares e ativação da proteína quinase C (PKC). A PKC, por sua vez, pode ativar proteínas importantes para a regulação celular como proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e quinase regulada por sinal extracelular ERK1/2 (Willard e Koochekpour, 2013; Ribeiro, Hamilton, *et al.*, 2014). Além disso, o mGluR5 interage com a proteína HOMER, sendo capaz de ativar AKT e ERK1/2 (Rong *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2005; Nicodemo *et al.*, 2010).

No cérebro de roedores, o mGluR5 é expresso por diferentes regiões como bulbo olfatório, córtex, hipocampo, estriado e núcleo accumbens (Shigemoto *et al.*, 1993; Romano *et al.*, 1995). Ademais, além de ser expresso por neurônios (Doria *et al.*, 2015), o mGluR5 está presente em micróglia e astrócitos (Biber *et al.*, 1999; Byrnes *et al.*, 2009; Panatier e Robitaille, 2016).

Em um estudo de ativação de micróglia por LPS, o mGluR5 foi responsável pela oscilação de Ca^{2+} intracelular e ativação de NF- κ B em uma via independente da via clássica por Receptor Toll do tipo 4 (TLR4) (Liu *et al.*, 2014). Neste mesmo estudo, foi visto que o mGluR5, juntamente com o TLR4, foi capaz de atenuar a liberação de TNF, (fator de necrose tumoral) um fator conhecido por estimular cascatas inflamatórias e provocar danos e morte neuronal (Zhao *et al.*, 2001).

O mGluR5 está amplamente expresso no SNC e em diferentes tipos celulares. Além disso, sua capacidade de ativar vias intracelulares importantes para a sobrevivência neuronal (Rong *et al.*, 2003) e transcrição gênica (Gass e Olive, 2008) o torna importante alvo em processos patológicos, principalmente no que diz respeito a doenças neurodegenerativas.

1.5 mGluR5 e a Doença de Huntington

O mGluR5 parece desempenhar um papel importante na DH, visto que é expresso nas principais regiões acometidas pela doença (Shigemoto *et al.*, 1993). Anborgh *et al.* (2005) demonstraram que a htt interage com o mGluR5 através da proteína optineurina. Além disso, a proteína httm interage com o receptor de IP3 no retículo endoplasmático, aumentando a liberação de Ca^{2+} intracelular (Tang *et al.*, 2003).

Ribeiro *et al.* (2010) demonstraram, através de cultura primária de neurônios estriatais, que os camundongos *knock-in* para DH Hdh(Q111/Q111) apresentam alterações nas vias de sinalização intracelulares do mGluR5. Apesar de haver menor formação de IP3, o agonista do mGluR5 aumentou a liberação de Ca^{2+} dos camundongos Hdh(Q111/Q111), quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, a ativação da AKT foi maior em camundongos Hdh(Q111/Q111) e a estimulação do mGluR5 também aumentou os níveis de ERK ativada.

O *knock-out* do mGluR5 em camundongos Hdh(Q111/Q111) promoveu uma melhora do desempenho no teste motor Rota-Rod e diminuiu o número de inclusões intranucleares de httm (Ribeiro, Devries, *et al.*, 2014). Porém, o tratamento crônico de camundongos R6/2 com o antagonista do mGluR5 methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), apesar de ter levado a um leve aumento da sobrevivência e a uma melhora na performance no Rota-Rod, não promoveu uma melhora nos agregados de httm (Schiefer *et al.*, 2004).

Interessantemente, camundongos BACHD, quando tratados cronicamente com moduladores alostéricos positivos do mGluR5 (PAMs), obtiveram aumento da ativação de AKT sem aumentar a concentração intracelular de Ca^{2+} . Este efeito resultou em proteção dos neurônios estriatais contra a morte induzida por glutamato (Doria *et al.*, 2013). Mais recentemente, o tratamento crônico de camundongos BACHD com o PAM CDPPB durante 18 semanas aumentou a fosforilação de AKT e ERK1/2 e aumentou a expressão de mRNA de BDNF, proteínas importantes para a sobrevivência neuronal. O tratamento crônico com CDPPB também foi capaz de prevenir a morte celular que ocorre no estriado de camundongos BACHD e diminuir a formação de agregados httm (Doria *et al.*, 2015).

Em conjunto, os estudos aqui reportados corroboram a participação do mGluR5 na DH e sua possível intervenção como alvo terapêutico. Por isso, se torna importante elucidar as vias intracelulares que podem ser modificadas através do mGluR5. Embora o mGluR5 tenha sido implicado em processos relativos à neuroinflamação, nenhum estudo mostrou seu envolvimento na neuroinflamação na DH.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar se o mGluR5 desempenha um papel nos processos inflamatórios associados à DH.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as populações de micróglia e astrócitos através de Imunohistoquímica, durante a progressão da DH, no córtex e estriado de camundongos BACHD, BACHD/mGluR5^{-/-}, WT e mGluR5^{-/-} com 2, 6 e 12 meses de idade.
- Avaliar a neurodegeneração, através de Imunohistoquímica, durante a progressão da DH, no córtex e estriado de camundongos BACHD, BACHD/mGluR5^{-/-}, WT e mGluR5^{-/-} com 2, 6 e 12 meses de idade.
- Analisar a expressão de mediadores inflamatórios associados à DH em diferentes regiões do cérebro de camundongos BACHD, BACHD/mGluR5^{-/-}, WT e mGluR5^{-/-} com 2, 6 e 12 meses de idade.
- Analisar a expressão de fractalquina (CX3CL1) no córtex de camundongos BACHD, BACHD/mGluR5^{-/-}, WT e mGluR5^{-/-} com 2, 6 e 12 meses de idade através do método de RT-qPCR

3 MATERIAIS

2-propanol, solução de Betaína, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, NaCl, paraformaldeído, proteinase K, solução Tris (hidroximetil) aminometano-hidroclorídrico (Tris HCl) e solução tris (hidroximetil) aminometano - ácido etilenodiamino tetra-acético (Tris-EDTA) foram adquiridos da Sigma Aldrich®. Tubos tipo eppendorff e ponteiros de micropipetas foram adquiridos da Axygen Brasil. Agarose, sacarose e sulfato dodecil de sódio (SDS) foram adquiridos tanto da empresa HEXAPUR quanto da Sigma Aldrich®. (dNTPs) foram adquiridos da Thermo Scientific®. H₂O Nucleasefree foi adquirida da Ambion®. Os iniciadores utilizados para as reações de PCR e qPCR estão devidamente descritos nas tabelas 1 e 2 e foram adquiridos da Síntese Biotecnologia. O kit Power SYBR® Green PCR Master Mix, bem como o SYBR® Safe foram adquiridos pela Thermo Scientific®. Lamínulas de 12mm e laminas foram adquiridas pela Pró cito Laboratórios. Os kits Vectastain Elite ABC (Mouse e Rabbit IgG) e Vector SG Peroxidase Substrate foram adquiridos da Vector Laboratories. O anticorpo anti-s100B é proveniente da Cell Signaling Technology, o anti-IBA-1 é da marca WAKO e o anticorpo anti-núcleo neuronal – NeuN foi adquirido da empresa INVITROGEN. O modulador alostérico positivo VU0409551 é proveniente da VCNDD, já o antagonista de mGluR5: -methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) e o Agonista (S)-3,5-DHPG são provenientes da Tocris Bioscience.

4 MÉTODOS

4.1 Modelos animais

O trabalho foi realizado com camundongos das linhagens mGluR5 knockout, o C57/B6;129-Grm5tm1Rod/J (mGluR5^{-/-}), e modelos transgênicos para DH FVB/NJ (wild type) e FVB/N-Tg(HTT*97Q)IXwy/J (BACHD) obtidos do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Os animais foram criados e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG em ciclo de 12 horas claro/escuro, com temperatura constante de 23°C e recebendo água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho estão em concordância com as normas e receberam aprovação do CEUA-UFMG (Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFMG), parecer nº 234/2016 (Anexo 1). As culturas primárias de neurônios foram realizadas utilizando os embriões de camundongos E15 (embriões com 15 dias de gestação) dos camundongos C57.

Para geração dos duplos mutantes, foi realizado o cruzamento entre os camundongos mGluR5^{-/-} e os camundongos BACHD, obtendo-se a linhagem parental F1. Posteriormente, os camundongos F1 foram cruzados entre si para obtenção das linhagens de interesse (F2): WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} (duplo mutante). Apenas camundongos F1 foram utilizados para cruzamentos e os camundongos heterozigotos F2 foram descartados.

4.2 Genotipagem

4.2.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada a partir de tecidos dos camundongos FVB (WT e BACHD). As amostras foram adicionadas a 500 µL de solução de extração (H₂O, SDS 10%, Tris-EDTA, NaCl, Proteinase K) e deixadas overnight em banho-maria a 55°C. Seguiu-se centrifugação a 16.000 g por 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novos tubos eppendorfs contendo 500 µL de isopropanol. A seguir, foi realizada a homogeneização (10x) e uma nova etapa

de centrifugação a 16.000g por 10 min à temperatura ambiente. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados invertidos e abertos para secar por pelo menos 1 hora. Após este tempo, foi adicionado 200 µL de solução TE 0,5X (Tris HCl 1M, EDTA 0,5M, H₂O) e os tubos foram deixados no banho-maria a 37°C por no mínimo 1 hora. As amostras de DNA foram armazenadas a 4°C.

4.2.2 Amplificação do DNA para identificação da huntingtina mutante

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

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

Tabela 1- Iniciadores utilizados no PCR convencional para htt.

Primer	Sequência	Amplicon	%CG
HTT-M4F	TGAATTGTACAGCCGATGGA	157	53,4
HTT-M4R	CCGTAGTTCTGTCAGCGTCA	157	57,5

Após a amplificação, 12 µL do produto de PCR juntamente com 3 µL de tampão de amostra 5x foram aplicados em gel não desnaturante contendo 2% de

agarose, SYBR® Safe e solução tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5X. O gel foi acondicionado em uma cuba de eletroforese horizontal preenchida com TAE 0,5X e submetido a uma corrente de 100 volts por 30 min. A captura da imagem foi realizada utilizando o equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

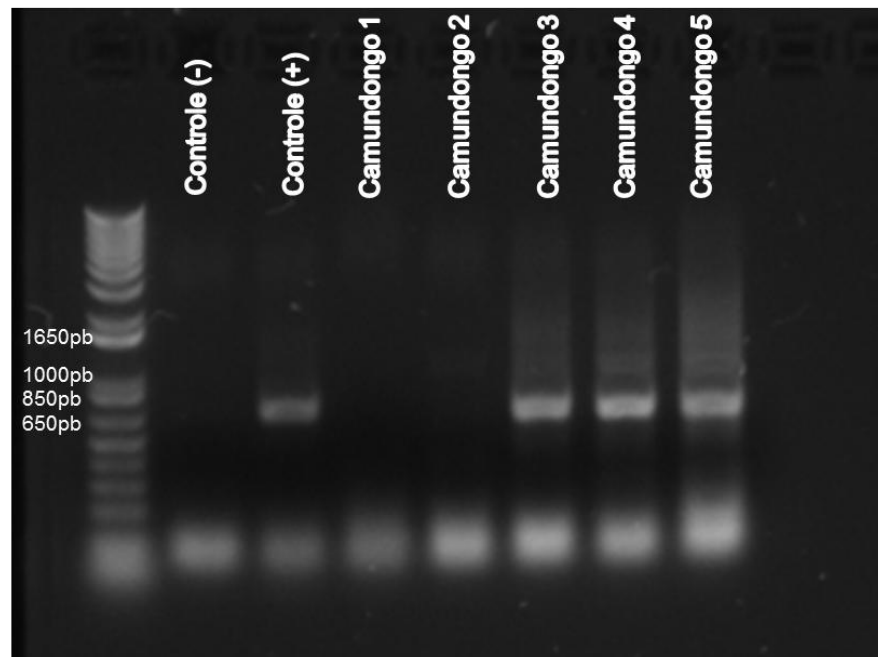


Figura 1. Gel de agarose para genotipagem dos camundongos BACHD: A primeira canaleta representa o padrão de 1Kb, as canaletas 2 e 3 representam os controles negativo e positivo. Camundongos 1 e 2 são WT e não possuem amplificação da *htt* mutada. Os camundongos 3, 4, e 5 apresentam amplificação da banda com 650pb, indicando a presença da *htt* mutada.

4.2.3 Amplificação do DNA para identificação do mGluR5

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

Tabela 2- Iniciadores utilizados no PCR convencional para mGluR5.

Nome no estoque	Sequência	Amplicon	%CG
Primer comum	CACATGCCAGGTGACATCAT		50
Selvagem – reverso	CCATGCTGGTTGCAGAGTAA	442	50
Mutante - reverso	CACGAGACTAGTGAGACGTG	650	55

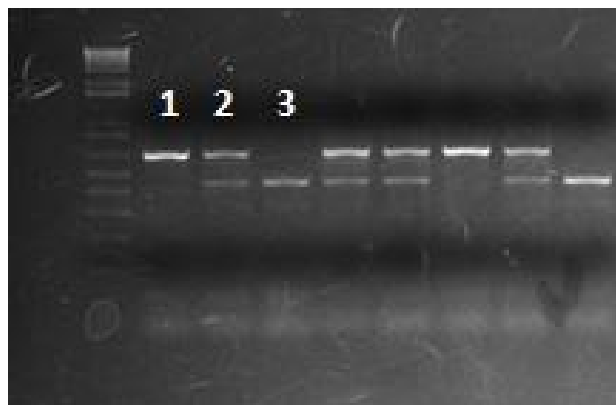


Figura 2. Genotipagem de camundongos mutantes para o gene mGluR5. O amplicon gerado pelos iniciadores da linhagem *mGluR5*^{-/-} possui 650 pb (Canaleta 1), da linhagem *mGluR5*^{+/-} possui 650 e 442 pb (Canaleta 2) e da linhagem *mGluR5*^{+/+} (Canaleta 3) possui 442 pb.

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

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

Apenas os camundongos homozigotos mGluR5^{+/+} e mGluR5^{-/-} foram utilizados neste estudo.

4.3 Transcrição reversa e PCR quantitativo (RT-qPCR)

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

O PCR quantitativo (qPCR) foi realizado utilizando o kit Power SYBR® Green PCR Master Mix, segundo protocolo do fabricante. Para isso, foram utilizadas as plataformas de PCR em tempo real StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems e QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real-Time PCR System. A reação de qPCR foi realizada a fim de quantificar os níveis de mRNA dos genes descritos na tabela 3. Os iniciadores, dos respectivos genes, foram desenhados com o auxílio do software Primer3plus (Untergasser, Nijveen et al. 2007) (tabela 3). Os iniciadores foram checados utilizando a ferramenta Primer-BLAST (Ye, Coulouris et al. 2012) para avaliação *in silico* da sua especificidade para com seus alvos.

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

Tabela 3- Características dos iniciadores utilizados nas reações de qPCR

Código	Sequência	Amplicon (pb)	Tm (°C)	%GC	Nº do Identificador
Mn-Actina.R	AATGCCTGGGTACATGGTGGTA	122	58,4	50	NM_007393.3
Mn-Actina.F	TGGAATCCTGTGGCATCCATGA		58,6	50	
Mm-CX3CL1. F	CGACAAGATGACCTCACGAA	100	59,8	50	
Mm-CX3CL1.R	CTGTGTCGTCTCCAGGACAA		59,9	55	
Mm- TNF. F	GCTGAGCTCAAACCCTGGTA	118	59,68	55	NM_013693
Mm- TNF. R	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG		58,37	55	
Mm- Il1b. F	GGGCCTCAAAGGAAAGAATC	183	56,37	50	NM_008361.4
Mm- Il1b. R	TACCAGTTGGGGAAGTCTGC		59,31	55	
Mm- CX3CR1. F	TGCCTTCTTCTCTTCTGGA	161	60,1	50	
Mm- CX3CR. R	TAAAGGGGTTGAGGCAACAG		60,1	50	
Mm- MCP-1. F	CCCAATGAGTAGGCTGGAGA	210	60,2	55	
Mm- MCP-1. R	GCTGAAGACCTTAGGGCAGA		59,6	55	
Mm-C3-F	AAGCATCAACACACCCAACA	172	60	45%	
Mn-C3-R	CTTGAGCTCCATTCGTGACA		60	50%	
Mm- C4b. F	AAA CAA CCA CAA CAT GCT GC	79	58,06	45	XM_00652353 2.3
Mm- C4b. R	GTT CTC TGG GAA GGA GGT GC		60,04	60	

4.4 Imunohistoquímica

Os animais WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2, 6 e 12 meses de idade foram eutanasiados e seus cérebros removidos e armazenados em paraformaldeído 4% em PBS por 72 horas e, em seguida, colocados em sacarose 30% em PBS overnight, a 4°C. Os cérebros foram fatiados a 40 µm utilizando um criostato, e as fatias foram armazenadas no freezer em solução crioprotetora. Por meio de fatias “free-floating”, foi utilizado o protocolo de detecção através da enzima peroxidase. Em resumo, a atividade endógena da peroxidase foi extinguida utilizando 0,3% de peróxido de hidrogênio. Em seguida as fatias foram lavadas 2 x de 5 min com PBS 1X, seguido de permeabilização com Triton (X-100) 1% for 10 min. As ligações não específicas foram bloqueadas utilizando 1,5% de soro de cabra (Para S-100B e IBa-1) e soro de cavalo (para Neun) (Vector Elite Kit) por 30 min,

seguido de incubação com o anticorpo coelho anti-S100 β (1:1000), anti-IBA-1 (1:500) e camundongo NeuN (1:1000) em PBS contendo 2% de soro de cabra ou cavalo e 3% de BSA por 90 min a 4°C. Em seguida, as fatias foram incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo ou anti-coelho(1:1000) conjugado com a biotina (Vector Elite Kit) por 90 min a 4°C. Finalmente, as fatias foram incubadas com uma solução contendo a enzima peroxidase complexada a avidina (Vector Elite Kit) por 90 min a 4°C. A imunomarcção foi visualizada utilizando o substrato da enzima peroxidase e o cromógeno (Vector Elite Kit). As fatias foram montadas em lâminas e visualizadas utilizando o Axio Imager A2-Carl Zeiss Microscope com lente Zeiss de 20x. Uma área representativa de 710x532 μ m das imagens das regiões do córtex e estriado foram analisadas. O número de células foi contado utilizando a ferramenta *cell counter* do software ImageJ (NIH, USA).

4.5 Extração de proteína

Os animais WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2, 6 e 12 meses de idade foram eutanasiados e seus cérebros removidos. As regiões corticais e estriatais foram dissecadas e colocadas em tampão de extração de citocinas (NaCl 0,4 M; tween 20 0,05%; BSA bovino 0,5%; Cloreto de benzetônio 0,1 mM; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1 mM e ajustado para 100 mL de solução EDTA (10mM; 20 UI de aprotinina) preparada a partir do tampão fosfato). A ruptura celular e extração das citocinas foram feitas com o auxílio de um homogeneizador de amostras mecânico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 10.000 rpm, o sobrenadante foi aspirado e armazenado sob refrigeração (-80°C) até o momento do uso para CBA.

4.6 *Cytometric Bread Array*® (CBA)

O kit de CBA mouse Th1/Th2/Th17 de citocinas foi utilizado conforme manual de instruções fornecido pela BD® e protocolo empregado por Barbosa e colaboradores (De Miranda *et al.*, 2016). De maneira resumida, após preparo das esferas de captura utilizando os reagentes do kit, 25 μ L do sobrenadante das amostras preparadas foram adicionadas a 25 μ L de solução contendo as esferas de captura em uma placa de 96 poços e incubadas protegidas da luz por 2 horas. Após

a incubação, a placa foi centrifugada por 5 min a 200 g e seu sobrenadante aspirado e descartado. Foi adicionado 100 µL de tampão de lavagem e submetido a um ciclo de centrifugação 5 min a 200 g, processo esse realizado num total de 2 vezes. Após a última lavagem, foram adicionados 100 µL tampão de lavagem e misturados por 2 min a 1.100 rpm. Esse conteúdo foi transferido para tubos cônicos de polipropileno de 15 ml para leitura pelo citômetro BD FACSCanto® com capacidade de leitura de laser para faixas de 488, 532 633 ou 635 nm e capaz de distinguir fluorescências entre 576, 660 e >680 nm.

4.7 Cultura primária de neurônios

As culturas neuronais foram preparadas a partir da região cortical do cérebro de embriões E15. Após a dissecação, o tecido cortical foi submetido à digestão por tripsina, seguido de dissociação celular utilizando uma pipeta-Pasteur polida no fogo.

As células foram adicionadas ao meio Neurobasal suplementado com N2 e B27, 2 mM de GlutaMAX, 50 µg/ml penicilina, e 50 µg/ml estreptomicina e em seguida plaqueadas em placas de 12 poços previamente preparadas com poli-L-orнитina. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ ao longo de 10 a 12 dias *in vitro*, sendo o meio trocado a cada 4 dias.

4.8 Estimulação dos neurônios

A cultura primária de neurônios, obtida de embriões de camundongos C57, foram incubadas com 500 µL de HBSS com Ca²⁺ durante cinco min na ausência de meio neurobasal à 37°C antes do ensaio de estimulação. Em seguida, foram administrados 10 µM de DHPG, em duplicatas, por diferentes tempos (60, 30, 15, 5, 2 e 0 min) para obtenção da curva tempo resposta. Para o ensaio com MPEP e VU0409551, da mesma maneira, foi adicionado 500 µL de HBSS com Ca²⁺. Quando usado, o MPEP foi adicionado cinco minutos antes e, após isso, os neurônios foram estimulados com 10 µM de DHPG e 10 µM de VU0409551 pelos 15 min seguintes. Após o ensaio, os neurônios foram lavados 1 vez com HBSS pré aquecido e, em seguida, lisados com 1 ml de trizol para extração de RNA.

4.9 Análise estatística

O programa Graph Pad PRISM (versão 6.01 Graph Pad Software Inc.) foi utilizado para as análises estatísticas. Os resultados de q-PCR, Imunohistoquímica e estimulação de neurônios foram examinados através do teste de análise variância one-way ANOVA. Para tal, foi utilizado o teste post-hoc de Dunnett que compara simultaneamente os valores obtidos com o controle pré-determinado, como indicado nas legendas das figuras. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Há aumento do número de micróglia no córtex dos camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/ mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade

A neuroinflamação é permeada por eventos que ocorrem tanto a nível molecular quanto celular. Estudos em cérebros *post-mortem* mostraram que, na DH, há aumento do número de células da glia, bem como sua ativação em substratos neuronais envolvidos na doença (Vonsattel *et al.*, 1985; Myers *et al.*, 1991). Além disso, já foi visto que modelos como o R6/2 apresentam aumento de micróglia no estriado a partir de 10 meses de idade (Simmons *et al.*, 2007). Para avaliar se a presença da httm e o mGluR5 interferem na população de micróglia, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica em cortes coronais do corpo estriado marcados com anticorpo anti-Iba-1. As diferentes linhagens de animais: WT, que são os animais controle; os mGluR5^{-/-}, que não expressam o mGluR5; os BACHD, que expressam a httm; e os BACHD/mGluR5^{-/-}, que expressam a httm e não apresentam o mGluR5; foram analisadas com 2, 6 e 12 meses de idade, com o objetivo de avaliar a progressão da DH. O número de micróglia dos animais BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} não foi diferente do grupo controle com 2, 6 ou 12 meses de idade quando foi analisada a região do corpo estriado (figura 3).

Como visto anteriormente, além do estriado, o córtex é uma região acometida na DH e alterações inflamatórias nesse substrato neural foram vistas em diversos estudos (Sapp *et al.*, 2001; Pavese *et al.*, 2006; Simmons *et al.*, 2007; Tai *et al.*, 2007b; a; Politis *et al.*, 2011). A fim de investigar o envolvimento do mGluR5 e a httm na população de micróglia na região cortical, os cortes histológicos referentes a essa região foram submetidos à imunohistoquímica, analisados e o número de micróglia contabilizado. Com 2 e 6 meses de idade não houve diferença entre as linhagens analisadas (figura 4A e 4B). Porém, com 12 meses de idade os camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresentaram um maior número de micróglia quando comparado ao grupo controle, como pode ser observado nas imagens representativas (figura 4D), bem como na quantificação desse resultado (figura 4C).

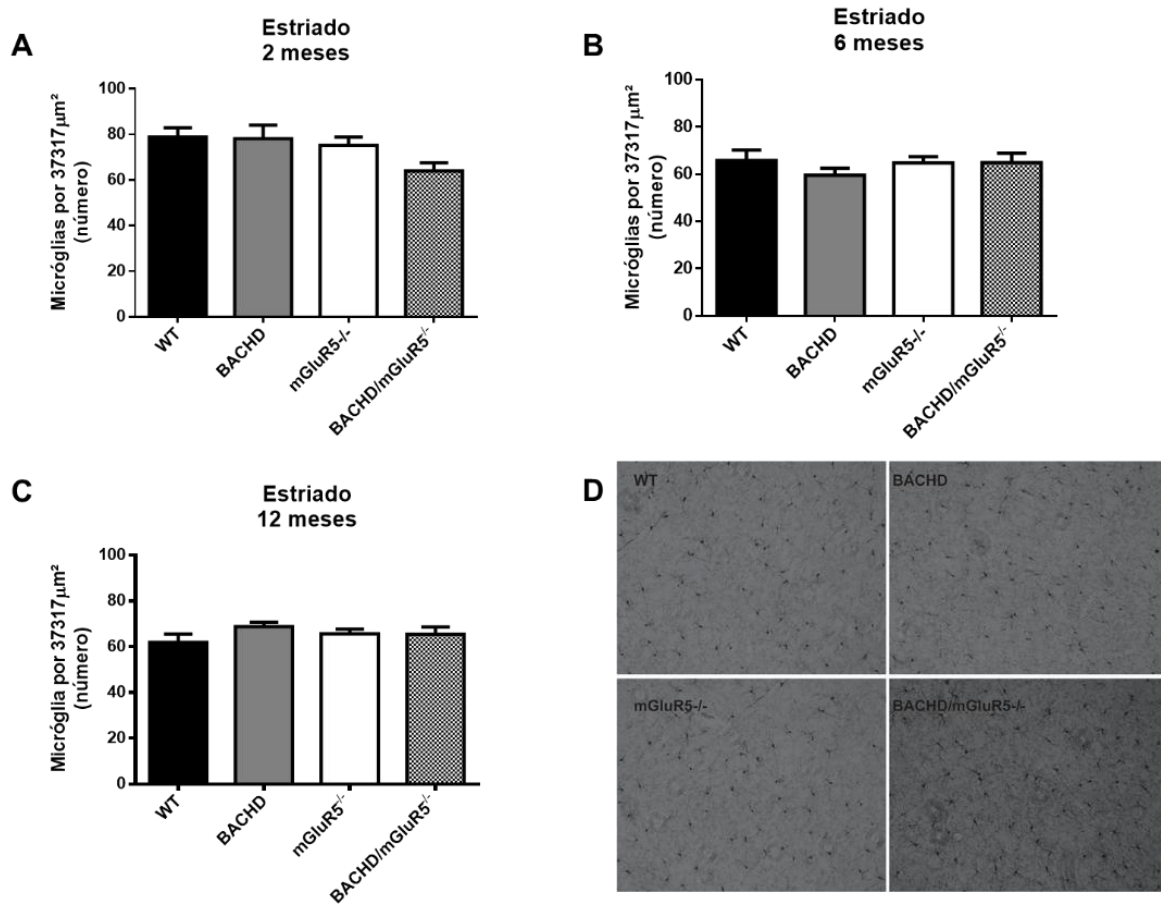


Figura 3. Não há diferença no número de micróglias no estriado dos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2, 6 ou 12 meses de idade. Os gráficos mostram a quantificação do número de células marcadas com o anticorpo anti-IBA-1 dos camundongos com 2 (A) (n=4), 6 (B) (n=4) e 12 meses de idade (C) (n=6). Os dados representam a média \pm SEM obtida a partir de 6 fotos tiradas para cada animal. A imagem (D) mostra cortes histológicos representativos da região do Estriado de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade.

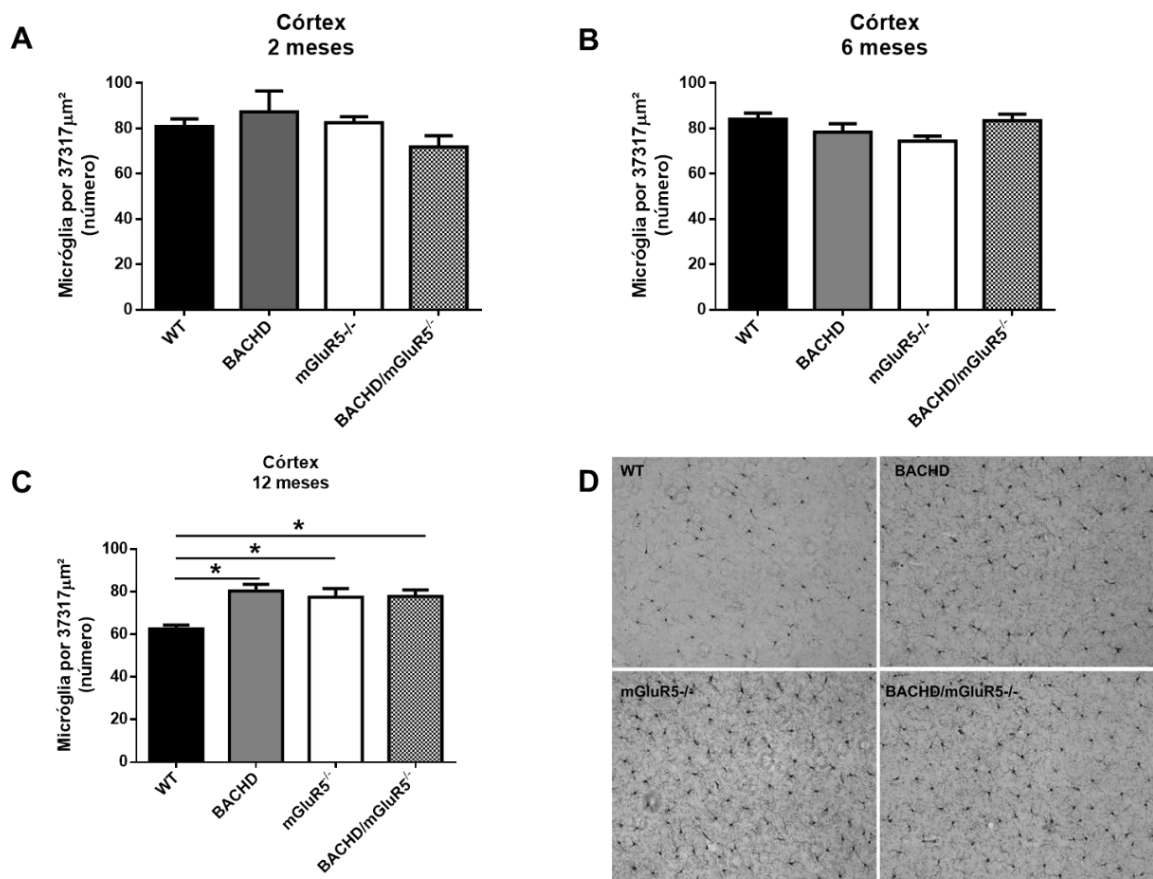


Figura 4. Há microgliose no córtex de BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/ mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. Os gráficos mostram a quantificação do número de células marcadas com o anticorpo anti-IBA-1 dos camundongos com 2 (A) (n=4), 6 (B) (n=4) e 12 meses de idade (C) (n=6). Os dados representam a média \pm SEM obtida a partir de 6 fotos tiradas para cada animal. A imagem (D) mostra cortes histológicos representativos da região cortical de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. * representa $p < 0,05$ no teste *one way* ANOVA quando comparado à linhagem WT.

5.2 O córtex de camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresenta astrogliose com 12 meses de idade

Juntamente com a microgliose, um aumento no número dos astrócitos já tinha sido relatado em estudos *post-mortem* utilizando cérebros de pacientes com DH (Vonsattel et al., 1985; Myers et al., 1991). A fim de investigar se há envolvimento do mGluR5 e da httm com a população de astrócitos, submeteu-se cortes histológicos dos animais WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} à imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti-S100- β , específico para astrócitos. Primeiramente, foi analisada a região estriatal e, assim como no caso da população de micróglias, não houve diferença no número de astrócitos em animais com 2, 6 ou 12 meses de idade (figura 5).

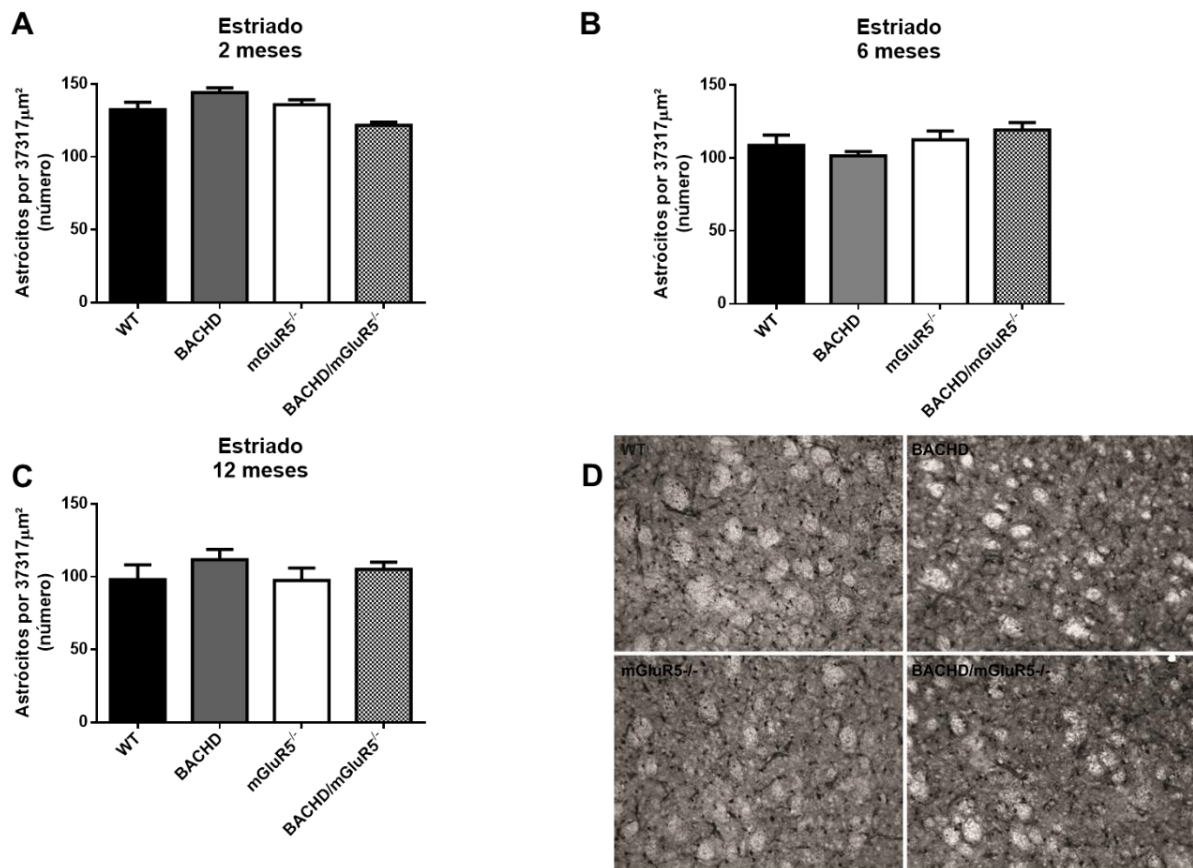


Figura 5. Não há diferença no número de astrócitos no estriado dos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2, 6 ou 12 meses de idade. Os gráficos mostram a quantificação do número de células marcadas com o anticorpo anti-S100-β dos camundongos com 2 (A) (n=4), 6 (B) (n=4) e 12 meses de idade (C) (n=6). Os dados representam a média ± SEM obtida a partir de 6 fotos tiradas para cada animal. A imagem (D) mostra cortes histológicos representativos da região do Estriado de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade.

Em seguida, analisou-se o número de astrócitos no córtex dos camundongos. Observou-se que, com 2 meses de idade, não houve diferença entre as linhagens (figura 6A). Entretanto, com 6 meses de idade, os camundongos mGluR5^{-/-} já apresentaram maior número de astrócitos quando comparados ao grupo WT (figura 6B). Com 12 meses de idade, os camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresentaram maior número de astrócitos comparados ao grupo controle, como pode ser observado nas imagens representativas (figura 6D), bem como na quantificação desse resultado (figura 6C).

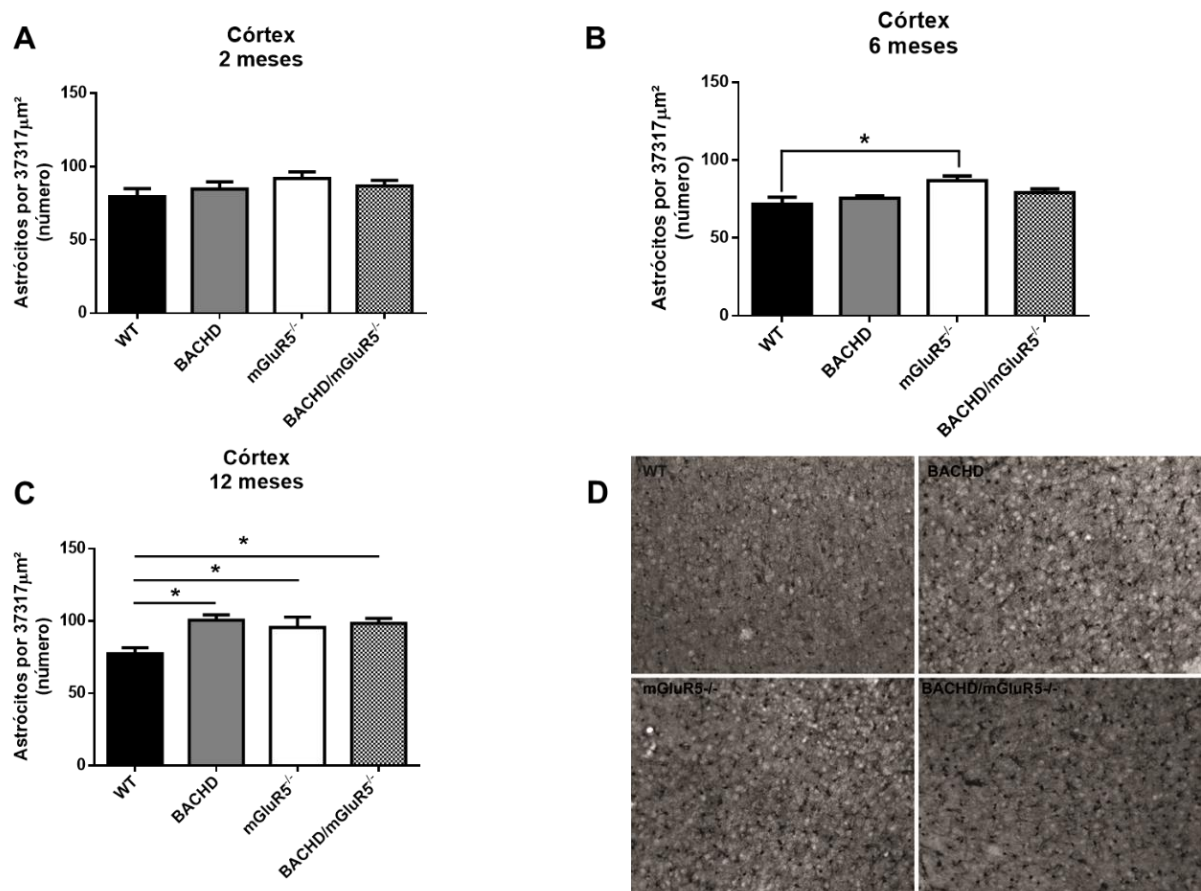


Figura 6. O número de astrócitos encontra-se aumentado na região do córtex dos animais mGluR5^{-/-} com 6 meses de idade e em animais BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. Os gráficos mostram a quantificação do número de células marcadas com o anticorpo anti-S100- β dos camundongos com 2 (A) (n=4), 6 (B) (n=4) e 12 meses de idade (C) (n=6). Os dados representam a média \pm SEM obtida a partir de 6 fotos tiradas para cada animal. A imagem (D) mostra cortes histológicos representativos da região cortical de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. * representa p<0,05 no teste one way ANOVA quando comparado à linhagem WT.

5.3 Camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresentam perda neuronal com 12 meses de idade na região cortical e estriatal

Sapp *et al.* (2001) demonstraram que, em córtex, caudado e putâmem de pacientes, o acúmulo de micróglia reativas ocorre paralelamente ao aumento da perda neuronal. Ademais, mediadores inflamatórios provenientes de células da glia reativas podem contribuir para o aumento da morte neuronal que, por sua vez, pode ativar mecanismos que contribuem para a inflamação, como revisado por (Rocha *et al.*, 2016). Dados do nosso e de outros grupos de pesquisa demonstraram que camundongos BACHD apresentam atrofia cortical e estriatal aos 12 meses de idade, bem como processos neurodegenerativos (Gray *et al.*, 2008; Doria *et al.*, 2015).

Para elucidar o papel do mGluR5 na perda neuronal na DH, cortes coronais da região cortical e estriatal foram marcados com anticorpo NeuN e as células NeuN⁺ foram contabilizadas. Na região do estriado houve neurodegeneração com 12 meses de idade nos camundongos mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-}. Além disso, camundongos BACHD apresentaram maior neurodegeneração quando comparados aos animais mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-}, como pode ser observado na quantificação (figura 7C) e nas imagens representativas (figura 7D). Interessantemente, já foi possível observar perda neuronal no córtex de camundongos BACHD desde 6 meses de idade (figura 8B), enquanto camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresentaram perda neuronal apenas com 12 meses de idade, como quantificado na figura 8C e demonstrado nas imagens representativas (figura 8D).

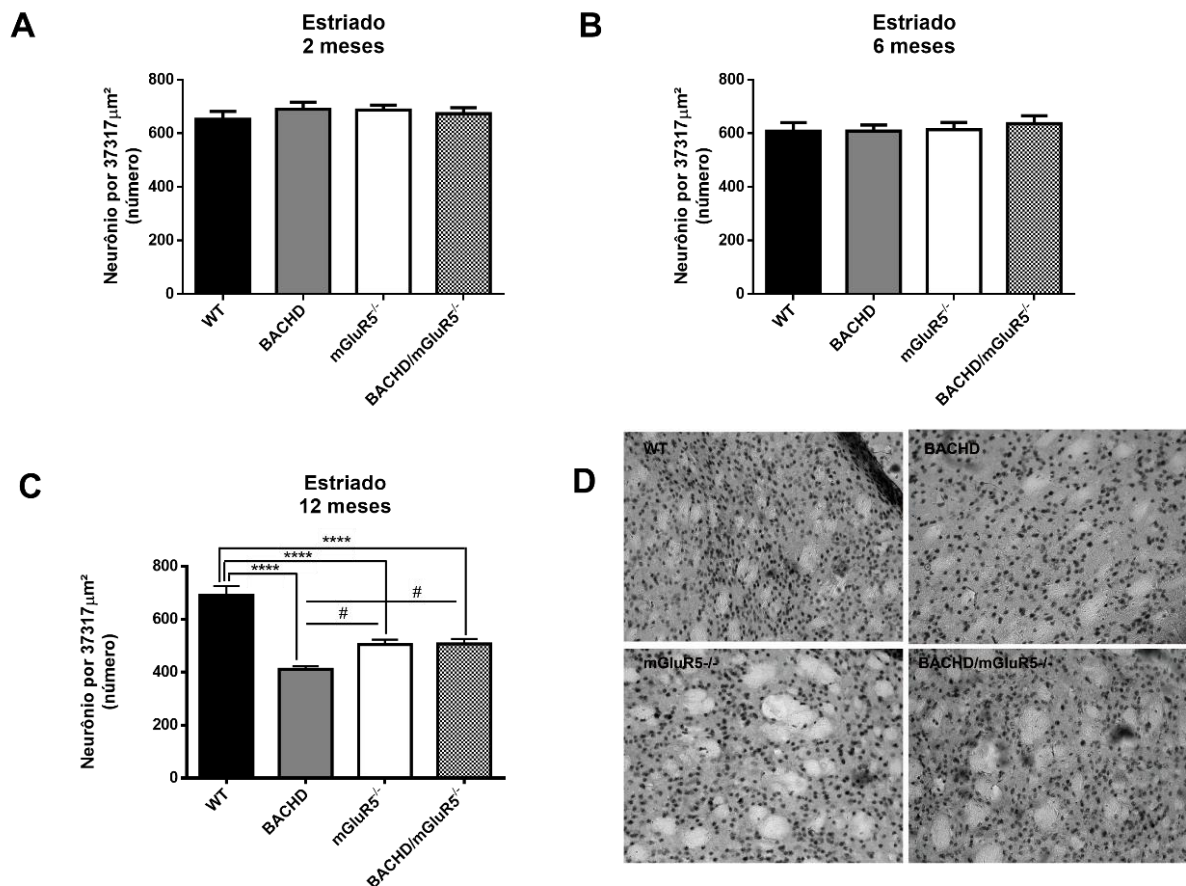


Figura 7. Camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresentam perda neuronal com 12 meses de idade na região do corpo estriado: Os gráficos mostram a quantificação do número de células marcadas com o NeuN dos camundongos com 2 (A) (n=4), 6 (B) (n=4) e 12 meses de idade (C) (n=6). Os dados representam a média \pm SEM obtida a partir de 6 fotos tiradas para cada animal. A imagem (D) mostra cortes histológicos representativos da região estriatal de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. ****

representam $p < 0,0001$ no teste *one way* ANOVA quando comparado à linhagem WT e # representa $p < 0,05$ no teste *one way* ANOVA.

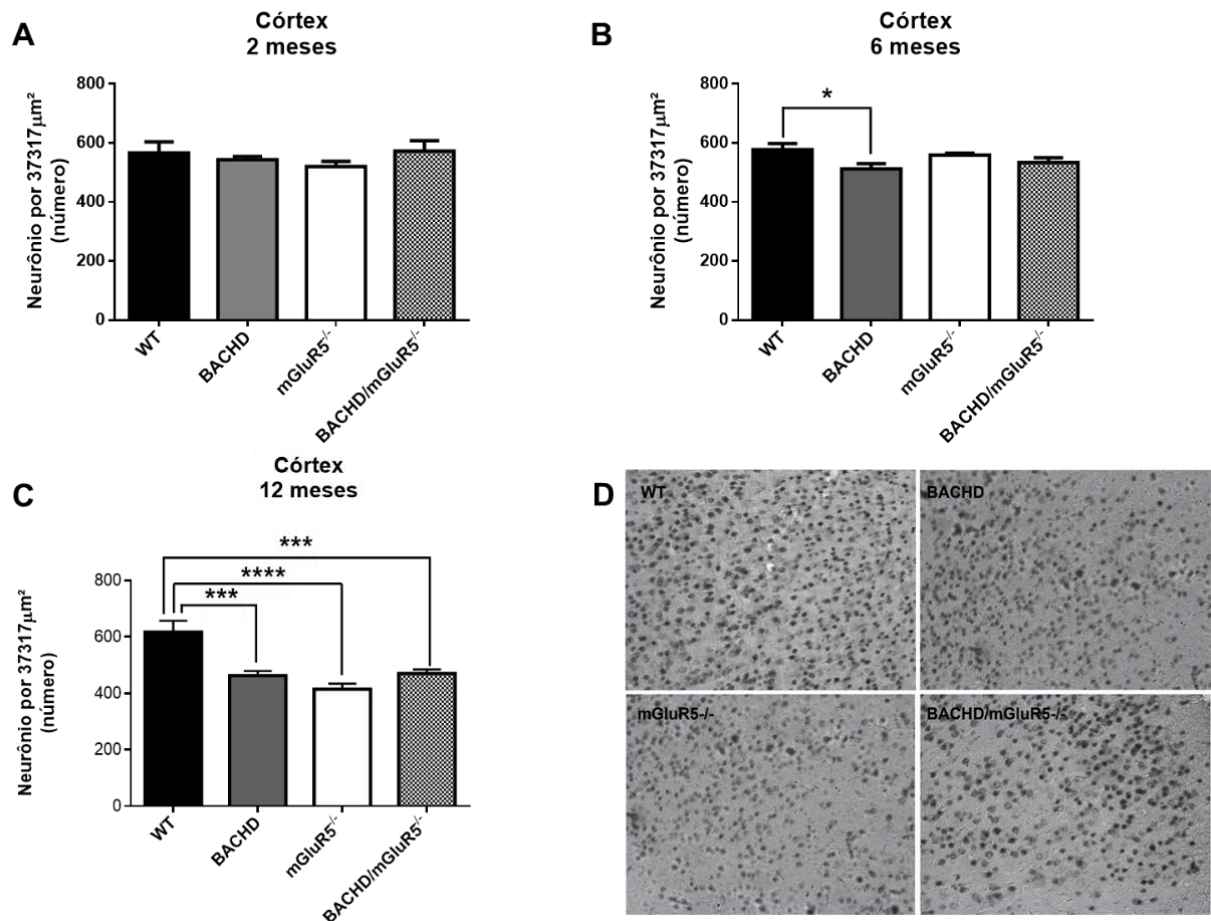


Figura 8. Camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresentam perda neuronal com 12 meses de idade na região cortical: Os gráficos mostram a quantificação do número de células marcadas com o NeuN dos camundongos com 2 (A) (n=4), 6 (B) (n=4) e 12 meses de idade (C) (n=6). Os dados representam a média \pm SEM obtida a partir de 6 fotos tiradas para cada animal. A imagem (D) mostra cortes histológicos representativos da região cortical de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. * representa $p < 0,05$, *** representam $p < 0,001$ no teste ONE WAY ANOVA quando comparado à linhagem WT.

5.4 Não há diferença nos níveis de citocinas no córtex de camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade

Neurodegeneração, microgliose e astrogliose podem resultar em aumento da produção de mediadores inflamatórios. Silvestroni *et al.* (2009) demonstraram, em cérebros *post-mortem* de pacientes com DH, aumento nos níveis de RNAm de citocinas como IL-6, IL-10 e TNF no caudado, putâmem e córtex, além de aumento de CCL2 (MCP-1), uma importante proteína quimioatrativa de monócitos. Bjorkqvist

et al. (2008) mostraram ainda que há aumento de citocinas inflamatórias em cérebros *post-mortem* de pacientes com DH nos núcleos caudado e putâmem além de, os camundongos transgênicos para DH, o R6/2, YAC128 e Hdh(Q150Q/Q150), apresentarem aumento de citocinas pró-inflamatórias no soro. Também foi visto desregulação na expressão de genes relacionados ao sistema do complemento como C3 e C4b nos núcleos caudado e putâmem e córtex pré-frontal de cérebros *post-mortem* de pacientes com DH (Hodges *et al.*, 2006).

Para avaliar os níveis das citocinas que tem sido implicadas na DH, foi realizado um ensaio de *Cytometric Bread Array*® (CBA) em lisados obtidos a partir dos cérebros dos camundongos WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2, 6 e 12 meses de idade. Curiosamente, no córtex dos animais com 12 meses de idade, onde foram vistas todas as alterações celulares até então, não houve diferença entre nenhum grupo analisado para as principais citocinas inferidas na DH: IL-6, IL-10 e TNF (Figura 9). A fim de confirmar este resultado, o nível de RNAm foi quantificado pela técnica de RT-qPCR a partir do córtex dos animais com 12 meses de idade para TNF (Figura 10A), visto que os primers para IL-6 e IL-10 não foram eficientes em baixos níveis de RNAm (Dados não mostrados). Assim como os níveis de proteína, o RNAm não apresentou diferença entre WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-}.

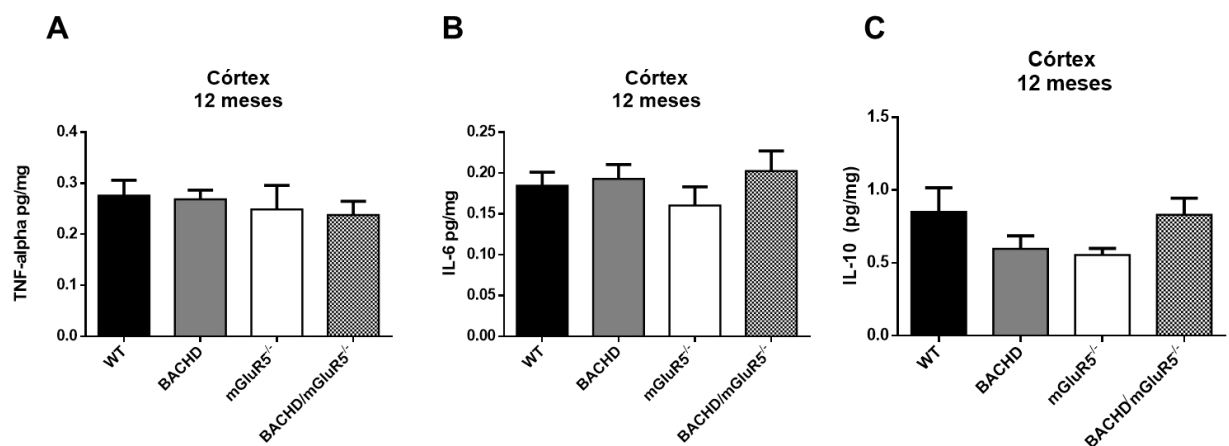


Figura 9. Não há diferença nos níveis de TNF, IL-6 e IL-10 em Córtex de camundongos com 12 meses de idade. Os gráficos mostram os níveis TNF(A), IL-6 (B) e IL-10 (C) expressos em pg de citocina por mg de proteínas no córtex dos animais WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} (n=6). Dados representam a média ± SEM.

O RNAm de IL-1 β , MCP-1, C3 e C4b também foram analisados por RT-qPCR em córtex de animais WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade e nenhuma diferença significativa foi vista entre as linhagens analisadas (Figura10).

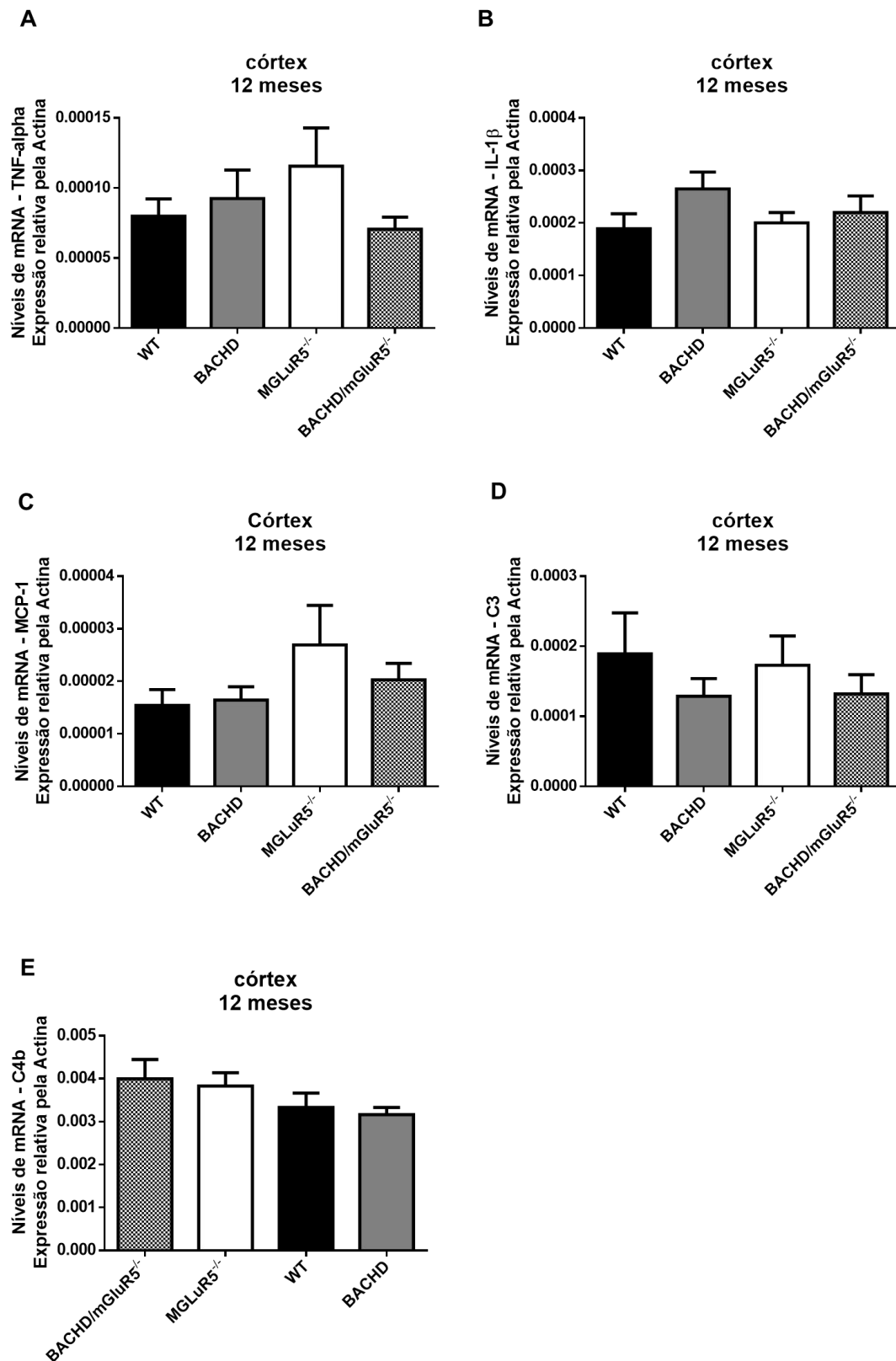


Figura 10. Não há diferença na expressão de TNF, IL-1 β , MCP-1, C3 e C4b na região do córtex nos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. Os gráficos mostram os níveis de RNAm de TNF(A), IL-1 β (B), MCP-1 (C), C3 (D) e C4b (E) determinados por RT-qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do córtex de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade (n=6). A reação de

qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média \pm SEM.

5.5 Há diminuição dos níveis da quimiocina CX3CL1 no córtex dos camundongos BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade

Devido ao aumento de micróglia e astrócitos e, ainda, a ocorrência da neurodegeneração na região cortical dos animais BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade, foi investigado se outros mediadores poderiam estar atuando nesses tipos celulares e favorecendo tais condições. A comunicação entre neurônios, astrócitos e micróglia é de extrema importância para o funcionamento cerebral e diversos ligantes e receptores participam desse processo (Sheridan e Murphy, 2013).

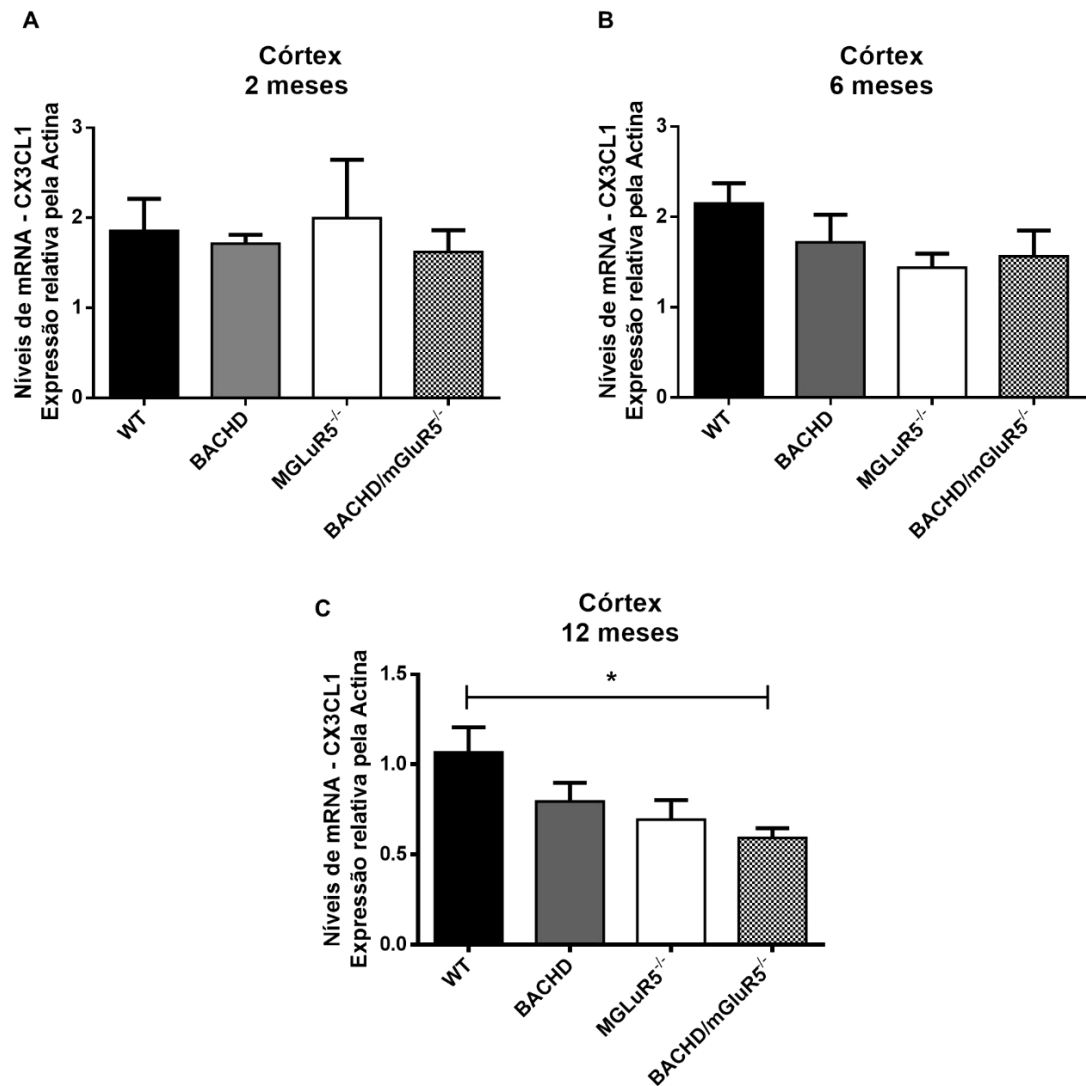


Figura 11. Camundongos BACHD/mGluR5^{-/-} apresentam diminuição dos níveis de RNAm de CX3CL1 quando comparados ao grupo WT. Os gráficos mostram os níveis de RNAm determinados por RT-qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do córtex de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2 (A) (n=4), 6 (B) (n=4) e 12 (C) meses de idade (n=6). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média \pm SEM. * representa $p < 0,05$ no teste *one way* ANOVA quando comparado à linhagem WT.

Neste contexto, a fractalquina ou CX3CL1 (Bazan *et al.*, 1997) é uma importante quimiocina produzida por neurônios e astrócitos (Hughes *et al.*, 2002), que tem sido implicada na regulação de micróglia, visto que seu receptor (CX3CR1) é, preferencialmente, expresso nesse tipo celular. Embora ainda não tenha sido descrito o envolvimento de CX3CL1 na DH, diversos estudos mostraram que o eixo CX3CL1-CX3CR1 está relacionado a processos de regulação da atividade microglial, desenvolvimento neuronal e poda sináptica, como revisado por (Sheridan e Murphy, 2013; Paolicelli *et al.*, 2014). Para investigar se a CX3CL1 poderia estar envolvida na

DH e, ainda, com o mGluR5, foi realizada a técnica de RT-qPCR utilizando o córtex dos animais WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 2, 6 e 12 meses de idade para a detecção dos níveis de RNAm de CX3CL1.

Na figura 11A e 11B os dados mostram que com 2 e 6 meses de idade não houve diferença entre as linhagens analisadas. No entanto, com 12 meses de idade, embora tenha havido uma tendência à diminuição no caso dos animais mGluR5^{-/-} e BACHD, apenas os animais BACHD/mGluR5^{-/-} apresentaram uma diminuição significativa da expressão de CX3CL1, o que demonstra o efeito somatório da ausência do mGluR5 e a presença da httm (figura 11C).

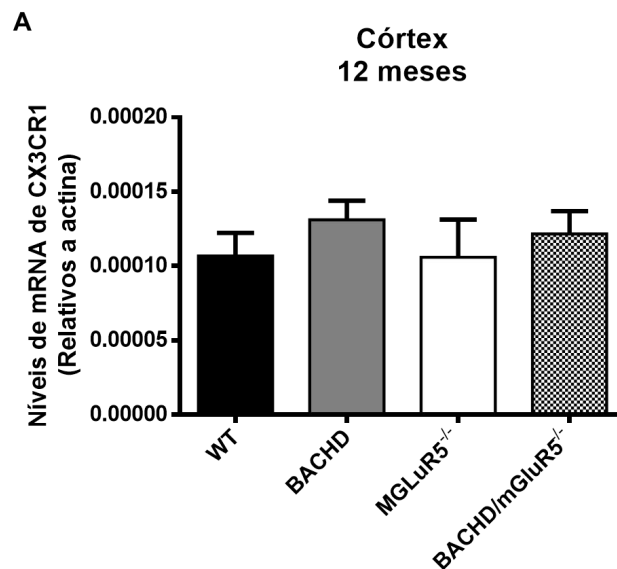


Figura 12. Não há diferença nos níveis de RNAm para o receptor de CX3CL1 nos camundongos WT, BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade. O gráfico mostra os níveis de RNAm determinados por RT-qPCR. As amostras de RNA foram extraídas do córtex de camundongos das linhagens WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade (n=6). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA de actina. Dados representam a média ± SEM.

Para esclarecer se havia também diferença na expressão do CX3CR1, foi realizado o RT-qPCR a partir de amostras dos animais WT, mGluR5^{-/-}, BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-} com 12 meses de idade para detecção dos níveis de RNAm de CX3CR1. O RT-qPCR não demonstrou diferença na expressão de CX3CR1 em nenhuma das linhagens analisadas (figura 12).

5.6 O antagonista do mGluR5 (MPEP) foi capaz de aumentar a expressão de CX3CL1 em cultura primária de neurônio

Diante dos resultados obtidos, levantou-se a hipótese de que o mGluR5 poderia modular a expressão de CX3CL1, visto que já foi demonstrado que a ativação do mGluR5 é capaz de regular a expressão de diversos genes por diferentes vias de sinalização intracelulares (Gass e Olive, 2008). A fim de elucidar o envolvimento do mGluR5 na expressão da CX3CL1, culturas primárias de neurônios provenientes do córtex de embriões de 15 dias de camundongos C57 foram preparadas de acordo com o protocolo utilizado por (Doria *et al.*, 2013). No 9º dia *in vitro* as culturas foram estimuladas por diferentes tempos com o agonista do mGluR5 (S)-3,5-DHPG na concentração de 10 μ M (Figura 13A). Em seguida, foi feita a extração de RNA e produção de cDNA para a quantificação, pela técnica de RT-qPCR, dos níveis de RNAm de CX3CL1.

Paralelamente, outro experimento utilizando o agonista: (S)-3,5-DHPG (10 μ M); o antagonista: -methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) (10 μ M) e o modulador alostérico positivo do mGluR5: VU0409551 (10 μ M) foi realizado. Neste ensaio, as culturas primárias de neurônios corticais foram estimuladas por 15 min com DHPG ou VU0409551. O MPEP, quando utilizado, foi adicionado à cultura cinco min antes da adição das demais drogas (Figura 13B).

Os tempos escolhidos de 2, 5, 15, 30 ou 60 min de estimulação do mGluR5 com DHPG não foram capazes de alterar a expressão de CX3CL1 (Figura 13A). Curiosamente, contrário à nossa hipótese inicial, o antagonista MPEP (10 μ M) aumentou significativamente a expressão de CX3CL1 (figura 13B). Diante disso, futuros experimentos, com diferentes tempos de estimulação com MPEP e análise dos níveis de RNAm e proteína, serão necessários para traçar o perfil do envolvimento do mGluR5 sob a expressão de CX3CL1. Ademais, assim como os neurônios, os astrócitos também expressam fractalquina e sua contribuição também deverá ser analisada.

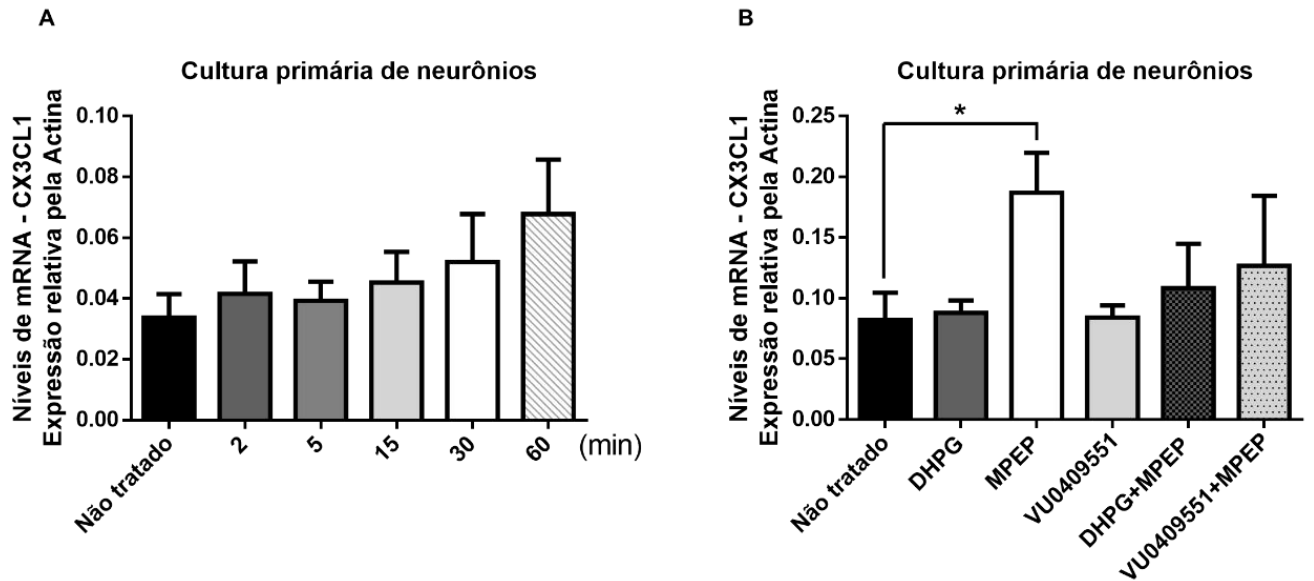


Figura 13. O antagonista do mGluR5 (MPEP) aumentou a expressão de CX3CL1 em cultura primária de neurônios corticais. O gráfico **A** mostra os níveis de RNAm de CX3CL1 determinados por RT-qPCR em cultura primária de neurônios corticais estimulados com DHPG 10 μ M por 0, 2, 5, 15, 30 e 60 minutos (n=7). O gráfico **B** mostra os níveis de RNAm de CX3CL1 determinados por RT-qPCR em cultura primária de neurônios corticais estimulados com DHPG 10 μ M por 15 minutos, MPEP 10 μ M por 20 minutos e VU0409551 10 μ M por 15 min (n=4). Dados representam a média \pm SEM. * representa p<0,05 no T test quando comparado ao grupo não tratado.

6 DISCUSSÃO

A DH é marcada por uma neurodegeneração progressiva, inclusões intracelulares de proteína httm e neuroinflamação. O camundongo BACHD recapitula muitos desses aspectos da DH, incluindo atrofia cortical e estriatal, agregados de httm e déficits motores progressivos (Gray *et al.*, 2008). Embora seja um modelo bem estabelecido, pouco se sabe sobre os processos inflamatórios presentes no BACHD. Simmons *et al.* (2016) demonstraram aumento de micróglia no estriado de BACHD com 12 meses de idade através de marcação dessas células com anti-IBA-1 por imunohistoquímica. Por outro lado, Mantovani *et al.* (2016) alegaram não haver microgliose e astrogliose no estriado desses camundongos com 12 meses de idade. Os autores mediram os níveis de RNAm do gene que codifica a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e IBA-1, específicas para astrócitos e micróglia respectivamente.

No presente trabalho nós demonstramos, através da técnica de imunohistoquímica para a marcação da proteína IBA-1, que há aumento do número de micróglia no córtex de animais com 12 meses de idade, mas não no estriado. Este aumento do número de micróglia pode indicar o acontecimento de processos inflamatórios na região, visto que essas células desempenham importante papel na eliminação de detritos e liberação de mediadores inflamatórios (Aguzzi *et al.*, 2013). Além disso, o aumento de células da glia já foi documentado em cérebros *post-mortem* de pacientes com DH (Myers *et al.*, 1991). A microgliose é uma resposta comum a diversos tipos de danos ao SNC. No entanto, a origem das células envolvidas nesse processo ainda é controversa. Diferentes processos no SNC podem gerar tanto uma proliferação local das micróglia quanto um recrutamento de monócitos do sistema periférico (Ransohoff e Cardona, 2010; Aguzzi *et al.*, 2013). Porém, não há nenhuma evidência de entrada de células periféricas no SNC no caso da DH (Rocha *et al.*, 2016). Além disso, em um modelo transgênico para outra doença neurodegenerativa, a esclerose lateral amiotrófica (ELA), foi demonstrado que a manutenção e a expansão local da micróglia dependem somente da auto renovação das células residentes do SNC (Ajami *et al.*, 2007). Entretanto, outros experimentos são necessários para elucidar a origem da microgliose observada nos camundongos BACHD, bem como nos camundongos *knockout* para o mGluR5.

A respeito da ativação das micróglia, somente a marcação com anti-IBA-1 não é capaz de definir se essas células estariam realmente ativadas. Para isso, uma avaliação da morfologia celular seria necessária, visto que as micróglia sofrem alterações fenotípicas quando ativadas. Em repouso apresentam-se ramificadas, mas durante o processo de ativação, aparecem arredondadas e seus processos se retraem (Crotti e Glass, 2015; Simmons *et al.*, 2016). Adicionalmente, outros anticorpos podem ajudar a esclarecer se há ou não a ativação das micróglia, como por exemplo, o anti-CD68. A CD-68 é um proteína lisossomal e sua expressão está associada a macrófagos e micróglia ativados (Stankov *et al.*, 2015).

Neste trabalho demonstramos também que camundongos BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-} apresentaram um maior número de astrócitos no córtex quando comparados ao grupo WT aos 12 meses de idade. Os astrócitos constituem o tipo mais abundante de célula da glia no SNC (Chung *et al.*, 2015) e apresentam uma grande heterogeneidade em sua morfologia e função. Além de prover suporte físico e metabólico aos neurônios, os astrócitos modulam a BHE, orientam a localização do axônio, mantêm a homeostase do cérebro e participam de processos inflamatórios secretando proteínas (Jha *et al.*, 2017). Por não haver mudanças com 2 e 6 meses no número de astrócitos, a astrogliose, vista aos 12 meses de idade, parece ser um processo adjacente à morte neuronal que ocorreu intensamente com 12 meses de idade no córtex dos camundongos BACHD e BACHD/mGluR5^{-/-}. Ademais, a microgliose também só foi vista aos 12 meses de idade e é sabido que não apenas o processo de morte celular, mas micróglia reativas também podem levar à ativação de astrócitos que contribuem para a morte neuronal (Liddelow *et al.*, 2017).

É importante notar que os animais mGluR5^{-/-} apresentaram uma astrogliose desde os 6 meses de idade, independente da ausência de alteração no número de micróglia ou de neurodegeneração. É sabido que um único astrócito pode envolver milhares de sinapses (Halassa *et al.*, 2007). Os astrócitos detectam neurotransmissores liberados durante a atividade neuronal e, por sua vez, podem modular a transmissão sináptica, liberando substâncias neuroativas chamadas gliotransmissores (Schwarz *et al.*, 2017). Neste aspecto, é importante citar que, através do uso do antagonista MPEP, o mGluR5 foi implicado como o receptor mais importante na detecção de glutamato pelos astrócitos nas sinapses glutamatérgicas, como revisado por (Panatier e Robitaille, 2016). Ademais, esses eventos ocorrem

em diversos substratos no cérebro, inclusive no córtex (Wang *et al.*, 2006). Este pode ser um dos motivos pelos quais o nocauteamento do gene do mGluR5 altera a população de astrócitos nos animais mGluR5^{-/-} com 6 meses de idade. Outro aspecto relevante observado a partir desses resultados é que o nocauteamento do mGluR5 não promove alterações aos 2 meses de idade, mas sim de maneira dependente do envelhecimento. Portanto, é possível hipotetizar que, apesar do *Knock-out* do receptor estar presente durante toda a vida do camundongo, parece que processos compensatórios fazem com que não haja grandes danos no início da vida dos camundongos. Entretanto, com o avançar da idade, os efeitos deletérios da falta do mGluR5 podem se sobressair gerando os eventos aqui relatados aos 6 e 12 meses de vida.

A neurodegeneração, por definição, é um processo que perturba as propriedades do SNC e, portanto, afeta a função neuronal, bem como a estrutura ou a sobrevivência dos neurônios (Przedborski *et al.*, 2003). Segundo Ransohoff (2016) a neuroinflamação em doenças como AD, DH, PD, e ELA é caracterizada por uma alteração da morfologia de células gliais, incluindo astrócitos e micróglia, e alterações pequenas ou moderadas nos mediadores inflamatórios no parênquima cerebral. Em contrapartida, a neuroinflamação na esclerose múltipla (EM) é intensa, compreendendo infiltrado de linfócitos e macrófagos derivados do sangue, acompanhada de comprometimento da BHE e reação glial intensa. As diferentes reações aos processos neurodegenerativos corrobora a hipótese de que a neuroinflamação seria uma reação secundária a neurodegeneração. Por outro lado, na DH, por exemplo, a *htrtm* é expressa tanto em neurônios quanto em células da glia (Shin *et al.*, 2005) e, ainda, todos esses tipos celulares apresentam agregados de *htrtm* (Jansen *et al.*, 2017). Já foi demonstrado que micróglia contendo *htrtm* são mais reativas do que o tipo selvagem (Bjorkqvist *et al.*, 2008). Ademais, micróglia expressando *htrtm* apresentam genes inflamatórios diferencialmente expressos mesmo na ausência de estímulos (Crotti *et al.*, 2014). Dito isso, é importante citar que há ainda uma discussão sobre a colaboração da neurodegeneração para a inflamação e desta para o processo de morte celular. De maneira geral, a neuroinflamação contribui para a neurodegeneração de diversas formas. Por exemplo, através do sistema de NADPH oxidase (PHOX) em micróglia ativadas levando à produção de superóxido e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) e através da óxido nítrico sintetase, levando à produção de óxido nítrico (NO) por

micróglia e astrócitos. Por sua vez, altos níveis de NO induzem a morte neuronal causando inibição da respiração mitocondrial, despolarização do neurônio e liberação de glutamato. Tanto células da glia, quanto neurônios podem liberar glutamato e glutaminase durante processos degenerativos. Altos níveis de glutamato podem levar à ativação de micróglia (Brown e Vilalta, 2015), criando assim uma retroalimentação entre neurodegeneração e neuroinflamação (Brown e Bal-Price, 2003; Brown e Neher, 2010; Brown e Vilalta, 2015; Ransohoff, 2016).

Embora a perda neuronal tenha sido demonstrada na região cortical e estriatal com 12 meses de idade, detectamos alteração da glia somente na região cortical. Esses resultados corroboram a existência de outros fatores contribuintes para a gliose vista no córtex. A diferente distribuição dos tipos celulares nas diversas regiões do cérebro pode justificar como algumas regiões reagem diferentemente aos danos teciduais. Por exemplo, os circuitos neuronais do cérebro de mamíferos são construídos dentro de redes de astrócitos, mas a proporção de astrócitos para neurônios varia entre as regiões. No córtex os astrócitos são mais numerosos que os neurônios, enquanto no cerebelo os neurônios superam em número os astrócitos (Khakh e Sofroniew, 2015). Neste contexto, não foram analisados no presente estudo os diversos tipos de astrócitos encontrados no SNC (Khakh e Sofroniew, 2015) e a variedade de micróglia (Keren-Shaul *et al.*, 2017) e de astrócitos (Liddel *et al.*, 2017) já descritas em diversos outros artigos. Assim, mais estudos são necessários para determinar porque a gliose ocorre apenas no córtex enquanto a neurodegeneração ocorre tanto no córtex quanto no estriado.

O mGluR5 não tinha sido implicado na modulação da neuroinflamação na DH. Embora não tenhamos visto nenhuma mudança no perfil de expressão de citocinas (Figura 9) nos animais BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-}, estes genótipos foram importantes para modular o número das principais populações celulares no SNC. Byrnes *et al.* (2009) demonstraram *in vitro* que a ativação do mGluR5 em micróglia com agonista CHPG foi capaz de diminuir a ativação das micróglia causada pelo LPS. Além do mais, ao adicionar as micróglia tratadas com CHPG em culturas de neurônios, houve diminuição da morte neuronal comparadas a co-cultura sem adição de CHPG nas micróglia. Tendo em vista este estudo, parece que a ativação do mGluR5 *in vitro* gerou um resultado benéfico para as culturas neuronais assim como o nocauteamento crônico do mGluR5 gerou efeitos deletérios para os camundongos mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-}.

Para elucidar os processos moleculares que permeiam a regulação das diferenças nas populações celulares encontradas no nosso estudo, nós investigamos se a CX3CL1 poderia estar diferentemente expressa nos animais BACHD, mGluR5^{-/-} e BACHD/mGluR5^{-/-}. A CX3CL1 é uma quimiocina que existe em duas formas: Uma forma ancorada à membrana e uma forma solúvel quimioatrativa (Bazan *et al.*, 1997). A CX3CL1 é expressa por neurônios e astrócitos e age unicamente em seu receptor CX3CR1. O CX3CR1 é um receptor metabotrópico expresso *in vivo* somente por micróglia (Cardona *et al.*, 2006). As micróglia, tanto no cérebro saudável quanto em patologias do SNC, são reguladas negativamente ou positivamente principalmente pelos neurônios (Ransohoff e Cardona, 2010). O eixo CX3CL1-CX3CR1 é um destes mecanismos utilizados pelas células de origem não mielóide para conter respostas microgliais exacerbadas, na tentativa de manter a homeostase no SNC (Paolicelli *et al.*, 2014). Consistente com essa ideia é o fato de que a ativação das células microgliais podem advir não só da liberação de mediadores que as acionem, mas, também, através da remoção da inibição. A relevância da regulação CX3CL1-CX3CR1 na ativação das células microgliais *in vivo* foi demonstrado por (Cardona *et al.* (2006)). Usando três modelos *in vivo* diferentes, mostraram que a deficiência de CX3CR1 altera as respostas microgliais, resultando em neurotoxicidade. Após injeções periféricas de LPS, os camundongos CX3CR1^{-/-} apresentaram maior ativação microglial e neurotoxicidade. Em um modelo da Doença de Parkinson e em um modelo transgênico de ELA, os grupos CX3CR1^{-/-} apresentaram perda de células neuronais mais extensa do que o controle e processos inflamatórios mais intensos. Portanto, esses dados corroboram nossa hipótese de que a diminuição da expressão de CX3CL1 vista, principalmente, em camundongos BACHD/mGluR5^{-/-} pode contribuir para a perda da regulação das células microgliais evidenciada, nesse estudo, pela microgliose aos 12 meses de idade.

A partir dos resultados que obtivemos nesse estudo, foi levantada a hipótese de que o mGluR5 poderia influenciar na expressão da CX3CL1, uma vez que os camundongos mGluR5^{-/-} apresentaram uma tendência com relação à diminuição da CX3CL1 e que o nocauteamento do receptor em camundongos BACHD levou a uma diminuição significativa da expressão dessa quimiocina. Para testar essa hipótese, nós realizamos os experimentos de estimulação *in vitro* dos neurônios com o agonista do mGluR5, o DHPG. Embora esperássemos que a ativação do mGluR5

pudesse aumentar os níveis de RNAm de CX3CL1, não foi vista nenhuma alteração. No entanto, surpreendentemente, o antagonista do mGluR5 MPEP foi capaz de aumentar significativamente, *in vitro*, a expressão de CX3CL1. Embora esse resultado tenha sido surpreendente, alguns fatores poderiam explicar o porquê dessa diferença entre os resultados *in vitro* e *in vivo*. As análises da expressão da CX3CL1 nos camundongos foi feita utilizando um lisado tecidual que contem não só neurônios, como também astrócitos e micróglia. Já os ensaios *in vitro* utilizaram apenas neurônios obtidos de embriões. Além disso, a diminuição da expressão da fractalquina no duplo mutante só ocorreu aos 12 meses de idade, indicando que essa alteração de expressão não seria um resultado direto do nocauteamento do mGluR5, mas sim a consequência de alterações associadas ao envelhecimento. Se assim não o fosse, deveríamos ter observado alteração da expressão da fractalquina já nos camundongos com 2 meses de idade. Até o momento nós não sabemos como o bloqueio do mGluR5 com MPEP causa um aumento da expressão da CX3CL1. Entretanto, é sabido que o mGluR5 pode atuar na regulação gênica (Gass e Olive, 2008). Assim, nós hipotetizamos que o mGluR5 poderia aumentar a expressão de algum repressor gênico e/ou miRNA que poderiam estar envolvidos na regulação da expressão do gene da fractalquina. A partir daí, nós investigamos se já havia sido mostrado que algum repressor gênico seria capaz de regular diretamente a CX3CL1. Interessantemente, utilizando um modelo celular para a DH, Soldati *et al.* (2013) mostraram que o gene que codifica a CX3CL1 é alvo direto do fator de transcrição que silencia o elemento repressor 1 (REST). REST é um repressor gênico que, em condições fisiológicas, está localizado no citoplasma através da formação do complexo formado pela htt selvagem, subunidade p150 da dinactina, proteína associada a huntingtina 1 (HAP1) e proteína com domínio LIM que interage com REST (RILP), como revisado por (Buckley *et al.*, 2010). Entretanto, na presença da httm, o REST é liberado desse complexo, migrando para o núcleo e aumentando a repressão de seus genes alvos (Zuccato *et al.*, 2003; Zuccato *et al.*, 2007). Interessantemente, dados ainda não publicados do nosso grupo demonstram que o mGluR5 é capaz de regular a expressão de REST. Portanto, mais estudos são importantes para elucidar as vias envolvendo a regulação da expressão dessa quimiocina pelo mGluR5.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A neuroinflamação tem um papel importante dentro da patologia da DH. Nesse estudo, nós demonstramos que tanto o mGluR5 quanto a htm interferem nas principais células regentes deste evento. E, ainda, que o mGluR5 é capaz de intervir no eixo CX3CL1-CX3CR1, importante para a comunicação estabelecida entre o SNC e o sistema imune. Assim, fica clara a função crucial do mGluR5 nos processos inflamatórios que ocorrem na DH. Entretanto, experimentos futuros ainda são necessários para esclarecer os mecanismos relacionados às alterações vistas nos camundongos BACHD/mGluR5^{-/-}.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUZZI, A.; BARRES, B. A.; BENNETT, M. L. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? **Science**, v. 339, n. 6116, p. 156-61, Jan 11 2013
- AJAMI, B.; BENNETT, J. L.; KRIEGER, C.; TETZLAFF, W.; ROSSI, F. M. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 12, p. 1538-43, Dec 2007
- AMCHOVA-PRAZAKOVA, E. [Importance of glutamic acid in metabolic processes in the human organism]. **Cas Lek Cesk**, v. 94, n. 45, p. 1211-5, Nov 4 1955
- ANBORGH, P. H.; GODIN, C.; PAMPILLO, M.; DHAMI, G. K.; DALE, L. B.; CREGAN, S. P.; TRUANT, R.; FERGUSON, S. S. Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin. **J Biol Chem**, v. 280, n. 41, p. 34840-8, Oct 14 2005
- ARRASATE, M.; MITRA, S.; SCHWEITZER, E. S.; SEGAL, M. R.; FINKBEINER, S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. **Nature**, v. 431, n. 7010, p. 805-10, Oct 14 2004
- BAZAN, J. F. et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. **Nature**, v. 385, n. 6617, p. 640-4, Feb 13 1997
- BIBER, K.; LAURIE, D. J.; BERTHELE, A.; SOMMER, B.; TOLLE, T. R.; GEBICKE-HARTER, P. J.; VAN CALKER, D.; BODDEKE, H. W. Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia. **J Neurochem**, v. 72, n. 4, p. 1671-80, Apr 1999
- BJORKQVIST, M. et al. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. **J Exp Med**, v. 205, n. 8, p. 1869-77, Aug 4 2008
- BROOKS, S.; HIGGS, G.; JONES, L.; DUNNETT, S. B. Longitudinal analysis of the behavioural phenotype in Hdh(CAG)150 Huntington's disease knock-in mice. **Brain Res Bull**, v. 88, n. 2-3, p. 182-8, Jun 1 2012
- BROWN, G. C.; BAL-PRICE, A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. **Mol Neurobiol**, v. 27, n. 3, p. 325-55, Jun 2003
- BROWN, G. C.; NEHER, J. J. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. **Mol Neurobiol**, v. 41, n. 2-3, p. 242-7, Jun 2010
- BROWN, G. C.; VILALTA, A. How microglia kill neurons. **Brain Res**, v. 1628, n. Pt B, p. 288-297, Dec 2 2015
- BUCKLEY, N. J.; JOHNSON, R.; ZUCCATO, C.; BITHELL, A.; CATTANEO, E. The role of REST in transcriptional and epigenetic dysregulation in Huntington's disease. **Neurobiol Dis**, v. 39, n. 1, p. 28-39, Jul 2010

- BYRNES, K. R.; STOICA, B.; LOANE, D. J.; RICCIO, A.; DAVIS, M. I.; FADEN, A. I. Metabotropic glutamate receptor 5 activation inhibits microglial associated inflammation and neurotoxicity. **Glia**, v. 57, n. 5, p. 550-60, Apr 1 2009
- CARDONA, A. E. et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. **Nat Neurosci**, v. 9, n. 7, p. 917-24, Jul 2006
- CHEN, L. et al. The biomarkers of immune dysregulation and inflammation response in Parkinson disease. **Transl Neurodegener**, v. 5, n. 1, p. 16, 2016
- CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. **Neurosci Lett**, v. 58, n. 3, p. 293-7, Aug 5 1985
- Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **J Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 369-79, Feb 1987
- CHOI, D. W.; KOH, J. Y.; PETERS, S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. **J Neurosci**, v. 8, n. 1, p. 185-96, Jan 1988
- CHUNG, W. S.; WELSH, C. A.; BARRES, B. A.; STEVENS, B. Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? **Nat Neurosci**, v. 18, n. 11, p. 1539-1545, Nov 2015
- COYLE, J. T.; SCHWARCZ, R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. **Nature**, v. 263, n. 5574, p. 244-6, Sep 16 1976
- CROTTI, A. et al. Mutant Huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 4, p. 513-21, Apr 2014
- CROTTI, A.; GLASS, C. K. The choreography of neuroinflammation in Huntington's disease. **Trends Immunol**, v. 36, n. 6, p. 364-73, Jun 2015
- DAVIES, S. W. et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. **Cell**, v. 90, n. 3, p. 537-48, Aug 8 1997
- DAYALU, P.; ALBIN, R. L. Huntington disease: pathogenesis and treatment. **Neurol Clin**, v. 33, n. 1, p. 101-14, Feb 2015
- DE LA MONTE, S. M.; VONSATTEL, J. P.; RICHARDSON, E. P., JR. Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 47, n. 5, p. 516-25, Sep 1988
- DE MIRANDA, A. S. et al. A Neuroprotective Effect of the Glutamate Receptor Antagonist MK801 on Long-Term Cognitive and Behavioral Outcomes Secondary to Experimental Cerebral Malaria. **Mol Neurobiol**, Oct 28 2016

- DIFIGLIA, M. Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. **Trends Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 286-9, Jul 1990
- DORIA, J. G. et al. The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPBB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease. **Neurobiol Dis**, v. 73, p. 163-73, Jan 2015
- DORIA, J. G. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease. **Br J Pharmacol**, v. 169, n. 4, p. 909-21, Jun 2013
- DUYAO, M. et al. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. **Nat Genet**, v. 4, n. 4, p. 387-92, Aug 1993
- FISHER, E. R.; HAYDEN, M. R. Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: prevalence and population at risk. **Mov Disord**, v. 29, n. 1, p. 105-14, Jan 2014
- GASS, J. T.; OLIVE, M. F. Transcriptional profiling of the rat frontal cortex following administration of the mGlu5 receptor antagonists MPEP and MTEP. **Eur J Pharmacol**, v. 584, n. 2-3, p. 253-62, Apr 28 2008
- GINHOUX, F. et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 841-5, Nov 5 2010
- GINHOUX, F.; PRINZ, M. Origin of microglia: current concepts and past controversies. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 8, p. a020537, Jul 1 2015
- GRAY, M. et al. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. **J Neurosci**, v. 28, n. 24, p. 6182-95, Jun 11 2008
- GREENAMYRE, J. T.; PENNEY, J. B.; YOUNG, A. B.; D'AMATO, C. J.; HICKS, S. P.; SHOULSON, I. Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. **Science**, v. 227, n. 4693, p. 1496-9, Mar 22 1985
- GUSELLA, J. F. et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. **Nature**, v. 306, n. 5940, p. 234-8, Nov 17-23 1983
- HALASSA, M. M.; FELLIN, T.; TAKANO, H.; DONG, J. H.; HAYDON, P. G. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. **J Neurosci**, v. 27, n. 24, p. 6473-7, Jun 13 2007
- HODGES, A. et al. Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. **Hum Mol Genet**, v. 15, n. 6, p. 965-77, Mar 15 2006
- HSIAO, H. Y.; CHEN, Y. C.; CHEN, H. M.; TU, P. H.; CHERN, Y. A critical role of astrocyte-mediated nuclear factor-kappaB-dependent inflammation in Huntington's disease. **Hum Mol Genet**, v. 22, n. 9, p. 1826-42, May 1 2013

HUGHES, P. M.; BOTHAM, M. S.; FRENTZEL, S.; MIR, A.; PERRY, V. H. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. **Glia**, v. 37, n. 4, p. 314-27, Mar 15 2002

JANSEN, A. H. et al. Frequency of nuclear mutant huntingtin inclusion formation in neurons and glia is cell-type-specific. **Glia**, v. 65, n. 1, p. 50-61, Jan 2017

JHA, M. K. et al. Functional dissection of astrocyte-secreted proteins: Implications in brain health and diseases. **Prog Neurobiol**, Dec 13 2017

KEREN-SHAUL, H. et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. **Cell**, v. 169, n. 7, p. 1276-1290 e17, Jun 15 2017

KHAKH, B. S.; SOFRONIEW, M. V. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 7, p. 942-52, Jul 2015

KHOSHMAN, A.; KO, J.; WATKIN, E. E.; PAIGE, L. A.; REINHART, P. H.; PATTERSON, P. H. Activation of the I κ B kinase complex and nuclear factor- κ B contributes to mutant huntingtin neurotoxicity. **J Neurosci**, v. 24, n. 37, p. 7999-8008, Sep 15 2004

LAWSON, L. J.; PERRY, V. H.; DRI, P.; GORDON, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151-70, 1990

LIDDELOW, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 481-487, Jan 26 2017

LIN, C. H. et al. Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. **Hum Mol Genet**, v. 10, n. 2, p. 137-44, Jan 15 2001

LIU, F.; ZHOU, R.; YAN, H.; YIN, H.; WU, X.; TAN, Y.; LI, L. Metabotropic glutamate receptor 5 modulates calcium oscillation and innate immune response induced by lipopolysaccharide in microglial cell. **Neuroscience**, v. 281C, p. 24-34, Sep 22 2014

MACDONALD, M. E. et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell**, v. 72, n. 6, p. 971-983, 1993

MANGIARINI, L. et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. **Cell**, v. 87, n. 3, p. 493-506, Nov 1 1996

MANTOVANI, S.; GORDON, R.; LI, R.; CHRISTIE, D. C.; KUMAR, V.; WOODRUFF, T. M. Motor deficits associated with Huntington's disease occur in the absence of striatal degeneration in BACHD transgenic mice. **Hum Mol Genet**, v. 25, n. 9, p. 1780-91, May 1 2016

MAO, L.; YANG, L.; TANG, Q.; SAMDANI, S.; ZHANG, G.; WANG, J. Q. The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. **J Neurosci**, v. 25, n. 10, p. 2741-52, Mar 9 2005

MENALLED, L. et al. Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. **Neurobiol Dis**, v. 35, n. 3, p. 319-36, Sep 2009

MENALLED, L. B. Knock-in mouse models of Huntington's disease. **NeuroRx**, v. 2, n. 3, p. 465-70, Jul 2005

MENALLED, L. B.; CHESSELET, M. F. Mouse models of Huntington's disease. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 1, p. 32-9, Jan 2002

MYERS, R. H.; VONSATTEL, J. P.; PASKEVICH, P. A.; KIELY, D. K.; STEVENS, T. J.; CUPPLES, L. A.; RICHARDSON, E. P., JR.; BIRD, E. D. Decreased neuronal and increased oligodendroglial densities in Huntington's disease caudate nucleus. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 50, n. 6, p. 729-42, Nov 1991

NANCE M; PAULSEN JS; ROSENBLATT A; V., W. **A PHYSICIAN'S GUIDE TO THE MANAGEMENT OF HUNTINGTON DISEASE.** 2013.

NEGRETTE, A. Corea de Huntington: Estudio de Una Sola Familia a Traves de Varias Generaciones. 1955

NICODEMO, A. A.; PAMPILLO, M.; FERREIRA, L. T.; DALE, L. B.; CREGAN, T.; RIBEIRO, F. M.; FERGUSON, S. S. Pyk2 uncouples metabotropic glutamate receptor G protein signaling but facilitates ERK1/2 activation. **Mol Brain**, v. 3, p. 4, Jan 21 2010

PANATIER, A.; ROBITAILLE, R. Astrocytic mGluR5 and the tripartite synapse. **Neuroscience**, v. 323, p. 29-34, May 26 2016

PAOLICELLI, R. C.; BISHT, K.; TREMBLAY, M. E. Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 129, 2014

PAVESE, N.; GERHARD, A.; TAI, Y. F.; HO, A. K.; TURKHEIMER, F.; BARKER, R. A.; BROOKS, D. J.; PICCINI, P. Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. **Neurology**, v. 66, n. 11, p. 1638-43, Jun 13 2006

POLITIS, M. et al. Microglial activation in regions related to cognitive function predicts disease onset in Huntington's disease: a multimodal imaging study. **Hum Brain Mapp**, v. 32, n. 2, p. 258-70, Feb 2011

PRINGSHEIM, T.; WILTSHIRE, K.; DAY, L.; DYKEMAN, J.; STEEVES, T.; JETTE, N. The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. **Mov Disord**, v. 27, n. 9, p. 1083-91, Aug 2012

PRZEDBORSKI, S.; VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V. Neurodegeneration: what is it and where are we? **J Clin Invest**, v. 111, n. 1, p. 3-10, Jan 2003

RAMASWAMY, S.; MCBRIDE, J. L.; KORDOWER, J. H. Animal models of Huntington's disease. **ILAR J**, v. 48, n. 4, p. 356-73, 2007

RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 777-83, Aug 19 2016

RANSOHOFF, R. M.; CARDONA, A. E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 253-62, Nov 11 2010

RIBEIRO, F. M.; CAMARGOS, E. R.; DE SOUZA, L. C.; TEIXEIRA, A. L. Animal models of neurodegenerative diseases. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 35 Suppl 2, p. S82-91, 2013

RIBEIRO, F. M.; DEVRIES, R. A.; HAMILTON, A.; GUIMARAES, I. M.; CREGAN, S. P.; PIRES, R. G.; FERGUSON, S. S. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout promotes motor and biochemical alterations in a mouse model of Huntington's disease. **Hum Mol Genet**, v. 23, n. 8, p. 2030-42, Apr 15 2014

RIBEIRO, F. M.; HAMILTON, A.; DORIA, J. G.; GUIMARAES, I. M.; CREGAN, S. P.; FERGUSON, S. S. Metabotropic glutamate receptor 5 as a potential therapeutic target in Huntington's disease. **Expert Opin Ther Targets**, v. 18, n. 11, p. 1293-304, Nov 2014

RIBEIRO, F. M.; PAQUET, M.; FERREIRA, L. T.; CREGAN, T.; SWAN, P.; CREGAN, S. P.; FERGUSON, S. S. Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease. **J Neurosci**, v. 30, n. 1, p. 316-24, Jan 6 2010

RIBEIRO, F. M.; VIEIRA, L. B.; PIRES, R. G.; OLMO, R. P.; FERGUSON, S. S. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. **Pharmacol Res**, v. 115, p. 179-191, Jan 2017

ROBERTS, P. J. Glutamate receptors in the rat central nervous system. **Nature**, v. 252, n. 5482, p. 399-401, Nov 29 1974

ROCHA, N. P.; RIBEIRO, F. M.; FURR-STIMMING, E.; TEIXEIRA, A. L. Neuroimmunology of Huntington's Disease: Revisiting Evidence from Human Studies. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 8653132, 2016

ROMANO, C.; SESMA, M. A.; MCDONALD, C. T.; O'MALLEY, K.; VAN DEN POL, A. N.; OLNEY, J. W. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. **J Comp Neurol**, v. 355, n. 3, p. 455-69, May 8 1995

RONG, R. et al. PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis. **Nat Neurosci**, v. 6, n. 11, p. 1153-61, Nov 2003

ROSS, C. A.; TABRIZI, S. J. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. **Lancet Neurol**, v. 10, n. 1, p. 83-98, Jan 2011

SAPP, E. et al. Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 60, n. 2, p. 161-72, Feb 2001

SCHAFER, D. P. et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. **Neuron**, v. 74, n. 4, p. 691-705, May 24 2012

SCHIEFER, J.; SPRUNKEN, A.; PULS, C.; LUESSE, H. G.; MILKEREIT, A.; MILKEREIT, E.; JOHANN, V.; KOSINSKI, C. M. The metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP and the mGluR2 agonist LY379268 modify disease progression in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Brain Res**, v. 1019, n. 1-2, p. 246-54, Sep 3 2004

SCHWARZ, Y.; ZHAO, N.; KIRCHHOFF, F.; BRUNS, D. Astrocytes control synaptic strength by two distinct v-SNARE-dependent release pathways. **Nat Neurosci**, v. 20, n. 11, p. 1529-1539, Nov 2017

SEEBAHN, A.; STICHT, H.; ENZ, R. Expression, purification, and structural analysis of intracellular C-termini from metabotropic glutamate receptors. **Methods Enzymol**, v. 520, p. 257-79, 2013

SHERIDAN, G. K.; MURPHY, K. J. Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. **Open Biol**, v. 3, n. 12, p. 130181, Dec 18 2013

SHIGEMOTO, R.; NOMURA, S.; OHISHI, H.; SUGIHARA, H.; NAKANISHI, S.; MIZUNO, N. Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. **Neurosci Lett**, v. 163, n. 1, p. 53-7, Nov 26 1993

SHIN, J. Y.; FANG, Z. H.; YU, Z. X.; WANG, C. E.; LI, S. H.; LI, X. J. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. **Journal of Cell Biology**, v. 171, n. 6, p. 1001-1012, Dec 19 2005

SILVESTRONI, A.; FAULL, R. L.; STRAND, A. D.; MOLLER, T. Distinct neuroinflammatory profile in post-mortem human Huntington's disease. **Neuroreport**, v. 20, n. 12, p. 1098-103, Aug 5 2009

SIMMONS, D. A. et al. A small molecule p75NTR ligand normalizes signalling and reduces Huntington's disease phenotypes in R6/2 and BACHD mice. **Hum Mol Genet**, v. 25, n. 22, p. 4920-4938, Nov 15 2016

SIMMONS, D. A.; CASALE, M.; ALCON, B.; PHAM, N.; NARAYAN, N.; LYNCH, G. Ferritin accumulation in dystrophic microglia is an early event in the development of Huntington's disease. **Glia**, v. 55, n. 10, p. 1074-84, Aug 1 2007

SOLDATI, C.; BITHELL, A.; JOHNSTON, C.; WONG, K. Y.; STANTON, L. W.; BUCKLEY, N. J. Dysregulation of REST-regulated coding and non-coding RNAs in a

cellular model of Huntington's disease. **J Neurochem**, v. 124, n. 3, p. 418-30, Feb 2013

STANKOV, A.; BELAKAPOSKA-SRANOVA, V.; BITOLJANU, N.; CAKAR, L.; CAKAR, Z.; ROSOKLIJA, G. Visualisation of Microglia with the use of Immunohistochemical Double Staining Method for CD-68 and Iba-1 of Cerebral Tissue Samples in Cases of Brain Contusions. **Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)**, v. 36, n. 2, p. 141-5, 2015

TAI, Y. F.; PAVESE, N.; GERHARD, A.; TABRIZI, S. J.; BARKER, R. A.; BROOKS, D. J.; PICCINI, P. Imaging microglial activation in Huntington's disease. **Brain Res Bull**, v. 72, n. 2-3, p. 148-51, Apr 30 2007a

Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. **Brain**, v. 130, n. Pt 7, p. 1759-66, Jul 2007b

TAIPA, R. et al. Inflammatory pathology markers (activated microglia and reactive astrocytes) in early and late onset Alzheimer disease: a post mortem study. **Neuropathol Appl Neurobiol**, Oct 17 2017

TANG, T. S.; TU, H.; CHAN, E. Y.; MAXIMOV, A.; WANG, Z.; WELLINGTON, C. L.; HAYDEN, M. R.; BEZPROZVANNY, I. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. **Neuron**, v. 39, n. 2, p. 227-39, Jul 17 2003

VONSATTEL, J. P.; MYERS, R. H.; STEVENS, T. J.; FERRANTE, R. J.; BIRD, E. D.; RICHARDSON, E. P., JR. Neuropathological classification of Huntington's disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 44, n. 6, p. 559-77, Nov 1985

WALDVOGEL, H. J.; KIM, E. H.; TIPPETT, L. J.; VONSATTEL, J. P.; FAULL, R. L. The Neuropathology of Huntington's Disease. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 22, p. 33-80, 2015

WALKER, F. O. Huntington's disease. **Lancet**, v. 369, n. 9557, p. 218-28, Jan 20 2007

WANG, X. et al. Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. **Nat Neurosci**, v. 9, n. 6, p. 816-23, Jun 2006

WEXLER, N. S. et al. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 10, p. 3498-503, Mar 9 2004

WILLARD, S. S.; KOOCHEKPOUR, S. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. **Int J Biol Sci**, v. 9, n. 9, p. 948-59, 2013

ZEINEH, M. M.; CHEN, Y.; KITZLER, H. H.; HAMMOND, R.; VOGEL, H.; RUTT, B. K. Activated iron-containing microglia in the human hippocampus identified by magnetic resonance imaging in Alzheimer disease. **Neurobiol Aging**, v. 36, n. 9, p. 2483-500, Sep 2015

ZHAO, X. et al. TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. **J Neurosci Res**, v. 64, n. 2, p. 121-31, Apr 15 2001

ZUCCATO, C. et al. Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. **J Neurosci**, v. 27, n. 26, p. 6972-83, Jun 27 2007

ZUCCATO, C. et al. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. **Nat Genet**, v. 35, n. 1, p. 76-83, Sep 2003