



Dissertação de mestrado

Juliana Guimarães Dória

Efeito neuroprotetor dos moduladores alostéricos positivos
do receptor metabotrópico de glutamato 5 na Doença de
Huntington

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Programa de Pós-Graduação em Neurociências
Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
Belo Horizonte/MG, 01 de agosto de 2013

Dissertação de mestrado

Juliana Guimarães Dória

Efeito neuroprotetor dos moduladores alostéricos positivos do receptor metabotrópico de glutamato 5 na Doença de Huntington

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Neurociências, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiola M. Ribeiro

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Programa de Pós-Graduação em Neurociências
Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
Belo Horizonte/MG, 01 de agosto de 2013

Dória, Juliana Guimarães.

Efeito neuroprotetor dos moduladores alostéricos positivos do receptor metabotrópico de glutamato 5 na doença de Huntington [manuscrito] / Juliana Guimarães Dória. – 2013.

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

Orientadora: Fabiola M. Ribeiro.

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

1. Huntington, Doença de – Teses. 2. Receptor metabotrópico de glutamato 5.
3. Enzimas alostéricas – Teses. 4. Regulação alostérica– Teses. 5. Neurociências –

COLABORADORES

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

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

Ministério da Educação da República Eslovaca

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus adorados pais, Zuleine e Cícero pelo amor incondicional, apoio e exemplo e ao meu amado esposo Daniel por seu amor e companhia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha querida orientadora profa. Fabiola por ter me aceitado em seu laboratório, por me ensinar e orientar com tanta paciência. Você viabilizou este trabalho e a realização deste sonho. Obrigada!

Agradeço a todas as IC's, a Jéssica pela companhia e amizade sincera, e especialmente a Ton Ton por ter dividido comigo horas e mais horas de experimentos comportamentais.

Agradeço a Flávia e a Isabella pelo carinho, amizade e companhia.

A Leidiane pela amizade, horas de conversa e cuidados com os animais.

Agradeço a todos do Lab. RNAi, Kátia, Zamira, Roenick, Romina, Érick, André, Isaque, Manu, Flavinha, Ana Paula e ao professor João Trindade pela companhia todos os dias e pelas muitas horas de excelente convivência.

Obrigada a profa. Grace pelo apoio com os experimentos comportamentais, principalmente por nos ceder espaço em seu laboratório.

Agradeço ao Vinícius, Luciana e a Cristiane pela ajuda com os muitos protocolos comportamentais.

Obrigada a profa. Luciene pelo carinho, paciência em assistir meus seminários e por seus conselhos muito úteis.

Por fim, agradeço e dedico este trabalho a minha amada vovó Nenza (*in memorian*), que partiu e nos deixou seu exemplo de amor incondicional e dedicação ao próximo.

“O cientista não estuda a natureza porque ela é útil; ele a estuda porque se deleita nela, e se deleita nela porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena ser conhecida, e se não valesse a pena ser conhecida, a vida não valeria a pena ser vivida.”

Henry Poincaré

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparativo cérebro de indivíduos com DH e indivíduos que não apresentam a doença.

Figura 4: Genotipagem de camundongos BACHD.

Figura 5: Princípio do ensaio de teste de viabilidade celular.

Figura 6: Teste de reconhecimento de objeto.

Figura 7: Fluorescência emitida pela marcação com NeuN e DAPI.

Figura 8: Fluorescência emitida pela marcação com anti-GAT1.

Figura 9: A marcação do anticorpo anti-GAT1 é específica.

Figura 10: Morte neuronal por insulto de glutamato.

Figura 11: DHPG, mas não MPEP, protege os neurônios da morte induzida por glutamato.

Figura 12: Os veículos de diluição das drogas não causam morte neuronal.

Figura 13: Os MAPs do mGluR5 protegem os neurônios em cultura primária da morte neuronal induzida por glutamato.

Figura 14: Os MAPs do mGluR5 protegem os neurônios BACHD em cultura primária da morte neuronal induzida por glutamato.

Figura 15: O MAP VU1545 é um potente neuroprotetor e possui baixa toxicidade.

Figura 16: VU1545 protege contra a morte induzida por NMDA.

Figura 17: A proteção neuronal pelo VU1545 é via mGluR5.

Figura 18: A proteção neuronal pelo VU1545 é dependente da fosforilação de AKT

Figura 19: O VU1545 é mais eficaz em promover neuroproteção que a memantina

Figura 20: Camundongos BACHD submetidos ao teste Rota-rod.

Figura 21. Tempo médio para subir no teste de escalada Rearing-Climbing em função do genótipo e idade.

Figura 22. VU1545 não reverte a atividade locomotora induzida por MK-801

Figura 23. O CDPPB melhora o desempenho de camundongos BACHD no teste de reconhecimento de objetos

Tabela 1: Mix para PCR

Tabela 2: Programa do Termociclador

Tabela 3: Eletroforese: Gel de agarose 2%

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg: nanogramas

µL: microlitros

µM: Micromolar

ADX47273):(4-fluorophenyl)(3-(3-(4-fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-1-yl)methanone

AMPA: Ácido aminopropiônico

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

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

CPPHA: N-[4-Chloro-2-[(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl]phenyl]-2-hydroxybenzamide

DA: Doença de Alzheimer

DAG: diacilglicerol

DFB: 3,3- Difluorobenzaldazina

DH: Doença de Huntington

DHPG: [(S)3,5 Dihidroxifenilglicina]

DP: Doença de Parkinson

ERK: Quinase regulada por sinais extracelulares

GPCR: Proteína G acoplada ao receptor metabotrópico

GTP: guanosina trifosfato

Gα: Subunidade alfa da proteína G

HBSS: Solução Salina Tamponada com HEPES

Htt: Proteína Huntingtina

i.p. (intraperitoneal)

IP3: Inositol tri-fosfato

M: molar

MAN: Modulador alostérico negativo

MAP: Modulador alostérico positivo

mGluR: Receptor metabotrópico glutamatérgico

mM: milimolar

MPEP: 2-metil-6(feniletinil) piridina

nm: nanômetro

NMDA: N-metil d-aspartato

NMDAR: Receptor N-metil d-aspartado

pb: pares de base

PI: fosfatidilinositol

PI3K: Fosfatidilinositol-3-kinase

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC: Proteína quinase C

PLC: Fosfolipase C

RE: retículo endoplasmático

SNC: Sistema Nervoso Central

v/v: Volume por volume

VU1545: 4-nitro-N-(1-(2-fluorofenil)3-fenil-1H pirazol-5-il) benzamida

Sumário

INTRODUÇÃO	16
1.1 Doença de Huntington	16
1.2 Glutamato e doença de Huntington	17
1.3 Excitotoxicidade e neurodegeneração	20
1.4 Drogas com ação no mGluR5.....	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Material.....	27
3.2 Métodos.....	29
3.2.1 Modelo de camundongo	29
3.2.2 Cultura primária de neurônios	30
3.2.3 Genotipagem.....	30
3.2.4 Imunofluorescência	33
3.2.5 Ensaio de morte celular	34
3.2.6 Campo aberto.....	36
3.2.7 Reconhecimento de objeto	36
3.2.8 Rota Rod.....	38
3.2.9 Rearing-Climbing	38
3.2.10 Análise estatística	38
4. RESULTADOS	40
4.1 Caracterização da cultura primária	40
4.2 Efeito de diferentes concentrações de glutamato na morte neuronal	42
4.3 DHPG, mas não o MPEP, protege os neurônios da morte induzida por glutamato	43
4.4 Efeito dos veículos de diluição das drogas sobre a morte neuronal	45
4.5 Capacidade dos moduladores alostéricos nas concentrações de 100 nM e 10 µM em prevenir a morte de neurônios estriatais em cultura primária.....	46

4.6 Capacidade dos moduladores alostéricos a 1 μ M em prevenir a morte de neurônios BACHD	48
4.7 Curva dose-resposta do MAP VU1545	49
4.8 Efeito neuroprotetor do VU1545 contra a morte neuronal induzida por NMDA... 50	
4.9 Bloqueio da proteção neuronal pelo VU1545 por MPEP	52
4.10 A neuroproteção promovida por VU1545 é dependente da ativação de AKT ... 53	
4.11 Potencial neuroprotetor da memantina versus VU1545.....	54
4.12 Desempenho motor dos camundongos BACHD no Rota-rod.....	55
4.13 Desempenho motor dos camundongos BACHD no Rearing-Climbing.....	56
4.14 Efeito do VU1545 <i>in vivo</i>	58
4.15 Efeito do tratamento subcrônico com CDPPB em camundongos BACHD	59
5. DISCUSSÃO	62
6. PERSPECTIVAS.....	67
REFERÊNCIAS	69
Anexos	75

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder, progressive and hereditary, that evolves inevitably to death. Stimulation of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5), which is coupled to $G_{\alpha q}$, promotes increased levels of IP3 and intracellular Ca^{2+} , which can cause excitotoxicity. However, activation of this receptor is also able to promote the activation of neuroprotective pathways, including AKT and ERK, making this a good object of study. Recent data demonstrate that mGluR5 positive allosteric modulators (PAMs) may favor the activation of certain signaling pathways over others. The results obtained by our study demonstrate that the mGluR5 PAMs, DFB, CDPBP and VU1545, are able to protect primary cultured striatal neurons from cell death induced by glutamate insult. *In vivo* experiments using a transgenic mouse model of HD (BACHD) indicate that these animals exhibit HD-related symptoms, including impaired motor and cognitive functions. Moreover, CDPBP sub-chronic administration was effective to ameliorate this cognitive impairment.

Keywords: Huntington's Disease, mGluR5, allosteric modulators, BACHD

RESUMO

A doença de Huntington (DH) é uma desordem neurodegenerativa, hereditária e progressiva que evolui inevitavelmente para a morte. A estimulação do receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5), que é acoplado à proteína $G_{\alpha q}$, estimula a produção de IP3 e o aumento de Ca^{2+} intracelular, o que pode contribuir para a excitotoxicidade. No entanto, a ativação desse receptor também é capaz de promover a ativação de vias neuroprotetoras, incluindo a via da AKT e ERK, tornando este um bom objeto de estudo. Dados recentes demonstram que moduladores alostéricos positivos do mGluR5 (MAPs) podem privilegiar a ativação de determinadas vias de sinalização em detrimento a outras. Os resultados obtidos por nosso estudo demonstraram que os MAPs do mGluR5, DFB, CDPPB e VU1545, são capazes de proteger os neurônios estriatais em cultura primária da morte celular induzida por insulto de glutamato. Experimentos *in vivo* com um camundongo transgênico modelo da DH (BACHD) indicam que estes animais apresentam sintomas característicos da DH, incluindo comprometimento motor e cognitivo. Além disso, a administração sub-crônica de CDPPB a esses animais mostrou-se eficaz em amenizar o comprometimento cognitivo.

Palavras chave: Doença de Huntington, mGluR5, moduladores alostéricos, BACHD

INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Huntington

A Doença de Huntington (DH) é uma desordem neurodegenerativa, autossômica dominante, caracterizada pela tríade de sintomas: movimentos involuntários do corpo, distúrbios psiquiátricos e demência (Dowie *et al.*, 2010). Os sintomas se manifestam tipicamente na meia vida do indivíduo, evoluem por cerca de 10 a 15 anos, culminando inevitavelmente na morte do paciente. A DH é causada pela expansão instável de repetições CAG no éxon 1 do gene referente à proteína huntingtina (htt), localizado no cromossomo 4p16 (Gusella *et al.*, 1983; Anborgh *et al.*, 2005; Jin e Johnson, 2010; Ribeiro *et al.*, 2010; The The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993) . Tal mutação resulta em uma expansão anormal de uma cauda de poliglutamina na porção amino-terminal da proteína htt (Faideau *et al.*, 2010). Neuropatologicamente, a DH é caracterizada pela perda progressiva de células neuronais dos núcleos putâmen e caudado e de regiões neocorticais do cérebro (Young, 2003; Li e Li, 2004; Faideau *et al.*, 2010) havendo uma diminuição global do volume cerebral (**FIG. 1**) (Ho *et al.*, 2003).

Não existem dados concretos que permitam definir a prevalência da DH no Brasil, mas estima-se que nos Estados Unidos a prevalência seja de 5 a 10 casos por 100.000 habitantes e a taxa de indivíduos com novas mutações é de 1% a 3% (Hersch e Rosas, 2008).

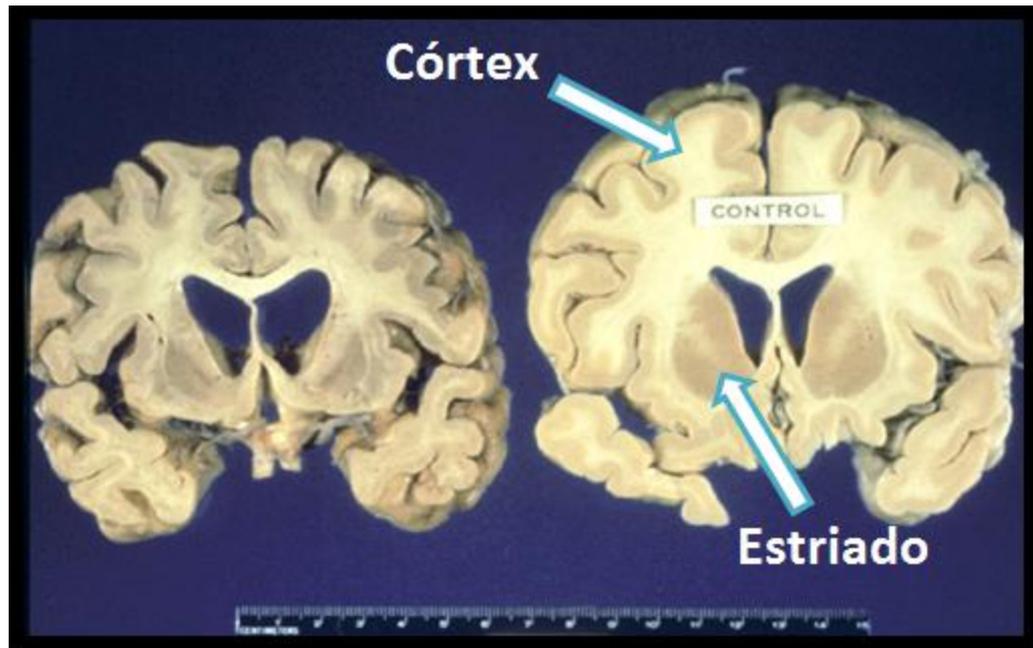


Figura 1. Comparativo cérebro de indivíduos com DH e indivíduos que não apresentam a doença. A figura mostra a redução do volume dos núcleos putâmen e caudado e de regiões neocorticais do cérebro com DH. Ao lado o cérebro de um indivíduo que não apresenta a DH.

1.2 Glutamato e doença de Huntington

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do cérebro, desempenha importante papel na plasticidade sináptica, aprendizado, memória e outras funções cognitivas (Mehta *et al.*, 2013). Existem dois tipos de receptores de glutamato: os ionotrópicos e os metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos, receptor de NMDA (NMDAR) e de AMPA-Kainato, são canais iônicos, localizados principalmente no terminal pós-sináptico, que se abrem com a ligação do glutamato, permitindo o fluxo dos íons Ca^{2+} e Na^{+} diretamente para o interior das células, mediando respostas neurotransmissoras rápidas (Masu *et al.*, 1991). Os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) são acoplados à proteína G (O'Brien

et al., 2003). O glutamato tem ação excitatória quando estimula receptores ionotrópicos, no entanto, com relação aos receptores metabotrópicos, sua ação é modulatória, podendo ser tanto excitatória quanto inibitória (Masu *et al.*, 1991). Os oito receptores metabotrópicos de glutamato são subdivididos em três subgrupos (I, II e III), que se diferenciam entre si por sua sequência, farmacologia e mecanismo de transmissão de sinais (O'brien *et al.*, 2003; Anborgh *et al.*, 2005; Conn *et al.*, 2005).

Os mGluRs do grupo I (mGluR1 e 5) são acoplados à proteína G α_q , promovendo ativação da fosfolipase C (PLC). Os grupos II (mGluR2 e 3) e III (mGluR4, 6, 7 e 8) são acoplados à proteína G α_i e associados a uma diminuição da produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), sendo localizados principalmente na região pré-sináptica, onde regulam a liberação de neurotransmissores, tais como o glutamato. Estes dois últimos grupos são distintos por sua farmacologia (Conn e Pin, 1997; O'brien *et al.*, 2003). Todos os subtipos dos mGluRs possuem um grande domínio amino-terminal, onde está presente o local de ligação do agonista, o glutamato (O'hara *et al.*, 1993; Conn e Pin, 1997; Bockaert e Pin, 1999; O'brien *et al.*, 2003).

Os mGluRs do grupo I estão localizados principalmente na região pós-sináptica, e sua ativação é acoplada à via do mensageiro fosfatidilinositol (PI). Nesta via, a ligação do agonista ao seu receptor de membrana promove a ativação da proteína G α_q . Uma vez ativada, ligada a guanosina trifosfato (GTP) a subunidade α se desacopla das subunidades $\beta\gamma$, ativando a PLC que catalisa a hidrólise do lipídeo de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). A

DAG permanece na membrana plasmática e atua no recrutamento de uma proteína quinase C (PKC) dependente de Ca^{2+} . O IP_3 , hidrossolúvel, se difunde pelo citoplasma e se associa a receptores presentes na membrana do retículo endoplasmático (RE). A ativação destes receptores de IP_3 leva à liberação de Ca^{2+} presentes no RE para o citoplasma, onde esse íon participa da ativação da PKC e de várias outras proteínas (Masu *et al.*, 1991; Ritzen *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2010). A estimulação dos receptores mGluR1/5 também leva à estimulação de outras vias de sinalização importantes para a proliferação e sobrevivência celular, tais como a ativação das proteínas quinase B (AKT) e proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) (**FIG. 2**) (Masu *et al.*, 1991; O'brien *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2005; Ritzen *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010). As proteínas AKT e ERK podem ser ativadas por meio da proteína Homer. A ativação do mGluR5 promove a formação de um complexo Homer/PIKE, que ativa a fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K) que, por sua vez, fosforila a proteína AKT (Guhan e Lu, 2004; Mao *et al.*, 2005).

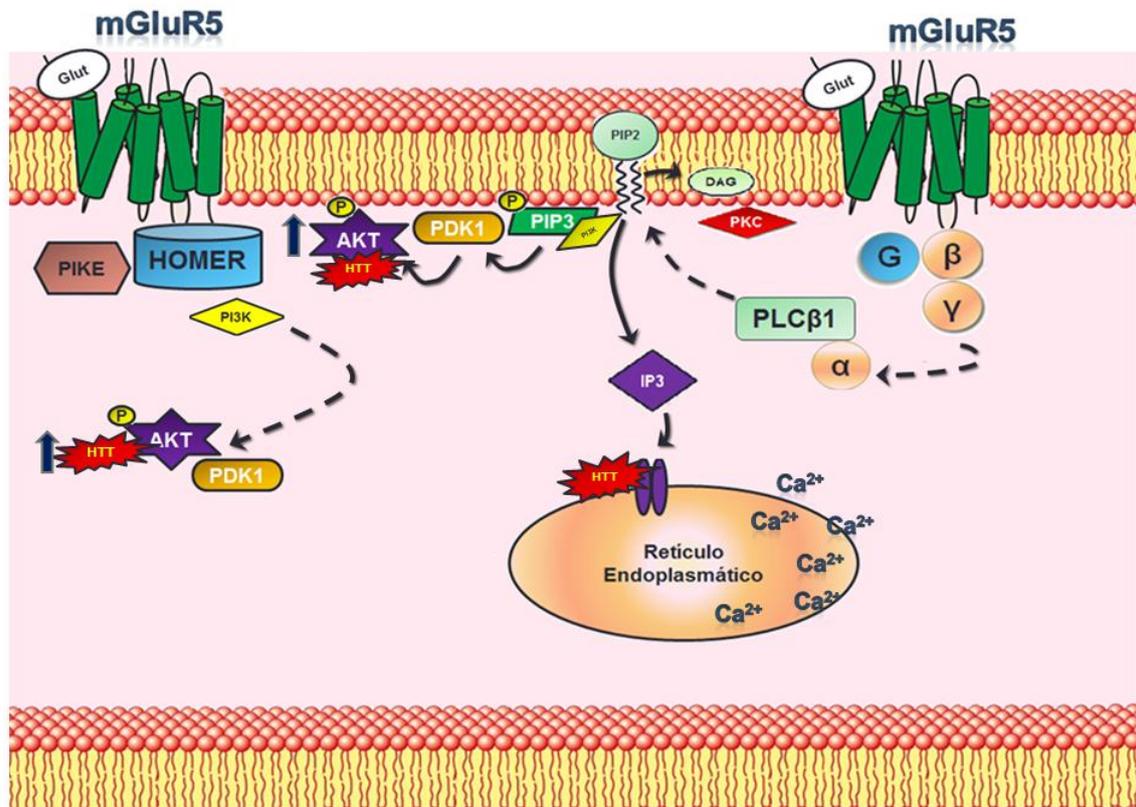


Figura 2: Sinalização celular via mGluR5. A ligação do glutamato ao seu receptor promove a ativação da proteína G α_q , ativando fosfolipase C (PLC). A PLC catalisa a hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). A DAG permanece na membrana plasmática e recruta a proteína quinase C (PKC). O inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) hidrossolúvel, se difunde pelo citoplasma e se associa a receptores de IP₃ presentes na membrana do retículo endoplasmático (RE). Ao lado, a fosforilação da proteína quinase B (AKT) ocorre pela interação do mGluR5 com a proteína HOMER.

1.3 Excitotoxicidade e neurodegeneração

Excitotoxicidade é o processo pelo qual aminoácidos excitatórios promovem neurodegeneração, constituindo na principal causa de morte celular em muitas doenças agudas do sistema nervoso central (SNC), incluindo acidente vascular cerebral, traumatismo e epilepsia, e ocorrendo também em

doenças crônicas, como a esclerose amiotrófica lateral, doença de Parkinson (DP), doença de Alzheimer (DA) e DH. A liberação excessiva e recaptção ineficiente de neurotransmissores excitatórios promovem hiperatividade de seus receptores e, eventualmente, a morte neuronal (Aarts e Tymianski, 2004; Nicholls, 2004).

Em condições fisiológicas, o glutamato liberado a partir de terminais pré-sinápticos atua sob receptores pós-sinápticos e promove despolarização, o que leva à liberação de Mg^{2+} a partir dos NDMAR, permitindo a passagem de Ca^{2+} através deste canal. Os receptores AMPA são comumente co-expressos com o NMDAR nas sinapses, onde em conjunto, contribuem para o processo de plasticidade sináptica, que está envolvida nos processos de aprendizado e memória (Mehta *et al.*, 2013).

Diversos estudos sugerem que níveis elevados de Ca^{2+} estão relacionados com a morte celular de neurônios do corpo estriado na DH (Zhang *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2010). Existem pelo menos três mecanismos diferentes que explicam o aumento do Ca^{2+} intracelular na DH: 1) a proteína htt mutante causa uma sensibilização do receptor de NMDA, resultando em um aumento do Ca^{2+} intracelular nos neurônios (Chen *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008) 2) a htt desestabiliza a regulação mitocondrial de Ca^{2+} (Panov *et al.*, 2002; Choo *et al.*, 2004); 3) a htt sensibiliza o receptor de IP_3 , o que resulta em uma maior liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (Tang *et al.*, 2005).

Os receptores mGluR5 são expressos em grande quantidade nas células do corpo estriado, e sua sinalização celular é alterada em camundongos modelo da DH *Hdh*^{Q111/Q111} (camundongos com expansão de

111 glutaminas na região amino-terminal) quando comparados com camundongos controle *Hdh*^{Q20/Q20} (Ribeiro *et al.*, 2010). Em camundongos *Hdh*^{Q111/Q111}, a htt mutante leva a uma dessensibilização dos receptores mGluR5, o que resulta em uma menor formação de IP₃ e curiosamente em um aumento da liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares (Ribeiro *et al.*, 2010).

Por outro lado, a ativação das vias protetoras da morte neuronal, envolvendo AKT e ERK1/2, pelo mGluR5 ocorre de maneira mais pronunciada em camundongos *Hdh*^{Q111/Q111} jovens, quando comparados a camundongos controle *Hdh*^{Q20/Q20}, indicando uma resposta adaptativa dos neurônios *Hdh*^{Q111/Q111}, bem como o papel neuroprotetor do mGluR5 na DH (Ribeiro *et al.*, 2010).

A presença da proteína htt mutada nas células desencadeia uma série complexa e pouco compreendida de eventos bioquímicos deletérios que, de forma progressiva, pode ocasionar o estresse neuronal, resultando em disfunção fisiológica e neurodegeneração. Uma hipótese é que os neurônios estriatais expressam principalmente os subtipos NR1A/NR2B do NMDAR (Calabresi *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2005), e que a htt mutante aumenta seletivamente a atividade destes canais quando comparado com os outros subtipos de NMDAR (Tang, 2003).

Na presença da htt mutada, a estimulação de NMDARs com subunidades NR1A/NR2B promovem alto influxo de Ca²⁺ que, em excesso no citosol é transportado para a mitocôndria. Com o tempo, a capacidade de armazenamento de Ca²⁺ pela mitocôndria é excedida, levando à liberação de citocromo-c para o citosol e ativação de caspases que participam da via

intrínseca de apoptose (Calabresi *et al.*, 1999; Tang, 2003; Tang *et al.*, 2005). Isto sugere que a neurodegeneração tardia que ocorre nos neurônios estriatais na DH possa ser pelo menos em parte resultado da perda da capacidade de armazenamento de Ca^{2+} mitocondrial (**FIG. 3**) (Tang *et al.*, 2005).

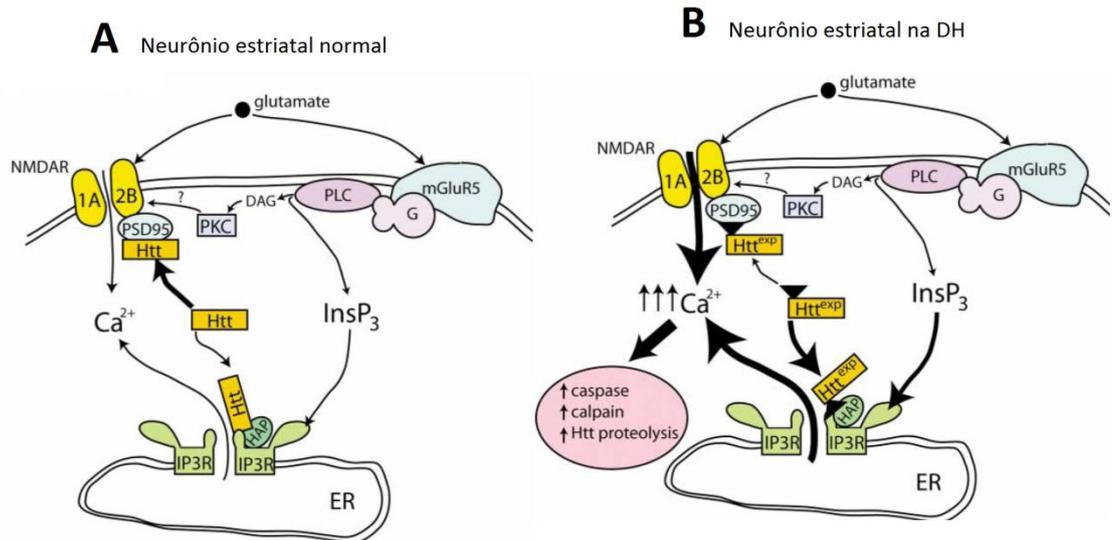


Figura 3. Sinalização celular em neurônio estriatal normal e na DH. O glutamato liberado estimula os receptores NMDA (NMDAR) com subunidades NR1A/NR2B e mGluR5 em neurônios estriatais. **(A)** Em neurônios normais, a ativação NMDAR promove influxo de Ca^{2+} e ativação do mGluR5. A ativação do mGluR5 estimula a fosfolipase C (PLC), através da proteína G formando diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). A ativação do mGluR5 coopera com a ativação de NMDAR em grande parte através da DAG, que ativa a proteína quinase c (PKC). O IP_3 promove liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (ER). **(B)** A proteína huntingtina (htt) mutante desestabiliza a sinalização de Ca^{2+} através de dois mecanismos: aumento da resposta dos NMDAR, provavelmente pela diminuição a interação com o complexo PSD95-NR1A/NR2B e sensibilização dos receptores de IP_3 (IP3R). O resultado é aumento intracelular de Ca^{2+} , de caspase e calpaína e ativação da via de apoptose.

1.4 Drogas com ação no mGluR5

Muitos dos agonistas e antagonistas utilizados no estudo da função dos mGluRs foram desenvolvidos como análogos do glutamato e agem por meio da

ligação ao sítio ortostérico do ligante endógeno (glutamato) ou perto dele, no domínio amino-terminal (O'brien *et al.*, 2003).

Os moduladores alostéricos são substâncias que se ligam a um determinado receptor em uma região diferente daquela em que se liga o agonista endógeno (sítio ortotestérico), e somente possuem atividade na presença do ligante endógeno ou ortostérico, como o glutamato. O 2-metil-6(feniletinil) piridina (MPEP), modulador alostérico negativo (MAN) seletivo do mGluR5, foi um dos primeiros compostos com ação antagonista para o mGluR5. Ele atua estabilizando a conformação do receptor na forma inativa, reduzindo a capacidade de o glutamato formar IP₃, sem, entretanto, afetar a afinidade entre o glutamato e seu receptor (Lea e Faden, 2006). Ao contrário dos ligantes endógenos, os moduladores alostéricos positivos (MAPs) não requerem a presença de aminoácidos em sua estrutura. Estes aminoácidos são polares e carregados, necessitando serem transportados ativamente através da barreira hemato-encefálica (Ritzen *et al.*, 2005). Os MAPs são relativamente lipofílicos e não carregados, o que facilita a sua passagem através da barreira hemato-encefálica por meio de difusão passiva (Ritzen *et al.*, 2005). Estas características dos MAPs permitem o estudo de seu efeito sistêmico, por meio de administração subcutânea ou intraperitoneal.

Os MAPs do mGluR5, tais como 3,3-Difluorobenzaldazina (DFB) (O'brien *et al.*, 2003), N-[4-Chloro-2-[(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl]phenyl]-2-hydroxybenzamide (CPPHA) (O'brien *et al.*, 2004), 3-ciano-N-(1,3difetil-1H-pirazol-5-il)benzamida (CDPPB) (Lindsley *et al.*, 2004), 4-nitro-N-(1-(2-fluorofenil)3-fenil-1Hpirazol-5-il) benzamida (VU1545), (4-fluorofenil)(3-(3-(4-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)piperidin-1-yl)methanone

(ADX47273) (De Paulis *et al.*, 2006), podem privilegiar a ativação de uma via de sinalização em detrimento a outra (Chen *et al.*, 2008). Dados da literatura sugerem que DFB e CPPHA, na ausência de agonista, são capazes de promover a ativação de ERK1/2 em astrócitos (Zhang *et al.*, 2005). Além disso, também já foi demonstrado que MAPs do mGluR5 são capazes de proteger contra injúria neuronal traumática em um mecanismo envolvendo ERK1/2 (Chen *et al.*, 2012). MAPs do mGluR5, por atravessarem a barreira hematoencefálica, podem ser usados para estudos *in vivo* e apresentam um grande potencial para tratar pacientes com a DH (Ritzen *et al.*, 2005)

Kinney e colaboradores (2005) descreveram pela primeira vez o uso do CDPPB como MAP do mGluR5. O desenvolvimento desta droga decorreu da necessidade de se obter uma substância que apresentasse efeito *in vivo*, uma vez que seu antecessor, o CPPHA, não possui tal efeito (Kinney *et al.*, 2005). A ligação do CDPPB ao receptor não altera a afinidade da ligação entre o mGluR5 e seu agonista, sendo assim, os efeitos modulatórios do CDPPB podem ser estudados sem que a ligação do agonista pelo receptor seja alterada.

Tendo em vista que a morte neuronal é o gatilho patológico da Doença de Huntington e que os MAPs do mGluR5 apresentam potencial efeito neuroprotetor, torna-se importante a investigação mais aprofundada acerca dos efeitos dos MAPs sobre modelos da DH.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Selecionar moduladores alostéricos positivos para o mGluR5 que sejam capazes de prevenir a morte neuronal induzida pelo insulto de glutamato;

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os tipos celulares presentes na cultura primária estriatal;
- Avaliar a capacidade dos MAPs do mGluR5 (CDPPB, DFB e VU1545) em proteger os neurônios contra a morte induzida por glutamato;
- Estudar os mecanismos envolvidos na neuroproteção promovida pelos MAPs do mGluR5
- Comparar o desempenho motor e cognitivo dos camundongos BACHD e WT;
- Verificar a ação *in vivo* do CDPPB;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich)

Agarose (HEXAPUR)

Alexa Fluor 488

Alexa Fluor 633

Anticorpo monoclonal anti-núcleo neuronal – NeuN

Anticorpo monoclonal anti-núcleo neuronal – NeuN

Anticorpo primário anti transportador vesicular de GABA – VGAT (Merck Millipore Billerica, MA, USA).

Anticorpo secundário de cabra anti camundongo - Alexa Fluor 633

Anticorpo secundário de cabra anti coelho - Alexa Fluor 488

B27 (Invitrogen)

Betaína Solution (Sigma)

BSA (Sigma Aldrich)

CDPPB (Tocris Cookson Inc. Ellisville, MO, USA)

DAPI

DFB (Tocris Cookson Inc. Ellisville, MO, USA)

DHPG (Tocris Cookson Inc. Ellisville, MO, USA)

DMSO (Sigma Aldrich)

dNTP (Invitrogen)

EDTA

Eppendorff 0,2; 0,6 e 1mL (Eppendorff)

Estreptomicina (Invitrogen)

GlutaMAX (50.0 mg·mL⁻¹ penicillin and 50.0 mg·mL⁻¹ streptomycin)

H₂O

Isopropanol

Lamínula 12mm (Pró cito Laboratórios)

Live/dead viability (Life Technologies, Foster City, CA, USA).

Live/dead viability (Life Technologies, Foster City, CA, USA).

LY294002 (Sigma-Aldrich. St Louis, MO, USA).

Meio Neurobasal

MgSO₄ (Sigma Aldrich)

MPEP (Tocris Cookson Inc. Ellisville, MO, USA).

MPEP (Tocris Cookson Inc. Ellisville, MO, USA).

N₂ (Invitrogen)

NaCl (Sigma Aldrich)

Paraformaldeído (Sigma Aldrich)

PBS

Penicilina (Invitrogen)

Pipeta Pasteur

Placa 4 wells Nunc

Poli-L-ornitina (Invitrogen)

Poli-L-ornitina (Invitrogen)

Ponteiras 10 µL (Eppendorff)

Ponteiras 1000 µL (Eppendorff)

Ponteiras 200 µL (Eppendorff)

Primer actina

Primer htt

Proteinase K (Sigma Aldrich)

SDS (HEXAPUR/ Sigma)

Sybr Safe

Taq

TRIS (Sigma Aldrich)

Tris HCl

Tris-EDTA

Triton X100 (Sigma Aldrich)

VU1545 (Tocris Cookson Inc. Ellisville, MO, USA)

3.2 Métodos

3.2.1 Modelo de camundongo

O trabalho foi realizado com camundongos das linhagens C57, SWISS e modelos transgênicos 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 CETEA-UFMG (Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFMG), parecer nº 03/2011 **(Anexo 1)**.

Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando os embriões de camundongos E15 (embriões com idade de 15 dias de gestação) dos

camundongos C57 e FVB/N. Os experimentos comportamentais foram realizados utilizando camundongos machos, da linhagem FVB (WT e BACHD) com 2 a 24 semanas de idade.

3.2.2 Cultura primária de neurônios

As culturas neuronais foram preparadas a partir da região estriatal do cérebro de embriões E15. Após a dissecação, o tecido estriatal 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, 2.0 mM de GlutaMAX, 50.0 µg/ml penicilina, e 50.0 µg/ml estreptomicina e em seguida plaqueadas em placas de 4 poços previamente preparadas com poli-L-ornitina. 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.

3.2.3 Genotipagem

- **Extração do 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 16.000g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novos eppendorfs contendo 500µL de isopropanol. A seguir, foi realizada a

homogeneização (10x) e uma nova etapa de centrifugação a 16.000g por 10 minutos em 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 deixado no banho-maria a 37°C por no mínimo 1 hora. As amostras de DNA foram armazenadas a 4°C

- **Amplificação do DNA**

A amplificação do gene *htt*, cujo amplicom é de aproximadamente 650 pb, e da actina utilizada como controle da qualidade da extração do DNA (amplicom de aproximadamente 122 pb) foi realizada segundo o protocolo apresentado na **tabela 1 e 2**:

Tabela 1: Mix para PCR

Reagentes	1x
H ₂ O de injeção	5,813 µL
Primer 1+2	1,20 µL
Buffer 10x	1,31 µL
dNTP	1,04 µL
DMSO	0,60 µL
Betaína (5M)	0,60 µL
β – Mercapto (1:1000)	0,917 µL
Taq	0,12 µL
DNA- <i>amostra</i>	0,75 µL
Total	12,35 µL

Total do mix por tubo: 11,60 µL

- **Primer *htt*:**

- Forward: CCG CTC AGG TTC TGC TTT TA
- Reverse: TGG TCG GTG CAG CGG CTC CTC

- **Primer actina:**
 - Forward: TGG AAT CGT GTG GCA TCC ATC A
 - Reverse: AAT GCC TGG GTA CAT GGT GGT A

Tabela 2: Programa do Termociclador

Fase do PCR	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Número de ciclos
Temperatura inicial	94°C	5'	1
Desnaturação	94°C	20''	25
Anelamento	57°C	20''	
Extensão	70°C	1' 30''	
Final da extensão	72°C	7'	1
Espera	4°C	∞	

Após a amplificação, 12 µL da amostra mais 3µL de tampão de amostra 5x foi aplicada em gel de agarose a 2% contendo Sybr Safe. O gel (**tabela 3**) foi acondicionado em uma cuba de eletroforese horizontal com solução tampão de corrida Tris-Acetato-EDTA (TAE 0,5x) e submetido a uma corrente de 100 volts por 30 minutos aproximadamente. A captura digital da imagem do gel foi realizada através de transiluminador (**FIG. 4**).

Tabela 3: Eletroforese: Gel de agarose 2%

Gel	Reação para cuba maior
TAE (0,5x)	100 mL
Agarose	2 g
Sybr safe	10 µL

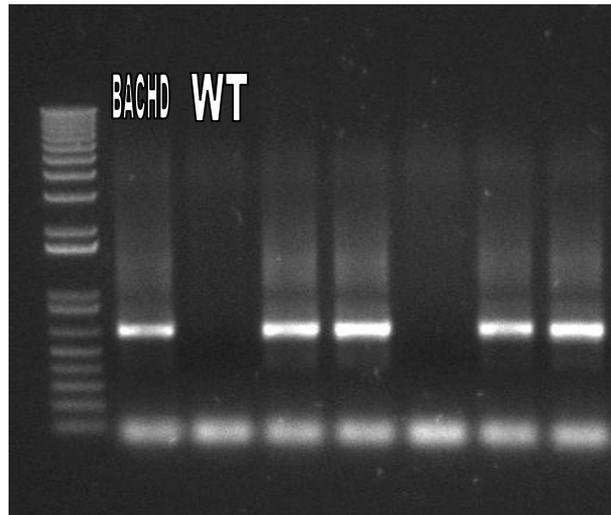


Figura 4: Genotipagem de camundongos BACHD. As bandas representam a amplificação do gene da htt, as canaletas que não apresentaram bandas indicam a ausência da htt transgênica humana, ou seja, camundongo WT.

3.2.4 Imunofluorescência

Os neurônios estriatais obtidos da cultura primária, plaqueados e incubados por 8 dias, foram lavados duas vezes com PBS 1X e fixados com paraformaldeído a 4% em PBS por 20 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas com PBS e pré-incubadas com uma solução permeabilizante contendo PBS, Triton 0,2% e BSA 3% por 60 minutos. Em seguida, os neurônios foram incubados com anticorpos primários em solução permeabilizante (coelho-anti-GAT1 (1:200) ou camundongo-anti-NeuN-marcador exclusivo de neurônios (1:500) a 4°C por 16 horas. As células foram então, lavadas e incubadas com anticorpos secundários (cabra-anti-coelho ou anti-camundongo) conjugados com Alexa Fluor 633 e Alexa Fluor 488 respectivamente por 60 minutos em solução permeabilizante (diluição 1:1000).

Finalmente as células foram lavadas com PBS e incubadas com marcador nuclear DAPI (1:1000) por 10 minutos. A detecção da marcação foi realizada utilizando filtros para excitação de 390/40, 482/18 e 586/15 nm e emissão de 446/33 nm para DAPI, 533/59 nm para Alexa Fluor 488 conjugado com anti-NeuN e 646/68 nm para Alexa Fluor 633 conjugado com anti-GAT. As imagens foram obtidas por meio do microscópio de fluorescência FLOID (Life Technologies).

3.2.5 Ensaio de morte celular

Para o ensaio de morte celular, foi utilizado o kit Live/Dead (Life Technologies). O Kit é composto pelos reagentes calceína-AM e homodímero de etídeo-1. O teste se baseia no princípio de que a calceína-AM é permeável a membrana celular, porém, após ser clivada por esterases contidas em células vivas, a mesma se torna incapaz de atravessar a membrana, permanecendo retida dentro da célula e levando a um aumento da fluorescência verde ao longo do corpo celular. O homodímero de etídeo-1 só é capaz de permear células que apresentem membrana danificada, ou seja, em processo de morte. Após permear a membrana celular, o homodímero de etídeo-1 se liga aos ácidos nucleicos, emitindo fluorescência vermelha (**FIG. 5**).

Os neurônios foram incubados por 20 horas na presença de veículo, droga ou glutamato, DHPG, MPEP, DFB, VU1545, CDPBB e/ou LY294002. Após incubação, os neurônios foram marcados com calceína-AM (2.0 μ M) e homodímero de etídeo-1 (2.0 μ M), preparado em solução PBS 1X por 15 minutos na incubadora. Após este tempo, os neurônios foram lavados três

vezes com PBS 1x.

As fotos foram obtidas por meio do microscópio FLOID, utilizando o filtro 488 para as imagens verdes (calceína-AM) e 633 para as imagens vermelhas (homodímero de etídeo-1). Consideramos um número mínimo de 300 células por poço, utilizando o software ImageJ. O número de células mortas foi expresso como porcentagem do número total de células.

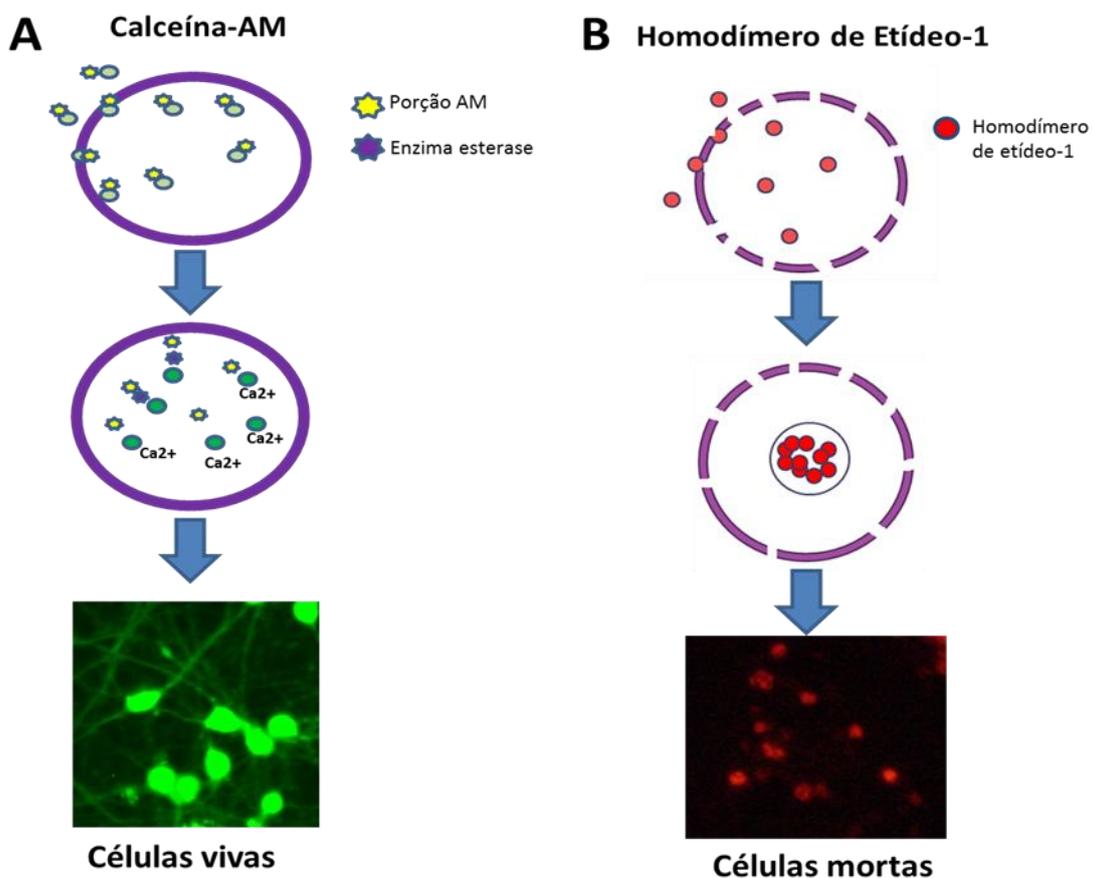


Figura 5: Princípio do ensaio de teste de viabilidade celular. (A) A calceína-AM, ao atravessar a membrana celular, é clivada pela enzima esterase, tornando-se incapaz de deixar o interior celular, o que promove um aumento da emissão de fluorescência verde (células vivas) ao longo do corpo celular. **(B)** O homodímero de etídeo-1 ao atravessar membranas comprometidas, se liga aos ácidos nucleicos e emite fluorescência vermelha (células mortas).

3.2.6 Campo aberto

Para avaliar a atividade locomotora nos camundongos em estudo, utilizamos o aparato de campo aberto Harvard Apparatus® (Massachusetts United States). O aparato contém pares de lasers distribuídos horizontalmente detectando o movimento do animal. Mensuramos neste teste a distância percorrida pelo camundongo em todo o aparato, o qual está diretamente relacionado com a atividade locomotora do mesmo. Os animais foram habituados na sala de experimento por ao menos 15 minutos, e a duração do teste foi de 10 minutos. O experimento foi realizado na fase clara do dia. Este teste foi realizado com camundongos SWISS tratados com VU1445 a 1 mg/Kg ou MK-801 0,2 mg/Kg, administrados via i.p. (intraperitoneal).

3.2.7 Reconhecimento de objeto

O aparato utilizado foi uma caixa de PVC com dimensões de 50 cm x 35 cm x 25 cm, iluminada e filmada. Os pares de objetos utilizados eram ora de plástico ou vidro, com dimensão e peso suficientes para não serem derrubados ou escalados pelos animais. Camundongos foram expostos aos objetos anteriormente ao teste e não exibiram preferência por um dos objetos ou por um dos lados da caixa. O teste constituiu de diferentes etapas **(FIG. 6)**:

- 1) Habituação: no dia anterior ao teste, os animais foram habituados na caixa vazia ao longo de 10 minutos.

- 2) Familiarização: no dia do teste, os animais foram colocados na caixa com dois objetos idênticos colocados em posições simétricas com relação ao centro do aparato, a uma distância de 15 cm de cada parede. Ao longo de 10 minutos, os animais foram filmados e puderam explorar livremente os dois objetos. Após este tempo, os animais voltaram para suas respectivas gaiolas.
- 3) Teste: após 90 minutos do período de familiarização, os animais foram reintroduzidos ao aparato e expostos a dois objetos, sendo um objeto familiar e o outro um novo objeto. Os objetos foram mantidos nas mesmas posições em todas as fases.

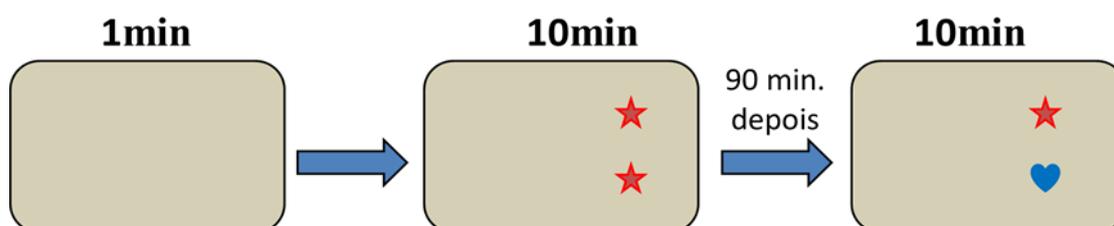


Figura 6: Teste de reconhecimento de objeto. Cada animal é colocado em uma caixa vazia por 1 minuto até que os objetos idênticos sejam alocados na caixa, em posições simétricas. Os animais são retirados da caixa teste e recolocados após 90 minutos. Nos 10 minutos seguintes, um dos objetos é substituído e o tempo de exploração em cada objeto é avaliado.

O aparato foi limpo com álcool 70% a cada troca de animal a fim de reduzir possíveis odores. Os testes foram realizados durante a fase clara do ciclo do dia e antes do início dos testes, os animais foram habituados à sala do experimento por ao menos 15 minutos.

O teste foi realizado com animais tratados e não tratados com CDPPB (5mg/Kg) por 7 dias. O CDPPB foi preparado em solução contendo 0,5% de metilcelulose e administrado via intraperitoneal com volume de 2 mL/Kg.

3.2.8 Rota Rod

Foram utilizados dois grupos de animais contendo de 6 a 7 camundongos FVB (WT e BACHD), sendo computada a latência (permanência em segundos) que o animal demora a cair da barra giratória do aparelho rota-rod (Insight®), com tempo de corte de no mínimo 5 segundos e no máximo 300 segundos. Os animais foram treinados por três dias consecutivos anteriores ao teste. Antes de cada treino e teste, os animais foram habituados à sala por ao menos 15 minutos. O resultado foi dado pela média de tempo em segundos de permanência de cada grupo no aparelho.

3.2.9 Rearing-Climbing

Foi utilizado um aparato confeccionado com arame, de formato cilíndrico, com dimensões de 10,5 cm de diâmetro e 40 cm de altura. Os animais de cada grupo foram colocados individualmente no aparato e filmados por 5 minutos para posterior análise. A cada troca de animal o aparato foi higienizado com álcool a 70%. O teste foi realizado durante a fase clara do dia, e em cada teste foi analisada a latência de escalada de cada animal. Os resultados foram agrupados em tempos de 0-75 segundos, 76-150 segundos, 151-300 segundos.

3.2.10 Análise estatística

As imagens obtidas no ensaio de morte neuronal foram analisadas utilizando o Software *Image J*® (National Institute of Mental Health). Os valores

obtidos para células mortas por estímulo foram corrigidos pelos valores da morte basal. A média e o erro padrão foram calculados para o número de experimentos independentes, como indicados nas legendas das figuras. O programa Graph Pad PRISM (versão 5 Graph Pad Software Inc.) foi utilizado para as análises estatísticas, que foi determinada pelo método ANOVA, seguido de teste Bonferroni (post-hoc), sendo que os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da cultura primária

Com o intuito de caracterizar as células presentes na cultura primária neuronal, utilizamos a técnica de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-NeuN, que é um marcador exclusivo de neurônios, associado ao anticorpo secundário Alexa-Fluor 488 (**Fig. 7A, verde**). Utilizamos ainda o marcador de núcleo celular DAPI a fim de quantificar o número global de células em cultura (**Fig. 7B, azul**). A quantificação desse dado nos indicou que aproximadamente 95% das células foram marcadas com NeuN, o que nos indica que as células presentes na cultura são em sua maioria neurônios (**FIG 7**).

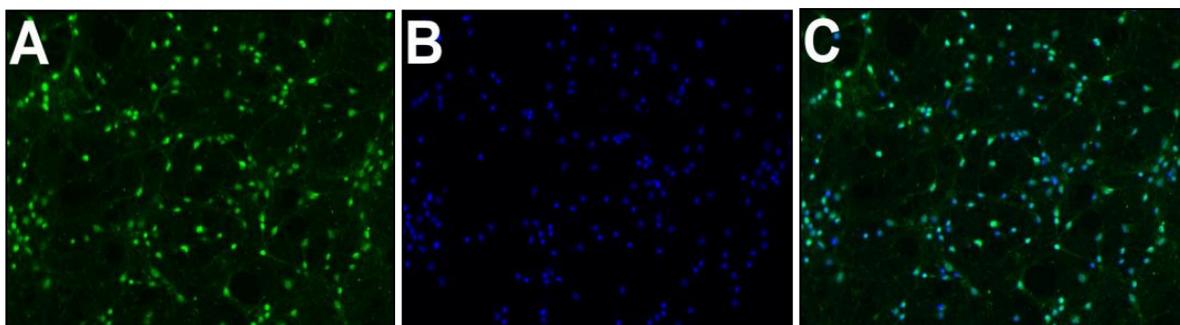


Figura 7: Fluorescência emitida pela marcação com NeuN e DAPI. (A) Células marcadas com NeuN (1:500) conjugado com AlexaFluor 488 (1:1000) emitindo fluorescência verde (aproximadamente 95%) **(B)** Núcleos celulares marcados com DAPI (1:1000) emitindo fluorescência azul (aproximadamente 4,47%). **(C)** sobreposição.

Visto que aproximadamente 95% das células em cultura são neurônios, nosso próximo passo foi determinar quais subtipos neuronais estariam presentes. A cultura primária foi realizada a partir da região do corpo estriado e,

uma vez que a maioria dos neurônios estriatais são GABAérgicos (Conn, Christopoulos, *et al.*, 2009), intentamos determinar os níveis de contaminação com neurônios não GABAérgicos. A cultura neuronal foi incubada com o anticorpo primário anti-GAT-1, que é um marcador de neurônios GABAérgicos, conjugado com o anticorpo secundário Alexa-Fluor 633. A grande maioria dos neurônios em cultura foram marcados com o anticorpo anti-GAT-1, comprovando a presença predominantemente de células GABAérgicas (**FIG. 8**).

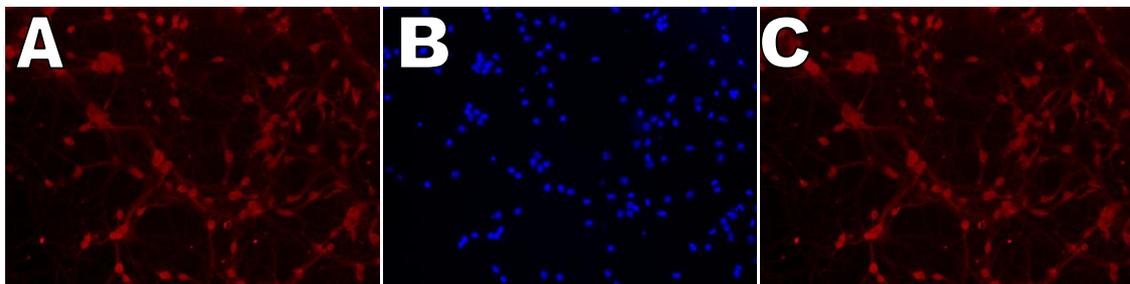


Figura 8: Fluorescência emitida pela marcação com anti-GAT1. (A) Células marcadas com anti-GAT1 (1:000) conjugado com AlexaFluor 633 (1:1000) emitindo fluorescência vermelha. **(B)** Núcleos celulares marcados com DAPI (1:1000) emitindo fluorescência azul. **(C)** Sobreposição.

Com o intuito de verificar se a marcação pelo anticorpo anti-GAT1 seria específica, incubamos a cultura neuronal apenas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 633 (1:1000), na ausência de qualquer anticorpo primário. Como esperado, não observamos marcação na ausência do anticorpo anti-GAT1, indicando que a marcação é específica (**FIG 9**).

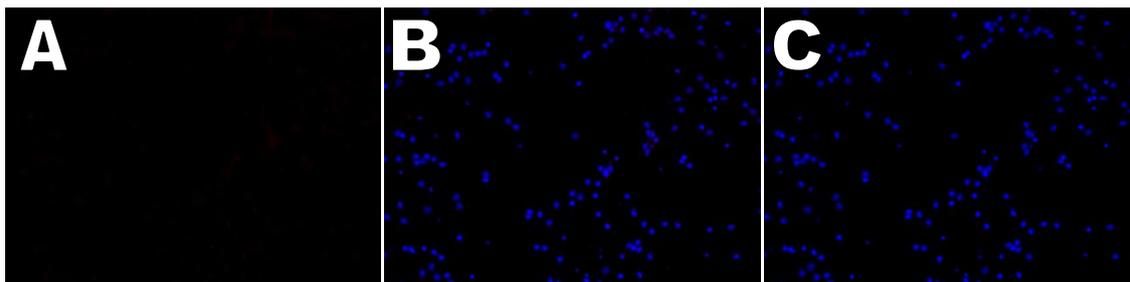


Figura 9: A marcação do anticorpo anti-GAT1 é específica. **(A)** Células marcadas apenas com AlexaFluor 633 (1:1000) não emitem fluorescência. **(B)** Núcleos celulares marcados com DAPI (1:1000) emitindo fluorescência azul. **(C)** Sobreposição.

4.2 Efeito de diferentes concentrações de glutamato na morte neuronal

Glutamato, o principal neurotransmissor do cérebro de mamíferos, quando em excesso, promove o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular por meio da ativação de receptores ionotrópicos pós-sinápticos, que promovem a entrada de Ca^{2+} a partir do meio extracelular, e da ativação de receptores metabotrópicos, os quais promovem a liberação deste íon a partir de estoques intracelulares. O acúmulo de Ca^{2+} intracelular de forma exacerbada ativa uma cascata de eventos que pode culminar em excitotoxicidade (Mehta *et al.*, 2013). Estimulamos a cultura primária de neurônios estriatais com concentrações crescentes de glutamato a fim de selecionar doses do neurotransmissor que fossem suficientes para causar um insulto de morte neuronal similar ao que ocorre na DH. Tratamos os neurônios em cultura primária com 50, 100 e 250 μM de glutamato por um período de 20 horas. Por meio do ensaio de morte neuronal, encontramos que as doses de 50, 100 e 250 μM de glutamato levam a uma morte neuronal de $17,22 \pm 0,74\%$, $35,66 \pm 5,25\%$ e $52,23 \pm 6,04\%$, respectivamente **(FIG. 10)**. A partir destes resultados, selecionamos as

concentrações de 50 e 100 μM , uma vez que 250 μM promoveu morte neuronal muito elevada, a qual dificilmente poderia ser revertida.

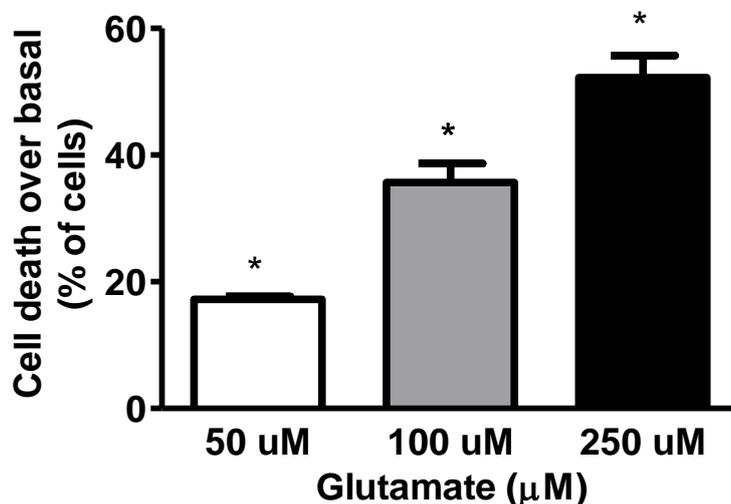
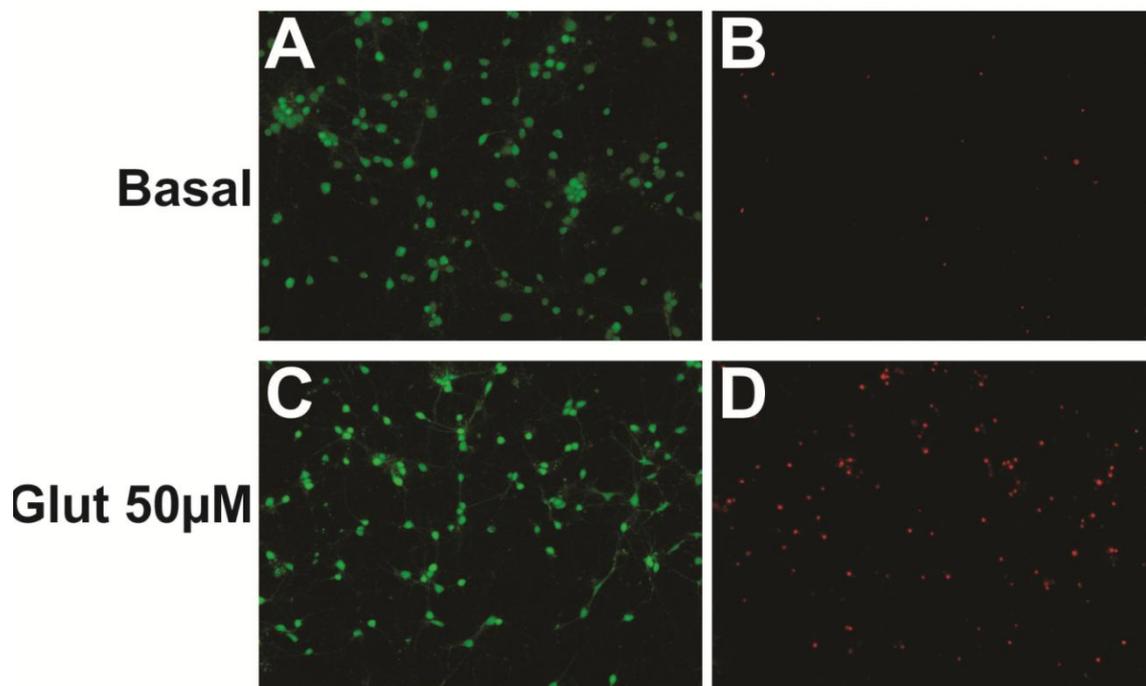


Figura 10: Morte neuronal por insulto de glutamato. Os neurônios estriatais obtidos da cultura primária de embriões E15 foram estimulados com concentrações crescentes de glutamato (50, 100 e 250 μM) por 20 horas. Os dados representam a média de três experimentos independentes. * indicam diferenças significativas em comparação à morte basal ($p < 0,05$).

4.3 DHPG, mas não o MPEP, protege os neurônios da morte induzida por glutamato

Devido à capacidade do mGluR5 em promover neuroproteção e/ou excitotoxicidade, tem sido discutido se a melhor alternativa terapêutica seria ativar ou inibir este receptor. Ambos o DHPG, que é agonista mGluR1/5, e o MPEP, que é um antagonista e MAN do mGluR5, foram propostos como tendo atividade neuroprotetora (Flor *et al.*, 2002; Wisniewski e Car, 2002).

A fim de avaliar a capacidade destes compostos em promover neuroproteção, incubamos neurônios estriatais em cultura primária com doses de 10 μM de DHPG e 10 μM de MPEP, na presença ou na ausência de 50 μM de glutamato por 20 horas. Observamos que na ausência de glutamato, ambas as substâncias causam morte neuronal acima dos níveis basais. Estes dados sugerem que estas substâncias possuem toxicidade intrínseca. Quando na presença de 50 μM de glutamato, observamos que apenas o DHPG é capaz de reduzir a morte neuronal por insulto de glutamato (**FIG.11**).



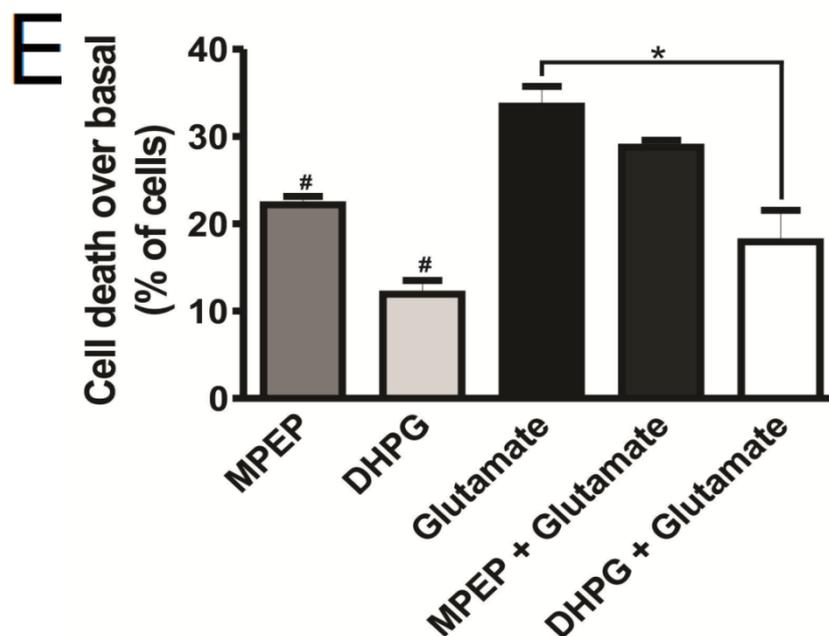


Figura 11: DHPG, mas não MPEP, protege os neurônios da morte induzida por glutamato. (A e C) Imagem de neurônios estriatais marcados com Calceína-AM (células vivas, verde). (B e D) Neurônios estriatais marcados com homodímero de etídeo1 (células mortas, vermelhas). As figuras A e B mostram a morte basal destes neurônios. As figuras C e D mostram a morte neuronal por insulto de 50 μ M de glutamato. (E) O gráfico mostra a porcentagem de morte celular acima da morte basal de neurônios tratados com MPEP 10 μ M e DHPG 10 μ M na presença ou na ausência de glutamato 50 μ M. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. * indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato. # indicam diferenças significativas em comparação à morte basal ($p < 0,05$).

4.4 Efeito dos veículos de diluição das drogas sobre a morte neuronal

As drogas utilizadas em nosso estudo foram diluídas ou preparadas com água, HBSS, DMSO (1:1000 v/v), DMSO (1:10.000 v/v). Como forma de controle, realizamos um ensaio de morte neuronal em que os neurônios da cultura primária foram estimulados apenas com tais veículos. A **FIG 12** mostra

que nenhum dos veículos utilizados no estudo causa morte neuronal a valores diferentes da morte basal.

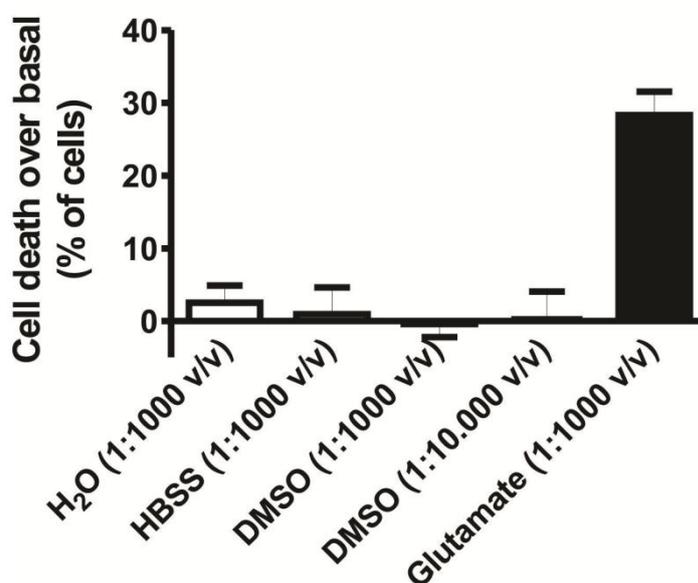


Figura 12: Os veículos de diluição das drogas não causam morte neuronal. O gráfico representa a porcentagem de morte neuronal dos neurônios estriatais quando tratados com H₂O (1:1000 v/v), HBSS (1:1000 v/v), DMSO (1:1000 v/v), DMSO (1:10.000 v/v), e glutamato a 50µM (1:1000 v/v) por 20 horas. Os dados representam a média de três experimentos independentes.

4.5 Capacidade dos moduladores alostéricos nas concentrações de 100 nM e 10 µM em prevenir a morte de neurônios estriatais em cultura primária

Visto que o agonista mGluR1/5, DHPG, e o modulador alostérico negativo, MPEP, são pouco eficazes em promover neuroproteção, avaliamos então a capacidade dos MAPs do mGluR5, CDPPB, DFB e VU1545, de proteger os neurônios do insulto com glutamato. Para tal, estimulamos neurônios estriatais em cultura primária com concentrações de 100 nM e 10 µM

dos MAPs na presença de glutamato a 50 μ M e 100 μ M. Observamos na **FIG 13** que todos os MAPs testados foram eficazes em promover neuroproteção nas doses de 10 μ M e 0,1 μ M na presença de 50 μ M e 100 μ M de glutamato.

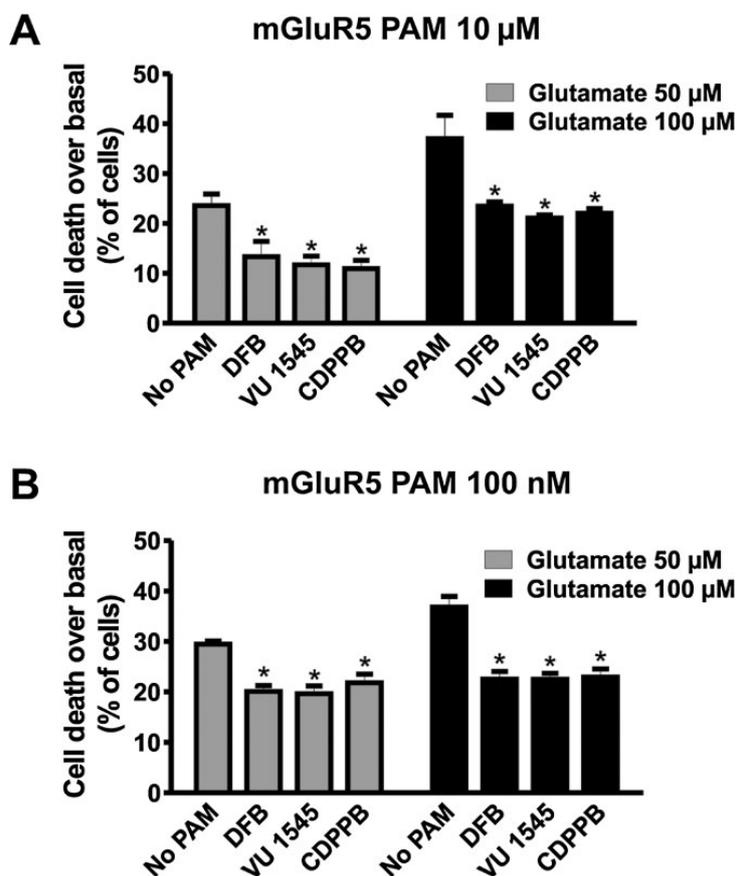


Figura 13: Os MAPs do mGluR5 protegem os neurônios em cultura primária da morte neuronal induzida por glutamato. (A) Porcentagem de morte celular de neurônios tratados com 10 μ M de DFB, VU1545 e CDPPB na presença de 50 μ M e 100 μ M de glutamato. **(B)** Porcentagem de morte celular de neurônios tratados com 100 nM de DFB, VU1545 e CDPPB na presença de 50 μ M e 100 μ M de glutamato. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. * indicam diferenças significativas em comparação ao grupo tratado com glutamato na ausência de MAPs ($p < 0,05$).

4.6 Capacidade dos moduladores alostéricos a 1 μM em prevenir a morte de neurônios BACHD

Para avaliar se os MAPs do mGluR5 teriam efeito neuroprotetor em neurônios em cultura primária de camundongos modelo da DH, estimulamos os neurônios de embriões E15 WT e BACHD com 1.0 μM dos MAPs , CDPPB, DFB e VU1545, na presença ou ausência de glutamato 50 μM .

Após realizar o ensaio de morte neuronal, observamos que todos os MAPs testados foram eficazes em prevenir a morte neuronal, tanto dos neurônios WT quanto BACHD (**FIG. 14**).

Interessantemente, observamos que o MAP VU1545 promoveu neuroproteção de forma mais significativa nos neurônios BACHD quando comparado à proteção aos WT. Esta observação é apoiada pela análise estatística (two-way ANOVA), que indicou uma interação significativa entre o genótipo e o tratamento com VU1545 [$\pm(2.030) = 3.446$; $P = 0.045$]. Estes dados estão em acordo com (Ribeiro *et al.*, 2010), que mostra maior ativação de vias protetoras através da estimulação do mGluR5 em camundongos expressando o gene da htt mutante, o que sugere um mecanismo compensatório contra a doença.

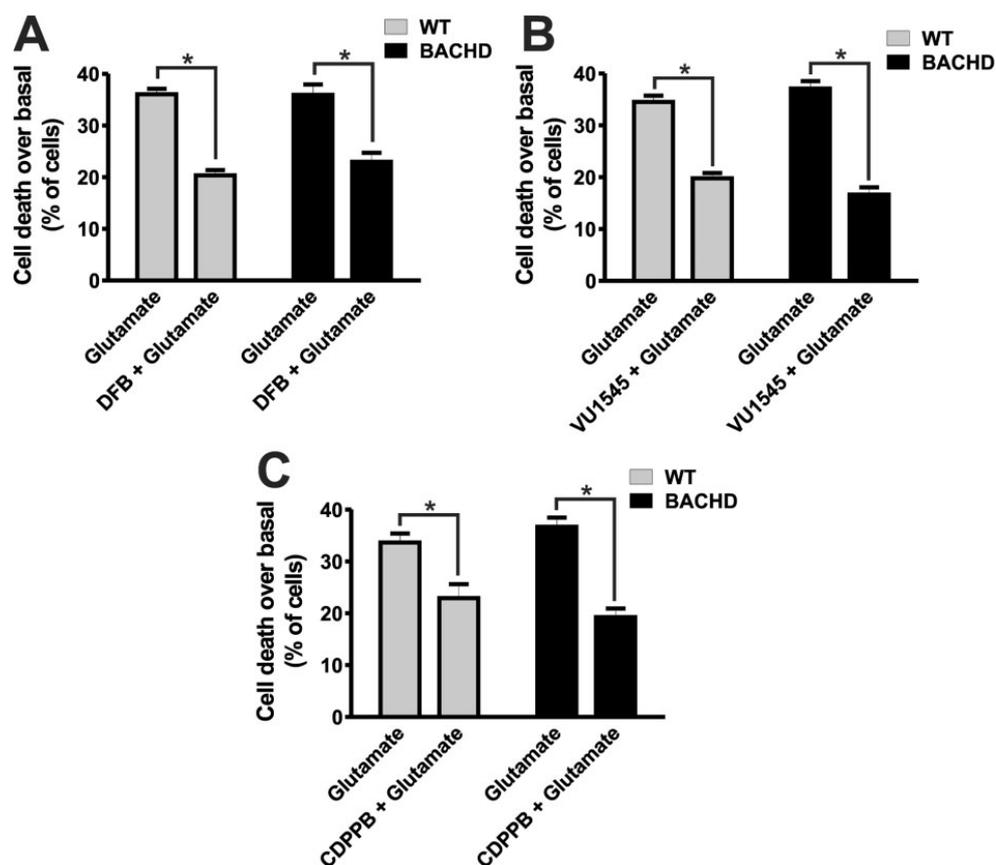


Figura 14: Os MAPs do mGluR5 protegem os neurônios BACHD em cultura primária da morte neuronal induzida por glutamato. (A) Porcentagem de morte celular de neurônios tratados com 1 μ M de DFB e 50 μ M de glutamato. **(B)** Porcentagem de morte celular de neurônios tratados com 1 μ M de VU1545 e 50 μ M de glutamato. **(C)** Porcentagem de morte celular de neurônios tratados com 1 μ M de CDPPB e 50 μ M de glutamato. Os dados representam a média de seis experimentos independentes. * indicam diferenças significativas em comparação ao grupo tratado com glutamato na ausência de MAPs ($p < 0,05$).

4.7 Curva dose-resposta do MAP VU1545

Para determinar concentrações mínimas em que os MAPs seriam capazes de promover neuroproteção, realizamos uma curva dose-resposta para o VU1545 em concentrações de 1, 5, 10, 100 e 10.000 nM, na presença ou ausência de 50 μ M de glutamato por 20 horas.

Na presença de glutamato 50 μ M, o VU1545 foi eficaz em promover neuroproteção em todas as doses testadas, quando comparado ao valor de morte neuronal na ausência do MAP. Interessantemente, na ausência de glutamato, nenhuma das concentrações de VU1545 promoveu morte neuronal a valores acima do basal, embora haja uma tendência na concentração de 10.000 nM. Estes resultados mostram que além de ser potente neuroprotetor, o VU1545 possui também uma baixa toxicidade (**FIG 15**).

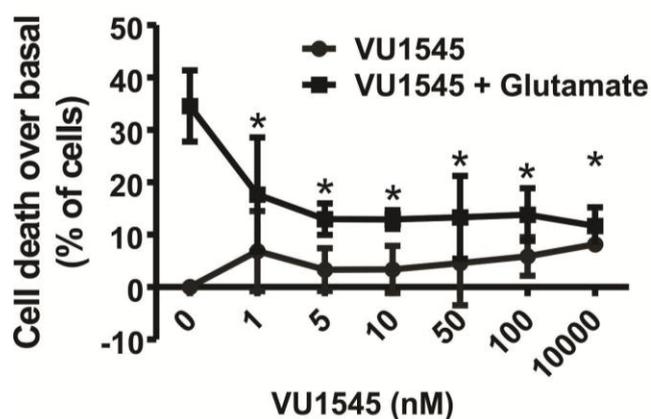


Figura 15: O MAP VU1545 é um potente neuroprotetor e possui baixa toxicidade. Porcentagem de morte neuronal sob o estímulo de VU1545 em concentrações de 1, 5, 10, 100 e 10.000 nM na presença ou ausência de 50 μ M de glutamato por 20 horas. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. * indicam diferenças significativas em comparação ao grupo tratado com glutamato na ausência de MAPs ($p < 0,05$).

4.8 Efeito neuroprotetor do VU1545 contra a morte neuronal induzida por NMDA

A maior parte da morte neuronal causada pela super-estimulação com glutamato é devido à hiperestimulação de receptores de NMDA (Zeron *et al.*, 2001). Entretanto, a estimulação de outros receptores, como os mGluRs do

grupo I, pode ter ação neuroprotetora (Baskys *et al.*, 2005). Para determinar se a neuroproteção promovida pelo VU1545 seria dependente da co-estimulação dos mGluRs pelo glutamato, decidimos verificar se o VU1545 possui efeito neuroprotetor sob a neurotoxicidade induzida pelo agonista NMDA. A estimulação dos NMDAR promoveu níveis elevados de morte neuronal de maneira dose-dependente. 100 nM de VU1545 promoveu neuroproteção contra a morte neuronal induzida por NMDA e esta neuroproteção foi significativa em neurônios tratados com 10 μ M de NMDA. Estes dados indicam que a neuroproteção do VU1545 é independente da co-estimulação pelo glutamato e que este MAP é capaz de proteger os neurônios da neurotoxicidade induzida por glutamato e NMDA (FIG. 16).

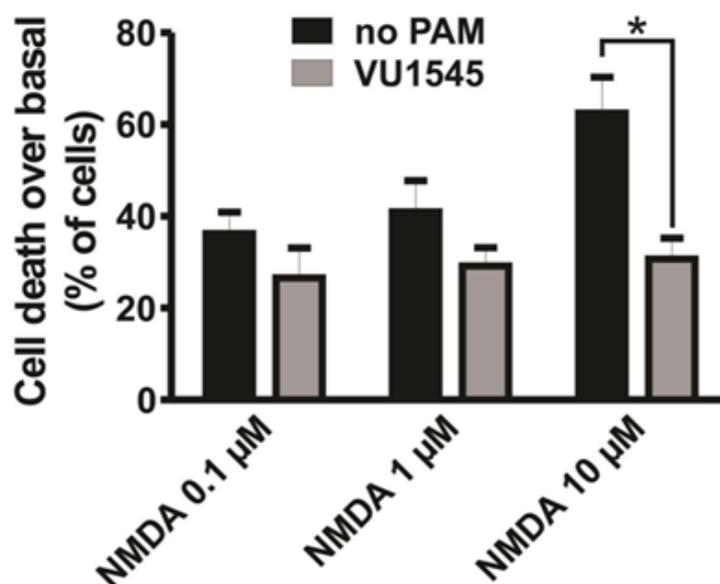


Figura 16: VU1545 protege contra a morte induzida por NMDA. Porcentagem de morte neuronal induzida por NMDA em concentrações 0.1, 1 e 10 μ M, na presença ou ausência de VU1545 100 nM por 20 horas. Os dados representam a média de três experimentos independentes. * indicam diferenças significativas em comparação ao grupo tratado com 10.0 μ M de NDMA na ausência de VU1545 ($p < 0,05$).

4.9 Bloqueio da proteção neuronal pelo VU1545 por MPEP

Visto que o VU1545 é um potente neuroprotetor, decidimos confirmar se sua neuroproteção ocorre via mGluR5. Para tal, estimulamos neurônios estriatais em cultura primária com 100 nM de VU1545 e com glutamato 50 μ M, na ausência ou presença do MAN do mGluR5, MPEP a 10 μ M.

Observamos que a neuroproteção promovida pelo VU1545 na presença de glutamato é revertida pela co-incubação com MPEP, indicando que a proteção via VU1545 é dependente da ativação do mGluR5 (**FIG. 17**).

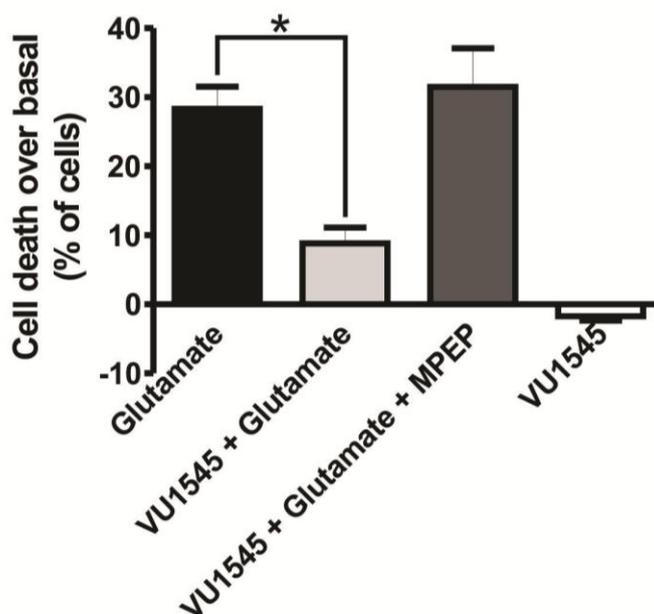


Figura 17: A proteção neuronal pelo VU1545 é via mGluR5. O gráfico mostra a porcentagem de morte neuronal induzida por VU1545 100.0 nM e MPEP 10.0 μ M na presença ou ausência de glutamato 50.0 μ M. Os dados representam a média de três experimentos independentes. * indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato ($p < 0,05$).

4.10 A neuroproteção promovida por VU1545 é dependente da ativação de AKT

A proteína AKT tem ação neuroprotetora e sua fosforilação é ativada pelos MAPs do mGluR5. O LY249002 é capaz de inibir a PI3K, a qual é responsável pela fosforilação da proteína AKT (Rong *et al.*, 2003). Para determinar se a ativação da AKT é importante para o efeito neuroprotetor dos MAPs do mGluR5, estimulamos neurônios estriatais em cultura primária com 25 μ M de LY249002 na presença de 50 μ M de glutamato e 1 μ M de VU1545. Observamos com este experimento que a neuroproteção ao insulto por glutamato mediada pelo VU1545 é revertida pelo LY294002, mostrando assim que o mecanismo de proteção ativado pelo VU1545 é dependente da ativação da proteína AKT (FIG.18).

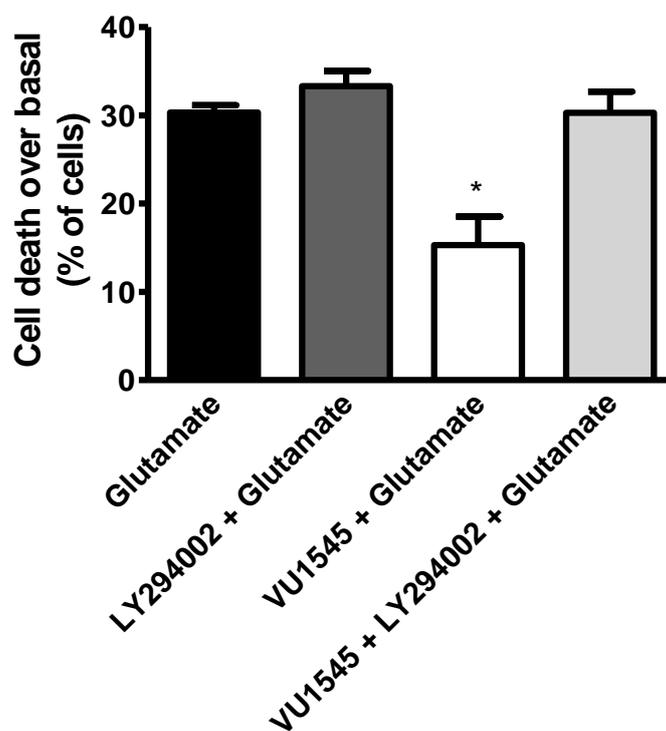


Figura 18: A proteção neuronal pelo VU1545 é dependente da fosforilação de AKT. O gráfico mostra a porcentagem de morte neuronal induzida por glutamato 50 μ M, na presença ou ausência de LY294002 25.0 μ M e VU1545 1 μ M. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. * indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato ($p < 0,05$).

4.11 Potencial neuroprotetor da memantina versus VU1545

Com o objetivo de avaliar mais minuciosamente a ação neuroprotetora do VU1545, realizamos experimentos onde comparamos o efeito neuroprotetor do VU1545 à droga memantina, que é um antagonista do receptor NMDA amplamente utilizada para o tratamento de enfermidades tais como a doença de Alzheimer (Li *et al.*, 2004; De Felice *et al.*, 2007). Estimulamos a cultura primária de neurônios estriatais com memantina em concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 30 μ M, na presença ou ausência de 50 μ M de glutamato. Em seguida, comparamos estes achados com a proteção promovida pelo VU1545 a 1 μ M.

Nossos resultados indicam que todas as doses de memantina na ausência de glutamato promovem morte neuronal a níveis acima do basal, indicando que esta droga é potencialmente tóxica à célula, ao contrário do observado com o VU1545. Ao observar os resultados na presença de glutamato, vemos que a memantina é eficiente em reduzir a morte neuronal somente em doses mais altas, de 10 μ M e 30 μ M. Entretanto, VU1545 promove neuroproteção de maneira mais eficiente que a memantina e em doses menores (**FIG. 19**).

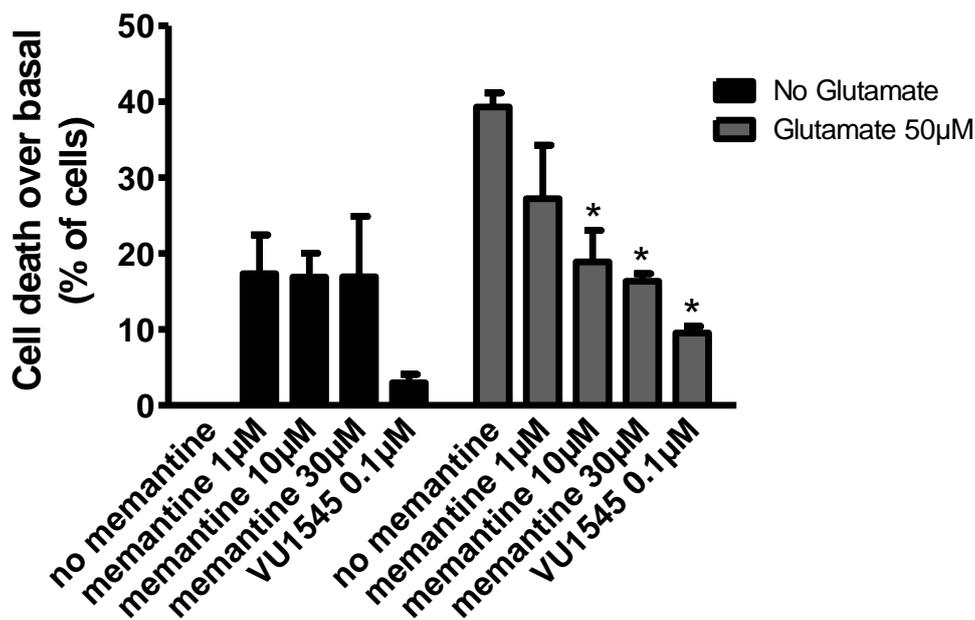


Figura 19: O VU1545 é mais eficaz em promover neuroproteção que a memantina. O gráfico mostra a porcentagem de morte neuronal induzida por memantina a 1 μM, 10 μM e 30 μM na presença ou ausência de 50 μM de glutamato. Os dados representam a média de cinco experimentos independentes. * indicam diferenças significativas em comparação ao grupo tratado com glutamato ($p < 0,05$).

4.12 Desempenho motor dos camundongos BACHD no Rota-rod

Finalizados os experimentos *in vitro*, decidimos que seria importante realizar testes *in vivo* com os MAPS do mGluR5, a fim de analisarmos o efeito dos MAPS sob o comportamento do animal. Para tanto, decidimos primeiramente submeter o camundongo modelo da DH, o BACHD, a testes comportamentais a fim de verificar a capacidade motora e cognitiva destes animais. O primeiro teste realizado foi o rota-rod. Este experimento foi realizado a cada 4 semanas ao longo de 24 semanas da vida do animal, com início na 8ª

semana de vida. A **FIG. 20** compara o desempenho motor dos camundongos BACHD versus WT, onde é verificada a latência do animal para cair do aparelho de rota-rod, ou seja, a quantidade de tempo em que o animal consegue permanecer no aparelho. Observamos que os camundongos WT possuem um desempenho motor melhor que os BACHD, e estes resultados se mantêm ao longo do período do estudo. Esta observação é apoiada pela análise estatística (two-way ANOVA), que indicou um efeito significativo do genótipo sobre o desempenho do animal no teste [$\pm(1.48) = 5,336$; $p = 0.0395$].

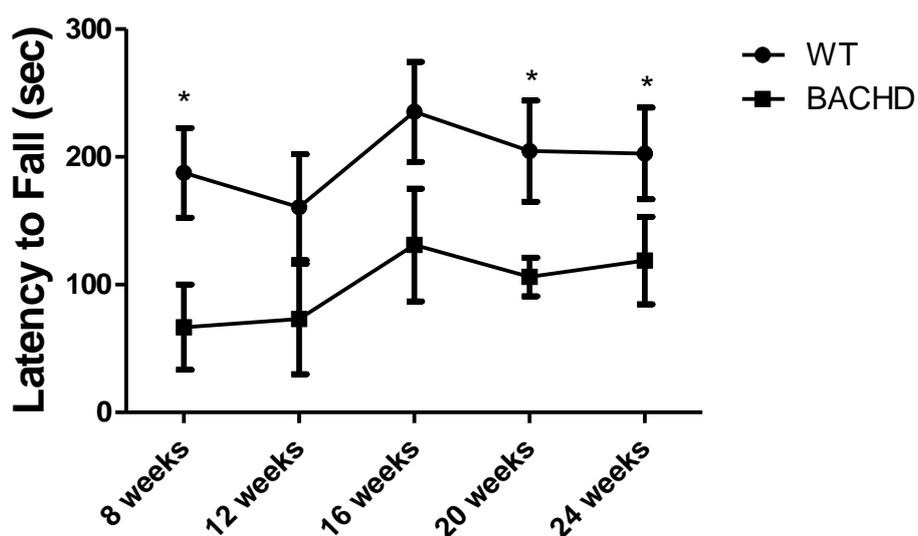


Figura 20: Camundongos BACHD submetidos ao teste Rota-rod. Animais com idade de 8 a 24 semanas foram submetidos ao teste do rota-rod. Os dados representam a média da latência para cair. WT n=8 e BACHD n=6 * indicam diferenças significativas em comparação à latência do grupo WT na mesma idade ($p < 0,05$).

4.13 Desempenho motor dos camundongos BACHD no Rearing-Climbing

No teste de *rearing-climbing*, analisamos a latência para escalada no aparato. A **FIG 21** mostra os resultados obtidos ao longo de 12, 16 e 20 semanas de vida dos camundongos modelo BACHD e WT. O gráfico apresenta a porcentagem dos camundongos que iniciaram a escalada nos tempos de 0-75 segundos, 76-150 segundos, 151-300 segundos. Observamos em todos os períodos testados um melhor desempenho dos camundongos WT sobre os BACHD.

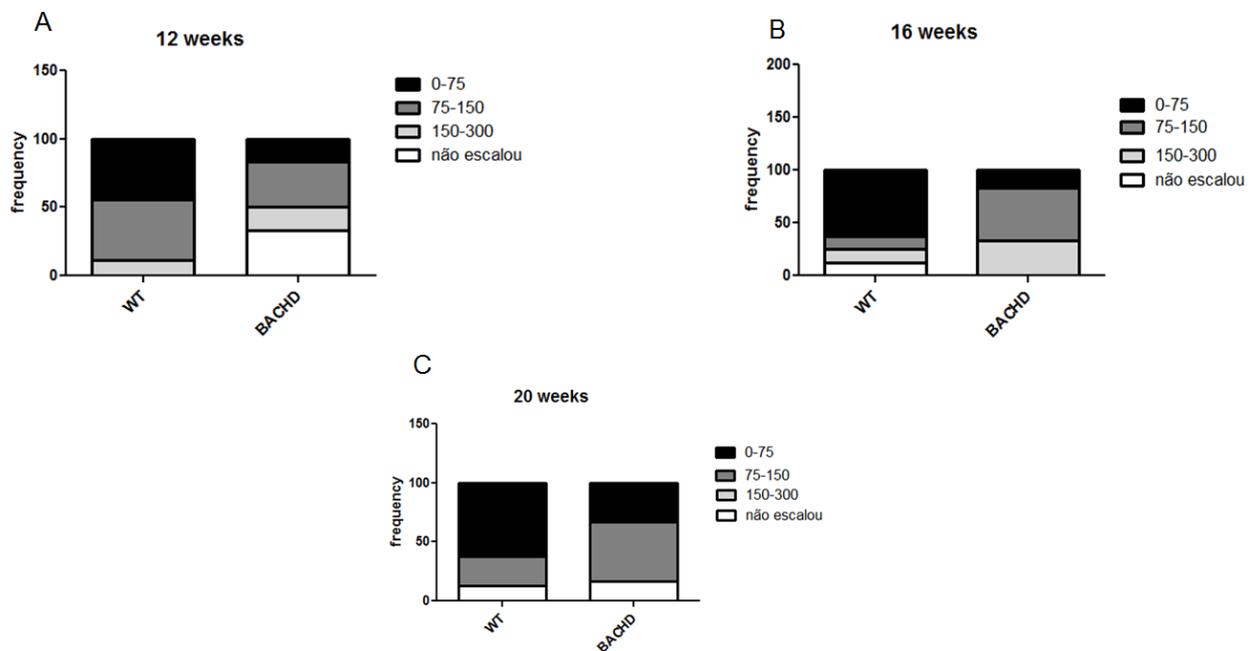


Figura 21. Tempo médio para subir no teste de escalada Rearing-Climbing em função do genótipo e idade. Cada gráfico mostra a porcentagem de camundongos que iniciaram a escalagem em menos de 75 s (preto), entre 75 e 150 s (cinza escuro), entre 150 e 300 s (cinza claro), ou que não subiram (branco). Idades de **a)** 12 semanas e **b)** 16 semana e **b)** 20 semanas.

4.14 Efeito do VU1545 *in vivo*

Tendo visto que não há até o momento estudos que tenham avaliado se o modulador alostérico VU1545 possui atividade *in vivo*, realizamos o teste de campo aberto utilizando este modulador na concentração de 1 mg/Kg i.p., diluído em 1% de metilcelulose em solução salina e administrado sob forma aguda na presença ou na ausência do antagonista de receptor de NMDA, MK-801 a 0,2mg/Kg i.p.. Wade S. (2010) mostrou em seu estudo que o MK-801 possui como efeito o aumento da atividade locomotora em animais submetidos ao teste de campo aberto. Sendo assim, intentamos investigar se a hiperlocomoção causada pelo MK-801 poderia ser revertida pela administração de VU1545 via intraperitoneal, uma vez que o CDPPB apresentou tal efeito (Fowler *et al.*, 2011). **A FIG 22** apresenta os resultados do campo aberto. Podemos observar que o MK-801 foi eficaz em promover hiperlocomoção nos animais submetidos ao teste, comparado com os animais que não receberam tratamento. Entretanto, encontramos que o VU1545, apesar de exibir ótimos resultados *in vitro*, não foi eficaz em reduzir a hiperlocomoção induzida pelo MK-801. Esse dado corrobora o que foi sugerido anteriormente, através de dados não mostrados, sobre a ineficácia do VU1545 *in vivo* (Stauffer, 2011)

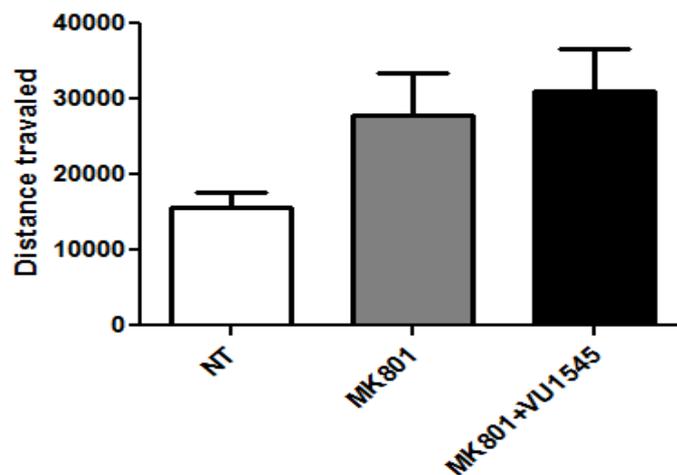


Figura 22. VU1545 não reverte a atividade locomotora induzida por MK-801. Gráfico mostra a distância percorrida no aparato na ausência de tratamento (N=6), após tratamento com MK-801 0,2 mg/Kg (N=6) na presença ou ausência de VU1545 1mg/Kg (N=6). Os dados representam as médias \pm SEM, expressa como porcentagem da distância percorrida pelos animais.

4.15 Efeito do tratamento subcrônico com CDPPB em camundongos BACHD

Foi demonstrado anteriormente que os camundongos BACHD possuem comprometimento cognitivo (Southwell *et al.*, 2009). O CDPPB possui boa tolerabilidade e quando administrado de forma aguda, em doses de 10 mg/Kg e 30 mg/Kg, é eficaz em reverter o déficit de memória induzido por 10mg/Kg de MK-801 (Uslaner *et al.*, 2009). Para avaliar se o CDPPB seria capaz de melhorar o desempenho dos camundongos BACHD com sete meses de idade, realizamos tratamento subcrônico por 7 dias com CDPPB na dose de 5mg/Kg, preparado em 0,5% de metilcelulose e administrado via intraperitoneal. No sétimo dia de tratamento e 20 minutos após a administração da droga, os

animais BACHD e WT foram submetidos ao teste de reconhecimento de objeto, no qual eles deveriam diferenciar entre um objeto já familiar a eles e um objeto novo.

Como demonstrado na **FIG. 23**, na ausência de tratamento com o CDPPB, os camundongos WT foram capazes de diferenciar entre o objeto familiar e o novo, visto que exploraram o objeto novo por mais de 50% do tempo. Já os camundongos BACHD não foram capazes de diferenciar entre o objeto novo e o objeto já familiar, indicando um déficit de memória nesses camundongos. Após 7 dias de tratamento com o CDPPB, os camundongos BACHD se equipararam ao desempenho dos camundongos WT, já que exploraram o objeto novo por um tempo superior ao tempo de exploração do objeto familiar. Isto nos indica que o CDPPB possui atividade *in vivo*, e mais, que ele é capaz de reverter, pelo menos parcialmente, o dano cognitivo causado pela doença de Huntington.

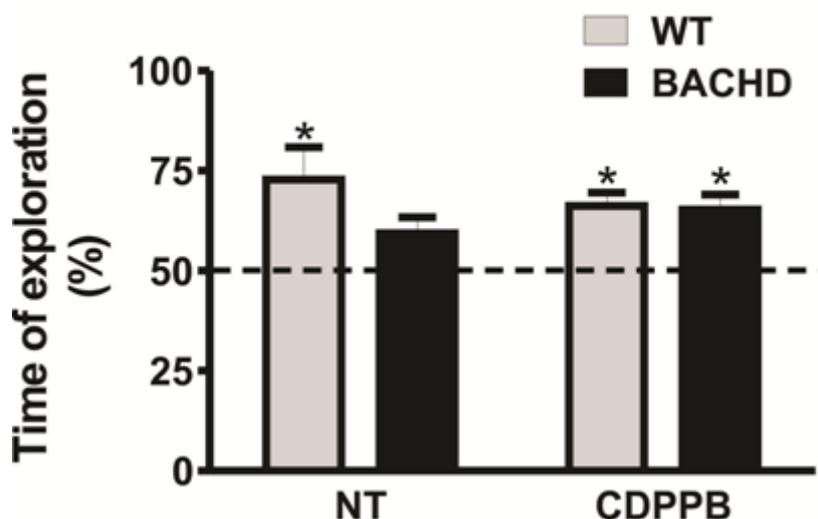


Figura 23. O CDPPB melhora o desempenho de camundongos BACHD no teste de reconhecimento de objetos. Gráfico mostra a porcentagem de tempo de exploração do objeto novo calculado como um índice entre o tempo gasto explorando um novo objeto x100/tempo

nos dois objetos. A pontuação de 50% indica que não há preferência. Os camundongos foram submetidos ao teste antes do tratamento (NT) (WT, n = 6) e BACHD (n = 6), e após administração de CDPPB 5 mg/kg, via intraperitoneal por sete dias consecutivos. Os dados representam as médias \pm SEM, expressa como percentagem de tempo a explorar ambos os objetos. *Indicam exploração do objeto novo por um tempo significativamente maior em relação à exploração aleatória dos dois objetos (maior que 50%) ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A perda de tecido neuronal é o principal fator causal de doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e a doença Huntington (Vonsattel e Difiglia, 1998; Donev *et al.*, 2009; Bagetta *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011). Assim, uma droga capaz de proteger os neurônios dos processos de morte celular seria um importante instrumento terapêutico para o tratamento de tais doenças. Neste estudo mostramos que os MAPs do mGluR5, tais como DFB, VU1545 e CDPPB, têm efeitos neuroprotetores significativos, reduzindo a morte neuronal induzida por glutamato e NMDA. O efeito neuroprotetor dos MAPs decorre de sua capacidade em ativar AKT sem, entretanto, promover aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (Doria *et al.*, 2013). Neste estudo nós demonstramos que o efeito neuroprotetor dos MAPs é dependente de ativação da AKT, haja vista que o bloqueio desta quinase reverte a neuroproteção mediada pelos MAPs. É importante ressaltar que o potencial dos MAPs como alternativas terapêuticas para doenças neurodegenerativas é ressaltado pelos altos níveis de neuroproteção observados em neurônios BACHD quando estimuladas com concentrações excitotóxicas de glutamato e pela maior eficiência dos MAPs dos mGluR5 na ativação de AKT em culturas primárias de neurônios estriatais BACHD. Além disso, o tratamento com o CDPPB inverteu o déficit de memória exibida pelos camundongos BACHD.

A estimulação do mGluR5 pode levar à ativação de vias capazes de promover neuroproteção ou exacerbar a neurotoxicidade (Bruno *et al.*, 2001; Zeron *et al.*, 2002; Schiefer *et al.*, 2004; Baskys *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2005).

A ativação da liberação de Ca^{2+} intracelular pelo mGluR5 ocorre via proteína $G_{\alpha q/11}$, o que leva à ativação da fosfolipase $\text{C}\beta 1$ e produção de InsP3 . Altos níveis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podem contribuir para processos de excitotoxicidade, exacerbando a morte neuronal (Orrenius *et al.*, 2003). Por outro lado, a estimulação do mGluR5 contribui para a ativação dos NMDAR, sendo que a ativação deste último receptor está intimamente envolvida no processo neurotóxico (Awad *et al.*, 2000). Em suporte a esse pressuposto, foi demonstrado que o bloqueio do mGluR5 pelo MPEP foi capaz de atenuar a apoptose induzida por glutamato em neurônios estriatais de camundongos transgênicos da DH (Tang *et al.*, 2005). No entanto, os nossos dados mostram resultados opostos, uma vez que demonstramos que o MPEP não é capaz de reduzir a morte celular neuronal induzida por glutamato (**Fig. 11**). Além de o MPEP possuir efeito neurotóxico quando aplicado na ausência de glutamato (**Fig. 11**) observamos que ele inverte o efeito neuroprotetor mediado pelo VU1545 (**Fig. 17**). Em nosso estudo, estimulamos os neurônios estriatais com glutamato na presença ou ausência de MPEP por 20 horas, diferente das 8 horas de estimulação realizada por (Tang *et al.*, 2005). É razoável pensar que o efeito neuroprotetor inicial promovido por MPEP decorre do bloqueio da liberação intracelular de Ca^{2+} , entretanto, ele também bloqueia a ativação de vias neuroprotetoras, sugerindo que quando o bloqueio do mGluR5 ocorre por longos períodos, o efeito do MPEP passa a ser neurotóxico (Doria *et al.*, 2013).

O mGluR5, além de promover a liberação de Ca^{2+} através de receptores de InsP3 , pode também ativar vias neuroprotetoras, tais como a ERK1/2 e AKT (Rong *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2005). Corroborando esses resultados, trabalhos recentes indicam que a ativação dos mGluR1/5 promove neuroproteção (Bruno

et al., 2001; Baskys *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012). Neste trabalho nós encontramos que o DHPG é neuroprotetor ante a morte neuronal causada pelo insulto de glutamato (**Fig. 11**), o que sugere que a ativação dos mGluR1/5 é mais eficaz em promover neuroproteção do que o bloqueio dos mGluR1/5. Ocorre, entretanto que a neuroproteção mediada pelo DHPG não é tão eficaz quanto a neuroproteção promovida pelos MAPs do mGluR5. Além disso, ao contrário dos MAPs do mGluR5, o DHPG aumenta a morte neuronal basal (**Fig. 11**). O DHPG, além de ativar vias neuroprotetoras, também promove a liberação de Ca^{2+} a partir dos estoques intracelulares, o que pode contribuir para a excitotoxicidade (Ribeiro *et al.*, 2010). Hipotetizamos neste trabalho que tanto o bloqueio do mGluR5 com MPEP quanto sua ativação por meio do DHPG não são estratégias ideais para promover neuroproteção. Por outro lado, a interação dos MAPs com o mGluR5 estabilizam uma conformação do receptor de forma a facilitar a ativação de vias neuroprotetoras, tais como AKT e ERK1/2, sem desencadear liberação excessiva de Ca^{2+} intracelular.

Trabalhos publicados indicam que a ativação de AKT pelo mGluR5 parece ser independente da via $InsP3/Ca^{2+}$, uma vez que seria o acoplamento de Homer/PIKE/mGluR5 que permitiria a ativação de PI3K por PIKE, promovendo a ativação da AKT (Rong *et al.*, 2003; Hou e Klann, 2004). Além disso, já foi demonstrado que os MAPs do mGluR5 são capazes de ativar determinada via de sinalização em detrimento a outra (Zhang *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2012). A estimulação de astrócitos corticais com DFB, CPPHA e CDPPB na ausência de um agonista do mGluR5 falhou em promover liberação de Ca^{2+} para além dos valores basais (Zhang *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2009). No entanto, o DFB e CPPHA são hábeis em

aumentar a ativação de ERK1/ 2, ainda que na ausência de um agonista do mGluR5 (Zhang et al., 2005). Além disso, cultura primária de neurônios corticais, quando tratados com CDPPB, exibiram níveis elevados de ativação de ERK1/2 (Chen et al. De 2012). O mGluR5 promove a ativação de ERK1/2 e AKT de forma semelhante, e esta ativação ocorre via Homer. Os MAPs do mGluR5, além de serem eficientes em promover ativação de AKT na ausência de um agonista do mGluR5, não desencadeiam aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (Doria et al., 2013). A ativação de AKT por meio dos MAPs do mGluR5 parece ser essencial para prevenir a morte neuronal induzida pelo glutamato, uma vez que o bloqueio da ativação AKT reverte completamente a neuroproteção induzida pelos MAPs (**Fig. 18**).

Demonstramos neste trabalho que o VU1545 parece ser mais eficaz em promover neuroproteção em neurônios estriatais de camundongos BACHD, quando comparado ao controle WT. Quando os neurônios de um camundongo modelo transgênico da DH foram tratados com DHPG, esses não apresentaram níveis de fosforilação de AKT diferentes do controle (Ribeiro et al., 2010). Entretanto, no caso do VU1545, este MAP promoveu maior nível de fosforilação de AKT em neurônios estriatais BACHD em relação ao controle (Doria et al., 2013). Estes dados ilustram o potencial dos MAPs do mGluR5, especialmente o VU1545, como ferramentas terapêuticas para prevenir a morte neuronal que ocorrem na DH. Os MAPs do mGluR5 são bastante seletivos para o mGluR5 e atualmente estão sendo testados no tratamento de outras desordens do sistema nervoso central (Ritzen et al., 2005; Conn, Lindsley, et al., 2009; Rodriguez et al., 2010). Testes *in vivo* em animais e ensaios clínicos em humanos indicam que os MAPs do mGluR5 podem ser boas opções

terapêuticas para o tratamento da esquizofrenia, apresentando baixa toxicidade e boa tolerância pelos pacientes (Rodriguez *et al.*, 2010; Spear *et al.*, 2011; Gray *et al.*, 2012). Os dados aqui apresentados demonstram que a neuroproteção mediada pelos MAPs ocorre via mGluR5 e que esta proteção é dependente da ativação da AKT. Mostramos ainda que os MAPs possuem baixa toxicidade e são eficazes em proteger os neurônios do insulto pelo glutamato. O VU1545 mostrou-se capaz de promover neuroproteção em doses muito baixas e esta neuroproteção foi mais robusta em neurônios BACHD do que em WT. Os experimentos comportamentais indicam que os camundongos BACHD apresentam um desempenho motor e cognitivo inferior aos WT. O tratamento sub-crônico com CDPPB melhorou o déficit de memória relacionado à DH, observado em camundongos BACHD, enfatizando ainda mais o potencial dos MAPs do mGluR5 como ferramentas potenciais para tratar doenças neurodegenerativas, especialmente a DH. Como o diagnóstico da DH pode ser realizado no início da vida por testes moleculares, os MAPs do mGluR5 poderiam ser utilizados para retardar a perda neuronal e, por conseguinte, a progressão da doença.

6. PERSPECTIVAS

O estudo da atividade *in vivo* dos MAPs para o mGluR5 apresenta grande potencial para minimizar o efeito da DH. Como visto que o CDPPB possui atividade *in vitro* e *in vivo*, nossos futuros trabalhos visam:

- Realizar uma curva dose-resposta a fim de identificar doses mínimas de CDPPB que sejam eficazes em promover neuroproteção;
- Avaliar o efeitos da administração crônica de CDPPB a camundongos BACHD por meio dos seguintes experimentos:
 - Fosforilação de ERK e AKT para determinar se a administração de CDPPB é capaz de ativar vias protetoras *in vivo*;
 - Imunohistoquímica para avaliar morte neuronal e formação de agregados huntingtina;
 - Microscopia eletrônica para avaliar a morfologia neuronal e sináptica;
 - Preferência por sacarose para avaliar o efeito antidepressivo do CDPPB sobre os animais WT e BACHD;
 - Reconhecimento de objeto para avaliar se o CDPPB ameniza o comprometimento cognitivo dos animais WT e BACHD;
 - Rota-rod para avaliar se o CDPPB ameniza o comprometimento motor dos animais WT e BACHD;
 - Teste aversivo de comida para avaliar o efeito ansiolítico do CDPPB sobre os animais WT e BACHD;

- Teste de enterrar bola de gude para avaliar o efeito ansiolítico do CDPPB sobre os animais WT e BACHD;
- Ressonância magnética para mensurar alterações de tamanho e volume do cérebro e estruturas específicas de animais BACHD e WT, tratados ou não com CDPPB;

REFERÊNCIAS

AARTS, M. M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. *Curr Mol Med*, v. 4, n. 2, p. 137-47, Mar 2004.

ANBORGH, P. H. et al. 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.

AWAD, H. et al. Activation of metabotropic glutamate receptor 5 has direct excitatory effects and potentiates NMDA receptor currents in neurons of the subthalamic nucleus. *J Neurosci*, v. 20, n. 21, p. 7871-9, Nov 1 2000.

BAGETTA, V. et al. Synaptic dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans*, v. 38, n. 2, p. 493-7, Apr 2010.

BASKYS, A. et al. Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. *Neuropharmacology*, v. 49 Suppl 1, p. 146-56, 2005.

BOCKAERT, J.; PIN, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*, v. 18, n. 7, p. 1723-9, Apr 1 1999.

BRADLEY, S. J.; WATSON, J. M.; CHALLISS, R. A. Effects of positive allosteric modulators on single-cell oscillatory Ca²⁺ signaling initiated by the type 5 metabotropic glutamate receptor. *Mol Pharmacol*, v. 76, n. 6, p. 1302-13, Dec 2009.

BRUNO, V. et al. An activity-dependent switch from facilitation to inhibition in the control of excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci*, v. 13, n. 8, p. 1469-78, Apr 2001.

CALABRESI, P. et al. Metabotropic glutamate receptors and cell-type-specific vulnerability in the striatum: implication for ischemia and Huntington's disease. *Exp Neurol*, v. 158, n. 1, p. 97-108, Jul 1999.

CHEN, N. et al. Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *J Neurochem*, v. 72, n. 5, p. 1890-8, May 1999.

CHEN, T. et al. Protective effects of mGluR5 positive modulators against traumatic neuronal injury through PKC-dependent activation of MEK/ERK pathway. *Neurochem Res*, v. 37, n. 5, p. 983-90, May 2012.

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

CHOO, Y. S. et al. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. Hum Mol Genet, v. 13, n. 14, p. 1407-20, Jul 15 2004.

CONN, P. J. et al. Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. Nat Rev Neurosci, v. 6, n. 10, p. 787-98, Oct 2005.

CONN, P. J.; CHRISTOPOULOS, A.; LINDSLEY, C. W. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. Nat Rev Drug Discov, v. 8, n. 1, p. 41-54, Jan 2009.

CONN, P. J.; LINDSLEY, C. W.; JONES, C. K. Activation of metabotropic glutamate receptors as a novel approach for the treatment of schizophrenia. Trends Pharmacol Sci, v. 30, n. 1, p. 25-31, Jan 2009.

CONN, P. J.; PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v. 37, p. 205-37, 1997.

DE FELICE, F. G. et al. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. J Biol Chem, v. 282, n. 15, p. 11590-601, Apr 13 2007.

DE PAULIS, T. et al. Substituent effects of N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)benzamides on positive allosteric modulation of the metabotropic glutamate-5 receptor in rat cortical astrocytes. J Med Chem, v. 49, n. 11, p. 3332-44, Jun 1 2006.

DONEV, R. et al. Neuronal death in Alzheimer's disease and therapeutic opportunities. J Cell Mol Med, v. 13, n. 11-12, p. 4329-48, Nov-Dec 2009.

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, Mar 12 2013.

DOWIE, M. J. et al. The therapeutic potential of G-protein coupled receptors in Huntington's disease. Pharmacol Ther, v. 128, n. 2, p. 305-23, Nov 2010.

FAIDEAU, M. et al. In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. Hum Mol Genet, v. 19, n. 15, p. 3053-67, Aug 1 2010.

FLOR, P. J. et al. Neuroprotective activity of metabotropic glutamate receptor ligands. Adv Exp Med Biol, v. 513, p. 197-223, 2002.

FOWLER, S. W. et al. Functional interaction of mGlu5 and NMDA receptors in aversive learning in rats. *Neurobiol Learn Mem*, v. 95, n. 1, p. 73-9, Jan 2011.

GRAY, L. J.; HANNAN, A. J.; ZHANG, X. Metabotropic glutamate receptors as targets for novel antipsychotic treatments. *Curr Pharm Biotechnol*, Jan 26 2012.

GUHAN, N.; LU, B. Homer-PIKE complex: a novel link between mGluRI and PI 3-kinase. *Trends Neurosci*, v. 27, n. 11, p. 645-8, Nov 2004.

HERSCH, S. M.; ROSAS, H. D. Neuroprotection for Huntington's disease: ready, set, slow. *Neurotherapeutics*, v. 5, n. 2, p. 226-36, Apr 2008.

HO, A. K. et al. Profile of cognitive progression in early Huntington's disease. *Neurology*, v. 61, n. 12, p. 1702-6, Dec 23 2003.

HOU, L.; KLANN, E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci*, v. 24, n. 28, p. 6352-61, Jul 14 2004.

HUANG, S. S. et al. Effects of mutant huntingtin on mGluR5-mediated dual signaling pathways: implications for therapeutic interventions. *Cell Mol Neurobiol*, v. 30, n. 7, p. 1107-15, Oct 2010.

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

LEA, P. M. T.; FADEN, A. I. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonists MPEP and MTEP. *CNS Drug Rev*, v. 12, n. 2, p. 149-66, Summer 2006.

LI, L. et al. Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration. *FEBS Lett*, v. 566, n. 1-3, p. 261-9, May 21 2004.

LI, S. H.; LI, X. J. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet*, v. 20, n. 3, p. 146-54, Mar 2004.

LINDSLEY, C. W. et al. Discovery of positive allosteric modulators for the metabotropic glutamate receptor subtype 5 from a series of N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)benzamides that potentiate receptor function in vivo. *J Med Chem*, v. 47, n. 24, p. 5825-8, Nov 18 2004.

MAO, L. et al. The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *J Neurosci*, v. 25, n. 10, p. 2741-52, Mar 9 2005.

MASU, M. et al. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature*, v. 349, n. 6312, p. 760-5, Feb 28 1991.

MEHTA, A. et al. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol*, v. 698, n. 1-3, p. 6-18, Jan 5 2013.

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

O'BRIEN, J. A. et al. A family of highly selective allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Mol Pharmacol*, v. 64, n. 3, p. 731-40, Sep 2003.

O'BRIEN, J. A. et al. A novel selective allosteric modulator potentiates the activity of native metabotropic glutamate receptor subtype 5 in rat forebrain. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 309, n. 2, p. 568-77, May 2004.

O'HARA, P. J. et al. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron*, v. 11, n. 1, p. 41-52, Jul 1993.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 4, n. 7, p. 552-65, Jul 2003.

PANOV, A. V. et al. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci*, v. 5, n. 8, p. 731-6, Aug 2002.

RIBEIRO, F. M. et al. Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*, v. 30, n. 1, p. 316-24, Jan 6 2010.

RIBEIRO, F. M.; PIRES, R. G.; FERGUSON, S. S. Huntington's disease and Group I metabotropic glutamate receptors. *Mol Neurobiol*, v. 43, n. 1, p. 1-11, Feb 2011.

RITZEN, A.; MATHIESEN, J. M.; THOMSEN, C. Molecular pharmacology and therapeutic prospects of metabotropic glutamate receptor allosteric modulators. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v. 97, n. 4, p. 202-13, Oct 2005.

RODRIGUEZ, A. L. et al. Discovery of novel allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 reveals chemical and functional diversity and in vivo activity in rat

behavioral models of anxiolytic and antipsychotic activity. *Mol Pharmacol*, v. 78, n. 6, p. 1105-23, Dec 2010.

RONG, R. et al. PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluR1 to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis. *Nat Neurosci*, v. 6, n. 11, p. 1153-61, Nov 2003.

SCHIEFER, J. et al. 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.

SOUTHWELL, A. L.; KO, J.; PATTERSON, P. H. Intrabody gene therapy ameliorates motor, cognitive, and neuropathological symptoms in multiple mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci*, v. 29, n. 43, p. 13589-602, Oct 28 2009.

SPEAR, N. et al. Preclinical profile of a novel metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulator. *Eur J Pharmacol*, v. 659, n. 2-3, p. 146-54, Jun 1 2011.

STAUFFER, S. R. Progress toward positive allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGlu(5)). *ACS Chem Neurosci*, v. 2, n. 8, p. 450-70, Aug 17 2011.

SUN, Y. et al. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem*, v. 276, n. 27, p. 24713-8, Jul 6 2001.

TANG, T. 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. 227-239, 2003.

TANG, T. S. et al. Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 7, p. 2602-7, Feb 15 2005.

USLANER, J. M. et al. Dose-dependent effect of CDPBB, the mGluR5 positive allosteric modulator, on recognition memory is associated with GluR1 and CREB phosphorylation in the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuropharmacology*, v. 57, n. 5-6, p. 531-8, Oct-Nov 2009.

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

WADE, Stephanie L. CDPB Reverses an NMDA Receptor Antagonist-Induced Deficit in Inhibitory Avoidance and Conditioned Taste Aversion Learning in Rats. 2010. 55f. Dissertação (Master Of Arts) - University of Missouri. Columbia.

WISNIEWSKI, K.; CAR, H. (S)-3,5-DHPG: a review. *CNS Drug Rev*, v. 8, n. 1, p. 101-16, Spring 2002.

XU, J. et al. mGluR5 has a critical role in inhibitory learning. *J Neurosci*, v. 29, n. 12, p. 3676-84, Mar 25 2009.

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

ZERON, M. M. et al. Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol Cell Neurosci*, v. 17, n. 1, p. 41-53, Jan 2001.

ZERON, M. M. et al. Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron*, v. 33, n. 6, p. 849-60, Mar 14 2002.

ZHANG, H. et al. Full length mutant huntingtin is required for altered Ca²⁺ signaling and apoptosis of striatal neurons in the YAC mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, v. 31, n. 1, p. 80-8, Jul 2008.

ZHANG, Y.; RODRIGUEZ, A. L.; CONN, P. J. Allosteric potentiators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 have differential effects on different signaling pathways in cortical astrocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 315, n. 3, p. 1212-9, Dec 2005.

Anexos



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

CERTIFICADO

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

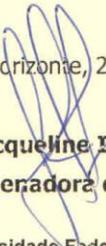
Este certificado expira-se em **27/ 04/ 2016**.

CERTIFICATE

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

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

Belo Horizonte, 2 de Maio de 2011.


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

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

(Mod.Cert. v1.0)

RESEARCH PAPER

Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease

JG Doria^{1*}, FR Silva^{1*}, JM de Souza¹, LB Vieira², TG Carvalho¹, HJ Reis³, GS Pereira⁴, T Dobransky⁵ and FM Ribeiro¹

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ²INCT de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³Departamento de Farmacologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁴Núcleo de Neurociências, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, and ⁵DB Biotech, Kosice, Slovakia

Correspondence

Dr Fabiola M Ribeiro,
Departamento de Bioquímica e
Imunologia, ICB, Universidade
Federal de Minas Gerais, Ave.
Antonio Carlos 6627, Belo
Horizonte CEP: 31270-901,
MG, Brazil. E-mail:
fmribeiro@icb.ufmg.br

*These authors contributed
equally to this manuscript.

Keywords

mGluR5; AKT; cell signalling;
Huntington's disease; glutamate;
cell death; calcium

Received

4 October 2012

Revised

31 December 2012

Accepted

17 February 2013

BACKGROUND AND PURPOSE

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by a polyglutamine expansion in the huntingtin protein. We have previously demonstrated that the cell signalling of the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) is altered in a mouse model of HD. Although mGluR5-dependent protective pathways are more activated in HD neurons, intracellular Ca²⁺ release is also more pronounced, which could contribute to excitotoxicity. In the present study, we aim to investigate whether mGluR5 positive allosteric modulators (PAMs) could activate protective pathways without triggering high levels of Ca²⁺ release and be neuroprotective in HD.

EXPERIMENTAL APPROACH

We performed a neuronal cell death assay to determine which drugs are neuroprotective, Western blot and Ca²⁺ release experiments to investigate the molecular mechanisms involved in this neuroprotection, and object recognition task to determine whether the tested drugs could ameliorate HD memory deficit.

KEY RESULTS

We find that mGluR5 PAMs can protect striatal neurons from the excitotoxic neuronal cell death promoted by elevated concentrations of glutamate and NMDA. mGluR5 PAMs are capable of activating Akt without triggering increased intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i); and Akt blockage leads to loss of PAM-mediated neuroprotection. Importantly, PAMs' potential as drugs that may be used to treat neurodegenerative diseases is highlighted by the neuroprotection exerted by mGluR5 PAMs on striatal neurons from a mouse model of HD, BACHD. Moreover, mGluR5 PAMs can activate neuroprotective pathways more robustly in BACHD mice and ameliorate HD memory deficit.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

mGluR5 PAMs are potential drugs that may be used to treat neurodegenerative diseases, especially HD.

Abbreviations

[Ca²⁺]_i, intracellular Ca²⁺ concentration; CDPPB, 3-Cyano-N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)benzamide; CPPHA, N-[4-Chloro-2-[(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl]phenyl]-2-hydroxybenzamide; DFB, [(3-Fluorophenyl)methylene]hydrazono-3-fluorobenzaldehyde; DHPG, (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine; HD, Huntington's disease; Htt, huntingtin; InsP3, inositol-1,4,5-triphosphate; LY294002, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride; mGluR, metabotropic glutamate receptor; MPEP, 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine; PAM, positive allosteric modulator; PIKE, PI3K enhancer; VU1545, N-[1-(2-Fluorophenyl)-3-phenyl-1H-pyrazol-5-yl]-4-nitrobenzamide; WT, wild type

Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by a polyglutamine expansion in the amino-terminal region of the huntingtin (Htt) protein (Group THsDCR, 1993). HD patients exhibit a progressive neuronal cell loss in the caudate-putamen and neocortical regions of the brain, which leads to motor deterioration, loss of cognitive function, psychiatric disturbance and death (Young, 2003; Li and Li, 2004).

Glutamate is postulated to play an important role in excitotoxic neuronal cell loss (DiFiglia, 1990; Nicoletti *et al.*, 1996; Calabresi *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2010a). Although it is well established that overstimulation of ionotropic glutamate receptors, such as NMDAR, leads to excitotoxicity, the role of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in neuronal cell death processes is not completely understood (Zeron *et al.*, 2002; Schiefer *et al.*, 2004). Group I mGluRs (mGluR1 and mGluR5) are coupled to the activation of G_{αq/11} proteins, which stimulate the activation of phospholipase Cβ1 resulting in diacylglycerol and inositol-1,4,5-triphosphate (InsP3) formation, release of Ca²⁺ from intracellular stores and activation of protein kinase C. Activation of mGluR1/5 expressed in neurons from a mouse model of HD leads to high levels of Ca²⁺ release from intracellular compartments, which can contribute to excitotoxic processes (Tang *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2010b). However, mGluR1/5 stimulation also leads to activation of other signalling pathways important for cell survival/proliferation, such as ERK and Akt (Rong *et al.*, 2003; Hou and Klann, 2004; Mao *et al.*, 2005). Interestingly, mGluR5 activation leads to higher levels of ERK and Akt activation in HD than in control neurons (Ribeiro *et al.*, 2010b). Thus, mGluR5 can produce either excitotoxicity or neuroprotection depending on which cell signalling pathway is activated.

To characterize drugs that could be neuroprotective in HD, we have investigated a number of compounds acting on mGluR5. We find that mGluR5 blockage by 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) is not neuroprotective, although mGluR1/5 activation by (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) promotes neuroprotection against glutamate-induced neuronal death. However, both MPEP and DHPG treatments increase basal neuronal death. The neurotoxic effects of mGluR5 agonists and antagonists might be due to overstimulation of Ca²⁺ release or blockage of protective pathways respectively. mGluR5 positive allosteric modulators (PAMs) can activate one signalling pathway without triggering others (Zhang *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012). Thus, we decided to investigate whether the mGluR5 PAMs, [(3-Fluorophenyl)

methylene]hydrazono-3-fluorobenzaldehyde (DFB), N-[1-(2-Fluorophenyl)-3-phenyl-1H-pyrazol-5-yl]-4-nitrobenzamide (VU1545) and 3-Cyano-N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)benzamide (CDPPB) could have a neuroprotective role. We find that mGluR5 PAMs are capable of protecting neurons from glutamate- and NMDA-induced neuronal cell death. The tested PAMs can activate Akt without promoting intracellular Ca²⁺ release, and blockage of Akt stimulation abrogates PAM-mediated neuroprotection. PAMs are also capable of promoting neuroprotection in striatal neurons from a mouse model of HD, BACHD, and one of the tested PAMs, VU1545, more efficiently activates Akt and promotes neuroprotection in BACHD neurons than in wild-type (WT) neurons. Moreover, the memory deficit exhibited by BACHD mice was ameliorated by CDPPB treatment. Thus, our results indicate that mGluR5 PAMs exhibit the potential to treat HD as they prevent neuronal death and improve memory deficit in an HD mouse model.

Methods

Material

Neurobasal medium, N2 and B27 supplements, GlutaMAX (50.0 µg·mL⁻¹ penicillin and 50.0 µg·mL⁻¹ streptomycin), Fura-2 AM, DAPI, mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) monoclonal antibody, Alexa Fluor 633 goat anti-mouse and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit secondary antibodies, and live/dead viability assay were purchased from Life Technologies (Foster City, CA, USA). Rabbit anti-vesicular GABA transporter (VGAT) was purchased from Merck Millipore (Billerica, MA, USA). DHPG, MPEP, DFB, VU1545 and CDPPB were purchased from Tocris Cookson Inc. (Ellisville, MO, USA). HRP-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody was from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). ECL Western blotting detection reagents were from GE Healthcare (Little Chalfont, UK). Rabbit anti-phospho Akt and anti-Akt monospecific clonal antibodies were from DB Biotech (Kosice, Slovakia). 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride (LY294002) and all other biochemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). All studies involving animals are reported in accordance with the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath *et al.*, 2010).

Mouse model

FVB/NJ (wild type) and FVB/N-Tg (HTT^{97Q})IXwy/J (BACHD) transgenic mice (Gray *et al.*, 2008) were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Mice were

housed in an animal care facility at 23°C on a 12 h light/12 h dark cycle with food and water provided *ad libitum*. Animal care was in accordance with the Universidade Federal de Minas Gerais Ethics Committee on Animal Experimentation, CETEA.

Neuronal primary culture preparation

Neuronal cultures were prepared from the striatal region of E15 mouse embryo brains. Animal procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation, CETEA/UFMG. After dissection, striatal tissue was submitted to trypsin digestion followed by cell dissociation using a fire-polished Pasteur pipette. Cells were plated on poly-L-ornithine-coated dishes in neurobasal medium supplemented with N2 and B27 supplements, 2.0 mM GlutaMAX, 50.0 µg·mL⁻¹ penicillin and 50.0 µg·mL⁻¹ streptomycin. Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator and cultured for 10–12 days *in vitro* with medium replenishment every 4 days.

Immunofluorescence and imaging

Striatal neurons were washed twice in PBS and fixed with 4% formaldehyde in PBS for 20 min. After fixation, cells were washed with PBS and pre-incubated with a permeabilization solution (PBS, 0.2% Triton and 3% BSA) for 60 min. Subsequently, rabbit anti-GAT1 (1:200) or mouse anti-NeuN (1:500) antibodies were added to cells and incubated at 4°C in permeabilization solution for 16 h. Cells were washed and incubated with goat anti-rabbit and anti-mouse antibodies conjugated to Alexa Fluor 633 and Alexa Fluor 488, respectively, for 60 min in permeabilization solution at 1:1000 dilution. Following that, cells were washed and stained with DAPI 1:1000 for 10 min. Detection of immunolabelled proteins was performed using filter sets for excitation of 390/40, 482/18 and 586/15 nm and emission of 446/33 nm for DAPI, 533/59 nm for Alexa Fluor 488-labelled anti-NeuN antibody and 646/68 nm for Alexa Fluor 633-labelled anti-GAT1 antibody. Images were obtained by fluorescence microscopy using an Olympus IX70 Multi-Fluorescence Microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and an Olympus Evolt E-300 camera (Olympus).

Akt activation experiments

Neuronal primary cultures from WT and BACHD embryos were incubated in HBSS for 20 min at 37°C. Cultures were then stimulated with DHPG (from a 10 mM stock solution in HBSS), DFB (from a 10 mM stock solution in DMSO), VU1545 (from a 10 mM stock solution in DMSO) and CDPPB (from a 10 mM stock solution in DMSO) at concentrations indicated in the *figure legends* for 5 min at 37°C. When LY294002 (from a 10 mM stock solution in DMSO) was used, it was added 5 min prior to and kept during mGluR5 stimulation. Neurons were lysed in RIPA buffer (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.2, 0.05 M EDTA, 1% nonidet P40, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease inhibitors (1.0 mM AEBF and 10.0 µg·mL⁻¹ of both leupeptin and aprotinin). About 50.0 µg of total cellular protein for each sample was subjected to SDS-PAGE, followed by electroblotting onto nitrocellulose membranes.

Immunoblotting

Membranes were blocked with 5% BSA in wash buffer (150.0 mM NaCl, 10.0 mM Tris-HCl, pH 7.0 and 0.05% Tween 20) for 1 h and then incubated with rabbit anti-phospho Akt (S473) (1:1000) antibody in wash buffer containing 3% BSA for 2 h at room temperature. Membranes were rinsed three times with wash buffer and then incubated with secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1:5000 in wash buffer containing 3% skim milk for 1 h. Membranes were rinsed three times with wash buffer and incubated with ECL Western blotting detection reagents. Antibodies were then stripped and membranes were incubated with anti-Akt (1:1000) for 2 h and probed with secondary antibody to determine total Akt expression. Non-saturated, immunoreactive Akt bands were quantified by scanning densitometry. Immuno-band intensity was calculated using ImageJ™ software and the number of pixels of Akt phospho-bands was divided by the number of pixels of total Akt to normalize phosphorylation levels of kinases to total kinase expression.

Cell death assay

Neurons were incubated for 20 h with either vehicle or drug, glutamate (from a 10 mM stock solution in H₂O), DHPG, MPEP, DFB, VU1545, CDPPB and/or LY294002, as indicated in the *figure legend*, and cell death was determined by live/dead viability assay, as described previously (Ribeiro *et al.*, 2010b). Briefly, neurons were stained with 2.0 µM calcein acetoxymethyl ester (AM) and 2.0 µM ethidium homodimer-1 for 15 min and the fractions of live (calcein AM positive) and dead (ethidium homodimer-1 positive) cells were determined. Neurons were visualized by fluorescence microscopy using an Olympus IX70 Multi-Fluorescence Microscope. Images were captured using an Olympus Evolt E-300 camera and scored by a blinded observer. A minimum of 300 cells were analysed per well in triplicate using ImageJ software. Dead cells were expressed as a percentage of the total number of cells.

Measurement of intracellular Ca²⁺ concentration

Neuronal primary cultures from WT and BACHD embryos seeded on 12 mm coverslips were loaded with 0.2 µM Fura-2 AM for 20 min at 37°C. Coverslips were washed with HBSS and inserted into a cuvette filled with 2.0 mL of HBSS. Neurons were stimulated with 10.0 µM DFB, 10.0 µM VU1545, 10.0 µM CDPPB, 10.0 µM DHPG or 30.0 mM KCl and illuminated with alternating 345 and 380 nm light, with the 510 nm emission detected using a PTI spectrofluorimeter. Baseline (60 s) measurements were obtained before addition of agonist. At the end of each experiment, SDS 10% (0.1% final) was added to obtain R_{max} , followed by 3.0 M Tris + 400.0 mM EGTA (pH 8.6) for R_{min} , as described by Grynkiewicz *et al.* (1985). The increase in intracellular Ca²⁺ concentration ($[Ca^{2+}]_i$) promoted by depolarization induced by 30.0 mM KCl was taken as 100%.

Novel object recognition task

The object recognition test is based on differential spontaneous exploration of novel and familiar objects (Ennaceur and

Delacour, 1988). The apparatus used was an open box made of PVC (50 × 35 × 25 cm) surmounted by a video camera and a light. Objects were made of glass or plastic and their weight was such that mice could not displace them. As far as we could ascertain, they had no natural significance for mice and they had never been associated with reinforcement. Initial tests showed that mice did not have any preference for the objects used. The general procedure consisted of three different phases: habituation, training and test phase. On the first day, mice were individually submitted to a single habituation session of 10 min, during which they were introduced to the empty arena. On the second day (24 h later), animals were submitted to a single 10 min training session, during which two identical objects were placed in symmetrical positions from the centre of the arena and each object was 15 cm from the side walls. After a 90 min delay, during which mice returned to their home cage, they were reintroduced into the arena for 10 min (test phase) and exposed to two objects, a familiar object and a novel object, placed at the same locations as during the training phase. To control odour cues, the apparatus and objects were cleaned with 70% ethanol between each session and animal. All sessions were performed during the first part of the light cycle, and mice were acclimated to the room for at least 30 min before the beginning of each session. Exploration time was defined as sniffing or touching the object with the nose. Data are expressed as recognition index, calculated according to the following formulae: $\text{time exploring the new object} \times 100 / (\text{time exploring the familiar object} + \text{time exploring the new object})$ (Lazaroni et al., 2012). Two weeks after submitting untreated (NT) mice to object recognition test, animals were treated with CDPPB (5 mg·kg⁻¹) for 7 days and resubmitted to object recognition assay. CDPPB was suspended in 0.5% methylcellulose and injected i.p. at a volume of 2 mL·kg⁻¹.

Data analysis

Means ± SEM are shown for the number of independent experiments indicated in figure legends. GraphPad Prism™ software was used to analyse data for statistical significance and for curve fitting. Statistical significance was determined by ANOVA testing followed by Bonferroni *post hoc* multiple comparison testing.

Results

mGluR5 activation protects against glutamate-induced neuronal cell death

In order to characterize the primary cultures employed in this study, we have used various neuronal-specific markers. DAPI, which is a nuclear marker that stains DNA, was used to determine the total number of cells (Supporting Information Fig. S1B and C). Most cells present in these primary cultures were neurons as they were (about 95%) NeuN positive (Supporting Information Fig. S1A, B and C). Moreover, cultured neurons are mainly medium-sized spiny neurons as they are positive for the VGAT (Supporting Information Fig. S1D, E and F). Neurons that were incubated with fluorescent secondary antibodies in the absence of primary antibodies did not exhibit any staining (Supporting Information Fig. S1G, H and

I). In addition, Neurons that were incubated with anti-excitatory amino acid transporter 3 antibody, which is a marker for glutamatergic neurons, exhibited no staining, indicating that the neurons present in the striatal primary cultures were not contaminated with glutamatergic neurons (data not shown).

Increased levels of glutamate promote neuronal cell death by activating excitotoxic mechanisms mainly due to augmentation of cytosolic Ca²⁺ concentration (DiFiglia, 1990; Nicoletti et al., 1996; Calabresi et al., 1999). Primary-cultured striatal neurons stimulated with 50.0 μM glutamate for 20 h exhibited 29.46 ± 0.7% neuronal cell death above basal levels (Figure 1). Higher levels of glutamate, such as 100.0 and 250.0 μM glutamate, promoted 36.82 ± 2.1 and 52.23 ± 3.5% neuronal cell death respectively (data not shown).

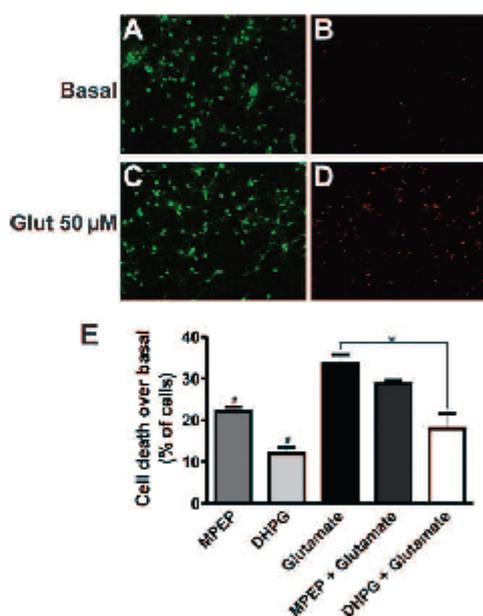


Figure 1

DHPG, but not MPEP, protects against glutamate-induced neuronal cell death. Shown is a representative image for primary-cultured striatal neurons labelled with calcein AM (A, green, live cells) and ethidium homodimer-1 (B, red, dead cells) exhibiting basal neuronal death. Also shown is a representative image for primary-cultured striatal neurons treated with 50.0 μM glutamate for 20 h and labelled with calcein AM (C) and ethidium homodimer-1 (D). (E) Graph shows percentage of neuronal cell death in primary cultured striatal neurons that were treated with 10.0 μM MPEP, 10.0 μM DHPG, 50.0 μM glutamate, 10.0 μM MPEP + 50.0 μM glutamate and 10.0 μM DHPG + 50.0 μM glutamate for 20 h. Data represent the means ± SEM of four independent experiments. * indicates significant difference as compared with neurons treated with glutamate and † indicates significant differences as compared with basal neuronal death ($P < 0.05$).

Glutamate-mediated excitotoxic neuronal cell death occurs mainly via NMDAR activation, although group 1 mGluR stimulation may also play a role in this cell-death process (DiFiglia, 1990; Nicoletti *et al.*, 1996; Calabresi *et al.*, 1999). As it is not clear whether mGluR1/5 activation can exacerbate or protect against neuronal cell death, we decided to investigate whether either MPEP, which is an mGluR5 negative allosteric modulator that acts as an inverse agonist, or DHPG, which is an mGluR1/5 agonist, could protect against glutamate-induced neuronal cell death. 10.0 μ M MPEP was not efficient in protecting neurons from glutamate-induced neuronal cell death (Figure 1E). Moreover, MPEP in the absence of glutamate was neurotoxic (Figure 1E). About 10.0 μ M DHPG treatment decreased glutamate-induced neuronal death; however, DHPG also promoted an increase in neuronal death when applied in the absence of glutamate, which indicates that DHPG can be either neurotoxic or neuroprotective depending on the context of activation (Figure 1E). mGluR5 can both increase cytosolic Ca^{2+} concentration and activate protective pathways (Rong *et al.*, 2003; Hou and Klann, 2004; Mao *et al.*, 2005). Thus, the neurotoxic effects of mGluR5 agonists and antagonists might be due to overstimulation of Ca^{2+} release and blockage of protective pathways respectively.

mGluR5 PAMs activate AKT without increasing intracellular Ca^{2+} concentration and protect against glutamate-induced neuronal cell death

Drugs acting on mGluR5 that could activate protective pathways, such as Akt, but without triggering Ca^{2+} release might have effective neuroprotective actions. It has been demonstrated that mGluR5 PAMs can activate one signalling pathway without triggering others (Zhang *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012). Thus, we decided to investigate whether PAMs in the absence of agonist were able to promote Akt activation without triggering Ca^{2+} release. To test this, striatal neuronal cultures were labelled with Fura-2 AM and stimulated with 10.0 μ M DFB, 10.0 μ M VU1545, 10.0 μ M CDPBB, 10.0 μ M DHPG or 30.0 mM KCl. DFB, VU1545 and CDPBB did not promote an increase in $[Ca^{2+}]_i$ above basal levels (Figure 2). However, DHPG promoted an increase in $[Ca^{2+}]_i$ that was $62.87 \pm 10.0\%$ of that promoted by 30.0 mM KCl depolarization (Figure 2).

To determine whether PAMs could activate Akt in the absence of an mGluR5 agonist, we stimulated primary-cultured striatal neurons with PAMs and determined Akt phosphorylation by Western blot experiments. About 10.0 μ M DFB was not sufficient to activate Akt above basal levels (Figure 3A and B). However, 100.0 μ M DFB was efficient in promoting Akt activation above basal levels, and DFB-mediated Akt activation was as robust as that promoted by 10.0 μ M DHPG (Figure 3A and B). In addition, both VU1545 at the concentrations of 10.0 and 100.0 μ M (Figure 3C and D) and CDPBB also at the concentrations of 10.0 and 100.0 μ M (Figure 3E and F) activated Akt above basal levels as robustly as 10.0 μ M DHPG. As VU1545 and CDPBB promoted Akt phosphorylation as efficiently at the concentration of 10.0 μ M as at the concentration of 100.0 μ M, we decided to test whether these drugs could activate Akt when employed

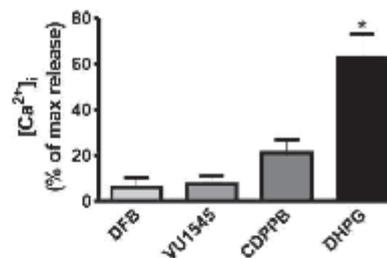


Figure 2

mGluR5 PAMs do not promote increased intracellular Ca^{2+} concentration. Graph shows intracellular Ca^{2+} concentration in primary-cultured striatal neurons stimulated with 10.0 μ M DFB, 10.0 μ M VU1545, 10.0 μ M CDPBB and 10.0 μ M DHPG. Data represent the means \pm SEM of six independent experiments expressed as percentage of 30.0 mM KCl-induced Ca^{2+} release. * indicates significant difference as compared with basal Ca^{2+} release ($P < 0.05$).

at lower concentrations. Both VU1545 (Figure 4A and B) and CDPBB (Figure 4C and D) at the concentrations of 0.1 and 1.0 μ M efficiently promoted Akt activation above basal levels. Moreover, Akt activation by VU1545 (Figure 4A and B) and CDPBB (Figure 4C and D) at the concentrations of 0.1 and 1.0 μ M were as efficient as 10.0 μ M DHPG in promoting Akt activation. These data indicate that mGluR5 PAMs can activate Akt in the absence of an mGluR5 agonist, having the potential to be neuroprotective. Moreover, low concentrations of VU1545 and CDPBB could be sufficient to induce neuroprotection.

As all tested mGluR5 PAMs were efficient in activating Akt without promoting increased $[Ca^{2+}]_i$, we decided to test whether these drugs could be neuroprotective. To investigate this, primary-cultured striatal neurons were treated with glutamate in the presence or absence of PAMs for 20 h. Vehicle, including H_2O , HBSS or DMSO, in the absence of drug was not sufficient to modify neuronal cell death as compared with basal levels (Supporting Information Fig. S2). However, neuronal cell death induced by 50.0 and 100.0 μ M glutamate was significantly reduced by co-stimulating the cultures with DFB, VU1545 and CDPBB at the concentrations of 10.0 μ M (Figure 5A) and 100 nM (Figure 5B). These data highlight the potential of mGluR5 PAMs as neuroprotective drugs.

VU1545 is a very potent neuroprotective drug and this neuroprotection is dependent on Akt activation

To determine the minimum concentration of mGluR5 PAMs necessary to promote neuroprotection, we performed a dose-response experiment using VU1545 at the concentrations of 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0 and 10 000.0 nM. About 1.0 nM VU1545 sufficed to protect neurons from glutamate-induced cell death, although 5.0 nM VU1545 elicited higher levels of neuroprotection (Figure 6A). Interestingly, 5.0 nM VU1545 was as efficient as 10 000.0 nM VU1545 to promote neuroprotection (Figure 6A). Moreover, when applied in the

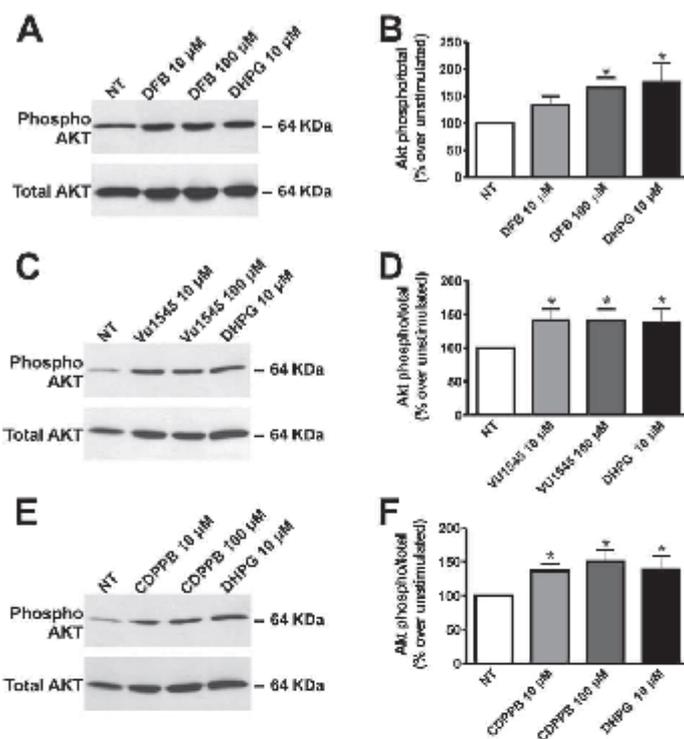


Figure 3

DFB, VU1545 and CDPPB promote AKT activation. Shown are representative immunoblots for phospho- (upper panel) and total-Akt expression (lower panel) in primary-cultured striatal neurons that were either untreated (NT) or treated with 10.0 μ M DHPG, 10.0 or 100.0 μ M DFB (A), 10.0 or 100.0 μ M VU1545 (C) and 10.0 or 100.0 μ M CDPPB (E) for 5 min. About 100.0 μ g of cell lysate was used for each sample. Graphs show the densitometric analysis of phospho-AKT normalized to total-AKT expression in primary-cultured striatal neurons that were either untreated (NT) or treated with 10.0 μ M DHPG, 10.0 or 100.0 μ M DFB (B), 10.0 or 100.0 μ M VU1545 (D) and 10.0 or 100.0 μ M CDPPB (F) for 5 min. Data represent the means \pm SEM of six independent experiments, expressed as percentage of basal Akt phosphorylation. * indicates significant differences as compared with untreated neurons ($P < 0.05$).

absence of glutamate, VU1545 did not increase neuronal death above basal levels at any of the tested concentrations, although we observed a tendency towards augmented neuronal death when VU1545 was applied at high doses such as 10 000.0 nM (Figure 6A). Thus, VU1545 is a very potent neuroprotective drug and, different from DHPG, has no neurotoxic effect when applied in the absence of glutamate.

Most neuronal cell death induced by glutamate is due to NMDAR overstimulation (Zeron *et al.*, 2001). However, it has been shown that stimulation of other glutamate receptors such as group I mGluRs can be neuroprotective (Baskys *et al.*, 2005). To determine whether VU1545-dependent neuroprotection depends on glutamate co-stimulation of mGluRs, we decided to examine whether VU1545 can protect against neurotoxicity induced by NMDA, which does not activate glutamate receptors other than NMDAR. NMDAR stimulation led to high levels of neuronal death, especially when NMDA

was applied at high concentrations such as 10.0 μ M (Figure 6B). About 100.0 nM VU1545 led to neuroprotection against NMDA-induced neuronal cell death and this neuroprotection reached statistical significance in the case of neurons treated with 10.0 μ M NMDA (Figure 6B). These data indicate that VU1545 neuroprotection is independent of glutamate co-stimulation and that this PAM can protect against both glutamate- and NMDA-induced neurotoxicity.

To confirm that the neuroprotective effect exerted by VU1545 was through mGluRs, we introduced MPEP to primary-cultured striatal neurons that were treated with 50.0 μ M glutamate + 100.0 nM VU1545 for 20 h. MPEP completely blocked VU1545-induced neuroprotection (Figure 6C), strongly implicating mGluRs in this neuroprotective mechanism. To determine whether Akt activation by PAMs is important for mGluRs PAMs' neuroprotective effects, we blocked Akt stimulation by using a PI3K inhibitor,

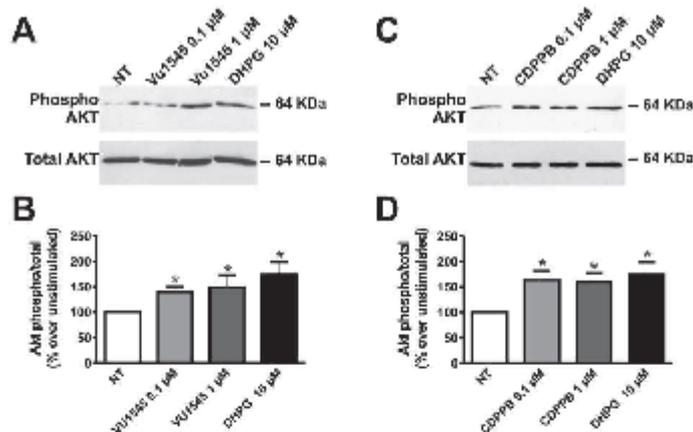


Figure 4

VU1545 and CDPPB promote AKT activation even at lower concentrations. Shown are representative immunoblots for phospho- (upper panel) and total-AKT expression (lower panel) in primary-cultured striatal neurons that were either untreated (NT) or treated with 10 μ M DHPG, 0.1 or 1.0 μ M VU1545 (A) and 0.1 or 1.0 μ M CDPPB (C) for 5 min. About 100.0 μ g of cell lysate was used for each sample. Graphs show the densitometric analysis of phospho-AKT normalized to total-AKT expression in primary-cultured striatal neurons that were either untreated (NT) or treated with 10.0 μ M DHPG, 0.1 or 1.0 μ M VU1545 (B) and 0.1 or 1.0 μ M CDPPB (D) for 5 min. Data represent the means \pm SEM of six independent experiments, expressed as percentage of basal AKT phosphorylation. * indicates significant differences as compared with untreated neurons ($P < 0.05$).

LY294002. PI3K is responsible for phosphorylating Akt on serine-473, promoting Akt activation (Rong *et al.*, 2003). Thus, blocking PI3K with LY293002 leads to Akt inhibition. Western blot experiments indicated that primary-cultured striatal neurons that were pre-incubated with 25.0 μ M LY294002 for 5 min prior to 10.0 μ M VU1545 stimulation for 5 min exhibited no Akt phosphorylation above basal levels (data not shown). To test whether Akt activation by VU1545 was responsible for VU1545-induced neuroprotection, we added 25.0 μ M LY294002 to primary-cultured striatal neurons that were treated with either 50.0 μ M glutamate or 50.0 μ M glutamate + 1.0 μ M VU1545 for 20 h. VU1545 neuroprotection against glutamate-induced neuronal cell death was eliminated by the addition of LY294002 (Figure 6D). These data indicate that VU1545-mediated neuroprotection is dependent on Akt activation.

mGluR5 PAMs can protect striatal neurons from a mouse model of HD against glutamate-induced neuronal cell death

To test whether mGluR5 PAMs could be efficient neuroprotective drugs in neurodegenerative diseases, we tested these compounds in primary-cultured striatal neurons from a mouse model of HD, BACHD. When both WT and BACHD neurons were co-stimulated with 1.0 μ M DFB (Figure 7A), 1.0 μ M VU1545 (Figure 7B) and 1.0 μ M CDPPB (Figure 7C), glutamate-induced neuronal cell death was significantly reduced. Interestingly, VU1545 neuroprotective effect appeared higher in BACHD neurons than in WT neurons (Figure 7C). Supporting these observations, statistical analysis

(two-way ANOVA) indicated that there was a significant interaction between genotype and VU1545 treatment [\pm (2.030) = 3.446; $P = 0.045$].

We have previously demonstrated that AKT activation by DHPG appeared more pronounced in neurons from a knock-in mouse model of HD than in control mice, although these difference did not reach statistical significance (Ribeiro *et al.*, 2010b). Thus, we decided to investigate whether the increased neuroprotective effect of VU1545 in BACHD neurons could be due to increased Akt activation in BACHD striatal neurons. To test this hypothesis, primary-cultured striatal neurons from WT and BACHD embryos were stimulated with either 10.0 μ M DHPG or 10.0 μ M VU1545. DHPG promoted Akt activation in BACHD neurons to the same levels as those observed in WT neurons (Figure 8A and B). However, VU1545-mediated Akt phosphorylation was more pronounced in BACHD neurons than in WT neurons (Figure 8A and B).

Stimulation of striatal neurons from a knock-in and from a transgenic mouse model of HD with either glutamate or DHPG causes increased $[Ca^{2+}]_i$, as compared with that observed in neurons from control mice (Tang *et al.*, 2003; 2005; Ribeiro *et al.*, 2010b). VU1545 did not increase $[Ca^{2+}]_i$ in WT striatal neurons above basal levels (Figure 2). To test the effect of VU1545 on $[Ca^{2+}]_i$ in BACHD neurons, primary-cultured striatal neurons from BACHD mice were labelled with Fura-2 AM and stimulated with 10.0 μ M VU1545. As observed in the case of WT neurons, VU1545 did not promote an increase in BACHD neurons $[Ca^{2+}]_i$ above basal levels (data not shown). Moreover, the levels of $[Ca^{2+}]_i$ in BACHD neurons were not different from those observed in

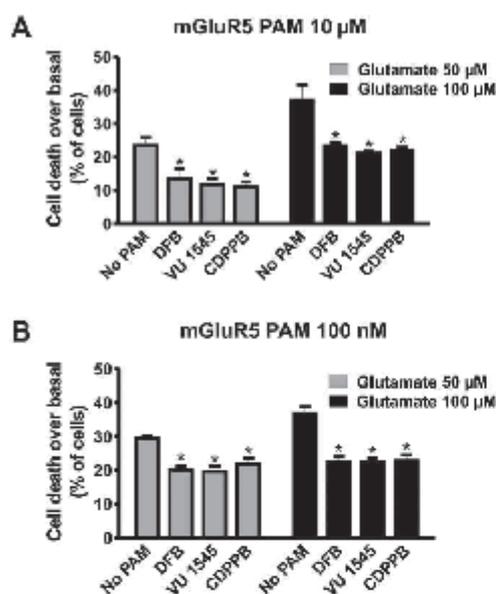


Figure 5 mGluR5 PAMs protect against glutamate-induced neuronal cell death. Graph shows percentage of neuronal cell death induced by either 50.0 or 100.0 µM glutamate in primary-cultured striatal neurons that were either untreated (no PAM) or treated with DFB, VU1545 and CDPPB at the concentrations of 10.0 µM (A) and 100.0 nM (B) for 20 h. Data represent the means ± SEM of four independent experiments. * indicates significant differences as compared with neurons treated with glutamate in the absence of PAMs ($P < 0.05$).

WT neurons (data not shown). Taken together, these data indicate that VU1545 does not trigger increased $[Ca^{2+}]_i$ when stimulating either BACHD or WT striatal neurons. Moreover, VU1545 can more efficiently promote Akt phosphorylation and neuroprotection in BACHD than in WT neurons.

CDPPB ameliorates BACHD deficit in novel object recognition memory

It has been previously shown that BACHD mice exhibit learning impairment (Southwell et al., 2009). In order to determine whether mGluR5 PAMs exhibit *in vivo* activity, we investigated whether CDPPB could improve BACHD mice performance in the object recognition task, which measures mice preference for a novel object. First, mice are allowed to explore two identical objects for 10 min. Following a 90 min delay, mice are reintroduced into the arena for 10 min and exposed to two objects: a familiar object and a novel object. The time mice explore the new object is calculated as a percentage of the total time exploring both familiar and novel objects. NT WT mice remembered the familiar object as the percentage of time exploring the new object was signifi-

cantly higher than 50% (Figure 9). However, NT BACHD mice displayed no preference for novel object (Figure 9). To determine whether CDPPB could ameliorate the memory deficit exhibited by BACHD mice, we injected WT and BACHD mice with CDPPB 5 mg·kg⁻¹ i.p. for 7 days and measured whether treated mice improved memory performance. Although CDPPB did not improve WT mice performance in the object recognition task, CDPPB-treated BACHD mice exhibited a significant preference for novel object, indicating that CDPPB can reverse the memory deficit exhibited by the HD mouse model (Figure 9). These data highlight the clinical potential of mGluR5 PAMs for treating neurodegenerative diseases.

Discussion

The loss of neuronal tissue is the main factor leading to the development of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease and HD (Vonsattel and DiFiglia, 1998; Donev et al., 2009; Bagetta et al., 2010; Ribero et al., 2011). Thus, a drug that could protect neurons from cell-death processes would be an important therapeutic tool to treat such diseases. In the present study, we show that mGluR5 PAMs, such as DFB, VU1545 and CDPPB, have significant neuroprotective effects, reducing glutamate- and NMDA-induced neuronal cell death. mGluR5 PAMs are capable of activating Akt without promoting increased $[Ca^{2+}]_i$. Moreover, mGluR5 PAMs’ neuroprotective effects are dependent on Akt activation, as blockage of this kinase leads to loss of PAM-mediated neuroprotection. Importantly, PAMs’ potential as drugs that may be used to treat neurodegenerative diseases is highlighted by the high levels of neuroprotection exerted by PAMs on BACHD neurons stimulated with excitotoxic concentrations of glutamate and by the higher efficiency of mGluR5 PAMs in activating Akt in primary-cultured BACHD striatal neurons. Moreover, CDPPB treatment reversed the memory deficit exhibited by BACHD mice.

mGluR5 stimulation can lead to activation of pathways that can either protect neurons from cell death or exacerbate neurotoxicity (Bruno et al., 2001; Zeron et al., 2002; Schiefer et al., 2004; Baskys et al., 2005; Tang et al., 2005). Activation of intracellular Ca^{2+} release by mGluR5 occurs via $G\alpha_{q11}$ proteins, leading to activation of phospholipase C β 1 and InSP3 production. High levels of $[Ca^{2+}]_i$ can contribute to excitotoxic processes, exacerbating neuronal death (Orrenius et al., 2003). Moreover, mGluR5 contributes to NMDAR activation, which may also add to neurotoxicity as NMDAR stimulation is intimately associated with excitotoxic neuronal cell death (Awad et al., 2000). In agreement with this rationale, mGluR5 blockage with MPEP decreases glutamate-induced apoptosis of striatal neurons from a transgenic HD mouse model (Tang et al., 2005). However, our data show opposite results, as we have demonstrated that MPEP is not capable of reducing glutamate-induced neuronal cell death (Figure 1E). In addition, MPEP is neurotoxic when applied in the absence of glutamate (Figure 1E) and reverses VU1545-mediated neuroprotective effect (Figure 6C). We have stimulated neurons with glutamate in the presence or absence of MPEP for 20 h instead of 8 h as performed by Tang et al. (2005). Therefore, it is possible that MPEP could be neuroprotective initially as it blocks Ca^{2+} release, but as it also blocks activation of protec-

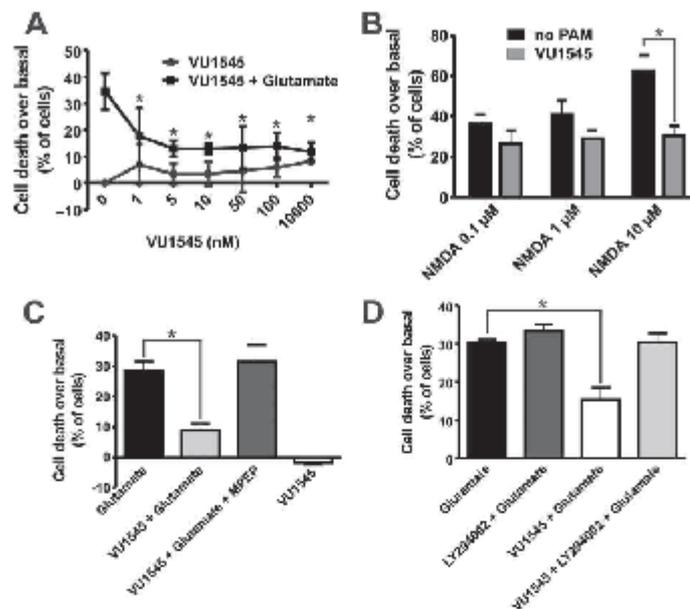


Figure 6

VU1545 is a very potent neuroprotective drug and this neuroprotection is dependent on Akt activation. (A) Graph shows the effect of VU1545 at the concentrations of 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0 and 10 000.0 nM on the percentage of neuronal cell death in primary-cultured striatal neurons that were either untreated (NT) or treated with 50.0 μ M glutamate for 20 h. Data represent the means \pm SEM of four independent experiments. * indicates significant differences as compared with neurons treated with glutamate in the absence of VU1545 ($P < 0.05$). (B) Graph shows percentage of neuronal cell death induced by NMDA at the concentrations of 0.1, 1.0 or 10.0 μ M in primary-cultured striatal neurons that were either NT (no VU1545) or treated with VU1545 100.0 nM for 20 h. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments. * indicates significant differences as compared with neurons treated with 10.0 μ M NMDA in the absence of VU1545 ($P < 0.05$). (C) Graph shows percentage of neuronal cell death in primary-cultured striatal neurons that were treated with 50.0 μ M glutamate, 100.0 nM VU1545 + 50.0 μ M glutamate + 10.0 μ M MPEP and 100.0 nM VU1545 for 20 h. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments. * indicates significant difference as compared with neurons treated with glutamate ($P < 0.05$). (D) Graph shows percentage of neuronal cell death in primary-cultured striatal neurons that were treated with 50.0 μ M glutamate, 25.0 μ M LY294002 + 50.0 μ M glutamate, 1.0 μ M VU1545 + 50.0 μ M glutamate and 1.0 μ M VU1545 + 25.0 μ M LY294002 + 50.0 μ M glutamate for 20 h. Data represent the means \pm SEM of four independent experiments. * indicates significant difference as compared with neurons treated with glutamate ($P < 0.05$).

tive pathways, it could become toxic when applied for longer periods. In addition to activating Ca^{2+} release via InsP3 receptors, mGluR5 can also activate neuroprotective pathways, such as ERK1/2 and Akt (Rong *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2005). Consistent with an mGluR5 neuroprotective role, most recently published data indicate that mGluR1/5 activation leads to neuroprotection (Bruno *et al.*, 2001; Baskys *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2010b; Chen *et al.*, 2012). We have shown here that DHPG is neuroprotective against glutamate-induced neuronal cell death (Figure 1E), which indicates that mGluR1/5 activation is a better strategy to promote neuroprotection than mGluR1/5 blockage. However, this DHPG-mediated neuroprotection is not as robust as that offered by mGluR5 PAMs (compare Figure 1E and Figure 6). Moreover, different from mGluR5 PAMs, DHPG increases basal neuronal death (Figure 1E). In addition to activating neuroprotective pathways, DHPG also triggers Ca^{2+} release from intracellular

stores, which might contribute to excitotoxicity. We hypothesize that neither blocking mGluR5 with MPEP nor activating it with DHPG is the best strategy to promote neuroprotection. Conversely, interaction of PAMs with mGluR5 could stabilize a conformation of the receptor that would facilitate activation of neuroprotective pathways, including Akt and ERK1/2, without triggering $\text{G}\alpha_{q11}/\text{InsP3}/\text{Ca}^{2+}$ activation.

The activation of Akt by group I mGluR5 involves PI3K and phosphoinositide-dependent kinase (Rong *et al.*, 2003; Hou and Klann, 2004). A PI3K enhancer (PIKE) couples group I mGluR5 to PI3K via Homer proteins (Rong *et al.*, 2003). Importantly, formation of the functional complex mGluR1-Homer-PIKE allows PI3K activation by PIKE, which results in reduced apoptosis (Rong *et al.*, 2003). Thus, activation of Akt by mGluR5 appears to be independent of the InsP3/ Ca^{2+} pathway. It has been demonstrated that mGluR5 PAMs have the potential to activate one signaling pathway without trig-

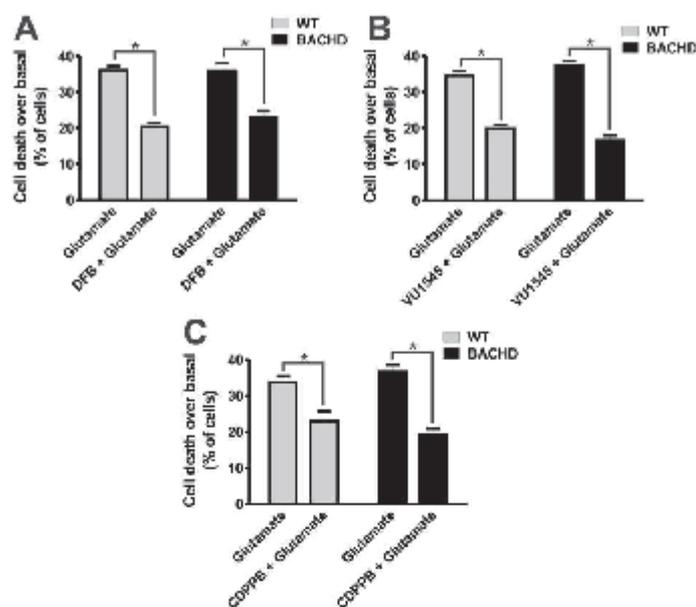


Figure 7

mGluRS PAMs protect BACHD neurons from glutamate-induced neuronal cell death. Graphs show percentage of neuronal cell death induced by 50.0 μM glutamate in either BACHD or wild-type (WT) primary cultured striatal neurons in the presence or absence of 1.0 μM DFB (A), 1.0 μM VU1545 (B) and 1.0 μM CDPPB (C) for 20 h. Data represent the means ± SEM of four to six independent experiments. * indicates significant differences as compared with neurons treated with glutamate in the absence of PAMs ($P < 0.05$).

gering others (Zhang *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012). Stimulation of cortical astrocytes with DFB, N-[4-Chloro-2-[(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl]phenyl]-2-hydroxybenzamide (CPPHA) and CDPPB in the absence of mGluRS agonist fails to increase Ca^{2+} release above basal levels (Zhang *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2009). However, DFB and CPPHA increase ERK1/2 activation even in the absence of mGluRS agonist in cortical astrocytes (Zhang *et al.*, 2005). Moreover, primary-cultured cortical neurons treated with CDPPB exhibit high levels of ERK1/2 activation (Chen *et al.*, 2012). As mGluRS activates ERK1/2 and Akt in a similar manner, which occurs via Homer, we decided to investigate whether mGluRS PAMs could activate Akt in the absence of agonist. Our data show that mGluRS PAMs efficiently activate Akt without promoting increased $[Ca^{2+}]_i$. Akt activation by mGluRS PAMs appears to be essential for preventing glutamate-induced neuronal death, as blockage of Akt activation abrogates PAM-induced neuroprotection.

Akt activation can protect against neuronal death (Datta *et al.*, 1999; Kandel and Hay, 1999). Moreover, Akt can also promote phosphorylation of mutated Htt protein, which functions to reduce Htt aggregate formation and neuronal cell death, providing a protective pathway in HD (Humbert *et al.*, 2002; Warby *et al.*, 2009). We and others have shown that basal Akt phosphorylation is increased in HD (Gines

et al., 2003; Ribeiro *et al.*, 2010b). Furthermore, basal Akt activation appears to be dependent on glutamate receptors as both NMDAR antagonist MK801 and mGluRS antagonist MPEP decrease Akt activation in HD neurons to WT levels (Gines *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2010b). DHPG-mediated Akt activation in striatal neurons from a knock-in (Ribeiro *et al.*, 2010b) and a transgenic (Figure 8) mouse model of HD is not different from that observed in control neurons. Interestingly, VU1545 promotes higher levels of Akt activation in BACHD striatal neurons than in WT neurons (Figure 8). Moreover, VU1545 appears to be more efficient in preventing cell death of BACHD neurons than of WT neurons (Figure 7). These data highlight the potential of mGluRS PAMs, especially VU1545, as therapeutic tools to prevent the neuronal cell death that takes place in HD.

mGluRS PAMs are very selective for mGluRS and are currently being tested to treat other disorders of the CNS (Ritzen *et al.*, 2005; Conn *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2010). *In vivo* animal tests and human clinical trials indicate that mGluRS PAMs might be good therapeutic options to treat schizophrenia, exhibiting low toxicity and being well tolerated by patients (Rodriguez *et al.*, 2010; Spear *et al.*, 2011; Gray *et al.*, 2012). The data presented here demonstrate that mGluRS PAMs can activate Akt without promoting increased $[Ca^{2+}]_i$, offering neuroprotection against glutamate- and NMDA-

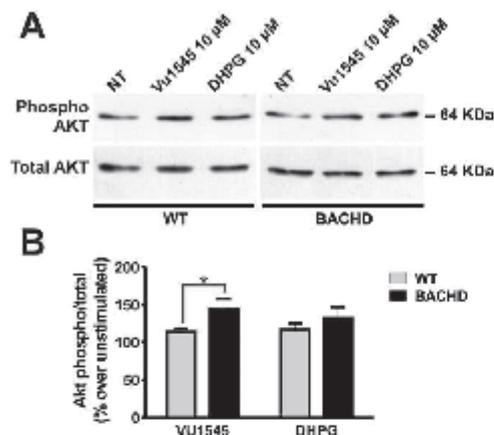


Figure 8

VU1545 activates Akt more robustly in BACHD than in wild-type (WT) neurons. (A) Shown is a representative immunoblot for phospho- (upper panel) and total-Akt expression (lower panel) in primary cultured striatal neurons from either WT or BACHD mice that were either untreated (NT) or treated with 10.0 μ M DHPG or 10.0 μ M VU1545. About 100.0 μ g of cell lysate was used for each sample. (B) Graph shows the densitometric analysis of phospho-Akt normalized to total-Akt expression in primary-cultured striatal neurons from either WT or BACHD mice that were either NT or treated with 10.0 μ M DHPG or 10.0 μ M VU1545. Data represent the means \pm SEM of six independent experiments, expressed as percentage of basal Akt phosphorylation. * indicates significant difference as compared with matched treated WT neurons ($P < 0.05$).

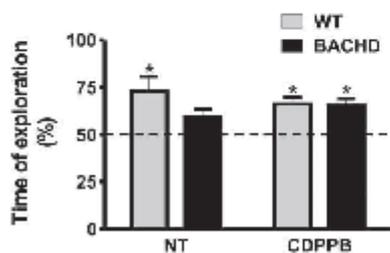


Figure 9

CDPPB ameliorates BACHD deficit in novel object recognition memory. Graph shows percentage of time of novel object exploration calculated as an index between time spent exploring a novel object \times 100/time with both objects. A score of 50% indicates no preference. Two weeks after untreated (NT) wild-type (WT, $n = 6$) and BACHD ($n = 6$) mice were submitted to object recognition test, both WT and BACHD were treated with CDPPB i.p. 5 mg·kg⁻¹ for 7 days and reassessed for recognition memory. Data represent the means \pm SEM, expressed as percentage of time exploring both objects. * indicates significant differences from chance exploration (50%) ($P < 0.05$).

induced neurotoxicity. Moreover, VU1545 activates Akt and protects neurons from a mouse model of HD in a more robust manner than that observed in the case of WT neurons. Importantly, CDPPB sub-chronic treatment ameliorated HD-related memory deficit observed in BACHD mice, further emphasizing mGluR5 PAMs' potential as drugs to treat neurodegenerative diseases, especially HD. As HD diagnosis can be established early in life by genotypic tests, mGluR5 PAMs could be used to slow neuronal loss and, consequently, disease progression.

Acknowledgements

We thank L. R. Souza for technical assistance. H. J. R. and G. S. P. are CNPq research fellow. This work was supported by CNPq grant to F. M. R. and by the grant from the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic to T. D., DB Biotech, Slovakia.

Conflict of Interest

None.

References

- Awad H, Hubert GW, Smith Y, Levey AI, Conn PJ (2000). Activation of metabotropic glutamate receptor 5 has direct excitatory effects and potentiates NMDA receptor currents in neurons of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 20: 7871–7879.
- Bagetta V, Ghiglieri V, Sgobio C, Calabresi P, Picconi B (2010). Synaptic dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans* 38: 493–497.
- Baskys A, Bayazitov I, Fang L, Blaahjerg M, Poulsen FR, Zimmer J (2005). Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. *Neuropharmacology* 49 (Suppl. 1): 146–156.
- Bradley SJ, Watson JM, Challiss RA (2009). Effects of positive allosteric modulators on single-cell oscillatory Ca²⁺ signaling initiated by the type 5 metabotropic glutamate receptor. *Mol Pharmacol* 76: 1302–1313.
- Bruno V, Battaglia G, Copani A, Cespedes VM, Galindo MF, Cena V *et al.* (2001). An activity-dependent switch from facilitation to inhibition in the control of excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci* 13: 1469–1478.
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Bernardi G (1999). Metabotropic glutamate receptors and cell-type-specific vulnerability in the striatum: implication for ischemia and Huntington's disease. *Exp Neurol* 158: 97–108.
- Chen T, Cao L, Dong W, Luo P, Liu W, Qu Y *et al.* (2012). Protective effects of mGluR5 positive modulators against traumatic neuronal injury through PKC-dependent activation of MEK/ERK pathway. *Neurochem Res* 37: 983–990.
- Conn PJ, Lindsley CW, Jones CK (2009). Activation of metabotropic glutamate receptors as a novel approach for the treatment of schizophrenia. *Trends Pharmacol Sci* 30: 25–31.

- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13: 2905–2927.
- DiFiglia M (1990). Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* 13: 286–289.
- Donev R, Kolev M, Millet B, Thome J (2009). Neuronal death in Alzheimer's disease and therapeutic opportunities. *J Cell Mol Med* 13: 4329–4348.
- Ennaceur A, Delacour J (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behav Brain Res* 31: 47–59.
- Gines S, Ivanova E, Seong IS, Saura CA, MacDonald ME (2003). Enhanced Akt signaling is an early pro-survival response that reflects N-methyl-D-aspartate receptor activation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *J Biol Chem* 278: 50514–50522.
- Gray LJ, Hannan AJ, Zhang X (2012). Metabotropic glutamate receptors as targets for novel antipsychotic treatments. *Curr Pharm Biotechnol* 13: 1522–1534.
- Gray M, Shirasaki DI, Cepeda C, Andre VM, Wilburn B, Lu XH et al. (2008). Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J Neurosci* 28: 6182–6195.
- Group THsDCR (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971–983.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440–3450.
- Hou L, Klann E (2004). Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* 24: 6352–6361.
- Humbert S, Bryson EA, Cordelières FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S et al. (2002). The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* 2: 831–837.
- Kandel ES, Hay N (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253: 210–229.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. *Br J Pharmacol* 160: 1577–1579.
- Lazaroni TL, Raslan AC, Fontes WR, de Oliveira ML, Bader M, Alentia N et al. (2012). Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 97: 113–123.
- Li SH, Li XJ (2004). Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 20: 146–154.
- McGrath J, Drummond G, McLachlan E, Kilkenny C, Wainwright C (2010). Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1573–1576.
- Mao L, Yang L, Tang Q, Samdani S, Zhang G, Wang JQ (2005). The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *J Neurosci* 25: 2741–2752.
- Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G, Knöpfel T (1996). Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* 19: 267–271.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 552–565.
- Ribeiro FM, Paquet M, Cregan SP, Ferguson SS (2010a). Group I metabotropic glutamate receptor signalling and its implication in neurological disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9: 574–595.
- Ribeiro FM, Paquet M, Ferreira LT, Cregan T, Swan P, Cregan SP et al. (2010b). Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 30: 316–324.
- Ribeiro FM, Pires RG, Ferguson SS (2011). Huntington's disease and Group I metabotropic glutamate receptors. *Mol Neurobiol* 43: 1–11.
- Ritzen A, Mathiesen JM, Thomsen C (2005). Molecular pharmacology and therapeutic prospects of metabotropic glutamate receptor allosteric modulators. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97: 202–213.
- Rodríguez AL, Grier MD, Jones CK, Herman EJ, Kane AS, Smith RL et al. (2010). Discovery of novel allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 reveals chemical and functional diversity and in vivo activity in rat behavioral models of anxiolytic and antipsychotic activity. *Mol Pharmacol* 78: 1105–1123.
- Rong R, Ahn JY, Huang H, Nagata E, Kalman D, Kapp JA et al. (2003). PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluR1 to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis. *Nat Neurosci* 6: 1153–1161.
- Schiefer J, Sprunken A, Puls C, Luesse HG, Milkereit A, Milkereit E et al. (2004). 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* 1019: 246–254.
- Southwell AL, Ko J, Patterson PH (2009). Intrabody gene therapy ameliorates motor, cognitive, and neuropathological symptoms in multiple mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci* 29: 13589–13602.
- Spear N, Gadiant RA, Wilkins DE, Do M, Smith JS, Zeller KL et al. (2011). Preclinical profile of a novel metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulator. *Eur J Pharmacol* 659: 146–154.
- Tang TS, Tu H, Chan EY, Maximov A, Wang Z, Wellington CL et al. (2003). Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron* 39: 227–239.
- Tang TS, Slow E, Lupu V, Stavrovskaya IG, Sugimori M, Llinas R et al. (2005). Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2602–2607.
- Vonsattel JP, DiFiglia M (1998). Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 369–384.
- Warby SC, Doty CN, Graham RK, Shively J, Singaraja RR, Hayden MR (2009). Phosphorylation of huntingtin reduces the accumulation of its nuclear fragments. *Mol Cell Neurosci* 40: 121–127.
- Young AB (2003). Huntingtin in health and disease. *J Clin Invest* 111: 299–302.
- Zeron MM, Chen N, Moshaver A, Lee AT, Wellington CL, Hayden MR et al. (2001). Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol Cell Neurosci* 17: 41–53.

Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P *et al.* (2002). Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 33: 849–860.

Zhang Y, Rodriguez AL, Conn PJ (2005). Allosteric potentiators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 have differential effects on different signaling pathways in cortical astrocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 1212–1219.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Figure S1 Neuronal primary cultures are mainly composed of medium-sized spiny neurons. Shown are representative fluorescence micrographs demonstrating the presence of both Alexa Fluor 488-conjugated anti-NeuN antibody (green)

(A) and DAPI staining (blue) (B) in the same striatal neurons (C). Shown are representative fluorescence micrographs demonstrating the presence of both Alexa Fluor 633-conjugated anti-VGAT antibody (red) (D) and DAPI staining (blue) (E) in the same striatal neurons (F). Shown are representative fluorescence micrographs demonstrating the absence of either Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 633 (G) and the presence of DAPI staining (blue) (H) in the same striatal neurons (I). Data are representative images of multiple cells from three independent experiments.

Figure S2 Drug dilution vehicles (water, HBSS and DMSO) do not modify neuronal cell death. Graph shows percentage of neuronal cell death in primary-cultured striatal neurons that were treated with H₂O (1:1000 v/v), HBSS (1:1000 v/v), DMSO (1:1000 v/v), DMSO (1:10,000 v/v) and 50.0 μ M glutamate (1:1000 v/v) for 20 h. All vehicles were diluted as indicated (v/v) in complete neurobasal medium. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments.