



Tese de Doutorado

Juliana Guimarães Dória

Efeito dos moduladores alostéricos positivos do receptor metabotrópico de glutamato 5, CDPPB e VU0409551, em camundongos modelo da doença de Huntington

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Instituto de Ciências Biológicas (ICB)

Belo Horizonte/MG, Agosto de 2017

Juliana Guimarães Dória

Tese de Doutorado

Efeito dos moduladores alostéricos positivos do receptor metabotrópico de glutamato 5, CDPBB e VU0409551, em camundongos modelo da doença de Huntington

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Neurociências, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do Título de doutora em Neurociências.

Orientadora: Profa. Fabiola M. Ribeiro

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- ICB
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS
BELO HORIZONTE – Agosto de 2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Guimarães Dória, Juliana

Efeito dos moduladores alostéricos positivos do receptor metabotrópico de glutamato 5, CDPPB e VU0409551, em camundongos modelo da doença de Huntington [manuscrito] / Juliana Guimarães Dória. - 2017.

134 p. : il.

Orientador: Fabiola Mara Ribeiro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto Ciências Biológicas.

1.Doença de Huntington. 2.Plasticidade Sináptica.
3.Moduladores Alostéricos. 4.mGluR5. I.Mara Ribeiro, Fabiola.
II.Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto Ciências Biológicas. III.Título.

Agências de fomento

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

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

CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Fabíola, por me aceitar em seu lab desde o mestrado, pela confiança, por todas as oportunidades, pelo aprendizado, indo a bancada comigo quando necessário. Obrigada especialmente por aceitar e entender todas as minhas idas e vindas. De coração, muito obrigada!

Em especial, agradeço as minhas colegas e amigas Toniana, Jéssica, Isabella, Flávia e Edleusa, sem vocês meu trabalho teria sido muito difícil. Obrigada por terem sido meus olhos e minhas mãos em todas as vezes que estive fora. Devo muito a vocês!

Obrigada a Ana Luísa pela ajuda e companhia, na maioria das vezes até tarde da noite, inclusive finais de semana. Ao Pablo, por ter dividido seus conhecimentos. A Adriane pelo zelo com os animais do biotério.

Ao prof. Jeffrey Conn, por ter me recebido em seu laboratório e nos ceder o VU0409551, com o qual desenvolvi a segunda etapa do meu doutorado. Obrigada aos membros do VCNDD, especialmente a Hyekyung, Luis e Tristano.

A profa. Luciene, pelos conhecimentos compartilhados e pelo carinho.

A profa. Cristina Guatimosim e seus alunos, especialmente a Jéssica e Herman pelas lindas imagens de microscopia eletrônica.

Aos professores Helton e Antônio, por abrirem a porta de seu laboratório desde o início, fiz do Lab de Neurofarmacologia minha segunda casa no ICB.

Agradeço a todos do NNC, por abrir as portas do laboratório e me socorrer com reagentes.

A todos do RNAi, com quem dividimos não apenas o laboratório, mas também conhecimento, alegrias, preocupações, lanches. Vocês fazem parte da minha vida.

Obrigada a Mainha, por sempre me receber em sua casa de braços abertos, por ouvir minhas angústias e compartilhar de minhas alegrias.

Obrigada a Dan, pelo apoio incondicional e por entender todas as vezes que eu tive de partir. Aos meus amados Nobel e Jolie, por não saírem do meu lado, mesmo durante as madrugadas, a tranquilidade deles me acalma.

“.... Tornamo-nos ridículos, incapazes, cômicos. Mas isso não é quem nós somos. Isso é a nossa doença. E como qualquer doença, tem uma causa, uma progressão, e pode ter uma cura...”

Do filme *Para sempre Alice*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.2 Doença de Huntington	16
1.2 Proteína huntingtina.....	18
1.3 mGluR5 e doença de Huntington	20
1.4 Excitotoxicidade e neurodegeneração	23
1.5 mGluR5 e plasticidade sináptica	26
1.6 Compostos com ação no mGluR5.....	29
2. Justificativa.....	32
3. Objetivo Geral	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Materiais.....	34
4.2 METODOS.....	35
4.2.1 Modelo animal.....	35
4.2.2 Administração dos compostos	35
4.2.3 Cultura primária de neurônios	37
4.2.4 Ensaio de morte neuronal:	38
4.2.5 Imunohistoquímica.....	40
4.2.6 <i>Biotinilação de superfície celular</i>	41
4.2.7 Western blot.....	42
4.2.8 <i>RT-PCR quantitativo</i>	43
4.2.9 Análise Histológica e Microscopia eletrônica de transmissão	44
4.2.10 Análise das imagens de microscopia eletrônica de transmissão	45
4.2.13 Reconhecimento de objeto.....	47
4.2.14 Teste de Rotarod	48
4.2.15 <i>Condicionamento ao medo</i>	48
4.2.16 <i>Campo aberto</i>	49
4.3 Análise estatística	50
5. Capítulo 01	51
5.1 <i>Objetivos específicos do capítulo 01</i>	51
5.2. RESULTADOS	52
5.2.1 <i>O CDPPB melhora a performance comportamental de camundongos BACHD</i>	52
5.2.2 <i>O CDPPB protege os neurônios estriatais da morte induzida por glutamato in vitro</i>	55
5.2.3 <i>O CDPPB aumenta a fosforilação de ERK1/2 em camundongos BACHD com 30 semanas de idade</i>	58
5.2.4 <i>Expressão do mRNA de BDNF no córtex de camundongos BACHD</i>	60
5.2.5 <i>A expressão do mRNA de BDNF é aumentada pelo tratamento com CDPPB</i>	61
5.2.6 <i>O tratamento crônico com CDPPB reduz a morte celular</i>	62
5.2.7 <i>O CDPPB reverte a redução do peso de regiões cerebrais</i>	64
5.2.8 <i>O tratamento crônico com CDPPB previne a morte neuronal</i>	65
5.2.9 <i>O tratamento crônico com CDPPB aumenta a fosforilação de AKT</i>	68
5.2.10 <i>O tratamento com CDPPB reduz o número de agregados de huntingtina</i> ..	69
5.2.11 <i>O CDPPB normaliza o número de vesículas na zona ativa</i>	72
5.3 Discussão do capítulo 01	74
6. Capítulo 02	77
6.1 Objetivos específicos do capítulo 02	77

6.2 Resultados	78
6.2.1 O tratamento com o VU0409551 melhora o déficit de memória apresentado por camundongos BACHD.	78
6.2.2 O VU0409551 aumenta a expressão de mGluR5 na membrana neuronal.	82
6.2.3 O tratamento com VU0409551 aumenta os níveis de c-Fos no hipocampo ..	85
6.2.4 O tratamento com VU0409551 aumenta os níveis de mRNA de BDNF	86
6.2.5 O VU0409551 protege os neurônios estriatais da morte induzida por glutamato in vitro	87
6.2.6 O tratamento com VU0409551 aumenta os níveis de mRNA de Arg3.1/ARC 90	
6.2.7 O tratamento com VU0409551 aumenta os níveis de mRNA de syntaxina 1A e PSD-95	91
6.2.8 Alterações na morfologia e número das espinhas dendríticas	94
6.3 Discussão do capítulo 02	97
7. Conclusão	102
CEUA	103
Publicações ao longo do doutorado.....	104
Referências Bibliográficas	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cérebro de indivíduo com DH e de indivíduos que não apresentam a doença.

Figura 2. Sinalização celular em neurônio estriatal controle e na DH.

Figura 3: Morfologia das espinhas dendríticas.

Figura 4: Mini bomba osmótica

Figura 5: Esquema do tratamento com CDPPB.

Figura 6: Princípio do ensaio de teste de viabilidade celular

Figura 7: Efeito do tratamento com CDPPB no desempenho motor de camundongos BACHD.

Figura 8: Efeito do tratamento com CDPPB sobre a memória de camundongos BACHD.

Figura 9: Curva concentração-reposta do CDPPB.

Figura 10: Efeito do tratamento com CDPPB sobre a fosforilação de ERK1/2 em camundongos BACHD tratados com CDPPB.

Figura 11: Níveis do mRNA do BDNF em camundongos BACHD com 52 semanas de idade.

Figura 12: Níveis do mRNA do BDNF em camundongos BACHD tratados com CDPPB com 30 semanas de idade.

Figura 13: Efeito do tratamento crônico com CDPPB sobre a morte celular no estriado de camundongos BACHD com 30 semanas de idade

Figura 14: Efeito do CDPPB sobre o peso do cérebro de camundongos BACHD com 30 semanas de idade.

Figura 15: Efeito do tratamento crônico com CDPPB sobre a morte neuronal no estriado de camundongos BACHD com 52 semanas de idade.

Figura 16: Fosforilação de AKT em camundongos WT e BACHD tratados com CDPPB.

Figura 17: Número de agregados de huntingtina em BACHD com 52 semanas tratados com CDPPB.

Figura 18: Efeito do tratamento crônico com CDPPB na morfologia das sinapses de camundongos BACHD com 30 semanas de idade.

Figura 19: Efeitos do tratamento com VU0409551 na memória.

Figura 20: Efeitos do tratamento com VU0409551 sobre a locomoção.

Figura 21: Efeito do tratamento com VU0409551 sobre a expressão de mGluR5 total e na membrana plasmática.

Figura 22: Níveis de c-Fos após o tratamento com VU0409551.

Figura 23: Efeito do VU0409551 sobre níveis de mRNA de BDNF.

Figura 24: Curva concentração-resposta do VU0409551 em neurônios estriatais.

Figura 25: Efeito do tratamento com VU0409551 sobre os níveis de mRNA de Arg3.1/ARC.

Figura 26: Efeito do tratamento com VU0409551 sobre os níveis de mRNA de Syntaxina 1A e PSD-95.

Figura 27: Imagem de um terminal dendrítico obtido pelo microscópio Confocal Nikon C2.

Figura 28: Efeito do tratamento com VU0409551 sobre a densidade e morfologia das espinhas dendríticas presentes na formação hipocampal.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[6,7-Dihydro-2-(phenoxyethyl)oxazolo[5,4-c]pyridin-5(4H)yl(fluorophenyl)methanone (VU040951)

2-metil-6(feniletinil) piridina (MPEP)

3-Cyano-*N*-(1,3-diphenyl-1*H*-pyrazol-5-yl)benzamide (CDPPB)3 dihydroxyphenylglycine (DHPG)

ACSF: fluido cerebrospinal artificial

AMPA: Ácido aminopropiônico

Proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK1/2)

Depressão a longo prazo (LTD)

Diacilglicerol (DAG)

Dimetil-sulfoxido (DMSO)

Doença de Alzheimer (DA)

Doença de Parkinson (DP)

Elemento responsivo a AMPc (CREB)

Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

Fosfatidilinositol (PI)

Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂)

Fosfolipase C (PLC)

Glutamina (CAG)

Guanosina difosfato (GDP)

Guanosina trifosfato (GTP)

Huntingtina (*Htt*)

Ácido gama-aminobutírico (GABA)

Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3)

Intraperitoneal (i.p.)

Metaloproteinase (MMP10)

Moduladores alostéricos negativos (MANs)

Moduladores alostéricos positivos (MAPs)

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

Neurônios espinhosos médios (MSNs)

nM: nanomolar,

Paraformaldeído (PFA)

Poliglutamina (polyQ)

Potencialização de longo prazo (LTP)

Proteína de densidade pós-sináptica-95 (PSD-95)

Proteína quinase C (PKC)

Proteína regulada por atividade e associada ao citoesqueleto (Arg3.1/ARC)

Proteínas quinase B (AKT)

Quinase 1 dependentes de fosfoinositois (PDK1)

Receptores ionotrópicos (iGluRs)

Receptores metabotrópicos (mGluRs)

Retículo endoplasmático (RE)

SNC (sistema nervoso central)

Solução tampão fosfato salino (PBS)

Subcutâneo (s.c.)

µg: nanogramas

µL: microlitros

µM: Micromolar

RESUMO

A doença de Huntington (DH) é uma desordem neurodegenerativa, hereditária e progressiva que evolui inevitavelmente para a morte. O glutamato possui um papel importante em uma ampla gama de funções no sistema nervoso central, ativando tanto receptores ionotrópicos quanto receptores metabotrópicos (mGluRs). O mGluR5, em especial, é um alvo potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para uma série de distúrbios neurológicos e psiquiátricos, bem como para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como é o caso da Doença de Huntington. Estudos anteriores mostraram que os moduladores alostéricos positivos para o mGluR5 são eficazes em reduzir a morte neuronal induzida pelo insulto de glutamato, bem como ativar vias de neuroproteção como ERK1/2 e AKT *in vitro*. Assim, o objetivo desse trabalho foi determinar se os MAPs, CDPPB e VU0409551, seriam capazes de promover neuroproteção *in vivo* e melhorar o déficit de memória característico da DH. Nossos resultados demonstraram que o tratamento crônico com CDPPB é capaz de melhorar os sinais patológicos e fenotípicos da DH exibidos pelos camundongos BACHD por promover o aumento dos níveis de fosforilação de ERK1/2 e AKT, de aumentar a expressão do mRNA de BDNF, reduzir a formação de agregados tóxicos da HTT mutada e a morte neuronal, além de melhorar os déficits de memória e motores apresentados por camundongos BACHD. O tratamento sub-crônico com VU0409551 foi capaz de reverter o déficit de memória em camundongos BACHD, estabilizando o mGluR5 na membrana celular e promovendo o aumento da ativação de vias de sinalização importantes para a plasticidade sináptica, levando a um aumento da densidade e da maturação das espinhas dendríticas.

Palavras chave: Doença de Huntington, mGluR5, neurodegeneração, CDPPB, VU0409551, plasticidade sináptica, BACHD

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a hereditary and progressive neurodegenerative disorder that inevitably leads to death. Glutamate plays an important role in a wide variety of functions in the central nervous system by activating ionotropic and metabotropic glutamate receptors (mGluRs). mGluR5 in particular has potential as a target for the development of new therapeutic agents to treat a wide range of neurological and psychiatric disorders, as well as neurodegenerative disease, such as HD. Previous studies have shown that mGluR5 positive allosteric modulators are effective in reducing neuronal cell death triggered by glutamate insult, as well as in activating neuroprotective pathways, such as ERK1/2 and AKT *in vitro*. The main goal of this study was to determine whether CDPBB and VU0409551 would be able to promote neuroprotection *in vivo* and rescue the memory deficit that takes place in HD. Our results demonstrate that CDPBB treatment improves the pathological and phenotypic signs exhibited by a mouse model of HD, the BACHD. CDPBB treatment increased the phosphorylation levels of ERK1/2 and AKT, enhanced the expression of BDNF, reduced the formation of toxic aggregates of the mutated huntingtin protein (HTT) and decreased neuronal cell loss in BACHD animals. Moreover, behavioral studies have shown that CDPBB chronic treatment improved BACHD mice motor and cognitive deficits. VU0409551 subchronic treatment was effective to reverse the memory deficit exhibited by BACHD mice and to improve parameters related to synaptic plasticity, stabilizing mGluR5 at the cell surface and stimulating cell signaling pathways important for synaptic plasticity and promoting increased density and maturation of the dendritic spines.

Keywords: Huntington's disease, mGluR5, neurodegeneration, CDPBB, VU0409551, synaptic plasticity, BACHD

1. INTRODUÇÃO

1.2 Doença de Huntington

A Doença de Huntington (DH), descrita pela primeira vez por George Huntington em 1872, é uma desordem neurodegenerativa, autossômica dominante, cujos sintomas se manifestam tipicamente na meia vida do indivíduo, evoluem por cerca de 10 a 15 anos, culminando inevitavelmente na morte (revisado por DOWIE ET AL., 2010). Os sinais da DH variam entre os indivíduos, mas são usualmente caracterizados por uma tríade de sinais motores, cognitivos e psiquiátricos. Os sinais motores podem ser divididos em movimentos coreiformes com distúrbios de marcha, que podem aparecer no início da doença, e comprometimento motor, como bradicinesia e rigidez que são observadas em pacientes na fase avançada da doença (Saudou e Humbert, 2016). Os sinais cognitivos incluem declínio de memória e redução da atenção e flexibilidade mental, que evoluem progressivamente a medida que a doença progride (Landles e Bates, 2004). Os sinais psiquiátricos/emocionais incluem depressão, apatia, irritabilidade, impulsividade e desinibição social (Saudou e Humbert, 2016).

Os sinais da DH são causados por uma atrofia severa do estriado devido à morte seletiva dos neurônios espinhosos médios (MSNs), o qual é um dos principais achados desta doença (Difiglia, 1990). A atrofia e morte neuronal ocorrem de forma progressiva, havendo uma correlação positiva entre o nível de acometimento neuropatológico, as alterações bioquímicas e o grau de comprometimento físico na doença (Myers et al., 1991) (**FIG. 1**). Os MSNs são o tipo celular predominante no estriado, e são principalmente vulneráveis na DH (Difiglia, 1990). Eles utilizam o

neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA), dinorfina, encefalina ou substância P, como co-transmissores (Gil-mohapel e Rego, 2011). Podem ser observados diferentes graus de degeneração nos MSNs. Nos estados iniciais e intermediários da DH, os neurônios que expressam encefalina são mais susceptíveis que os que contém substância P, enquanto que no estado mais avançado todos os neurônios são afetados, embora os interneurônios sejam relativamente preservados (Reiner et al., 1988; Albin et al., 1992).

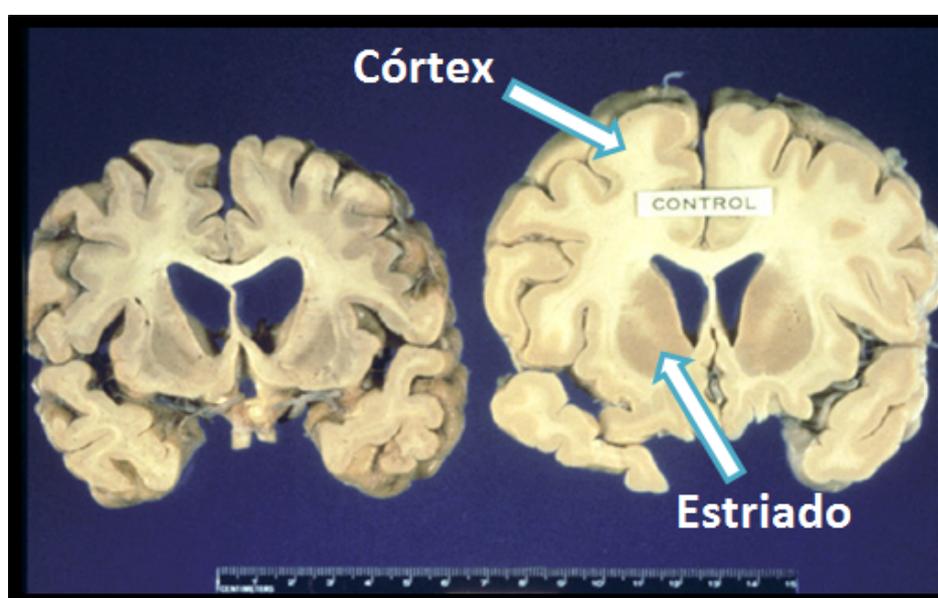


Figura 1. Cérebro de indivíduo com DH e de indivíduos que não apresentam a doença. A figura mostra a redução do volume dos núcleos putâmen e caudado (estriado) e de regiões neocorticais do cérebro com DH. Ao lado o cérebro de um indivíduo que não apresenta a DH.

Fonte: Universidade de Alberta/Canadá

Disponível em <<https://ualberta.ca/newsandevents/newarticles/2012/02/huntingtonsdiseasetherapy>>

Acesso em Julho/2017

Embora as alterações no sistema nervoso central (SNC) sejam as características mais proeminentes na DH, os pacientes também são acometidos por alterações imunes e metabólicas, perda e enfraquecimento muscular, cardiopatias e osteoporose (van der Burg et al., 2009). A DH evolui para a morte aproximadamente 20 anos após o início dos sintomas, e na maioria das vezes, os pacientes morrem por pneumonia (Saudou e Humbert, 2016). Não existem dados concretos que definam a prevalência da DH no Brasil, embora estima-se que nos Estados Unidos a prevalência seja de 5 a 10 casos por 100.000 habitantes (Hersch e Rosas, 2008).

1.2 Proteína huntingtina

A DH é causada por uma expansão instável de repetições de trinucleotídeos CAG, códon referente ao aminoácido glutamina, no gene *huntingtina* (*HTT*), o qual codifica a proteína HTT, formando uma cauda polimórfica de poliglutamina (polyQ). Indivíduos não afetados pela DH possuem até 35 repetições de CAG, sendo que a população em geral apresenta em média de 17 a 20 repetições. Repetições que excedam 35 CAG ocasionam a DH (Kremer et al., 1994).

A HTT é expressa em todas as células do corpo e encontra-se predominantemente na região extranuclear. Entretanto, a HTT mutante acumula-se progressivamente no núcleo dos neurônios do cérebro humano e de modelos animais de DH, originando as inclusões nucleares (Tanaka et al., 2006; Rosas et al., 2010).

A HTT forma complexos com outras proteínas, sendo que a HTT selvagem e mutante permitem um total de 350 e 363 interações diferentes, respectivamente, no cérebro de camundongos (Culver et al., 2012). Algumas dessas interações estão implicadas em funções celulares como, *splicing* de RNA, endocitose, tráfego vesicular

e homeostase da célula (Harjes e Wanker, 2003). A extensa lista de interações da HTT suporta a ideia de que ela esteja envolvida em diversas vias celulares. A maioria das proteínas com as quais a HTT interage encontram-se nas seguintes categorias: dinâmica celular (citoesqueleto, endocitose, tráfego e adesão), metabolismo, *turnover* de proteína e expressão gênica (transcrição e processamento de RNA); além de proteínas envolvidas na transdução de sinais (Saudou e Humbert, 2016).

A HTT é alvo de proteases que agem em diversos sítios, alguns dos quais permanecem não identificados. As proteases que clivam a HTT incluem caspases, calpaina, catepsinas e metaloproteinase (MMP10) (GAFNI; 2002; GOLDBERG et al., 1996). Estes sítios proteolíticos são encontrados em ambos HTT e HTT mutante, havendo um aumento de atividade dessas proteases no cérebro dos pacientes com DH (Saudou e Humbert, 2016). O aumento da atividade proteolítica leva à clivagem da HTT mutante, gerando fragmentos N-terminais contendo cauda polyQ anormal (Saudou e Humbert, 2016). Estes fragmentos, uma vez gerados, translocam para o núcleo promovendo morte neuronal por interferir na transcrição celular (Ross e Tabrizi, 2011; Valor, 2014). Ainda não há um consenso quanto ao papel dos agregados da HTT mutante. Alguns autores os descrevem como tóxicos, uma vez que podem interferir em funções celulares ocasionando morte celular, outros os descrevem como protetores, uma vez que estes reduziriam os níveis da forma solúvel e tóxica da proteína (Miller et al., 2010). Alguns dos efeitos da HTT mutante são: inibição da autofagia e da proteassoma; indução de anormalidades mitocondriais e metabólicas; alteração da endocitose e transporte por microtúbulos; distúrbio na sinalização de cálcio; excitotoxicidade causada pelo aumento da liberação de glutamato, dentre outros (Ross e Tabrizi, 2011). A toxicidade dos agregados pode variar de acordo com

o estágio da doença, com o tamanho do fragmento e com sua localização subcelular (Saudou e Humbert, 2016).

Um grande número de estudos relaciona a HTT selvagem à propriedade de sobrevivência neuronal. Como exemplo, a expressão da HTT selvagem em linhagens celulares e neurônios em cultura primária foi capaz de proteger estas células de diversos insultos de morte, incluindo a própria HTT mutante (Ho et al., 2001; Rigamonti et al., 2001; Leavitt et al., 2006). Da mesma forma, a depleção da HTT selvagem torna as células mais vulneráveis à morte celular (Zhang et al., 2006). Um dos mecanismos propostos pelos quais a HTT selvagem promove a sobrevivência neuronal é pelo bloqueio da ativação das caspases 3 e 9 (Rigamonti et al., 2001). Além disso, a HTT pode facilitar a sobrevivência neuronal por favorecer a transcrição, transporte axonal e liberação de vesículas contendo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), uma importante neurotrofina para os neurônios estriatais, liberado principalmente pelas sinapses cortico-estriatais (Zuccato et al., 2003; Gauthier et al., 2004). Assim, a ideia de que a HTT possui uma função no cérebro é reforçada pela descoberta do link entre os níveis de HTT e os níveis do BDNF (Tartari et al., 2008).

1.3 mGluR5 e doença de Huntington

Glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do cérebro de mamíferos, é responsável por uma variedade de funções fisiológicas como plasticidade sináptica, aprendizado, memória e outras funções cognitivas (Mehta *et al.*, 2013). No entanto, níveis elevados de glutamato podem promover a morte neuronal por excitotoxicidade (Calabresi *et al.*, 1999; Difiglia, 1990). O glutamato atua por meio de duas categorias de receptores: ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos

(mGluRs). Os iGluRs, formado pelos receptores de NMDA, AMPA e Kainato, são canais iônicos ligante-dependentes, localizados principalmente na região pós-sináptica, que se abrem após a ligação do glutamato e permitem a passagem dos íons Ca^{2+} , Na^+ e K^+ via receptores de NMDA e entrada de Na^+ e Ca^{2+} pelos receptores AMPA, mediando a neurotransmissão rápida (Masu et al., 1991). Já os mGluRs são acoplados ao sistema de segundo mensageiro via proteínas G (O'Brien et al., 2003).

Os mGluRs são divididos em três grandes grupos. O grupo I (mGluR 1 e 5), que são acoplados à proteína $G\alpha_q$. Os grupos II (mGluR 2 e 3) e III (mGluR 4, 6, 7 e 8) são acoplados à proteína $G\alpha_i$ e são negativamente acoplados a atividade da adenilato ciclase, reprimindo a transmissão sináptica excitatória por inibir a liberação de glutamato. Estes dois últimos grupos são distintos por sua farmacologia e homologia de sequência (Calabresi et al., 1999). Entre os três grandes grupos de mGluRs, o Grupo I, em especial o mGluR5, desperta bastante interesse na patologia da DH devido a sua distribuição no cérebro e sua atividade regulatória em múltiplos sistemas de sinalização, pela sua maior expressão nos MSNs estriatais, as principais células afetadas na DH, e por sua interação física com a HTT mutante (Anborgh et al., 2005; Mao et al., 2005). O mGluR5 é amplamente expresso no SNC, sendo expresso por neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, além de também ser expresso por células tronco cerebrais (Balázs et al., 1997). Embora seja encontrado pré e pós-sinapticamente, localizam-se principalmente na região peri-sináptica da membrana pós-sináptica das sinapses glutamatérgicas (Shigemoto et al., 1993). Os mGluR5 também são expressos no núcleo accumbens dos núcleos da base, córtex cerebral, células piramidais das

regiões CA1 e CA3 do hipocampo e nas células granulares no bulbo olfatório (Shigemoto et al., 1993; Testa et al., 1994).

A ativação do mGluR5 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 , por trocar guanossina difosfato (GDP) por guanossina trifosfato (GTP). Uma vez ativada através da ligação à GTP, a subunidade α se desacopla das subunidades $\beta\gamma$, ativando a fosfolipase C (PLC) que catalisa a hidrólise do lipídeo de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). O DAG permanece na membrana plasmática e atua no recrutamento da proteína quinase C (PKC) dependente de Ca²⁺. O IP3, hidrossolúvel, se difunde pelo citoplasma e se associa a receptores de IP3 presentes na membrana do retículo endoplasmático (RE). A ativação destes receptores de IP3 leva à liberação de Ca²⁺ do RE para o citoplasma, onde esse íon participa da ativação da PKC e de várias outras proteínas essenciais para a sobrevivência neuronal (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 sobrevivência e proliferação celular, assim como para a regulação da plasticidade sináptica, tais como a ativação das proteínas quinase B (AKT) e da proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK1/2) (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). O mGluR5 forma complexo com outras proteínas ancoradoras/sinalizadoras na densidade pós-sináptica, como a proteína de densidade pós-sináptica-95 (PSD-95), Shank e Homer. (Xiao *et al.*, 2000; Sheng, 2002). Por meio de sua longa porção C-terminal intracelular, o mGluR5 se liga a todos os três membros da família Homer, incluindo *Homer 1a*,

que antagoniza a ligação do mGluR5 com formas longas e constitutivamente expressas da proteína Homer (Homer 1b/c, Homer 2a/b e Homer3) (**FIG. 2**) (Xiao et al., 2000).

Os receptores mGluR5 são altamente expressos nos neurônios 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 a camundongos controle *Hdh*^{Q20/Q20} (Ribeiro et al., 2010). Em camundongos *Hdh*^{Q111/Q111}, a HTT mutante promove dessensibilização dos receptores mGluR5, o que resulta em uma menor formação de IP3 e em um aumento da liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares (Ribeiro et al., 2010). O aumento da liberação de Ca²⁺ em níveis reduzidos de IP3 pode ser explicada pela sensibilização dos receptores de IP3 pela HTT mutante (Tang et al., 2003). A formação do complexo mGluR5/Homer/PIKE é a via alternativa através da qual o PIP3 formado recruta AKT e a quinase 1 dependentes de fosfoinositois (PDK1) para a membrana plasmática, promovendo a fosforilação de AKT. Desde modo, a ativação de AKT por mGluR5 parece ser independente de Gαq. As proteínas Homer também medeiam a ativação de ERK1/2 (Guhan e Lu, 2004; Mao et al., 2005). O mGluR5 se liga fisicamente ao receptor NMDA na densidade pós-sináptica, regulando sua função por meio do complexo multi-proteico Homer1b/c/Shank, sendo que essa interação pode ser rompida por Homer 1a (Bertaso et al., 2010).

1.4 Excitotoxicidade e neurodegeneração

Excitotoxicidade é o processo pelo qual aminoácidos excitatórios promovem neurodegeneração, sendo uma das causas de morte celular em muitas doenças

agudas do SNC, incluindo acidente vascular encefálico e traumatismo, e ocorrendo também em doenças crônicas, como a esclerose amiotrófica lateral, doença de Parkinson (DP), doença de Alzheimer (DA) e DH (Calabresi et al., 1999; Sokol et al., 2011). As primeiras observações que relacionaram a excitotoxicidade com a patogênese da DH foram obtidas a partir de estudos com ácido kaínico, um aminoácido excitatório, em que a injeção inestraestriatal deste ácido promove intensa morte neuronal no estriado (DiFiglia, 1990). Do mesmo modo, a lenta infusão de glutamato foi eficaz em provocar morte neuronal no núcleo caudado (McBean e Roberts, 1984).

O estriado recebe *input* excitatório glutamatérgico de várias regiões do córtex cerebral (Gil-mohapel e Rego, 2011). Em condições fisiológicas, o glutamato liberado a partir de terminais pré-sinápticos atua sob receptores pós-sinápticos promovendo despolarização. A maioria dos MSNs expressam receptores de NMDA, cuja atividade pode ser potencializada pelo mGluR5, contribuindo para a excitotoxicidade (Tang et al., 2003). O cálcio desempenha um papel fisiológico importante nas células, atuando como um segundo mensageiro universal que participa das atividades celulares mais importantes em células eucarióticas (Brini et al., 2014). A ativação crônica dos receptores de NMDA promove o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . 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). Ao menos quatro mecanismos podem explicar o aumento do Ca^{2+} intracelular na DH: 1) a proteína HTT mutante causa uma sensibilização do receptor de NMDA, resultando em um aumento da entrada de Ca^{2+} nos neurônios (Sun et al., 2001; Chen et al., 2008); 2) a HTT desestabiliza a regulação mitocondrial de Ca^{2+} (Panov et al., 2003); 3) a HTT sensibiliza o receptor de IP3,

o que resulta em uma maior liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (Tang et al., 2005a) e a HTT aumenta a expressão na membrana plasmática e as correntes dos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem do tipo N, aumentando a entrada de Ca^{2+} (Silva et al., 2017). O aumento exacerbado da concentração intracelular de Ca^{2+} está associado à excitotoxicidade e morte neuronal (Pisani et al., 1997). Por exemplo, o excesso de Ca^{2+} no citosol é transportado para a mitocôndria. Com o tempo, a capacidade de armazenamento de Ca^{2+} pela mitocôndria é excedida, ocasionando na liberação do citocromo-c para o citosol e a ativação de caspases que participam da via intrínseca de apoptose (Calabresi et al., 1999; Tang et al., 2003, 2005a). Dessa forma, um fármaco neuroprotetor com ação no mGluR5 não deveria levar a um aumento adicional dos níveis de Ca^{2+} , uma vez que os mesmos já se encontram elevados na DH.

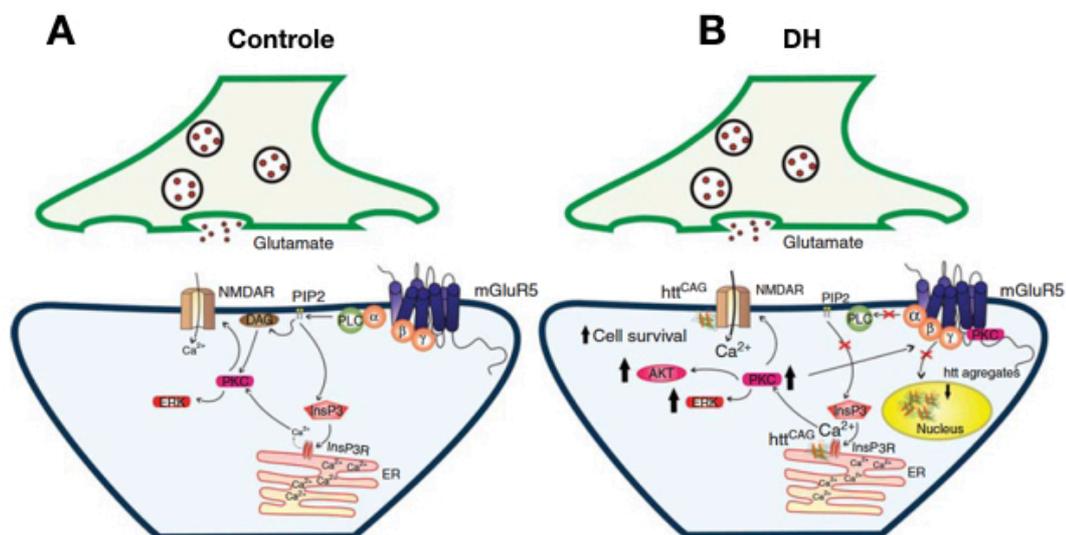


Figura 2. Sinalização celular em neurônio estriatal controle e na DH. O glutamato liberado estimula os receptores NMDA e mGluR5 em neurônios estriatais. **(A).** Em neurônios controle, a ativação dos receptores NMDA promove influxo de Ca^{2+} . A ativação do mGluR5 estimula a ativação da fosfolipase C (PLC) que promove a

hidrólise de fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato (PIP₂), formando diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), que se liga ao seu receptor no retículo endoplasmático (RE), e promove a liberação de Ca²⁺. A ativação de PKC leva a fosforilação de ERK1/2 e do receptor NMDA, facilitando a ativação deste receptor. O mGluR5 liga-se ao receptor NMDA através de proteínas ancoradoras como Homer, PSD-95 e Shank.

(B). A proteína huntingtina mutante (HTT) desestabiliza a sinalização de Ca²⁺ através de dois mecanismos: sensibilização do influxo de Ca²⁺ pelo receptor NMDA, e sensibilização dos receptores de IP₃ (IP₃R). O aumento da atividade de PKC promove a dessensibilização do mGluR5, diminuindo o acoplamento da proteína G, elevando a ativação de ERK1/2 e AKT, que pode ser neuroprotetor.

Fonte: RIBEIRO, F. M. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 as a potential therapeutic target in Huntington's disease. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 18, n. 11, p. 1293–1304, 2014.

1.5 mGluR5 e plasticidade sináptica

Em 1940, o neurocientista canadense Donald Herbb propôs que os neurônios fortalecem sua comunicação quando a célula pré-sináptica estimula persistentemente a célula pós-sináptica (Henley e Wilkinson, 2013). A plasticidade sináptica pode potencializar ou deprimir a função sináptica, dependendo da frequência da atividade dessa sinapse. Em geral, a estimulação em alta frequência estimula a atividade sináptica levando a uma potencialização de longo prazo (LTP), enquanto a estimulação de baixa frequência por um período mais prolongado leva a uma depressão a longo prazo (LTD) (Henley e Wilkinson, 2013). Ambos LTP e LTD são mecanismos celulares para o aprendizado e há uma relação direta entre a formação de LTP e o armazenamento da memória (Bliss e Collingridge, 1993; Christie, 1996).

A plasticidade sináptica é regulada pelos mGluRs do grupo I e o mGluR5 está

envolvido nas múltiplas formas de memória e processamento de informações (Wang e Zhuo, 2012). Uma vez ativado pelo glutamato, preferencialmente em condições de ativação neuronal intensa ou contínua, o mGluR5 regula a excitabilidade neuronal, reforçando os processos bioquímicos relacionados à plasticidade sináptica. Em roedores, o bloqueio do mGluR5 causa um significativo prejuízo na memória espacial e compromete a fase tardia do LTP (Bikbaev e Manahan-Vaughan, 2017). Além disso, compostos que modulam positivamente o mGluR5 reforçam e aumentam a amplitude da LTP (Huber e Menzel, 2004). O glutamato estimula a espinogênese por meio da formação do complexo mGluR5/SHANK/HOMER/NMDA, que promove o aumento da densidade e maturação das espinhas, e a inibição deste complexo por Homer1a leva a uma drástica redução na densidade das espinhas (Kwon e Sabatini, 2011; Moutin et al., 2012).

As espinhas dendríticas são protrusões da membrana neuronal com diversos tamanhos e comprimentos e são os maiores sítios de sinapses excitatórias. Esta diversidade de espinhas permite um aumento total da área da superfície pós-sináptica, de modo que mais sinapses e conexões podem ser formadas em um compacto volume de neuropil do que se as mesmas sinapses tivessem de se alinhar de forma uniforme ao longo do dendrito (Kater e Harris, 1994). As espinhas usualmente acomodam uma única sinapse e sua superfície contém numerosas proteínas, incluindo receptores, canais iônicos, proteínas de ancoragem, moléculas de sinalização enzimática, elementos de citoesqueleto, proteínas motoras e proteínas do tráfego envolvidas na exocitose e endocitose (Kennedy, 2000). As espinhas maiores tendem a ter sinapses maiores de forma irregular, com maior densidade de receptores de glutamato (Bailey et al., 2015), sendo mais propensas a conter um retículo endoplasmático liso que regula Ca^{2+} e também proteínas integrais que regulam o

tráfego para a membrana (Spacer e Harris, 1998). Muitos estudos associam a estrutura e a dinâmica das espinhas com a memória e a aprendizagem. Por exemplo, o treinamento espacial e o enriquecimento ambiental de camundongos promove alteração no número de espinhas na formação hipocampal (Moser et al., 1997).

Alterações de longo prazo na morfologia das espinhas contribuem para a transmissão sináptica que ocorre após uma experiência de aprendizagem ou LTP (Lamprecht e Ledoux, 2004). O encurtamento ou alargamento do corpo de uma espinha dendrítica afeta o influxo de Ca^{2+} , alterando assim a sinalização neuronal (Spacer e Harris, 1998). Estudos que medem as correntes induzidas por glutamato mostraram uma correlação positiva entre a sensibilidade das correntes e o tamanho das cabeças das espinhas (Matsuzaki et al., 2001). A morfologia das espinhas dendríticas está diretamente relacionada com seu grau de maturação e função. O formato filopódio projeta-se e volta a se retrair rapidamente na membrana durante os primeiros estágios da sinaptogênese (Ziv e Smith, 1996). Com uma meia vida de minutos, acredita-se que os filopódios sejam precursores das espinhas dendríticas, sendo que este formato é mais abundante durante a primeira semana pós natal e pode evoluir rapidamente para espinhas de formato longo ou *stubby* (Ziv e Smith, 1996). Ao longo do desenvolvimento, o formato *stubby* diminui em número e os formatos cogumelo e fino passam a ser maioria. Esta sequência no desenvolvimento das formas dendríticas sugerem que os filopódios iniciem o contato com o terminal pré-sináptico, levando à formação de espinhas e sinapses mais maduras (Hering e Sheng, 2001). O último estágio da maturação das espinhas origina o formato ramificado, que contém mais de uma densidade pós-sináptica (**FIG. 3**).

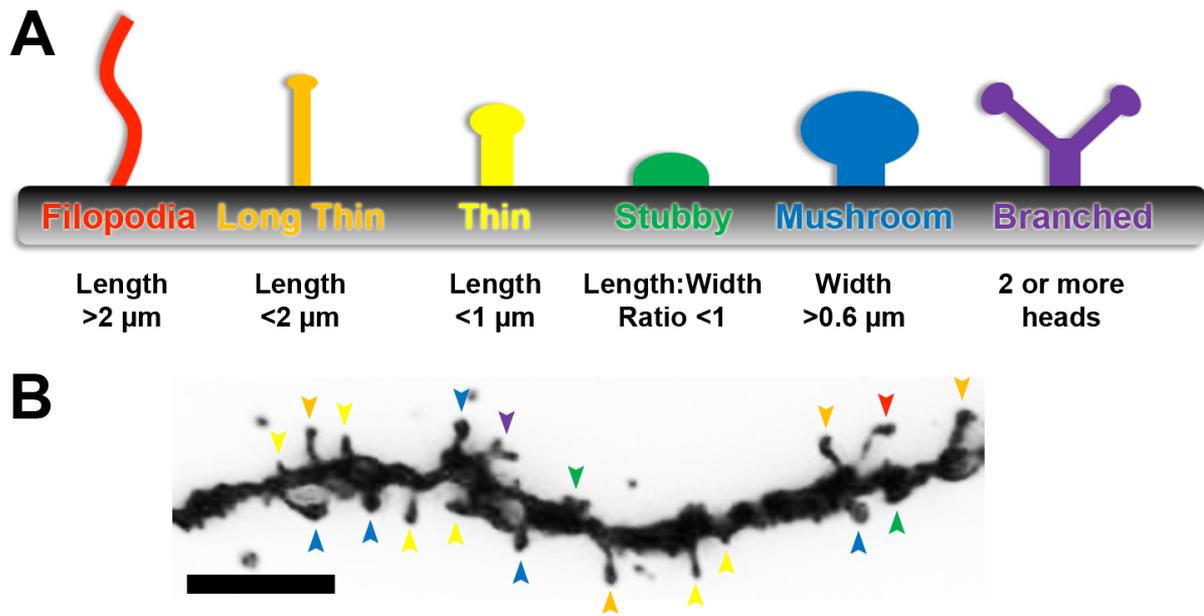


Figura 3: Morfologia das espinhas dendríticas. (A) A figura representa o progresso da maturação das espinhas (da esquerda para a direita). **(B)** Imagem obtida por meio da microscopia Confocal

Fonte: MATSUZAKI, M. et al. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Nature neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 1086–92, 2001.

1.6 Compostos com ação no mGluR5

Muitos dos agonistas e antagonistas utilizados no estudo da função dos mGluRs foram desenvolvidos como análogos do glutamato, ativando o receptor por meio da ligação ao sítio ortostérico do ligante endógeno (glutamato) ou perto dele, no domínio amino-terminal (O'Brien et al., 2003). Dentre os agonistas, o 3-dihydroxyphenylglycine (DHPG) foi um dos primeiros compostos seletivos desenvolvidos para estimular os mGluRs do grupo I, potencializando ambos mGluR1 e mGluR5 (Schoepp et al., 1999). Os moduladores alostéricos positivos (MAPs) são substâncias que se ligam a um determinado receptor em uma região diferente daquela em que se liga o agonista

endógeno e somente possuem atividade na presença do ligante endógeno ou ortostérico. Os moduladores alostéricos negativos (MANs) são compostos que estabilizam a conformação do receptor em sua forma inativa. O 2-metil-6(feniletinil) piridina (MPEP), um MAN seletivo para o mGluR5, possui ação antagonista neste receptor por reduzir a formação de IP3 via mGluR5, sem, entretanto, afetar a afinidade entre o glutamato e o receptor (Lea IV e Faden, 2006).

Os MAPs são relativamente lipofílicos e não carregados, o que facilita a sua passagem através da barreira hematoencefálica por meio de difusão passiva (Ritzen et al., 2005). Os MAPs 3-Cyano-*N*-(1,3-diphenyl-1*H*-pyrazol-5-yl)benzamide (CDPPB) e o [6,7-Dihydro-2-(phenoxymethyl)oxazolo[5,4-*c*]pyridin-5(4*H*)-yl](fluorophenyl)methanone (VU040951), podem privilegiar a ativação de uma via de sinalização em detrimento a outra, por exemplo ao aumentar a fosforilação de vias neuroprotetoras como ERK1/2, sem entretanto promover aumento intracelular de Ca²⁺ (DE PAULIS et al., 2006; LINDSLEY et al., 2004; ROOK et al., 2015).

Kinney e colaboradores (2005) descreveram pela primeira vez o uso do CDPPB como MAP do mGluR5. O desenvolvimento deste fárcaco decorreu da necessidade de se obter uma substância que apresentasse efeito *in vivo*, uma vez que seu antecessor, o *N*-[4-Chloro-2-[(1,3-dihydro1,3dioxo2*H*isoindol2yl)methyl]phenyl]hydroxybenzamide (CPPHA), não possui tal efeito (Kinney et al., 2005a). 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 ao receptor seja alterada. O CDPPB possui boa tolerabilidade e quando administrado de forma aguda, em doses de 10 mg/Kg a 30 mg/Kg, é eficaz em reverter o déficit de memória induzido por 10 mg/Kg de MK-801 (Uslaner et al., 2009).

Embora o CDPPB apresente atividade *in vivo*, a farmacocinética desse fármaco não seja ideal, sendo que a concentração cerebral atingida é muito baixa (Kinney et al., 2005b). Em vista disso, mais recentemente foi desenvolvido um novo MAP do mGluR5, o VU0409551. O VU0409551 é altamente seletivo para o mGluR5, bastante potente e com boa tolerabilidade *in vivo*. Diferentemente dos outros MAPs, o VU0409551 promove melhora da função cognitiva sem potencializar as correntes do receptor de NMDA (ROOK et al., 2015).

Tendo em vista que a morte neuronal é o gatilho patológico da DH e que os MAPs do mGluR5 possam ser neuroprotetores *in vitro*, torna-se importante a investigação mais aprofundada acerca dos efeitos dos MAPs sobre modelos da DH.

2. Justificativa

A Doença de Huntington é hereditária, progressiva e letal. Não existe, até o momento, fármacos que possam curar ou prevenir a doença. O quadro patológico da DH decorre da morte 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).

Em testes *in vitro* realizados anteriormente por nosso grupo, os MAPs do mGluR5 foram capazes de proteger neurônios estriatais de embriões BACHD do insulto por glutamato. Além disso, a estimulação do mGluR5 foi capaz de promover a ativação de vias neuroprotetoras, como AKT e ERK1/2. Os testes *in vivo* com administração sub-crônica por 7 dias realizados com o MAP CDPPB mostraram que este fármaco possui capacidade de melhorar a função cognitiva dos camundongos modelos da DH (BACHD) (Doria et al., 2013). Além disso, o tratamento sub-crônico com CDPPB, além de promover melhora da memória, aumentou o número de vesículas na zona ativa de neurônios BACHD, indicando um papel dos MAPs na plasticidade sináptica (Doria et al., 2015).

O déficit de memória é um achado comum em uma ampla gama de doenças neurodegenerativas, incluindo DA, DH, esquizofrenia, etc. Uma vez que o mGluR5 está intimamente implicado na fisiopatologia da DH e que a ativação deste receptor promove ativação de vias neuroprotetoras, compostos com efeito modulatório sob o mGluR5 apresentam potencial terapêutico e preventivo para o tratamento da DH e, possivelmente, de outras doenças neurodegenerativas.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos dos moduladores alostéricos positivos do mGluR5, CDPPB e VU0409551, sobre a morte neuronal e o déficit de memória apresentados por um camundongo modelo murino da DH, o BACHD.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich), Anticorpo anti-agregados de huntingtina – EM-48, Anticorpo anti-núcleo neuronal – NeuN, Anticorpo anti-total e fosfo-AKT, Anticorpo anti-total e fosfo-ERK1/2, Anticorpo secundário anti-coelho, B27 (Invitrogen) BSA (Sigma Aldrich), CDPPB (Tocris Cookson Inc. Ellisville, MO, USA), Cresil-Violeta, DHPG (Tocris Cookson Inc. Ellisville, MO, USA), DMSO (Sigma Aldrich), ECL reagentes, 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, Live/dead viability (Life Technologies, Foster City, CA, USA), Meio Neurobasal, MgSO₄ (Sigma Aldrich), MPEP (Tocris Cookson Inc. Ellisville, MO, USA), N₂ (Invitrogen), NaCl (Sigma Aldrich), pumps osmóticas (Alzet[®], volume total de 200 µL, modelo 2006, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany), Nuclease-Free Water, Paraformaldeído (Sigma Aldrich), PBS, PCR Master Mix, Penicilina (Invitrogen), Placa 4 e 96 wells Nunc, Poli-L-ornitina (Invitrogen), Power SYBR[®] Green, Proteinase K (Sigma Aldrich), SDS (HEXAPUR/ Sigma), TRIS (Sigma Aldrich), Tris HCl, Triton X100 (Sigma Aldrich), Trizol (Life Technologies), Vectastain Elite ABC Kit (Mouse IgG), Vector SG Peroxidase Substrate Kit (Vectorlabs), VU0409551 (VCNDD), β-ciclodextrina (Cayman Chemical Company, 16169), FD Rapid GolgiStain™ kit (FD NeuroTechnologies).

4.2 METODOS

4.2.1 *Modelo animal*

O trabalho foi realizado com camundongos das linhagens C57/BL6, 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 CEUA-UFMG (Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFMG), parecer nº 03/2011 (Anexo).

Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando os embriões de camundongos E15 (embriões com 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.

4.2.2 *Administração dos compostos*

O CDPPB foi dissolvido em dimetil-sulfoxido (DMSO) e continuamente administrado subcutaneamente (s.c.) por meio do implante de bombas osmóticas (Alzet[®], volume total de 200 µL, modelo 2006, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) (**FIG. 4**). O preenchimento e a preparação das bombas foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. A taxa de liberação das substâncias pelas

bombas foi de 0.15 $\mu\text{l/h}$ e a duração de cada pump foi de 6 semanas. Foram administrados 1.5 mg/Kg s.c de CDPPB em DMSO, sendo que os camundongos tratados com veículo receberam volumes iguais de DMSO. O veículo e o CDPPB foram continuamente liberados nos animais por um total de 18 semanas (**FIG. 5**).

O VU0409551 foi dissolvido em 20% de β -ciclodextrina em água e administrado 3mg/Kg a 4 mL/Kg via intraperitoneal (i.p.). O veículo e a VU0409551 foram administrados aos animais durante um total de 8 dias.

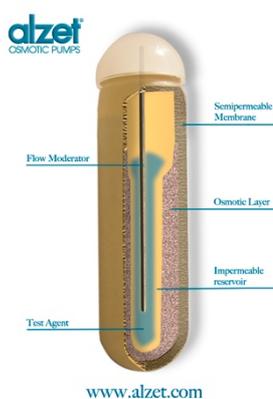


Figura 4: Mini bomba osmótica

Fonte: Disponível em <<http://www.alzet.com/resources/index.html>> Acesso em Julho/2017

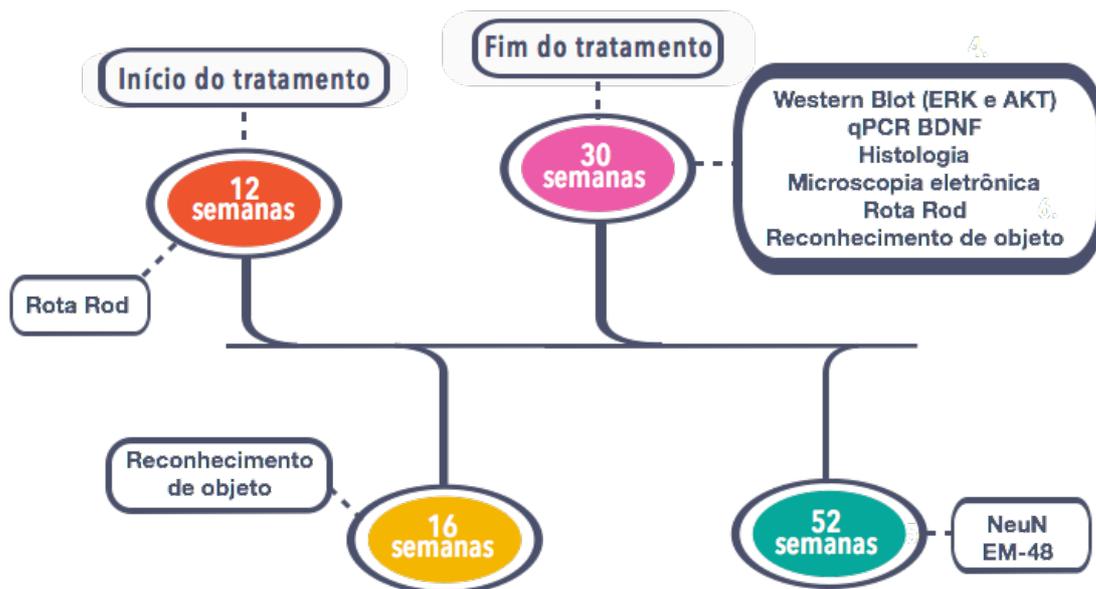


Figura 5: Esquema do tratamento com CDPBB. A linha do tempo demonstra o início e fim do tratamento, bem como as semanas de tratamento em que os experimentos foram realizados.

4.2.3 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.

4.2.4 Ensaio de morte neuronal:

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 à 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. 6**).

Os neurônios foram incubados por 20 horas na presença de veículo, CDPPB, VU0409551 e/ou glutamato. Após incubação, os neurônios foram marcados com calceína-AM (2.0 μM) e homodímero de etídeo-1 (2.0 μM), preparado em solução tampão fosfato salino (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4) 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. 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.

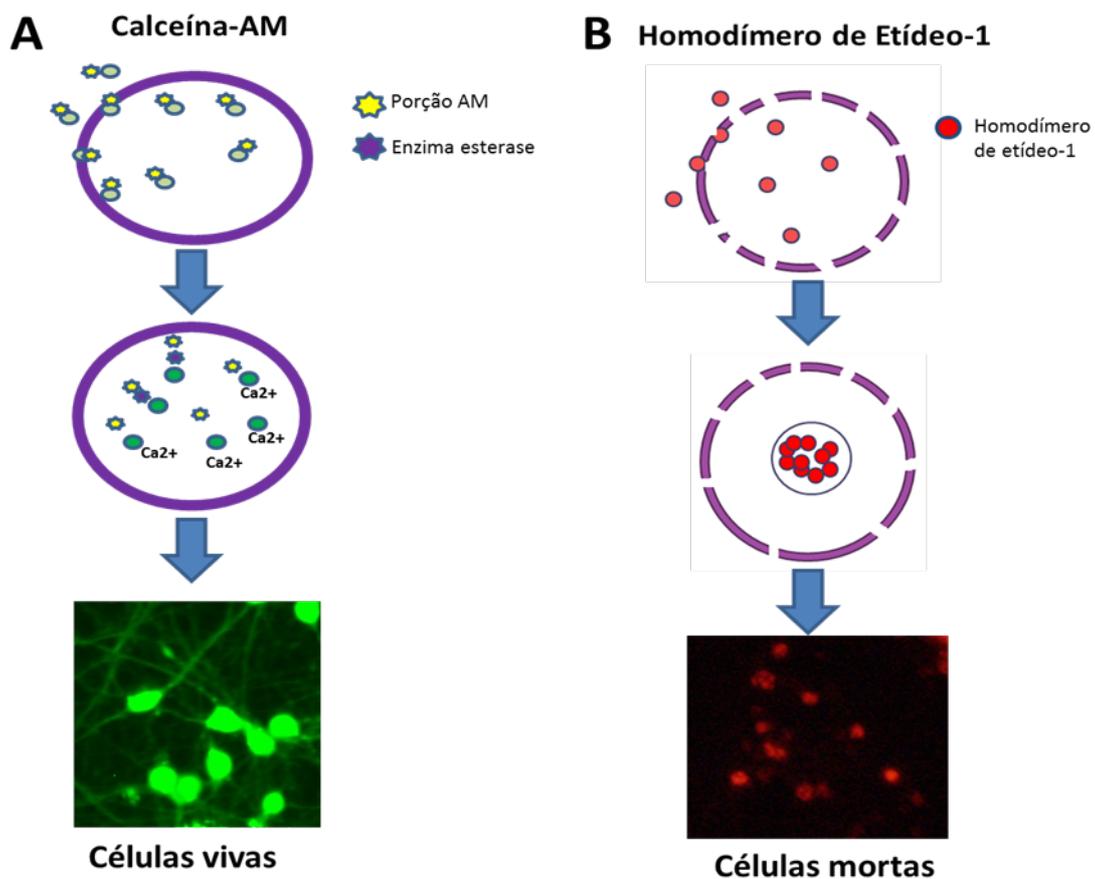


Figura 6: Princípio do ensaio de teste de viabilidade celular. (A) A calceína-AM (excitação/emissão~495 nm/~515 nm), ao atravessar a membrana celular, é clivada pela enzima esterase, tornando-se incapaz de deixar o interior celular, o que promove um aumento da emissão de fluorescência verde (células vivas) ao longo do corpo celular. **(B)** O homodímero de etídeo-1 (excitação/emissão~495 nm/~635 nm), ao atravessar membranas comprometidas, se liga aos ácidos nucléicos e emite fluorescência vermelha (células mortas).

4.2.5 Imunohistoquímica

Os animais foram anestesiados com Ketamina/Xilazina (100/10 mg/Kg) i.p. e submetidos a perfusão transcardíaca com paraformaldeído (PFA) 4% em PBS. Os cérebros foram removidos e armazenados em PFA 4% em PBS por 24 horas, e em seguida colocados em sacarose 30% em PBS overnight, a 4°C. Os cérebros foram fatiados a 40 µm utilizando um criostato, e as fatias foram armazenadas no freezer em solução crioprotetora. A detecção foi realizada em fatias “*free-floating*” utilizando o protocolo baseado na peroxidase. Em resumo, a atividade endógena da peroxidase foi extinguida utilizando 0,3% de peróxido de hidrogênio. Em seguida as fatias foram lavadas 2 x de 5 min com PBS 1X, seguido de permeabilização com Triton (X-100) 1% por 10 minutos. As ligações não específicas foram bloqueadas utilizando 1,5 % de soro de cavalo (Vector Elite Kit) por 30 min, seguido de incubação com os anticorpos camundongo anti-HTT (EM-48) (1:100) ou camundongo anti-NeuN (1:1000), em PBS contendo 2% de soro de cavalo e 3% BSA por 90 minutos a 4°C. Finalmente as fatias foram incubadas com o complexo de reagente da enzima avidina-biotina (Vector Elite Kit) por 90 minutos a 4°C, de acordo com as instruções do fabricante. A imunomarcagem foi visualizada utilizando cromógeno (Vector Elite Kit). As fatias foram montadas em lâminas e visualizadas utilizando o Axio Imager A2-Carl Zeiss Microscope com lente Zeiss de 20x. Uma área representativa de 710 µm x 532 µm das imagens do estriado foram analisadas. O número de células positivas para NeuN e EM-48 por imagens foram contados utilizando a ferramenta *cell counter* do software *Image J* (NIH, USA).

4.2.6 Biotinilação de superfície celular

O ensaio de biotinilação foi realizado como descrito anteriormente (Silva et al., 2017). O estriado e o hipocampo de fêmeas WT e BACHD de 8 a 10 meses de idade foram fatiados (300 μm) usando um “tissue chopper” Mcllwain. As fatias foram recuperadas em ACSF (NaCl 127 mM, KCl 2 mM, glucose 10 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, NaH_2CO_3 26 mM, MgSO_4 1 mM, CaCl_2 1 mM, pH 7,4) oxigenados com 95% de O_2 /5% de CO_2 e incubados sob agitação em banho a 37°C por 30 min. As proteínas presentes na membrana plasmática das fatias do hipocampo e do estriado foram biotiniladas com 1 mg/mL de sulfo-NHS-SS-biotina (Thermo Scientific) durante 1h em gelo. Para parar a reação de biotinilação, as fatias foram lavadas e incubadas durante 30 min em solução de glicina 100 mM em ACSF gelados, seguidas de 3 lavagens com ACSF gelado. As fatias foram então lisadas em tampão RIPA (NaCl 0,15 M, tris-HCl 0,05 M, pH 7,2, EDTA 0,05 M, Nonidet P40 a 1%, Triton X-100 a 1%, desoxicolato de sódio a 0,5%, SDS a 0,1%) contendo inibidores de protease (AEBSF 1 mM e 10g/ml de leupeptina e aprotinina, Sigma-Aldrich). As proteínas biotiniladas foram separadas das proteínas não biotiniladas através de um “pull-down” utilizando-se beads de NeutrAvidina (Thermo Scientific). Foram utilizadas quantidades equivalentes de proteína celular total para cada amostra. Foram guardados 20 μL do sobrenadante para a determinação dos níveis de mGluR5 intracelular. As proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE seguida por imunotransferência em membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com o reagente de detecção ECL e digitalizadas pelo ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

4.2.7 Western blot

As regiões cerebrais do córtex, estriado e hipocampo foram dissecadas e lisadas em tampão Triton (1% Triton X-100, 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.2) ou RIPA (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 % desoxicolato de sódio, 0.1 % SDS), contendo inibidores de protease e fosfatase (1.0 mM AEBSF e 10.0 µg/mL de leupeptina e aprotinina). 80 ou 100 µg do total de proteínas celulares para cada amostra foram separados em géis SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas a experimentos de western blot para se detectar os níveis de expressão das proteínas mGluR5 e c-Fos ou de fosforilação de ERK1/2 e AKT. As membranas foram bloqueadas em 5% de BSA em tampão de lavagem (150.0 mM NaCl, 10.0 mM Tris-HCl, pH 7.0, e 0.05% Tween 20) por 1 hora e em seguida incubada com anticorpos coelho anti-fosfo AKT (S473) (1:1000), coelho anti-fosfo ERK1/2 (Thr202/Thr204) (1:1000), coelho anti-mGluR5 (1:500) ou coelho anti-c-Fos (sc253) (1:700) em tampão contendo 3% de BSA por 20 horas à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 3 X 10 minutos com tampão de lavagem e incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase anti-coelho IgG (1:5000) em tampão contendo 3% de leite desnatado por uma hora. As membranas foram novamente lavadas por 3 X 10 minutos. A detecção das proteínas de interesse foi realizada por processo de quimioluminescência utilizando o Kit ECL Milipore e revelação através do LAS (GE Healthcare). Posteriormente as membranas foram submetidas ao *stripping* em tampão *stripping* (TRIS pH 6,8 65 mM, SDS 2% e 2-mercaptoetanol 100 mM, adicionado fresco) e novamente bloqueadas e incubadas com os anticorpos coelho anti-AKT (1:1000), coelho anti-ERK1/2 (1:1000) ou coelho anti β-actina (1:1000) por 20 horas. As membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho IgG (1:5000),

para determinar a expressão total de AKT, ERK1/2, mGluR5 e c-Fos. As Bandas não saturadas da Akt, ERK1/2, mGluR5 e c-Fos foram quantificadas utilizando o *software* Image J. Os valores obtidos para Akt e ERK1/2-fosforilada foram corrigidos pelos valores da Akt e ERK1/2 total e a média e o erro padrão foram calculados para o número de experimentos independentes. As membranas foram incubadas com o reagente de detecção ECL e digitalizadas pelo ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

4.2.8 RT-PCR quantitativo

O RNA foi isolado utilizando o reagente TRIzol®, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Burlington, ON, USA). O RNA foi resuspenso em 20 µl de água livre de RNase, e sua concentração e qualidade foi analisada pelo NanoDrop™ (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e com eletroforese de gel, respectivamente. Os cDNAs foram preparados a partir de 400 ng do total de RNA extraído em 20 µl da reação final de transcriptase reversa. O PCR quantitativo RT-PCR (qPCR) foi realizado para quantificar os níveis de mRNA do *fator neurotrófico derivado do cérebro* – BDNF (NM_001285416.1), *proteína associada ao citoesqueleto regulada por atividade* – Arg3.1/ARC (NM_018790.3), *Sintaxina 1A* (NM_016801.3) e *proteína de densidade pós-sináptica PSD-95* – Dgl4 (NM_007864.3). BDNF (*forward*: 5' ATGAAAGAAGTAAACGTCCAC 3'; *reverse* 5' CCAGCAGAAAGAGTAGAGGAG 3'), ARC (*forward* 5' GCTGAAGCAGCAGACCTGA 3'; *reverse* 5' TTCACTGGTATGAATCACTGCTG3'), *Sintaxina 1A* (*forward*: 5' GAACAAAGTTCGCTCCAAGC 3'; *reverse*: 5' GTGGCGTTGTACTIONCGGACAT 3') e PSD95 (*forward*: 5' TCTGTGCGAGAGGTAGCAGA3'; *reverse* 5'AAGCACTCCGTGAACTCCTG 3'). Os primers foram desenhados com o software Primer3plus (Untergasser, Nijveen et al. 2007) de acordo com (Agerman et al., 2003) e checados com ferramenta Primer-

BLAST (Ye, Coulouris et al. 2012). As amostras foram preparadas em triplicata, e as alterações na expressão dos genes foram determinadas de acordo com o método ΔCt , utilizando normalização pela actina. Os RT-qPCRs mostraram boa qualidade de amplificação, e a especificidade e eficiência dos primers foram testadas e confirmadas pelo método de diluição seriada.

4.2.9 Análise Histológica e Microscopia eletrônica de transmissão

Para a histologia e os estudos de ultraestrutura, os animais foram anestesiados com Ketamina/Xilazina (100/10 mg/kg) i.p. e submetidos a perfusão transcardíaca com PBS 1X gelado por 10 minutos, seguido de fixação com solução Karnovsky modificada por 10 minutos. Os cérebros perfundidos foram mantidos em solução Karnovsky overnight a 4°C. Para a histologia de rotina, após a fixação, as amostras do estriado foram desidratadas com etanol em concentração crescente (70%, 80%, 90%, 95% 2x) e em seguida incluídas em resina glicol metacrilato. Os blocos foram fatiados (5 μm) em micrótomo e marcados com cresil violeta para posterior visualização no microscópio Zeiss Axio Imager A2 utilizando lente objetiva 40x. Para a microscopia eletrônica, as amostras de estriado foram lavadas em tampão cacolitato 0,1 M, e pós-fixado em osmium reduzido (2% tetróxido de ósmio, contendo 1.6% de ferrocianeto de potássio), contrastado *en bloc* com acetato de uranila (2% acetato de uranila em água deionizada), desidratado através de series crescentes de etanol e infiltrados em resina EPON. Os cortes foram montados em grades de cobre de 200 ou 300 *mesh* e contrastados com citrato de chumbo para posterior visualização. A aquisição das fotografias digitais foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai-G2-Spirit-FEI/Quanta, do Centro de Microscopia da UFMG

e microscópio eletrônico de transmissão Zeiss-EM10 do Centro de Microscopia Eletrônica. A análise das imagens foi realizada com o programa Image J., e a densidade total de vesículas sinápticas foi calculada pela relação número de vesículas pela área do terminal.

4.2.10 Análise das imagens de microscopia eletrônica de transmissão

As sinapses foram selecionadas baseadas na presença de vesículas sinápticas e mitocôndrias em terminais pré-sinápticos e na densidade pós-sináptica na membrana pós-sináptica. Secções únicas através das sinapses de interesse foram traçadas e as áreas terminais (através das áreas seccionadas de cada nervo terminal) e o número de vesículas sinápticas foram determinados. A distribuição das vesículas sinápticas foram avaliadas pela quantificação das vesículas localizadas em diferentes distancias da zona ativa, como descrito por Becherer et al., 2001; Han et al., 2011; Rodrigues et al., 2013. As vesículas foram contadas 200 nm a partir da zona ativa. Todas as imagens investigadas neste estudo foram analisadas por um observador cego.

4.2.11 Marcação por Golgi-Cox

Aproximadamente 20 minutos após o último teste de memória, os camundongos foram sacrificados e o cérebro foi removido e lavado rapidamente com água destilada para remover o excesso de sangue. Durante duas semanas os cérebros foram mantidos imerso em uma solução de impregnação, consistindo em volumes iguais de Solução A e B (FD Rapid GolgiStain™). A solução foi substituída por uma nova após as primeiras 6 horas. Os cérebros foram transferidos para a

Solução C e armazenados à temperatura ambiente no escuro durante pelo menos 72 horas, sendo substituída após as primeiras 24 horas. Foram feitos cortes coronais em criostato com 100 a 200 μm de espessura a -20°C . As fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas e mantidas umedecidas com Solução C. Processo de impregnação: as fatias foram lavadas 2 vezes de 4 minutos cada com água Mili-Q e colocadas em solução consistindo em 1 parte de solução D com 1 parte da solução E + 2 partes de água Mili-Q por 10 minutos seguida de lavagem de 2 vezes de 4 minutos. Protocolo de desidratação: as fatias foram banhadas na sequência de 50%; 75%; 90% de etanol por 4 minutos cada, seguido de 4 lavagens de 4 minutos cada com etanol absoluto. As fatias foram lavadas com xileno 3 vezes de 4 minutos cada, e montadas com Entellan[®].

4.2.12 Aquisição de imagens e análises das espinhas dendríticas

Os neurônios piramidais do hipocampo foram escolhidos para análise com base nos seguintes critérios: 1) as células deveriam estar completamente impregnadas pela marcação Golgi-Cox; 2) não haver sobreposição com outra célula para garantir nenhum viés de confusão; 3) possuir um corpo celular definido; 4) possuir ramificação dendrítica primária intacta; 5) presença de ramificação secundária ou terciária medindo ao menos 20 μm . Foram obtidas um total de 12 - 15 imagens em série Z (Z-Staks) por animal a partir do microscópio Nikon Eclipse Ti (Confocal) com objetiva x63. A medição e classificação das espinhas dendríticas foram realizadas utilizando o software livre RECONSTRUCT, disponível em ([Http://synapses.clm.utexas.edu](http://synapses.clm.utexas.edu)), conforme descrito anteriormente (Risher et al., 2014).

4.2.13 Reconhecimento de objeto

O teste de reconhecimento de objeto é baseado na diferença entre a exploração espontânea de um objeto colocado em nova localização e um objeto em localização conhecida. O aparato utilizado foi uma caixa aberta, feita de PVC, medindo 50 cm x 35 cm x 25 cm, montada com uma câmera filmadora e luz. Dois objetos idênticos feitos de vidro ou plástico foram utilizados. O peso e a altura dos objetos foram suficientes para que estes não fossem derrubados ou escalados pelos camundongos. Testes iniciais mostraram que os animais não possuíam preferência por nenhum dos objetos. O procedimento geral constituiu de três etapas: familiarização, treinamento e teste. No primeiro dia, os animais foram individualmente submetidos a uma única fase de familiarização, com duração de 10 minutos, durante a qual os animais foram apresentados a um novo ambiente (caixa vazia). No segundo dia (24 horas depois), os animais foram submetidos a uma única seção de treinamento, onde dois objetos idênticos foram alocados em posições simétricas a partir do centro da arena. A distância entre os dois objetos e as paredes laterais foi de 15 cm. Durante 90 minutos, os animais retornaram a suas caixas de origem. Logo após este tempo, na terceira fase, os animais foram reintroduzidos na arena, porém um dos objetos foi colocado em nova localização. Para controlar odores, a cada troca de animais, o aparato e os objetos foram limpos e ventilados com álcool 70%. Todas as seções foram realizadas durante a primeira parte do ciclo do dia. Os animais foram ambientados na sala de experimento por ao menos 15 minutos, antes do início de cada seção.

4.2.14 Teste de Rotarod

O teste constou de duas fases: treinamento (3 dias) e o teste (último dia). Antes do início de cada seção, os animais foram habituados na sala de experimento por ao menos 15 minutos. No primeiro dia do treinamento, os animais descansaram por 5 minutos no aparelho rotarod antes do início da aceleração. Durante os três dias de treinamento, os camundongos foram treinados por no máximo 2 minutos em cinco velocidades de aceleração (de 4 a 40 RMP em 300s). O intervalo de descanso entre cada aceleração foi de 10 minutos. No dia do teste, a permanência no aparelho foi apurada em três seções de aceleração constante, com intervalo de 20 minutos entre cada apuração. A latência de queda no aparelho foi registrada, e o resultado foi dado pela média de tempo em segundos das três seções para cada animal. A latência mínima apurada foi de 5 s e a máxima foi de 300 s.

4.2.15 Condicionamento ao medo

Os animais foram posicionados em uma câmara de condicionamento feita em acrílico, medindo 23 x 23 x 30 cm, composta de paredes pretas e piso em forma de grade com barras de aço inoxidável (0,4 cm de diâmetro, separadas a 0,6 cm de distância). A câmara foi montada em uma caixa a prova de som e monitorada por vídeo (Insight Equipamentos, Ribeirão Preto, Brasil). Durante o período de habituação, os camundongos puderam explorar livremente a câmara por 120s. Após este tempo, um tom foi aplicado por 30s (CS: estímulo condicionado, 85 dB, 1KHz), sendo os últimos 2s emparelhados a choque nas patas (US: estímulo incondicionado, 0.7 mA). O protocolo de pareamento CS-US foi repetido 5 vezes para fortalecer a

associação, com intervalo de 30s entre cada estímulo. Após 60s, o animal foi colocado em sua gaiola de origem. Após 90 minutos, os camundongos foram posicionados em outra câmara, em um novo contexto, com o mesmo tamanho, mas paredes em preto e branco e cheiro diferente. Durante os primeiros 180s não foi aplicado nenhum estímulo, e nos 180s finais foi aplicado o mesmo tom usado no condicionamento. O comportamento de congelamento (freezing) (definido como imobilidade total acompanhado de postura tensa, exceto movimentos respiratórios) foi considerado como no mínimo de 2 s a cada 5 s (Radwanska et al., 2011) e foi analisado ao longo de todo o período na caixa para novo contexto.

4.2.16 Campo aberto

A atividade locomotora espontânea foi medida a partir do Harvard Apparatus automático (LE 8811 IR Activity Activity Monitors PANLAB, Harvard Apparatus, Espanha), composto de uma caixa acrílica medindo 45 x 45 x 20. Os animais foram posicionados no centro do aparelho campo aberto e a atividade horizontal espontânea (distância percorrida) e a distância percorrida no centro do aparato foi medida durante 60 min. Todas as sessões foram realizadas durante a primeira parte do ciclo de luz e os camundongos foram aclimatados à sala por pelo menos 30 minutos antes do início do experimento. Todas as quantificações foram calculadas utilizando o software ACTITRACK.

4.3 Análise estatística

As comparações das curvas concentração-resposta, imunohistoquímica e qPCR foram realizadas através da variância *one-way* ANOVA. As comparações condicionamento ao medo, campo aberto, Gogi-Cox e western blots, realizadas através da variância *two-way* ANOVA. As médias individuais foram comparadas pelo teste post-hoc *Bonferroni*. O reconhecimento de objeto foi analisado pelo método t-test. Os dados foram testados quanto à normalidade de distribuição pelo teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. Nenhum *outliers* (maior que dois desvios da média) foi encontrado e, portanto, nenhum dado foi excluído. A significância estatística foi determinada pela análise de variância, unidirecional e bidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla post hoc de Bonferroni.

Em todos os métodos, as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPadPrism® versão 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). A média e o erro padrão foram calculados para o número de experimentos independentes, como indicados nas legendas das figuras.

5. Capítulo 01

Estudo do efeito *in vivo* do modulador alostérico positivo do receptor metabotrópico de glutamato 5, CDPPB, em um camundongo modelo da doença de Huntington, o BACHD

5.1 Objetivos específicos do capítulo 01

- Avaliar o potencial neuroprotetor do CDPPB;
- Investigar a ativação de vias neuroprotetoras envolvendo ERK1/2, AKT e BDNF nos cérebros de camundongos;
- Avaliar as alterações na morfologia neuronal;
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com CDPPB sobre o comportamento motor e de memória dos camundongos WT e BACHD;

5.2. RESULTADOS

5.2.1 O CDPPB melhora a performance comportamental de camundongos BACHD

Uma vez que observamos que o tratamento crônico com CDPPB promove ativação de mecanismos neuroprotetores importantes e que esta ativação resulta em um aumento da sobrevivência neuronal e de parâmetros relevantes para o desempenho motor e de memória, realizamos os testes de rotarod, para avaliar o desempenho motor dos camundongos BACHD, e de reconhecimento de objeto em nova localização, para avaliar o desempenho de memória.

Gray e colaboradores (2008) demonstraram que os camundongos BACHD apresentam desempenho motor inferior aos camundongos WT, quando desafiados ao rotarod. Sendo assim, para analisar se o tratamento crônico com CDPPB melhoraria o desempenho motor destes camundongos, submetemos os três grupos experimentais ao aparelho rotarod. Os camundongos foram testados às 12 semanas de idade, antes do início do tratamento, e com 30 semanas de idade e 18 semanas de tratamento. O prejuízo motor acomete os camundongos BACHD ainda jovens, com 12 semanas de idade (**FIG. 7A**). O resultado do rotarod com 30 semanas de idade (**FIG. 7B**) nos mostrou ainda que os camundongos BACHD possuem comprometimento motor quando comparado ao WT e que o tratamento com CDPPB melhorou, pelo menos parcialmente, o desempenho motor, uma vez que os camundongos BACHD passaram a apresentar um desempenho motor que não se mostrou diferente dos camundongos WT.

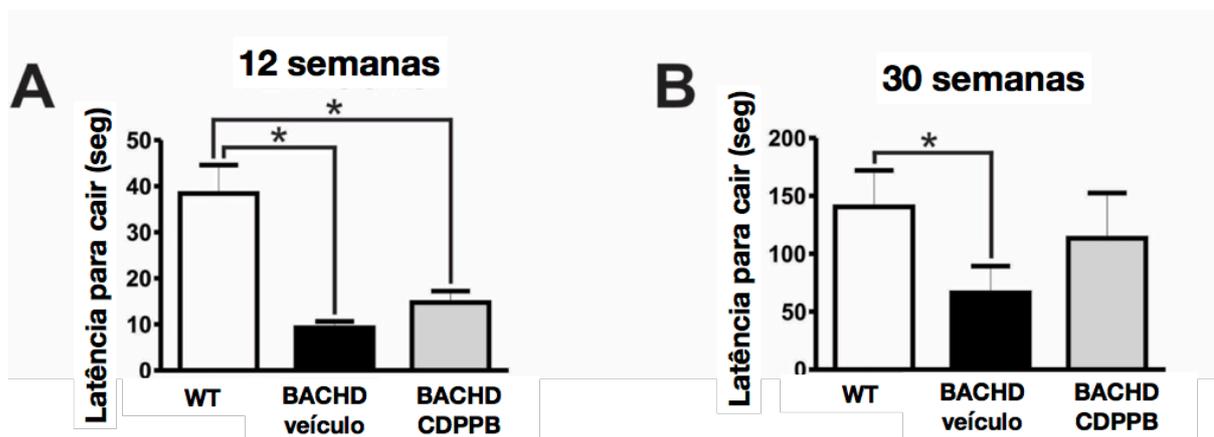


Figura 7: Efeito do tratamento com CDPPB no desempenho motor de camundongos BACHD. Os gráficos mostram a latência de queda no rotarod dos camundongos WT (n = 11), BACHD tratados com veículo (n = 10-11) e BACHD tratados com CDPPB (n=8) com 12 **(A)** e 30 semanas de idade **(B)**. A latência mínima no aparato foi de 5 segundos. * Indicam diferenças significativas comparados ao grupo WT ($p < 0,05$).

Foi demonstrado anteriormente que os camundongos BACHD possuem comprometimento de memória (Southwell et al., 2009). Também foi visto anteriormente por nosso grupo, que os camundongos BACHD possuem desempenho inferior no teste de reconhecimento de objeto novo, quando comparados aos camundongos WT (Doria et al., 2013). Os MAPs do mGluR5 possuem um efeito positivo sobre a memória, facilitando e melhorando a neurotransmissão de aprendizagem espacial, além de resgatar farmacologicamente a diminuição da memória induzida por fármacos no teste de reconhecimento de objetos (Uslaner et al., 2009).

Para avaliar se o tratamento crônico com CDPPB iria promover melhora da memória dos camundongos BACHD, nós submetemos estes animais ao teste de reconhecimento de objeto em nova localização. Neste teste, a memória é medida com

base na preferência pelo objeto colocado na nova localização. Durante a fase de treinamento, os camundongos puderam explorar livremente dois objetos idênticos por 10 minutos. Após um intervalo de 90 minutos em suas gaiolas de origem, os camundongos foram realocados na caixa de teste e re-expostos ao mesmo par de objetos, porém um dos objetos foi colocado em nova localização. O tempo de exploração foi calculado como a medida do tempo em que os camundongos exploraram o objeto na nova localização na fase de teste como uma porcentagem do tempo explorando o mesmo objeto durante a fase de treinamento mais a fase de teste. Os camundongos foram testados com 16 (**FIG. 8A**) e 30 semanas de idade (**FIG. 8B**). Com 16 semanas de idade, os três grupos experimentais exploraram mais os objetos na nova localização, o que sugere que com 16 semanas de idade ainda não houve comprometimento neuronal suficiente para causar piora do desempenho de memória (**FIG 18A**). Camundongos WT com 30 semanas de idade exploraram mais o objeto na nova localização do que aquele presente na localização antiga (**FIG. 18B**). Interessantemente, camundongos BACHD com 30 semanas de idade exploram pela mesma duração de tempo ambos os objetos (**FIG. 18B**). Esse dado indica que a memória de camundongos BACHD com 30 semanas de idade encontra-se comprometida. Entretanto, os camundongos tratados com CDPPB exploraram mais o objeto na nova localização do que na localização antiga (**FIG. 18B**), indicando que o tratamento crônico com CDPPB foi capaz de reverter o déficit de memória apresentado por camundongos BACHD.

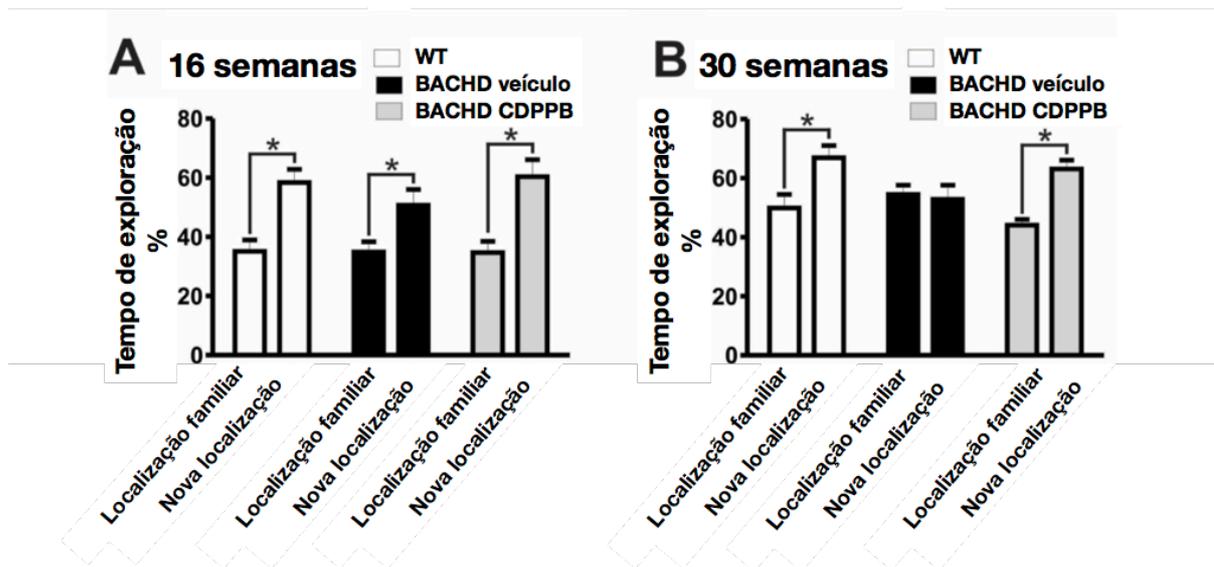


Figura 8: Efeito do tratamento com CDPPB sobre a memória de camundongos BACHD. Os gráficos mostram a porcentagem de tempo de exploração do objeto em nova localização, em relação ao tempo explorando os dois objetos dos camundongos WT (n = 11), BACHD tratados com veículo (n = 10-11) e BACHD tratados com CDPPB (n=8) com 16 (A) e 30 semanas de idade (B). Os dados representam as médias \pm SEM. * Indicam exploração do objeto na nova localização em relação à exploração aleatória dos dois objetos ($p < 0,05$).

5.2.2 O CDPPB protege os neurônios estriatais da morte induzida por glutamato *in vitro*

Glutamato, quando em excesso, promove o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, levando a uma cascata de eventos que pode culminar em excitotoxicidade (Mehta et al., 2013). Em um estudo anterior, demonstramos que o CDPPB, na concentração de 10 μ M, não promove a liberação intracelular de Ca^{2+} em cultura neuronal (Doria et al., 2013). Além disso, esse composto apresentou efeito

neuroprotetor frente ao insulto de glutamato em neurônios em cultura primária (Doria et al. 2013)

A fim de avaliar a toxicidade e a potência do MAP CDPPB *in vitro*, incubamos culturas primárias de neurônios estriatais de embriões de camundongos C57, na presença ou na ausência de glutamato 50 μ M, com 0, 1, 5, 10, 50, 100 e 10.000 nM de CDPPB. O CDPPB, em todas as concentrações testadas, não promoveu morte neuronal acima dos valores basais na ausência de glutamato 50 μ M, indicando que até a concentração máxima testada de 10.000 nM o CDPPB não é tóxico para neurônios. Além disso, a menor concentração de CDPPB testada (1 nM) foi suficiente para reduzir a morte neuronal induzida por glutamato a níveis basais, indicando que o CDPPB é um fármaco neuroprotetor (**FIG. 9**).

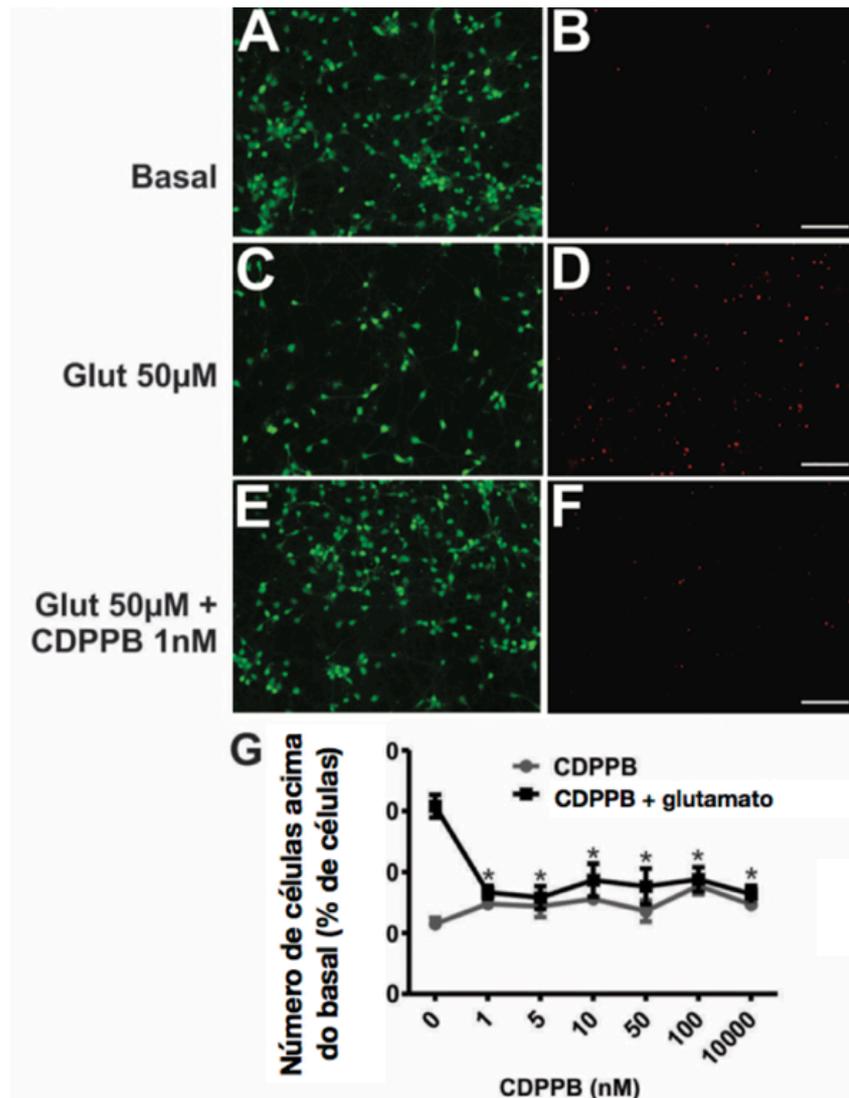


Figura 9: Curva concentração-reposta do CDPBP. Imagens de neurônios estriatais marcados com Calceína-AM (células vivas, verdes) (A, C e E). Neurônios estriatais marcados com homodímero de etídeo (células mortas, vermelhas) (B, D e F). Morte neuronal basal (A e B). Morte neuronal induzida por insulto de glutamato 50 μM por 20 horas (C e D). Morte neuronal induzida por insulto de glutamato 50 μM na presença de 1.0 nM de CDPBP (E e F). G. Gráfico mostra a porcentagem de morte neuronal sob o estímulo de CDPBP em concentrações de 1, 5, 10, 50, 100 e 10.000 nM na presença ou ausência de 50 μM 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 CDPBP ($p < 0,05$).

5.2.3 O CDPPB aumenta a fosforilação de ERK1/2 em camundongos BACHD com 30 semanas de idade

A fim de investigar os efeitos *in vivo* da administração crônica de CDPPB, camundongos BACHD com 12 semanas de idade foram tratados com veículo (DMSO) ou CDPPB (1.5 mg/Kg) através de administração subcutânea por meio de pumps osmóticas (Alzet ®), por um total de 18 semanas, sendo que um grupo prosseguiu sem tratamento da 18^o até 52^a semanas de idade (**FIG. 7**). Para avaliar os efeitos do tratamento com CDPPB, os achados moleculares e comportamentais dos camundongos BACHD tratados com CDPPB ou veículo foram comparados aos camundongos WT.

Trabalhos publicados por nosso e por outros grupos de pesquisa indicam que a estimulação dos receptores mGluR1/5 leva à estimulação de vias de sinalização importantes para a proliferação e sobrevivência celular, tais como AKT e ERK1/2 (Masu et al., 1991; Ribeiro et al., 2010). Dados da literatura sugerem que os MAPs DFB e CPPHA, na ausência de agonista, são capazes de promover a ativação de ERK1/2 em astrócitos (Zhang et al., 2005), e que esta ativação foi capaz de proteger neurônios de uma injúria traumática por um mecanismo dependente de ERK1/2 (Chen et al., 2012). Assim, decidimos avaliar se o tratamento crônico com CDPPB seria capaz de elevar os níveis de fosforilação da ERK1/2. A fosforilação da ERK1/2 foi avaliada por meio da técnica de western blot. Neste experimento, foram utilizados os cérebros de camundongos WT, BACHD tratados com veículo ou tratados com CDPPB, com 30 semanas de idade.

Os nossos resultados demonstram que o tratamento com CDPPB promoveu aumento da fosforilação de ERK1/2 no córtex de camundongos BACHD tratados com CDPPB, quando comparados a camundongos BACHD tratados com veículo ou camundongos WT (**FIG. 10A e 10D**). Além disso, o tratamento crônico com CDPPB promoveu um aumento da fosforilação de ERK1/2 na formação hipocampal (**FIG. 10C e 10F**), mas não no estriado (**FIG. 10B e 10E**).

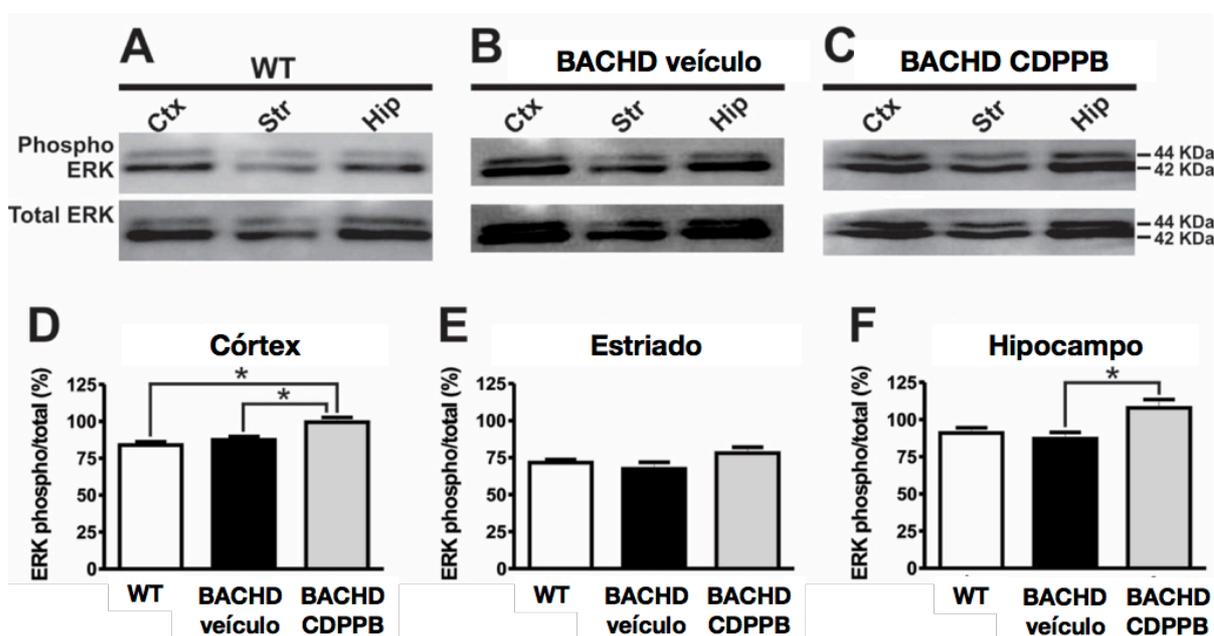


Figura 10: Efeito do tratamento com CDPPB sobre a fosforilação de ERK1/2 em camundongos BACHD tratados com CDPPB. Figura representativa de imunoblots de fosfo-ERK1/2 (figura de cima) e de ERK1/2 total (figura de baixo), no córtex (Ctx), estriado (Str) e formação hipocampal (Hip) de camundongos WT (**A**), BACHD tratados com veículo (**B**), e BACHD tratados com CDPPB (**C**). Os gráficos mostram a análise da expressão de fosfo-ERK1/2 normalizada pela expressão de ERK1/2 total, nas regiões do córtex (**D**), estriado (**E**) e formação hipocampal (**F**) de camundongos WT (n=3), BACHD tratados com veículo (n=3) e BACHD tratados com CDPPB (n=3), com 30

semanas de idade. Os dados representam a média \pm SEM, expressa em porcentagem da fosforilação basal de ERK1/2 total. * indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.2.4 Expressão do mRNA de BDNF no córtex de camundongos BACHD

Visto que o tratamento crônico com CDPPB promove um aumento da fosforilação de ERK1/2, e que a fosforilação de ERK1/2 promove a ativação de vias neuroprotetoras, levando, por exemplo, a um aumento da expressão do BDNF, nós investigamos então, por meio do experimento de RT-qPCR, se a expressão de BDNF estaria alterada no córtex de camundongos BACHD. Para tal, analisamos os níveis de mRNA de BDNF no córtex de camundongos com 8 (FIG. 11A), 30 (FIG. 11B) e 52 (FIG. 11C) semanas de idade. Camundongos BACHD com 52 semanas de idade apresentaram uma redução significativa da expressão de mRNA de BDNF, quando comparado a camundongos selvagens. Esta quantificação foi realizada em camundongos BACHD sem tratamento e nos sugere que a redução da expressão de BDNF poderia contribuir para a redução de mecanismos neuroprotetores, contribuindo assim para a progressão da DH.

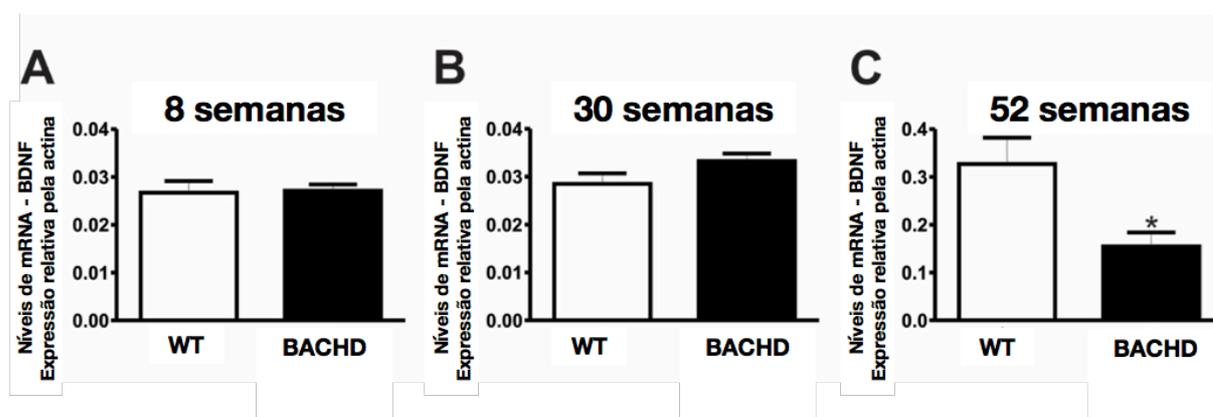


Figura 11: Níveis do mRNA do BDNF em camundongos BACHD com 52 semanas de idade. Os gráficos mostram os níveis de expressão de BDNF, determinados por RT-PCR, no córtex de camundongos WT (n=3) e BACHD (n=3) com 8 **(A)**, 30 **(B)** e 52 semanas de idade **(C)**. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de expressão de actina. Os dados representam a média \pm SEM. * indicam diferenças significativas comparados ao grupo WT ($p < 0,05$).

5.2.5 A expressão do mRNA de BDNF é aumentada pelo tratamento com CDPPB

A expressão do mRNA do BDNF encontra-se reduzida em camundongos BACHD de 52 semanas de idade e, por isso, decidimos investigar se o tratamento crônico com CDPPB iria alterar a expressão do BDNF nos camundongos com 30 semanas de idade. A expressão de BDNF não foi diferente quando comparamos camundongos WT, BACHD tratados com veículo e BACHD tratados com CDPPB nas regiões do estriado **(FIG. 12B)** e formação hipocampal **(FIG. 12C)**. Todavia, o tratamento com CDPPB levou a um aumento da expressão de BDNF no córtex dos camundongos BACHD **(FIG. 12A)**.

A fosforilação de ERK1/2 ativa vias neuroprotetoras, promovendo um aumento da expressão de BDNF. Sendo assim, foi interessante observar que o aumento da fosforilação de ERK1/2 no córtex foi seguido pelo aumento da expressão de BDNF em camundongos BACHD tratados com CDPPB.

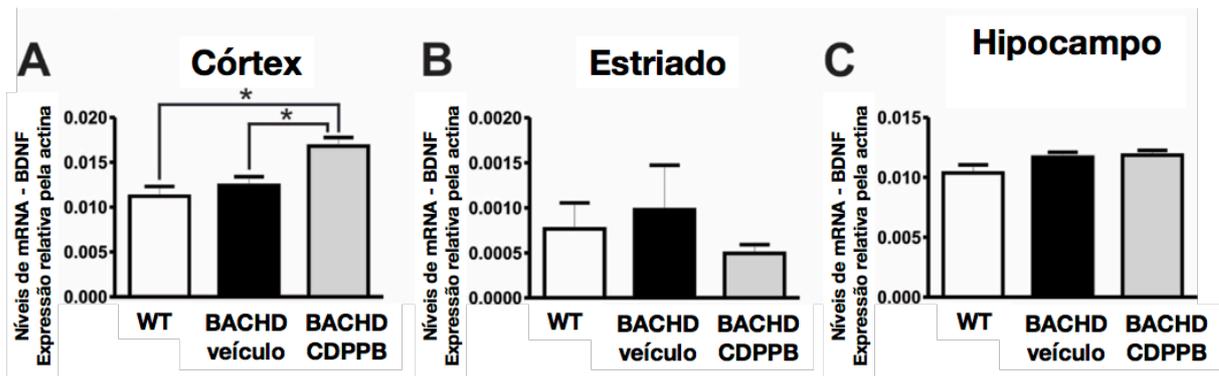


Figura 12: Níveis do mRNA do BDNF em camundongos BACHD tratados com CDPPB com 30 semanas de idade. Os gráficos mostram os níveis de expressão de BDNF, determinados por RT-qPCR, no córtex de camundongos WT (n=3) (A), BACHD tratados com veículo (n=3) (B) e BACHD tratados com CDPPB (n= 3) (C). A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de expressão de actina. Os dados representam a média ± SEM. * indicam diferenças significativas comparados ao grupo WT (p < 0,05).

5.2.6 O tratamento crônico com CDPPB reduz a morte celular

A neurodegeneração que ocorre na DH pode ser devido ao excesso de Ca^{2+} intracelular, promovendo excitotoxicidade, ou ainda pelo acúmulo de agregados da proteína HTT (DiFiglia, 1990). Camundongos BACHD apresentam agregados de HTT e morte neuronal detectáveis apenas quando atingem a idade de 12 meses.

Para determinar se o tratamento crônico com CDPPB seria eficaz para melhorar as alterações patológicas relacionadas com a neurodegeneração que ocorrem na DH, foram analisadas fatias de camundongos selvagens, BACHD tratados com veículo ou com CDPPB, com 30 e 52 semanas de idade. Para todos os camundongos tratados com CDPPB, o tratamento iniciou-se na 12^a semana e terminou na 30^a semana de vida. No entanto, um grupo de camundongos foi

sacrificado imediatamente após o fim do tratamento (30 semanas de idade) e outro grupo de camundongos foi mantido até a 52^a semana. Entre a 30^a semana e a 52^a semana, nenhum camundongo recebeu veículo ou CDPPB.

Vimos anteriormente que o tratamento crônico com o CDPPB promove, em camundongos BACHD, o aumento da fosforilação de ERK1/2 e da expressão de BDNF. Para investigar se essa ativação de vias neuroprotetoras se reflete em neuroproteção, foi utilizada a técnica de histologia tradicional, com coloração de cresil-violeta. Para este experimento, foram utilizadas fatias cerebrais de camundongos selvagens e BACHD tratados com veículo ou com CDPPB, na idade de 30 semanas, e avaliadas a quantidade de células presentes naquelas fatias. Camundongos BACHD tratados com veículo apresentaram redução no número de células do estriado, quando comparados ao grupo selvagem. Além disso, o tratamento com CDPPB reverteu, ainda que parcialmente, a perda de células que ocorre no estriado desses camundongos (**FIG. 13 A, B, C**).

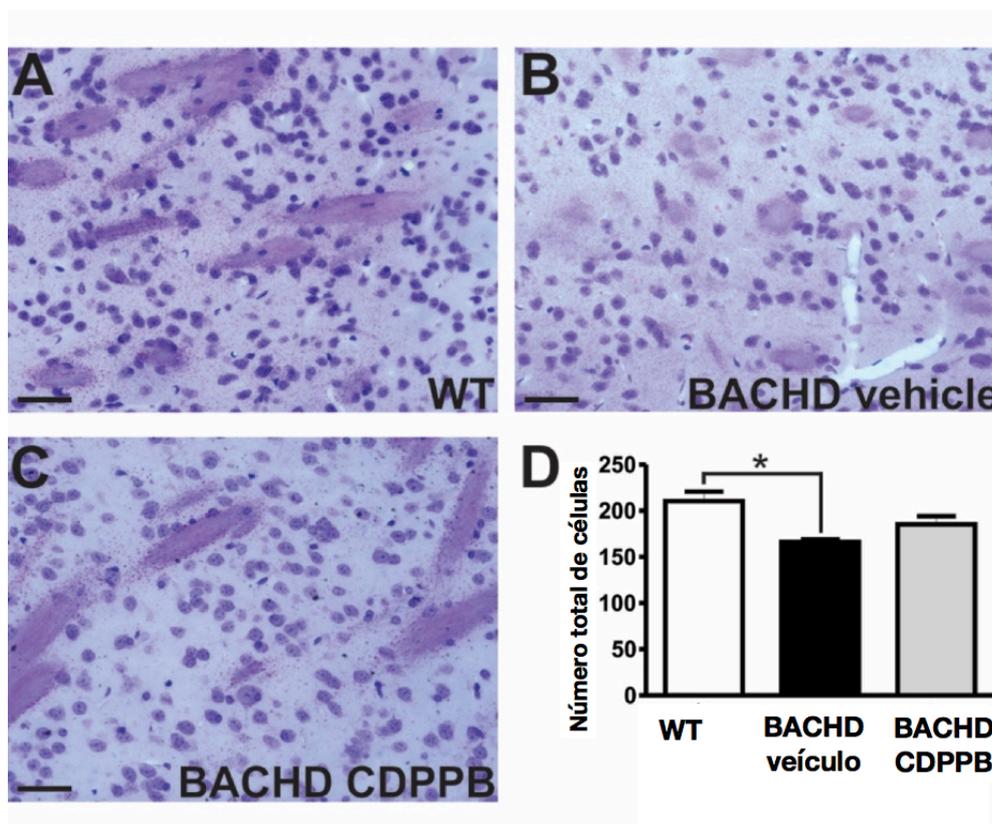


Figura 13: Efeito do tratamento crônico com CDPPPB sobre a morte celular no estriado de camundongos BACHD com 30 semanas de idade. Imagens representativas da histologia do estriado de camundongos WT (A), BACHD tratados com veículo (B) e BACHD tratados com CDPPPB (C). Os gráficos apresentam a quantificação do número total de células encontradas com a coloração cresil-violeta em WT (n = 3), BACHD tratados com veículo (n = 3) e BACHD tratados com CDPPPB (n = 3) (D). Os dados representam a média ± SEM de pelo menos 24 imagens por grupo experimental. * indicam diferenças significativas comparados ao grupo WT ($p < 0,05$).

5.2.7 O CDPPPB reverte a redução do peso de regiões cerebrais

Após cuidadosa dissecação dos cérebros para os experimentos de western blot e RT-qPCR, as regiões do estriado e na formação hipocampal dos três grupos experimentais foram pesadas. Observou-se uma redução na massa do estriado (FIG.

14A) e da formação hipocampal (**FIG. 14B)** dos camundongos BACHD tratados com veículo, comparados aos WT, e esta redução no volume foi parcialmente revertida pelo tratamento com CDPPB. Deste modo, a prevenção da morte neuronal pelo CDPPB reflete-se no volume do estriado e formação hipocampal dos camundongos BACHD.

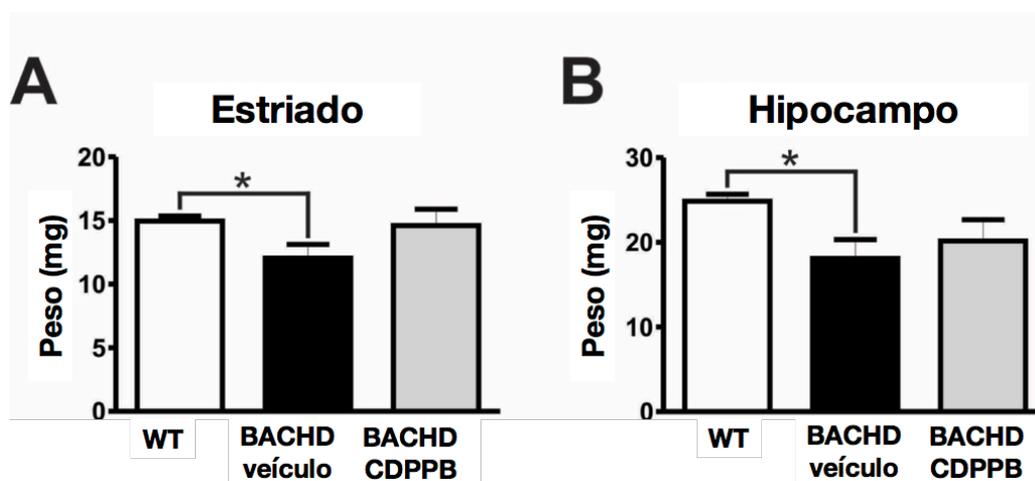


Figura 14: Efeito do CDPPB sobre o peso do cérebro de camundongos BACHD com 30 semanas de idade. Os gráficos mostram o peso em mg das regiões do estriado (A) e formação hipocampal (B) de camundongos WT (n = 3), BACHD tratados com veículo (n = 3) e BACHD tratados com CDPPB (n = 3). *indicam diferenças significativas comparados ao grupo WT ($p < 0,05$).

5.2.8 O tratamento crônico com CDPPB previne a morte neuronal

Visto que os camundongos BACHD não tratados apresentam uma redução no número de células no estriado, nós decidimos investigar, por meio de imunohistoquímica e utilizando anticorpo específico para neurônios (anti-NeuN), se a população de células que está reduzida no estriado de camundongos BACHD seriam

neurônios. A quantificação dos neurônios (positivos para NeuN) presentes no estriado nos mostrou que os camundongos BACHD com 52 semanas de idade tratados com veículo possuem uma redução significativa no número de neurônios, quando comparado ao grupo WT (**FIG. 15**). Entretanto, camundongos BACHD tratados com CDPPB não apresentaram perda neuronal, indicando que o tratamento com CDPPB foi capaz de prevenir a perda neuronal que ocorre em camundongos BACHD (**FIG. 15, B, C**).

Esses dados nos mostram que o tratamento crônico com CDPPB ativa vias neuroprotetoras em camundongos BACHD, e que esta ativação reflete diretamente na sobrevivência neuronal.

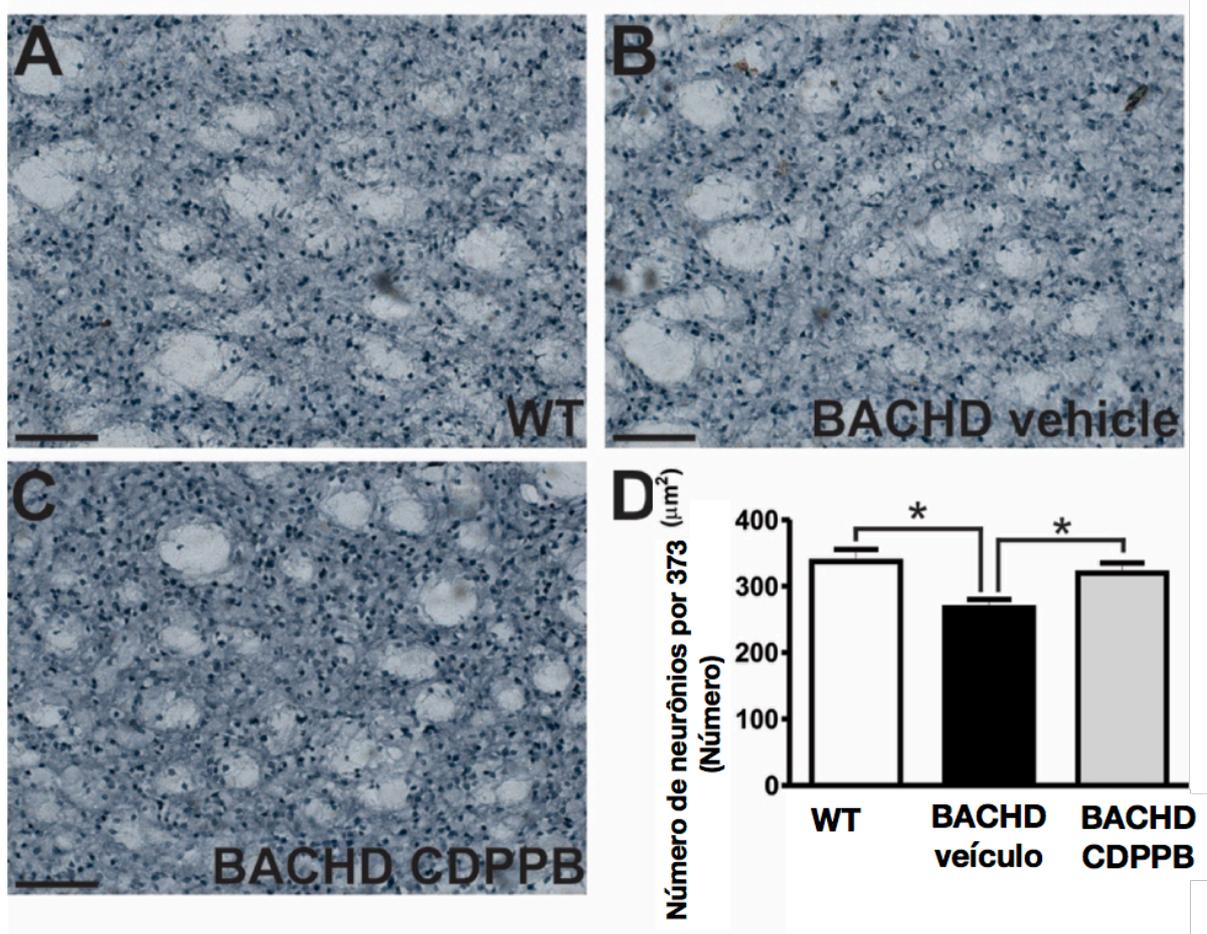


Figura 15: Efeito do tratamento crônico com CDPPB sobre a morte neuronal no estriado de camundongos BACHD com 52 semanas de idade.

Imagens representativas da imunohistoquímica do estriado de camundongos WT (n=3) **(A)**, BACHD tratados com veículo (n=3) **(B)** e BACHD tratados com CDPPB (n=3) **(C)**. Os gráficos apresentam a quantificação do número total de neurônios positivos para NeuN. Dados representam a média \pm SEM, de ao menos 9 imagens obtidas de 3 fatias por cada camundongo. * Indicam diferenças significativas comparados ao grupo BACHD tratado com veículo ($p < 0,05$).

5.2.9 O tratamento crônico com CDPPB aumenta a fosforilação de AKT

A proteína AKT participa diretamente da neuroproteção. Um de seus mecanismos neuroprotetores específicos para a DH é a fosforilação da proteína HTT, diminuindo a formação de agregados (Arrasate et al., 2004). Os agregados de HTT podem ser tóxicos aos neurônios e a AKT é importante para prevenção de sua formação, resultando na redução da morte neuronal. Tendo em vista que a fosforilação da AKT foi aumentada pelo tratamento *in vitro* com CDPPB (Doria et al., 2013), nós decidimos investigar se o tratamento crônico com CDPPB poderia alterar os níveis de fosforilação de AKT em camundongos BACHD.

A quantificação através de experimentos de western blot indicou que o tratamento com CDPPB promoveu um aumento da fosforilação de AKT nas regiões do córtex (**FIG. 16A**), estriado (**FIG. 16B**) e formação hipocampal (**FIG. 16C**) em camundongos BACHD, quando comparados aos grupos selvagem. Além disso, a ativação da AKT no estriado (**FIG. 16B**) e no formação hipocampal (**FIG. 16C**) de camundongos BACHD tratados com CDPPB foi maior do que o observado em camundongos BACHD não tratados com o fármaco.

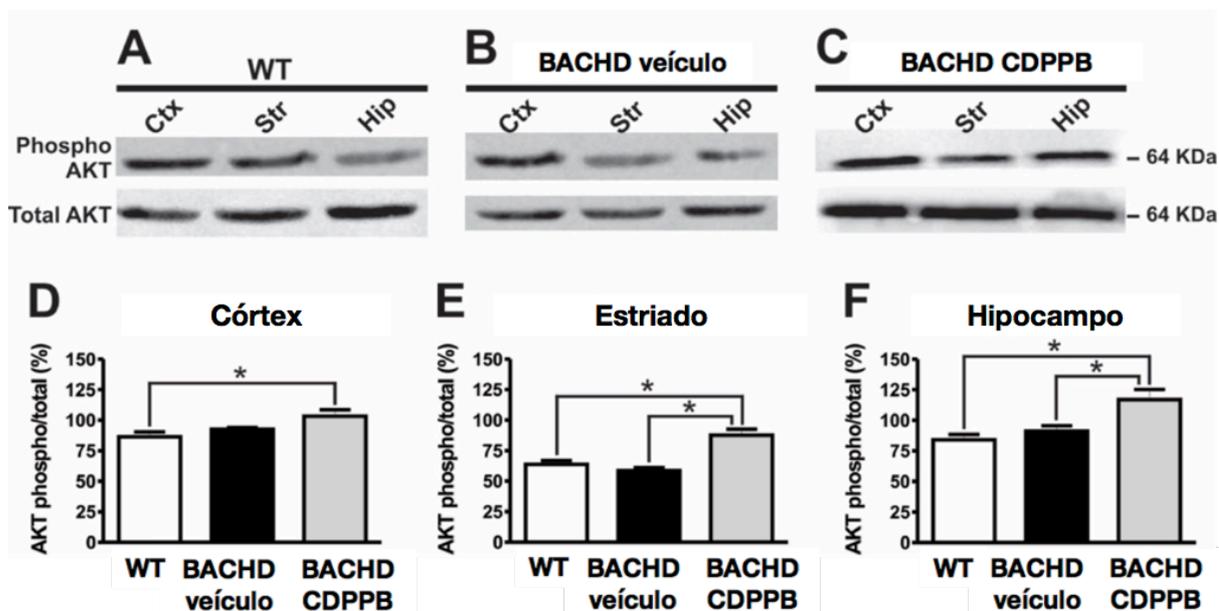


Figura 16: Fosforilação de AKT em camundongos WT e BACHD tratados com CDPPB. Figura representativa de imunoblots de fosfo-AKT (figura de cima) e de AKT total (figura de baixo), no 30 córtex (Ctx), estriado (Str) e formação hipocampal (Hip) de camundongos WT (A), BACHD tratados com veículo (B), e BACHD tratados com CDPPB (C). Os gráficos mostram a análise da expressão de fosfo-AKT normalizado pela expressão de AKT total, nas regiões do córtex (D), estriado (E) e formação hipocampal (F) de camundongos WT (n=3), BACHD tratados com veículo (n=3) e BACHD tratados com CDPPB (n=3), com 30 semanas de idade. Os dados representam a média \pm SEM, expressa em porcentagem da fosforilação basal de AKT total. * indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.2.10 O tratamento com CDPPB reduz o número de agregados de huntingtina

A formação dos agregados da HTT mutante é uma das possíveis causas da morte neuronal que ocorre na doença. A ativação da proteína AKT pode promover a fosforilação da proteína HTT mutada, diminuindo a formação de agregados de HTT e reduzindo a morte neuronal (Tartari et al., 2008; Saudou e Humbert, 2016).

Uma vez que o CDPPB promove um aumento dos níveis de fosforilação da AKT e que o tratamento com CDPPB reduz a morte neuronal, nós investigamos, por meio da imunohistoquímica, se o tratamento com CDPPB alteraria a quantidade dos agregados de HTT formados no cérebro dos camundongos BACHD.

Não foi observada marcação de agregados de HTT nas fatias de camundongos selvagens, embora camundongos BACHD tratados com veículo tenham apresentado níveis elevados de agregados (**FIG. 17A e 17B**), indicando que o anticorpo EM-48 é específico. Interessantemente, o número de agregados de HTT foi fortemente reduzido nos camundongos BACHD tratados com CDPPB, quando comparados ao grupo tratado com veículo (**FIG. 17**). Esses resultados nos levam à hipótese de que a ativação da AKT possa contribuir para a diminuição do número de agregados.

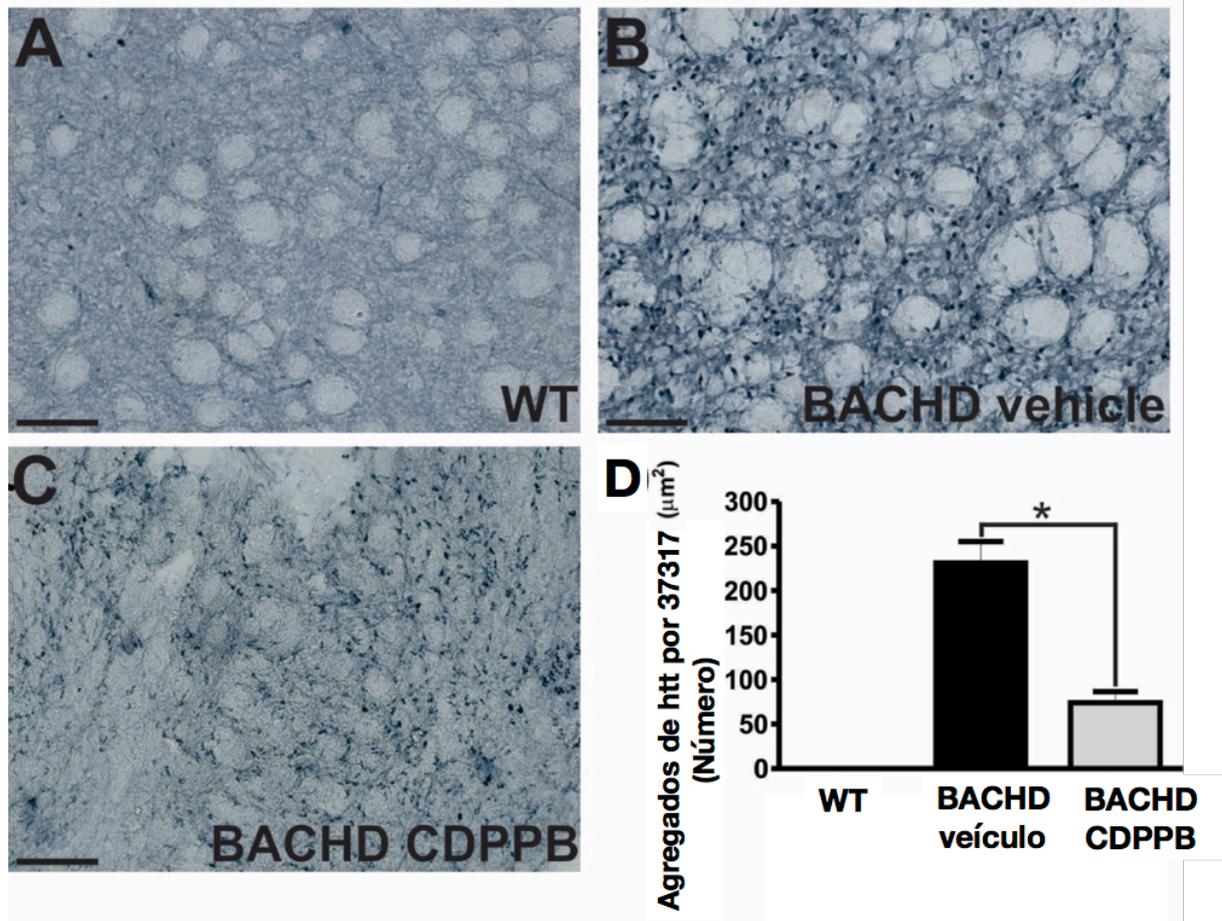


Figura 17: Número de agregados de huntingtina em BACHD com 52 semanas tratados com CDPPB. Imagens representativas de imunohistoquímica, utilizando anticorpo anti-agregados de huntingtina (EM-48), em fatias do estriado de camundongos WT (n=3) **(A)**, BACHD tratados com veículo (n=3) **(B)** e BACHD tratados com CDPPB (n=3) **(C)**. O gráfico mostra a quantificação da marcação positiva do EM-48 por 37317 μm². Dados representam a média ± SEM de ao menos 9 imagens obtidas de 3 fatias por cada camundongo. * Indicam diferenças significativas comparados ao grupo BACHD tratado com veículo (p < 0,05).

5.2.11 O CDPPB normaliza o número de vesículas na zona ativa

Para a análise detalhada da morfologia dos terminais sinápticos, realizamos a técnica de microscopia eletrônica. Foram analisadas a morfologia das sinapses presentes no estriado dos três grupos experimentais (camundongos WT, BACHD tratados com veículo e BACHD tratados com CDPPB), com 30 semanas de idade. Em uma primeira análise geral, não encontramos alterações na ultraestrutura das sinapses, dos terminais pré- e pós-sinápticos e organelas (**FIG. 18 A – F**).

Para analisar se o CDPPB promoveria alterações mais sutis, realizamos uma análise mais detalhada das sinapses. Quanto ao tamanho da área pré-sináptica e ao número de vesículas presentes no terminal pré-sináptico, não encontramos diferenças significativas entre os três grupos (**FIG. 18 G, H**). Entretanto, ao analisar o número de vesículas presentes na zona ativa, observamos que os camundongos BACHD tratados com veículo apresentaram menor número dessas vesículas, quando comparados aos camundongos selvagens, e que o tratamento com CDPPB aumentou, ao menos parcialmente, o número de vesículas presentes na zona ativa (**FIG. 18, I**). O número de vesículas na zona ativa é um parâmetro importante, uma vez que pode influenciar diretamente na liberação de neurotransmissores e, assim, na comunicação neuronal.

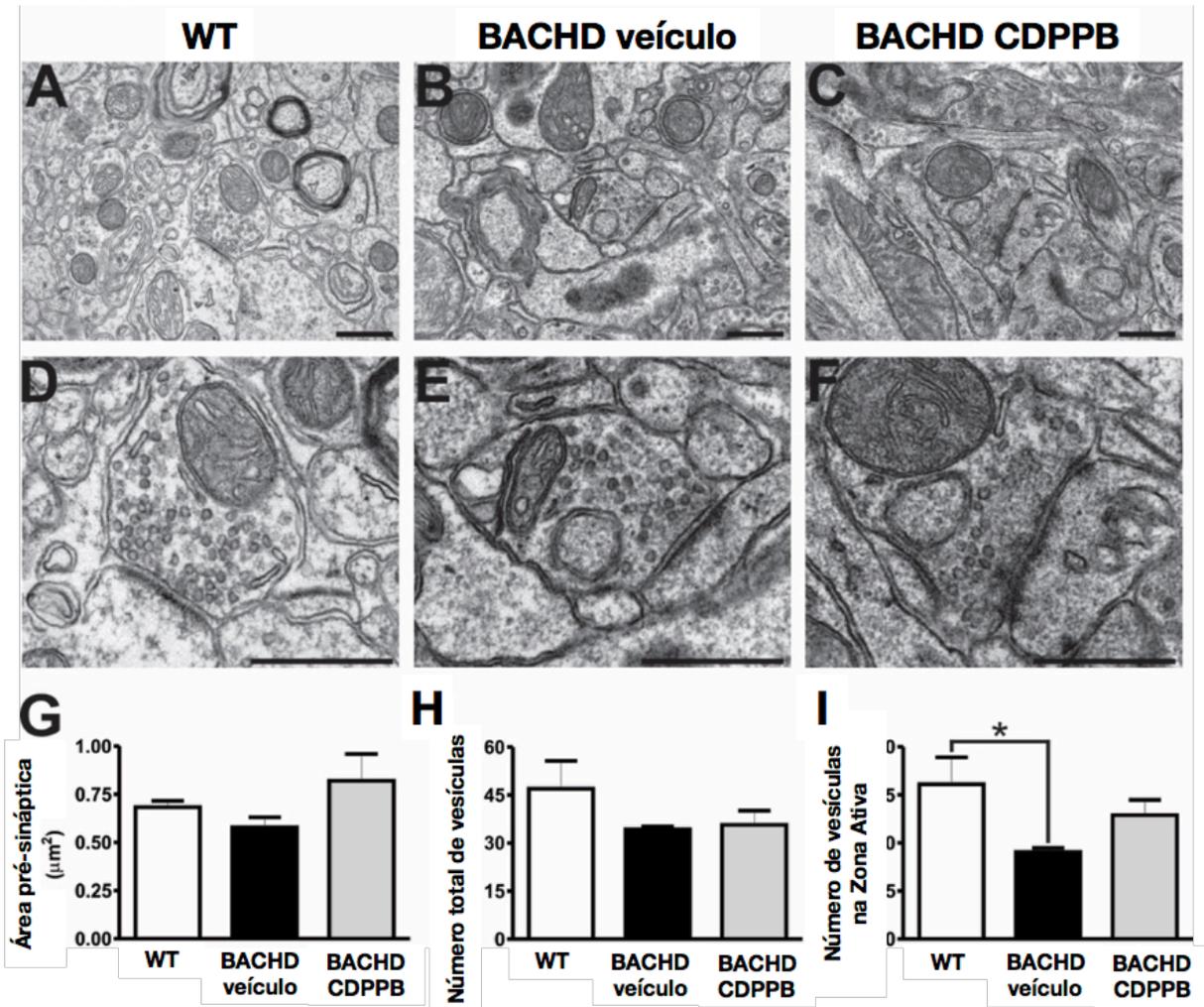


Figura 18: Efeito do tratamento crônico com CDPPB na morfologia das sinapses de camundongos BACHD com 30 semanas de idade. Imagens representativas da microscopia eletrônica do estriado de camundongos WT (n=3) (A), BACHD tratados com veículo (n=3) (B) e BACHD tratados com CDPPB (n=3) (C). As imagens (D), (E) e (F) mostram terminais pré-sinápticos de cada grupo, em maior aumento (50.000X). Os gráficos mostram a quantificação da área dos terminais pré-sinápticos (G), o número de vesículas por terminal pré-sináptico (H), e a média do número de vesículas presentes na zona ativa (I), para cada grupo de animal. Foram analisados 10 terminais nervosos por animal. * Indicam diferenças significativas comparados ao grupo WT (p < 0,05).

5.3 Discussão do capítulo 01

A morte neuronal é o principal fator causal de doenças neurodegenerativas, incluindo a DA, DP e a DH (G. Vonsattel e DiFiglia, 1998; Ribeiro et al., 2011). Fármacos capazes de prevenir a neurodegeneração representam um instrumento terapêutico importante para o tratamento destas doenças. Neste estudo, demonstramos que o CDPPB, MAP do mGluR5, melhora vários aspectos relacionados à patologia e aos sinais da DH. Os resultados obtidos a partir do ensaio de morte neuronal demonstraram que o CDPPB é um fármaco neuroprotetor com alta eficácia, apresentando baixa toxicidade mesmo quando utilizada em altas concentrações. O efeito neuroprotetor do CDPPB pode ser resultado de sua capacidade de ativar vias neuroprotetoras, como a fosforilação de ERK1/2 e AKT e o aumento da expressão de BDNF. Além disso, o tratamento crônico com CDPPB reduz significativamente a quantidade de agregados de HTT no estriado de camundongos BACHD. Além de prevenir a morte neuronal e ativar vias neuroprotetoras, o CDPPB reverteu o déficit de memória em camundongos BACHD. O ganho no desempenho no teste de reconhecimento de objeto em nova localização pode ser explicado não só pelo efeito neuroprotetor do fármaco, como também pelo aumento no número de vesículas presentes na zona ativa em camundongos BACHD, o qual está diretamente relacionada ao aumento da quantidade de neurotransmissores liberados na fenda sináptica.

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; Tang et al., 2005b). Além de promover a libertação de Ca^{2+} através da ativação de receptores de IP3, o mGluR5 também pode ativar vias neuroprotetoras, tais como a

ERK1/2, AKT e BDNF (Tyler e Pozzo-Miller, 2003; Yang et al., 2004). Neste capítulo, demonstramos que além de aumentar a fosforilação de ERK1/2 no córtex e na formação hipocampal, o tratamento crônico com CDPPB levou a uma maior expressão de mRNA de BDNF no córtex de camundongos BACHD com 30 semanas de idade. A expressão de BDNF pela fosforilação de CREB pode ser aumentada pela estimulação de ERK1/2 (Balázs et al., 1997). Deste modo, o aumento da ativação de ERK1/2 no córtex pode contribuir para o aumento da expressão de BDNF. O BDNF é transportado de forma anterógrada a partir de aferentes corticais para dendritos e axônios terminais, sendo liberado em seus alvos no estriado. Assim, a maior parte do BDNF encontrado no estriado tem origem cortical (Zuccato e Cattaneo, 2007). Foi demonstrado anteriormente que a infusão de proteína BDNF no estriado de um camundongo modelo da DH aumentou a sobrevivência dos neurônios estriatais, bem como melhorou a função motora destes animais (Canals et al., 2004). Uma série de estudos indicam que o déficit de BDNF contribui de forma significativa na patogênese da DH, assim, fármacos que aumentam a expressão de BDNF poderiam ser uma ferramenta terapêutica importante na DH (Saudou et al., 1998).

A HTT mutante interage com uma série de proteínas em diversas vias celulares (Cisbani e Cicchetti, 2012). Deste modo, proteínas com papel fisiológico importante podem ser recrutadas pelos agregados de HTT, tornando-se fisiologicamente inativas e impactando o funcionamento celular normal (Zeron et al., 2001). Ao analisar a presença de agregados de HTT, encontramos uma significativa redução na quantidade de agregados de HTT em camundongos BACHD tratados com CDPPB, quando comparado ao veículo. Este achado pode ser explicado pelo aumento da fosforilação de AKT pelo tratamento com CDPPB em camundongos BACHD. A proteína AKT, além de inibir a morte neuronal induzida pela HTT mutante, inibe a

formação de inclusões intranucleares (Humbert et al., 2002). Além disso, a HTT mutante interfere no transporte axonal e liberação de vesículas (Trushina et al., 2004). Observamos uma redução significativa no número de vesículas na zona ativa em camundongos BACHD tratados com veículo, e esta redução foi parcialmente revertida pelo tratamento com CDPPB. A redução na liberação de vesículas sinápticas pode ter consequências fisiológicas importantes e pode explicar a redução nos níveis de BDNF no estriado, uma vez que esta redução pode ser devido tanto a uma redução nos níveis de mRNA de BDNF, bem como pela diminuição do transporte de vesículas de BDNF que ocorre na DH (Gauthier et al., 2004). O prejuízo no transporte de vesículas impacta diretamente a liberação de neurotransmissores.

Testes *in vivo* em animais e ensaios clínicos em humanos indicam que os MAPs do mGluR5 podem ser uma alternativa terapêutica para o tratamento da esquizofrenia, apresentando baixa toxicidade e boa tolerância pelos pacientes (Gray et al., 2008; Spear et al., 2011). A neuroproteção mediada pelos CDPPB via mGluR5 decorre da ativação de ERK1/2 e AKT, aumento da expressão de BDNF, e redução na formação de agregados de HTT. O CDPPB apresenta baixa toxicidade e é eficaz em proteger os neurônios do insulto de glutamato. Os experimentos comportamentais indicam que os camundongos BACHD apresentam um desempenho motor e de memória inferior aos WT e que o tratamento crônico com CDPPB melhorou o déficit de memória relacionado à DH, bem como melhorou a performance motora avaliada pelo rotarod. Assim, o CDPPB apresenta-se como uma ferramenta farmacológica potencial para tratar doenças neurodegenerativas, especialmente a DH.

6. Capítulo 02

O modulador alostérico positivo do mGluR5, VU0409551, melhora a plasticidade sináptica e a memória de um camundongo modelo da DH, o BACHD

6.1 Objetivos específicos do capítulo 02

- Investigar o efeito do tratamento sub-crônico com VU0409551 sobre a memória dos camundongos BACHD e WT;
- Investigar se o VU0409551 altera a localização subcelular do mGluR5;
- Analisar a ativação neuronal através dos níveis de c-Fos em camundongos WT e BACHD, tratado com veículo ou VU0409551;
- Investigar a ativação de vias de sinalização envolvidas na plasticidade sináptica (ARG3.1/ARC e BDNF) pelo tratamento com o VU0409551 nos cérebros de camundongos BACHD e WT;
- Avaliar a toxicidade do VU0409551 *in vitro*;
- Avaliar se o tratamento com VU0409551 altera os níveis de marcadores pré- e pós-sináptico;
- Avaliar se camundongos BACHD apresentam alterações na morfologia e densidade de espinhas dendríticas
- Investigar se o tratamento com VU0409551 altera a morfologia e a densidade de espinhas dendríticas de camundongos WT e BACHD;

6.2 Resultados

6.2.1 O tratamento com o VU0409551 melhora o déficit de memória apresentado por camundongos BACHD.

Os camundongos BACHD exibem vários dos sinais típicos de pacientes com DH, bem como alterações moleculares e celulares que ocorrem na doença (Gray et al., 2008). Camundongos BACHD apresentam déficit de memória a partir de 30 semanas de idade (Walker e Walker, 2007; Doria et al., 2013). Interessantemente, a diminuição do número de neurônios em camundongos BACHD só pode ser observada a partir de 52 semanas de idade (Gray et al., 2008), indicando que os déficits de memória podem não estar relacionados apenas à perda neuronal, mas a alterações da plasticidade sináptica. Com o objetivo de avaliar o efeito do VU0409551 sobre o déficit de memória apresentado por camundongos BACHD, todos os testes comportamentais foram realizados com camundongos WT e BACHD entre 8 e 10 meses de idade. Os camundongos foram tratados com 3 mg/kg de VU0409551 ou veículo (20% de β -ciclodextrina) através de injeções intraperitoneais diárias ao longo de 8 dias.

Para avaliar o efeito do tratamento sub-crônico com VU0409551 sobre a memória dos camundongos BACHD, realizamos o teste de reconhecimento de objeto em nova localização. Aos oito meses de idade, diferentemente dos animais WT [WT-veículo: $t_{(6)}=3.44$; $P=0.01$; WT-VU0409551: $t_{(7)}=2.97$; $P=0.02$], camundongos BACHD tratados com veículo falharam em distinguir entre o objeto posto em nova localização e o objeto em localização conhecida, confirmando o déficit de memória apresentado por esse modelo animal [$t_{(7)}=0.03$; $P=0.97$] (**FIG. 19A**). Por outro lado, o tratamento com

VU0409551 promoveu uma melhora significativa da memória dos camundongos BACHD, os quais passaram a apresentar um desempenho semelhante aos camundongos WT [$t_{(8)}=4.46$; $P=0.002$] (**FIG. 19A**).

O medo é um mecanismo de defesa inato desencadeado por um estímulo aversivo (Phillips e LeDoux, 1992). A memória aversiva pode ser avaliada através do teste de medo condicionado. Neste teste, o estímulo inicial neutro não aversivo, que pode ser luz ou som, ganha propriedades emocionais após ser pareado a um estímulo nocivo, como por exemplo um choque nas patas, gerando uma resposta condicionada (CS). Uma vez que esta associação é aprendida, a ocorrência do estímulo neutro inicia uma resposta comportamental, autonômica e endócrina que ajuda o organismo a lidar com a situação aversiva (Rodrigues et al., 2004; Haettig et al., 2011). A expressão desta resposta, em forma de *freezing* (ausência total de movimento, exceto os respiratórios) serve como uma medida da memória criada durante a experiência de aprendizagem (Haettig et al., 2011). Na fase de teste, os camundongos WT tratados com veículo permaneceram em *freezing* por mais tempo durante o estímulo condicionante de som (CS+) do que na ausência de som (CS-) [WT-veículo: $t_{(58)}=3.45$; $P=0.004$; WT-VU0409551: $t_{(58)}=2.69$; $P=0.04$]. Por outro lado, os camundongos BACHD tratados com veículo não apresentaram diferença no tempo em *freezing* na presença ou ausência de som, indicando que esses camundongos apresentam déficit de memória [$t_{(58)}=0.95$; $P=0.82$] (**FIG. 19B**). Interessantemente, o tratamento com VU0409551 levou os camundongos BACHD e WT a permanecerem em *freezing* por mais tempo durante o CS+ comparado ao CS- [$t_{(58)}=3.75$; $P=0.002$]. Assim, o tratamento de camundongos BACHD com VU0409551 promoveu uma melhora do déficit de memória, uma vez que apresentaram uma associação correta entre som e choque. Uma vez que o tratamento com VU0409551 foi realizado por apenas 8 dias e que esse

tempo não seria suficiente para evitar a perda neuronal, nossos resultados sugerem que a capacidade do VU0409551 em melhorar a memória não esteja necessariamente relacionada ao seu efeito neuroprotetor, mas sim a alterações da plasticidade sináptica. Portanto, o VU0409551 apresenta um ótimo potencial para melhorar a memória desse modelo de camundongo transgênico da DH.

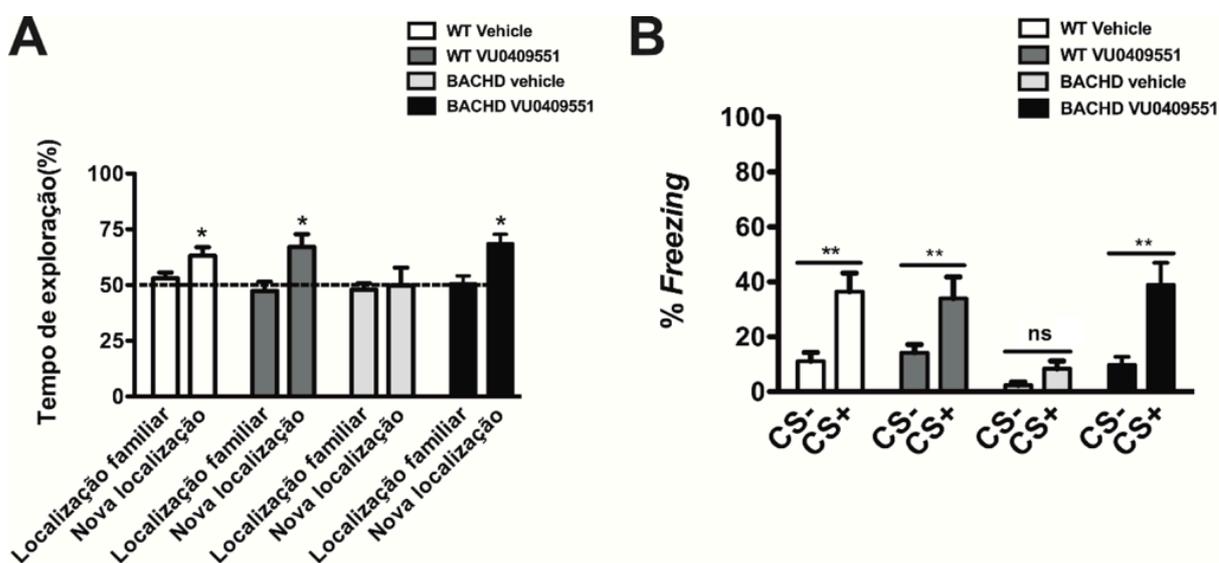


Figura 19: Efeitos do tratamento com VU0409551 na memória. **A.** Os gráficos mostram a porcentagem de tempo de exploração do objeto em nova localização, em relação ao tempo explorando os dois objetos pelos camundongos. Os dados representam \pm SEM, expresso como uma porcentagem de tempo explorando ambos os objetos. * indica diferenças significativas da exploração em relação ao acaso (50%) ($p < 0.05$). **B.** Gráfico mostra a resposta de *freezing* dos camundongos WT e BACHD na presença ou ausência do estímulo condicional (CS+ e CS-). Média \pm SEM de tempo em *freezing* durante CS+ e CS- * Indica diferença significativa entre o estímulo CS+ e CS- ($p < 0,05$). ns indica que não há diferença entre CS+ e CS- ($n = 7-9$).

Para avaliar se a falha dos camundongos BACHD em explorar o objeto colocado na nova localização seria resultado de uma hipolocomoção por parte desses animais, a atividade locomotora espontânea dos camundongos WT e BACHD tratados com 3 mg/kg de VU0409551 ou veículo foram avaliados através do aparato de campo aberto. Ao longo do experimento, os animais puderam explorar livremente a arena por 60 min. Não encontramos diferença significativa na distância total percorrida entre qualquer grupo testado [Genótipo: $F_{(1,29)}=0.46$, $P=0.83$; Tratamento: $F_{(1,29)}=0.26$, $P=0.62$; Interação: $F_{(1,29)}=0.66$, $P=0.42$] (**FIG 20. A e B**). O tempo total no centro do aparato é uma medida de comportamento que pode ser relacionada a um efeito ansiolítico, uma vez que os roedores têm uma tendência a passar mais tempo próximos às paredes do aparato do que no centro da arena, um ambiente desprotegido (Bailey e Crawley, 2009). Não encontramos diferenças na distância percorrida no centro entre os grupos experimentais testados [Genótipo: $F_{(1,29)}=0.11$, $P=0.74$; Tratamento: $F_{(1,29)}=0.43$, $P=0.52$; Interação: $F_{(1,29)}=0.30$, $P=0.59$] (**FIG. 20 C e D**). Em conjunto, esses dados sugerem que o tratamento com VU0409551 não promoveu mudanças na atividade locomotora ou comportamento relacionado à ansiedade.

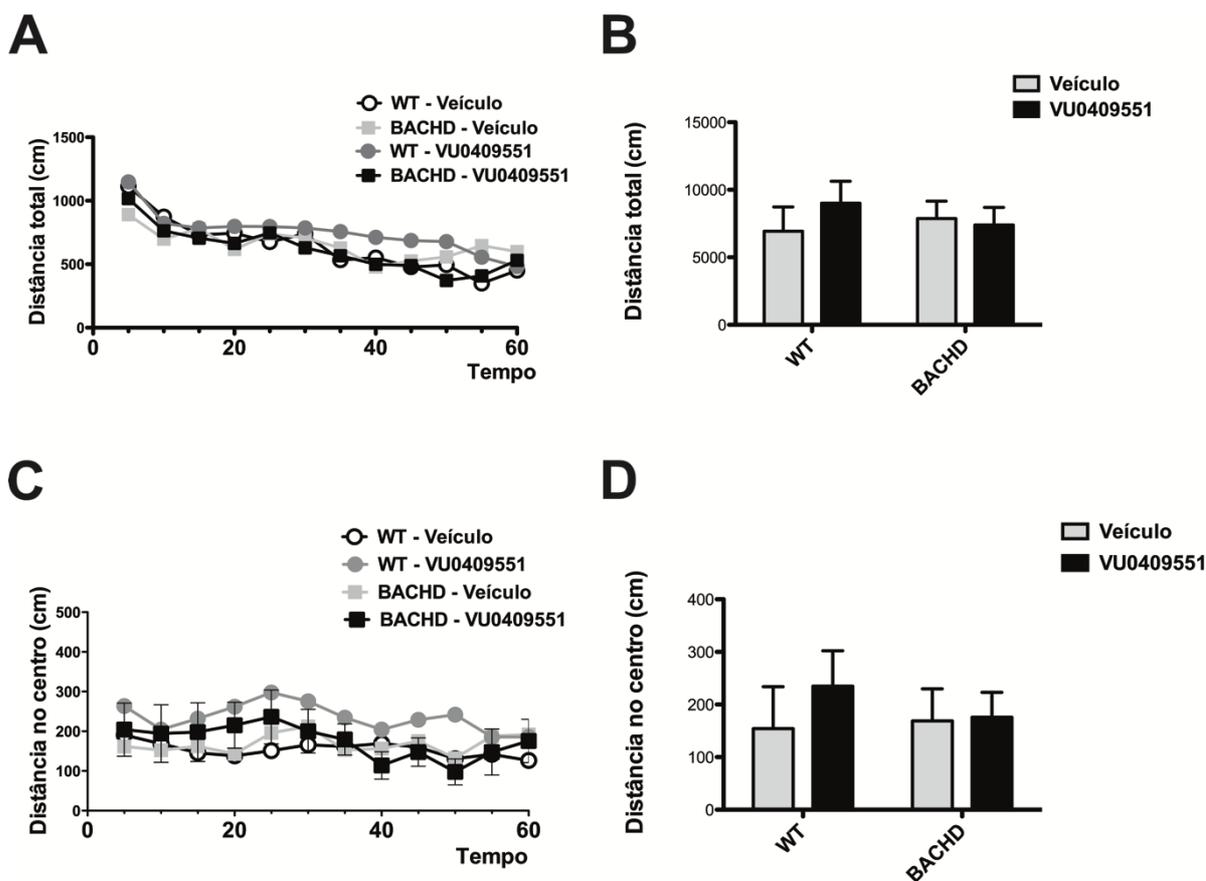


Figura 20: Efeitos do tratamento com VU0409551 sobre a locomoção. Os gráficos mostram a distância percorrida a cada 5 min (A), bem como a distância total percorrida no campo aberto ao longo de 60 minutos (B). Os gráficos mostram ainda a distância a cada 5 min (C), bem como a distância total percorrida no centro do aparato ao longo de 60 minutos (D). Os dados representam a média \pm SEM (n = 7-9).

6.2.2 O VU0409551 aumenta a expressão de mGluR5 na membrana neuronal.

A ação farmacológica do VU0409551 está relacionada a sua capacidade de modular o mGluR5, possivelmente através da ativação das vias ERK1/2/CREB/BDNF, independente dos receptores NMDA (Rook et al., 2015). Para investigar se o tratamento com VU0409551 altera a expressão subcelular do mGluR5, as proteínas

da membrana plasmática das fatias da formação hipocampal e do estriado de camundongos WT e BACHD tratados com veículo ou VU0409551 foram biotinizadas. A análise estatística indicou que o tratamento com VU0409551 teve um efeito significativo na expressão de mGluR5 nas fatias da formação hipocampal [Genótipo: $F_{(1,12)}=1.09$, $P=0.32$; Tratamento: $F_{(1,12)}=6.68$, $P=0.02$; Interação: $F_{(1,12)}=2.81$, $P=0.11$] e no estriado [Genótipo: $F_{(1,12)}=0.02$, $P=0.89$; Tratamento: $F_{(1,12)}=12.80$, $P=0.004$; Interação: $F_{(1,12)}=0.02$, $P=0.89$] (**FIG. 21A e B**). Entretanto, o tratamento com VU0409551 aumentou a expressão do mGluR5 na membrana plasmática das fatias obtidas de camundongos BACHD, tanto na formação hipocampal (**FIG. 21A**) quanto no estriado (**FIG. 21B**). Além disso, não foram observadas alterações nos níveis do mGluR5 no lizado celular total obtido a partir de fatias da formação hipocampal [Genótipo: $F_{(1,20)}=0.16$, $P=0.69$; tratamento: $F_{(1,20)}=0.01$, $P=0.91$; Interação: $F_{(1,20)}=0.01$, $P=0.92$] (**FIG. 21C**) ou do estriado [Genótipo: $F_{(1,20)}=0.65$, $P=0.43$; Tratamento: $F_{(1,20)}=0.30$, $P=0.59$; Interação: $F_{(1,20)}=0.42$, $P=0.52$] (**FIG. 21D**) de camundongos BACHD, quando comparado a camundongos WT. Assim, diferentemente do que seria esperado para um agonista clássico, o VU0409551 parece alterar a localização subcelular do mGluR5, favorecendo a expressão do receptor na membrana plasmática.

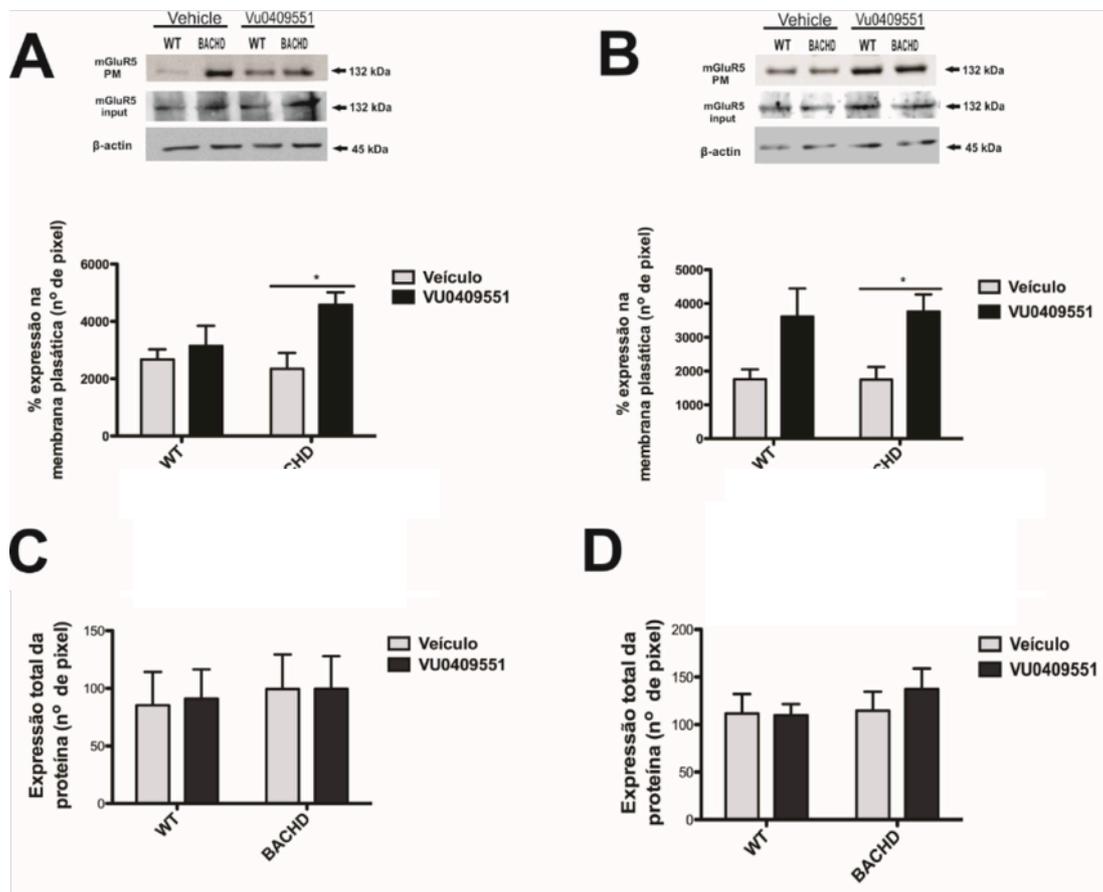


Figura 21: Efeito do tratamento com VU0409551 sobre a expressão de mGluR5 total e na membrana plasmática. São mostradas figuras representativas de imunoblots do mGluR5 expresso na membrana plasmática (blot superior), mGluR5 expresso no lizado total (blot no meio) e β -actina (blot inferior) em fatias da formação hipocampal (A) e do estriado (B) de camundongos WT e BACHD, tratados com veículo ou VU0409551. Os gráficos mostram a quantificação da expressão do mGluR5 na membrana plasmática em fatias da formação hipocampal (A) e do estriado (B) de camundongos WT e BACHD, tratados com veículo ou VU0409551. Os gráficos mostram a expressão celular total de mGluR5 na formação hipocampal (C) e no estriado (D) de camundongos WT e BACHD, tratados com veículo ou VU0409551. Os dados representam a média \pm SEM. * Indicam diferenças significativas em comparação com BACHD tratado com veículo ($p < 0,05$) ($n = 4$).

6.2.3 O tratamento com VU0409551 aumenta os níveis de c-Fos no hipocampo

O aumento da expressão de mGluR5 na membrana neuronal pode levar ao aumento da ativação das vias de sinalização dependentes desse receptor. Já foi demonstrado anteriormente que o VU0409551 é capaz de promover um aumento da ativação de ERK1/2 (Rook et al., 2015). A ERK1/2 é capaz de promover um aumento da expressão de c-Fos via elemento responsivo a AMPc (CREB). O c-Fos é produto do gene de expressão imediata e é amplamente utilizado como marcador de ativação neuronal (Morgan et al., 1987; Hasson et al., 2009). Uma vez que a ativação neuronal é um fator importante para a plasticidade sináptica, nós medimos os níveis de c-Fos nos camundongos WT e BACHD tratados com veículo ou VU0409551 através de experimentos de western-blot. No geral, o tratamento com VU0409551 teve um efeito significativo na expressão da proteína C-Fos na formação hipocampal [Genótipo: $F_{(1,18)}=1.10$, $P=0.31$; Tratamento: $F_{(1,18)}=11.40$, $P=0.003$; Interação: $F_{(1,18)}=1.34$, $P=0.25$ (**FIG. 22A**). Entretanto, não houve diferença nos níveis de c-Fos entre os grupos experimentais quando se analisou a expressão de c-Fos no estriado [Genótipo: $F_{(1,18)}=0.21$, $P=0.65$; Tratamento: $F_{(1,18)}=0.14$, $P=0.71$; Interação: $F_{(1,18)}=0.51$, $P=0.48$] (**FIG. 22B**). Assim, o tratamento com VU0409551 promoveu um aumento dos níveis de c-Fos na formação hipocampal dos camundongos BACHD, o que é um indicativo de aumento da atividade neuronal nessa região cerebral.

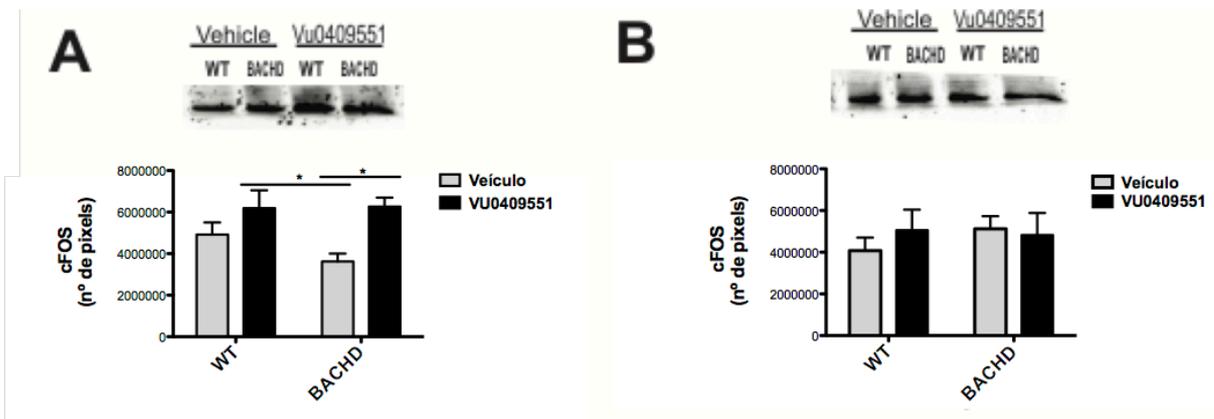


Figura 22: Níveis de c-Fos após o tratamento com VU0409551. São mostradas imagens representativas de imunoblots para o c-Fos na formação hipocampal **(A)** e no estriado **(B)** de camundongos WT e BACHD, tratados com veículo ou VU0409551. Os gráficos mostram a quantificação da expressão de C-Fos na formação hipocampal **(A)** e no estriado **(B)** de camundongos WT e BACHD, tratados com veículo ou VU0409551. Os dados representam a média \pm SEM. * Indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) ($n = 5-6$).

6.2.4 O tratamento com VU0409551 aumenta os níveis de mRNA de BDNF

A via ERK1/2/CREB, além de promover um aumento da expressão de c-Fos, também pode levar a uma maior expressão de BDNF. O BDNF desempenha um papel crítico na neuroproteção e na memória ao estimular a formação da fase tardia do LTP em sinapses glutamatérgicas em várias regiões cerebrais (Tyler e Pozzo-Miller, 2003). Para quantificar a expressão de BDNF, utilizamos a técnica de qPCR. O tratamento com VU0409551 teve um efeito significativo nos níveis de mRNA de BDNF na formação hipocampal [Genótipo: $F_{(1,20)}=3.72$, $P<0.07$; Tratamento: $F_{(1,20)}=14.88$, $P=0.001$; Interação: $F_{(1,20)}=0.23$, $P=0.63$] **(FIG. 23A)**, mas não no estriado [Genótipo:

$F_{(1,16)}=0.43, P=0.52$; Tratamento: $F_{(1,16)}=0.01, P=0.91$; Interação: $F_{(1,16)}=0.17, P=0.69$

(FIG. 23B).

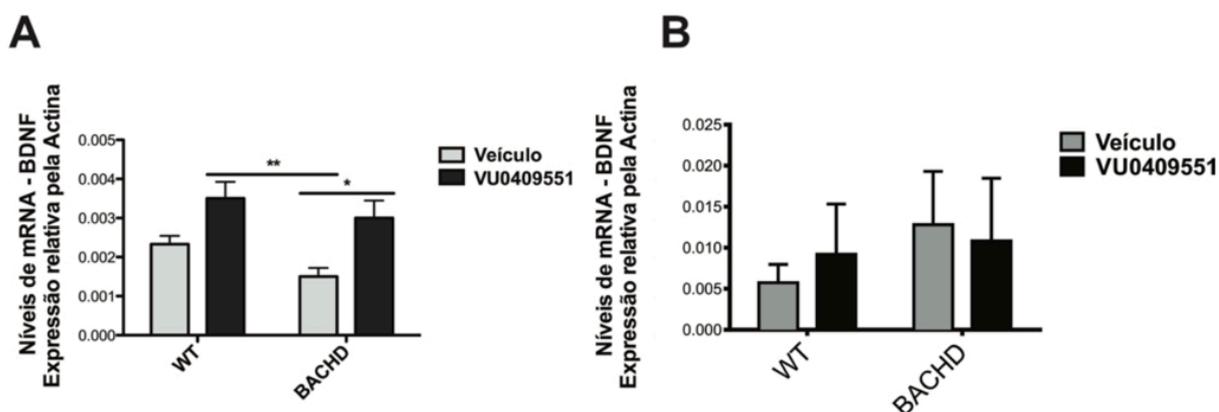


Figura 23: Efeito do VU0409551 sobre níveis de mRNA de BDNF. Os gráficos mostram os níveis de expressão de BDNF, determinados por RT-qPCR, na formação hipocampal (A) e estriado (B) de camundongos WT e BACHD tratados com VU0409551 ou veículo. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de expressão de actina. Os dados representam a média \pm SEM. * Indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) ($n = 6$).

6.2.5 O VU0409551 protege os neurônios estriatais da morte induzida por glutamato *in vitro*

Uma vez que o tratamento com VU0409551 levou a um aumento da expressão de BDNF, o qual é um fator neuroprotetor importante, decidimos investigar se o VU0409551 seria capaz de promover neuroproteção. Para avaliar o potencial neuroprotetor do VU0409551 frente ao estímulo por glutamato, bem como investigar sua toxicidade, realizamos uma curva concentração-resposta onde neurônios estriatais em cultura primária que foram obtidos a partir de embriões E15 de

camundongos C57 foram tratados com VU0409551 na presença ou na ausência do insulto de glutamato. O VU0409551 foi capaz de proteger neurônios estriatais do insulto de glutamato (50 μ M) em concentrações de 1, 10, 100 10.000 nM [$F_{(4,15)}=7.43$, $P=0.002$] (**FIG. 24**). Além disso, o VU0409551 não apresentou potencial tóxico uma vez que, na concentração máxima testada (10.000 nM), não levou à morte neuronal acima dos níveis basais [$F_{(4,16)}=2.12$, $P=0.13$].

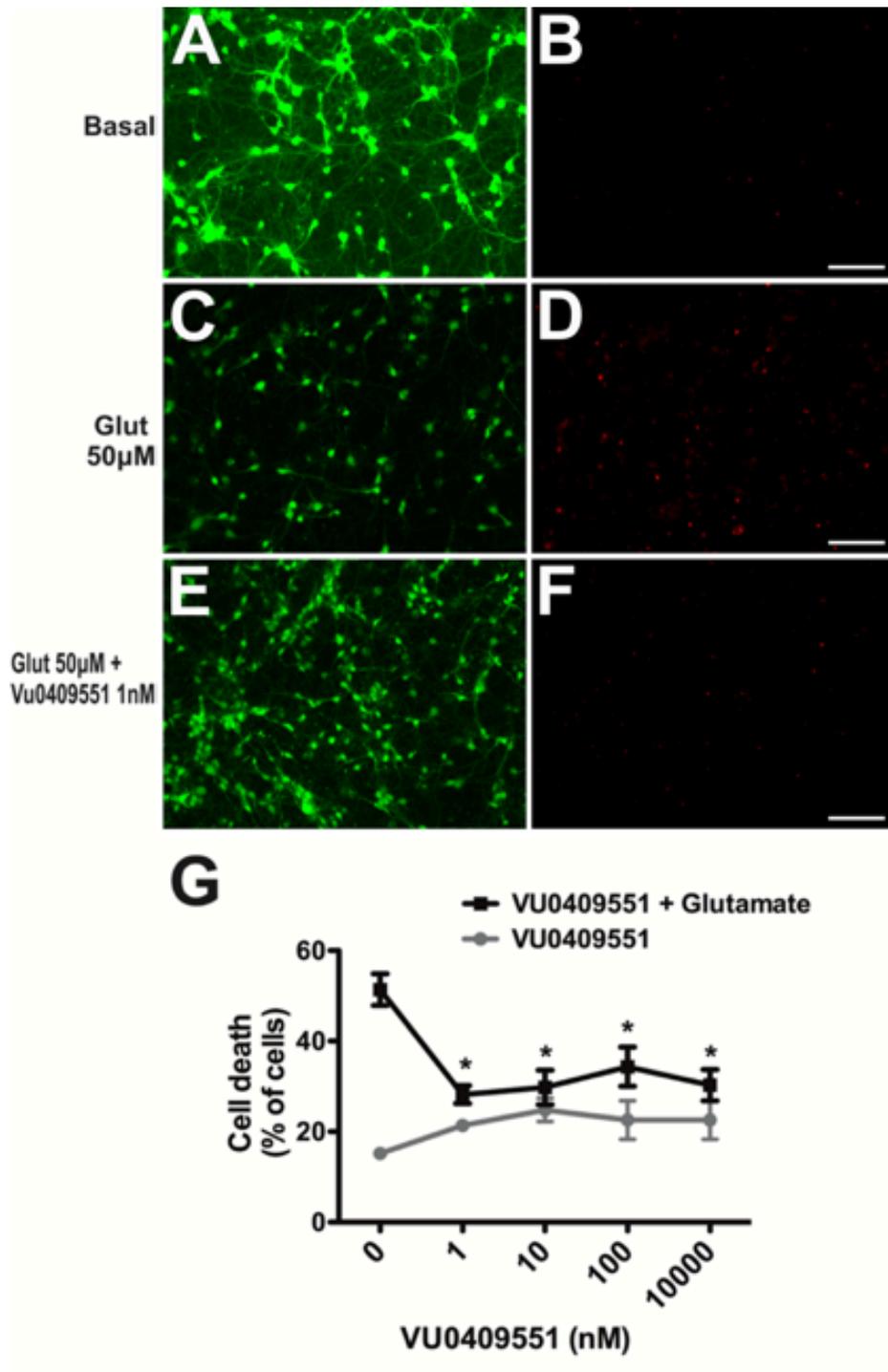


Figura 24: Curva concentração-resposta do VU0409551 em neurônios estriatais. Imagens de neurônios estriatais marcados com Calceína-AM (células vivas, verdes) (A, C e E) e homodímero de etídeo (células mortas, vermelhas) (B, D e F). Morte neuronal basal (A e B). Morte neuronal induzida por insulto de glutamato 50 μ M por 20 horas (C e D). Morte neuronal induzida por insulto de glutamato 50 μ M na presença

de 1.0 nM de VU0409551 (**E e F**). **G**. Gráfico mostra a porcentagem de morte neuronal sob o estímulo de VU0409551 nas concentrações de 1, 5, 10, 50, 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 VU0409551 ($p < 0,05$).

6.2.6 O tratamento com VU0409551 aumenta os níveis de mRNA de Arg3.1/ARC

O aumento da expressão da proteína regulada por atividade e associada ao citoesqueleto (Arg3.1/ARC) representa uma resposta rápida às experiências de aprendizagem, indução de LTP ou estímulo por BDNF, e tem sido bastante relacionada à plasticidade sináptica (Lyford et al., 1995; Steward e Worley, 2001; Chowdhury et al., 2006). Além disso, a Arg3.1/ARC, assim como o BDNF, é um dos alvos de CREB (Wang e Zhuo, 2012). Utilizamos a técnica de qPCR para medir os níveis Arg3.1/ARC e as análises mostraram O genótipo, assim como o tratamento com VU0409551, teve um efeito significativo na expressão de Arg3.1/ARC na formação hipocampal [Genótipo: $F_{(1,20)}=4.62$, $P=0.04$; Tratamento: $F_{(1,20)}=13.78$, $P=0.001$; Interação: $F_{(1,20)}=4.62$, $P=0.04$] (**FIG. 25A**). A análise do estriado não indicou diferenças entre os grupos estriado [Genótipo: $F_{(1,20)}=0.01$, $P=0.94$; Tratamento: $F_{(1,20)}=0.01$, $P=0.94$; Interaçao: $F_{(1,20)}=0.06$, $P=0.81$] (**FIG. 25B**). Esse aumento observado nos níveis do mRNA de BDNF e Arg3.1/ARC em camundongos BACHD pode ser um dos fatores contribuindo para a melhora no desempenho de memória observado em camundongos BACHD tratados com VU0409551.

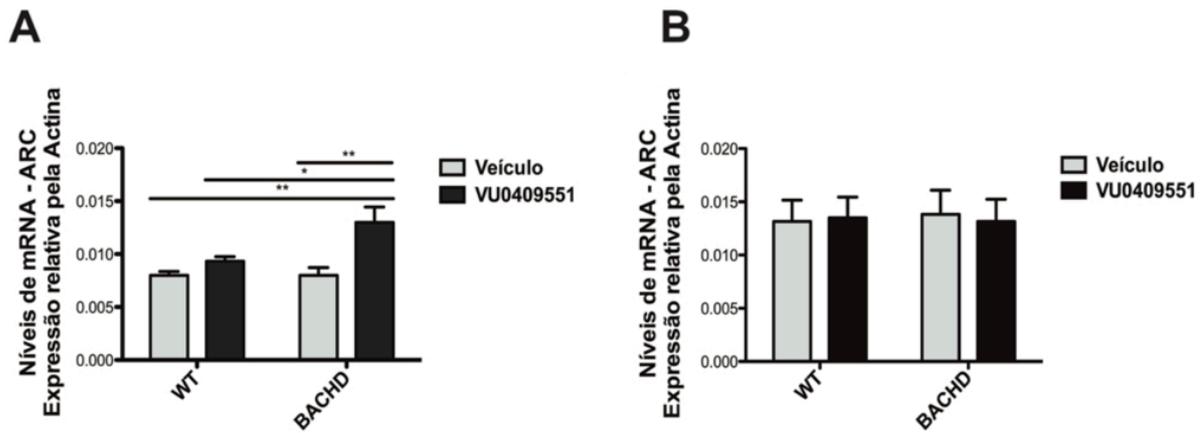


Figura 25: Efeito do tratamento com VU0409551 sobre os níveis de mRNA de Arg3.1/ARC. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de Arg3.1/ARC na formação hipocampal (A) e estriado (B) de camundongos WT e BACHD tratados com VU0409551 ou veículo, determinados por RT-PCR quantitativo. A reação de qPCR foi realizada em triplicada e normalizada para os níveis de mRNA de actina. Os dados representam a média \pm SEM. * Indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) ($n = 6$).

6.2.7 O tratamento com VU0409551 aumenta os níveis de mRNA de sintaxina 1A e PSD-95

A sintaxina 1A e a PSD-95 estão envolvidas no crescimento, ampliação e plasticidade de sinapses, reforçando a transmissão sináptica (Sala et al., 2001; Iasevoli et al., 2013). A sintaxina 1A é um dos alvos de CREB e tem um papel fundamental na exocitose de vesículas sinápticas, sendo largamente utilizada como um marcador de terminais pré-sinápticos (Li et al., 2004). Dessa forma, realizamos experimentos de qPCR para analisar os níveis de mRNA da sintaxina 1A. A análise estatística indicou que o tratamento com VU0409551 teve um efeito significativo nos

níveis de mRNA de sintaxina 1A na formação hipocampal [Genótipo: $F_{(1,20)}=0.44$, $P=0.51$; Tratamento: $F_{(1,20)}=9.32$, $P=0.006$; Interação: $F_{(1,20)}=2.85$, $P=0.11$] (**FIG. 26A**) e estriado [Genótipo: $F_{(1,20)}=0.28$, $P=0.07$; Tratamento: $F_{(1,20)}=9.09$, $P=0.007$; Interação: $F_{(1,20)}=1.54$, $P=0.23$] (**FIG. 26B**) de camundongos WT e BACHD. A análise *Post-hoc* indicou que o tratamento com VU0409551 promoveu um aumento nos níveis de mRNA de sintaxina 1A somente em camundongos BACHD, tanto na formação hipocampal (**FIG. 26A**) quanto no estriado (**FIG. 26B**).

A PSD-95 é largamente utilizada como marcador do número de terminais pós-sinápticos (El-Husseini et al., 2000) e interage com diversas proteínas na densidade pós-sináptica, inclusive a HTT (Li e Li, 2004). Uma vez que observamos um aumento da expressão da sintaxina 1A em função do tratamento com VU0409551, decidimos analisar a expressão da PSD95. No geral, o genótipo do camundongo e o tratamento tiveram um efeito significativo nos níveis de mRNA de PSD-95 na formação hipocampal [Genótipo: $F_{(1,20)}=5.86$, $P=0.03$; Tratamento: $F_{(1,20)}=17.57$, $P=0.0004$; Interação: $F_{(1,20)}=4.66$, $P=0.04$] (**FIG. 26C**) e no estriado [Genótipo: $F_{(1,20)}=3.47$, $P=0.08$; Tratamento: $F_{(1,20)}=5.94$, $P=0.02$; Interação: $F_{(1,20)}=0.52$, $P=0.48$] (**FIG. 26D**) de camundongos WT e BACHD tratado com veículo. Entretanto, o tratamento com VU0409551 aumentou a expressão de PSD-95 em animais BACHD, tanto na formação hipocampal (**FIG. 26C**) como no estriado (**FIG. 26C**). Assim, esses dados sugerem que o tratamento com VU0409551 promove um aumento da expressão de marcadores pré- e pós-sinápticos, indicando que esse MAP do mGluR5 possa promover alterações da morfologia e atividade sinápticas.

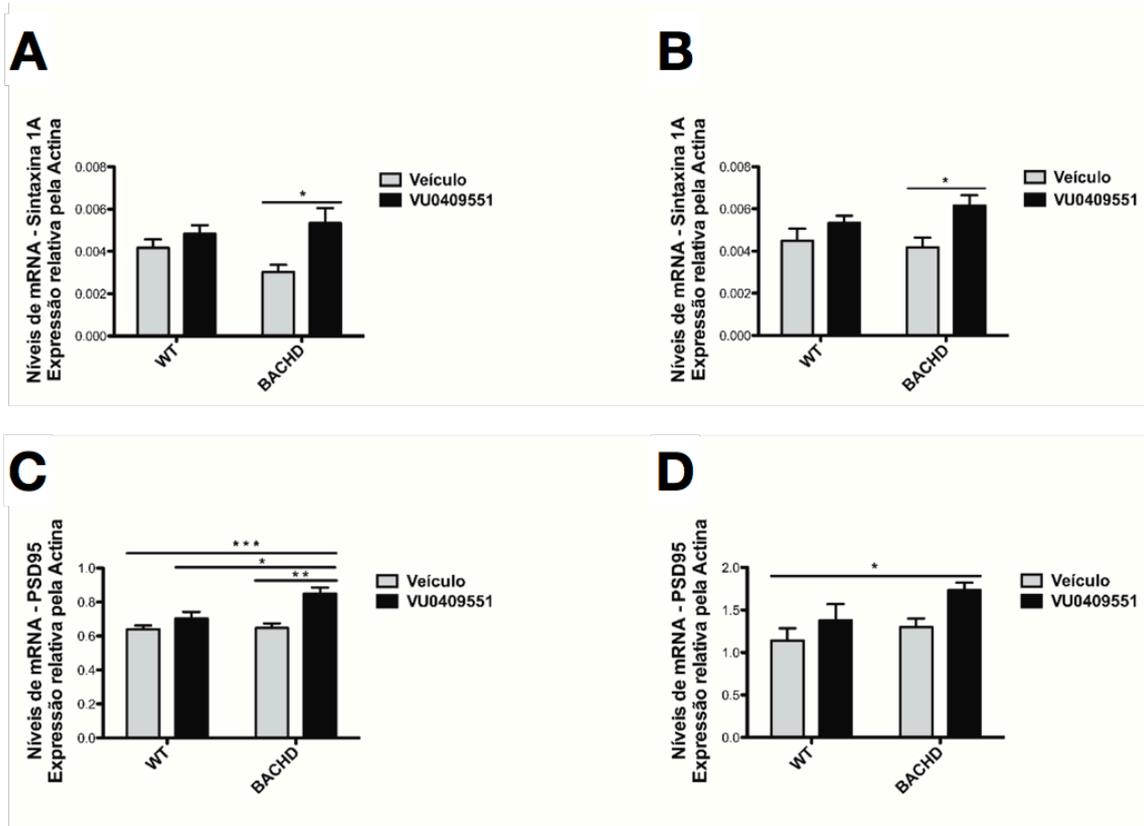


Figura 26: Efeito do tratamento com VU0409551 sobre os níveis de mRNA de Sintaxina 1A e PSD-95. Gráficos mostram os níveis de mRNA da sintaxina 1A na formação hipocampal **(A)** e estriado **(B)** de camundongos WT e BACHD tratados com veículo ou VU0409551, determinados por RT-PCR quantitativo. Os gráficos mostram os níveis de mRNA de PSD-95 na formação hipocampal **(C)** e no estriado **(D)** de camundongos WT e BACHD tratados com VU0409551 ou veículo, determinados por RT-PCR quantitativo. A reação de qPCR foi realizada em triplicada e normalizada pelos níveis de mRNA de actina. Os dados representam a média \pm SEM. * Indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) ($n = 6$).

6.2.8 Alterações na morfologia e número das espinhas dendríticas

A maioria das sinapses excitatórias no cérebro de mamíferos envolvem espinhas dendríticas, as quais representam o principal compartimento pós-sináptico de entrada excitatória no neurônio (Nimchinsky et al., 2002). A morfologia das espinhas dendríticas é muito diversa (**FIG. 27**) e as alterações em sua densidade, bem como em sua morfologia, refletem mudanças na força da transmissão sináptica (Nimchinsky et al., 2002). Nossos dados demonstraram um aumento na expressão de mGluR5 na membrana plasmática, bem como aumento nos níveis de mRNA de PSD-95. Uma vez que a superexpressão de PSD-95 promove um aumento na densidade das espinhas (El-Husseini et al., 2000), utilizamos a impregnação de Golgi-Cox para analisar as alterações no número e formas das espinhas dendríticas nos camundongos WT e BACHD.

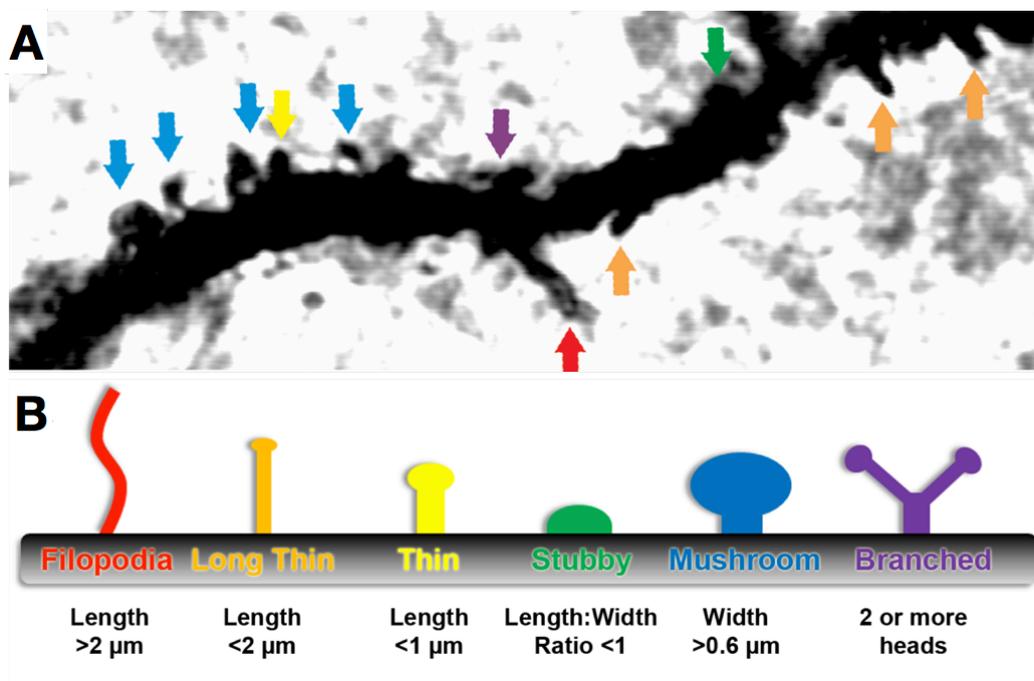


Figura 27: Imagem de um terminal dendrítico obtido pelo microscópio Confocal Nikon C2. A imagem mostra um terminal dendrítico terciário medindo 20 μm em um

neurônio hipocampal **(A)**. As setas coloridas apontam as diferentes formas de espinhas dendríticas. **B**. Desenho esquemático das espinhas mostradas em: Vermelho: Longo-fino; Laranja: filopódio; Amarelo: fino; Azul: Cogumelo; Verde: *Stubby*; Roxo: ramificado.

Fonte da figura B: MATSUZAKI, M. et al. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Nature neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 1086–92, 2001.

A análise estatística indicou que ambos genótipo e tratamento possuem um efeito significativo no número de espinhas dendríticas [Genótipo: $F_{(1,47)}=17.05$, $P=0.0001$; Tratamento: $F_{(1,47)}=7.49$, $P=0.009$; Interação: $F_{(1,47)}=0.02$, $P=0.89$] (**FIG. 28B**). Os resultados destas análises mostraram que os animais BACHD têm um número significativamente menor de espinhas dendríticas quando comparado a camundongos WT (**FIG. 28A**). Entretanto, o número de espinhas dendríticas não foi diferente comparando camundongos WT e BACHD tratados com VU0409551 (**FIG. 28A**). Analisamos ainda a morfologia de cada tipo de espinhas dendríticas (**FIG. 28B**). Essa análise indicou que o tratamento com VU0409551 teve um efeito significativo sob o número de espinhas do tipo cogumelo, uma forma madura de espinhas dendríticas [Genótipo: $F_{(1,47)}=0.15$, $P=0.70$; Tratamento: $F_{(1,47)}=15.52$, $P=0,0003$; Interação: $F_{(1,47)}=0.04$, $P=0,85$] (**FIG. 28C**). Interessantemente, o tratamento com VU0409551 aumentou significativamente o número dessas espinhas tanto em camundongos WT como em camundongos BACHD (**FIG. 28C**). Quanto ao formato ramificado, o qual é o último estágio de maturação das espinhas, a análise estatística indicou diferença significativa no número de espinhas ramificadas entre os camundongos BACHD e WT [Genótipo: $F_{(1,47)}=6.16$, $P=0.02$; Tratamento:

$F_{(1,47)}=13.64$, $P=0.0006$; Interação: $F_{(1,47)}=0.82$, $P=0.37$] (**FIG. 28D**). A análise *Post-hoc* indicou que o tratamento com VU0409551 promoveu um aumento desse tipo de espinha em camundongos WT (**FIG. 28D**). Em conjunto, esses dados sugerem que o tratamento com VU0409551 leva a um aumento do número e do grau de maturação de espinhas dendríticas.

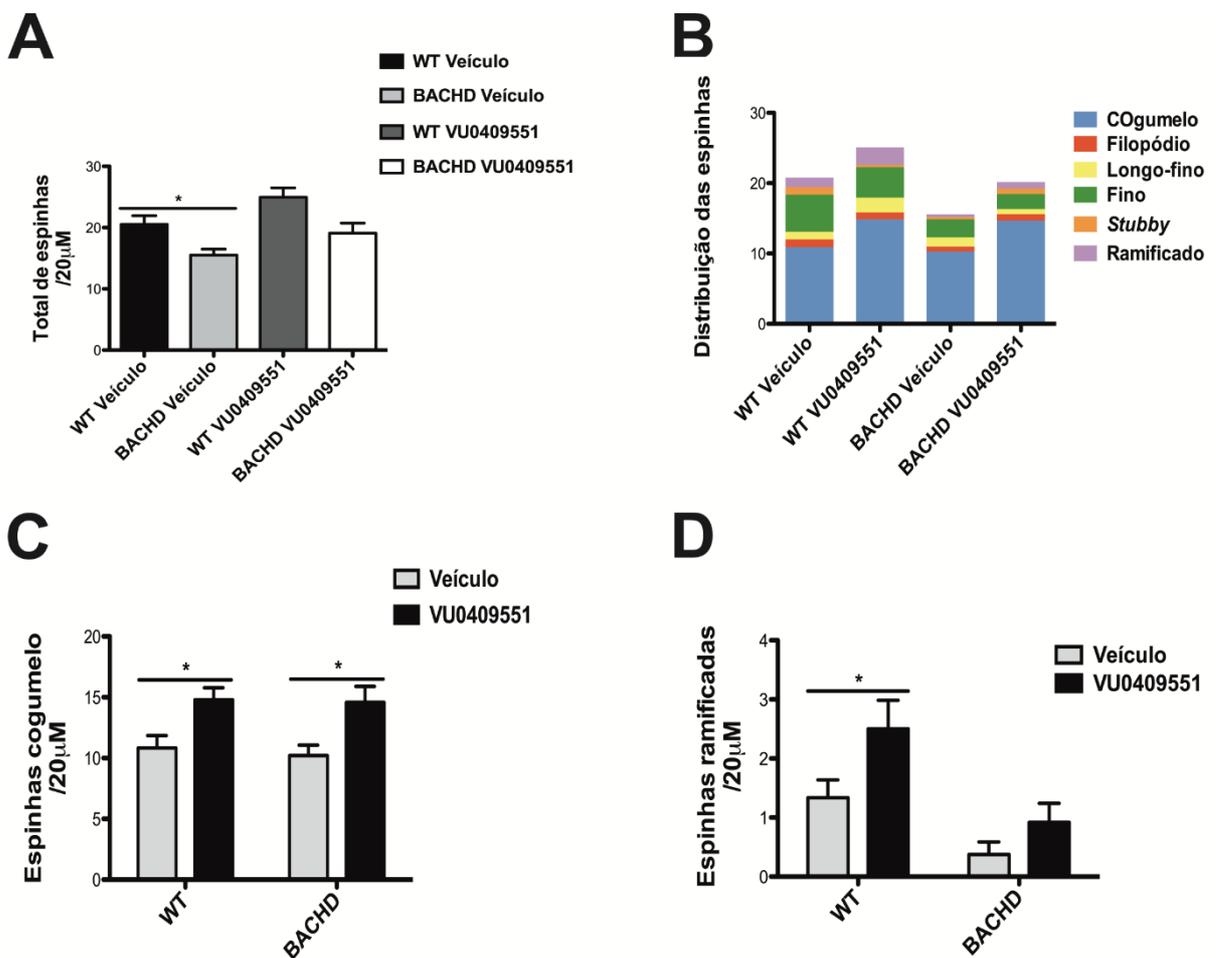


Figura 28: Efeito do tratamento com VU0409551 sobre a densidade e morfologia das espinhas dendríticas presentes na formação hipocampal. Os gráficos mostram o número total de espinhas (**A**) e a contribuição de cada tipo de espinha em 20 μ m de dendrito (**B**). Os gráficos mostram o número total de espinhas maduras apresentando formato cogumelo (**C**) e ramificada (**D**). Os dados representam a média \pm SEM. * Indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) ($n = 12-15$).

6.3 Discussão do capítulo 02

O comprometimento da memória é um achado comum em uma série de doenças neurodegenerativas, tais como DA, DH, esquizofrenia, etc. Os camundongos BACHD recapitulam muitos dos aspectos da neuropatologia e sinais da DH presentes em humanos, incluindo formação de agregados de HTT, morte neuronal, déficits cognitivos e motores (Gray et al., 2008). Corroborando os dados da literatura, no capítulo I nós demonstramos que a formação de agregados de HTT e a morte neuronal em camundongos BACHD só ocorre aos 12 meses de idade (Gray et al., 2008). Além disso, em um trabalho anterior do nosso grupo nós demonstramos que o tratamento de camundongos BACHD com CDPPB por apenas 7 dias foi suficiente para promover uma melhora da memória desses camundongos (Doria 2013). Uma vez que o comprometimento da memória precede a morte neuronal e que o tratamento com CDPPB por apenas 7 dias melhorou a memória de camundongos BACHD, hipotetizamos que os MAPs do mGluR5 promovam uma melhora de memória por ativar mecanismos de plasticidade sináptica que são independentes de seu efeito neuroprotetor. Corroborando essa hipótese, os dados apresentados no capítulo I demonstram que os camundongos BACHD apresentam uma redução do número de vesículas sinápticas na zona ativa e que o tratamento crônico com o CDPPB por 18 semanas promoveu um aumento no número de vesículas na zona ativa. No capítulo 2, demonstramos que a ativação do mGluR5 com VU0409551 leva a ativação de vias de sinalização importantes para a plasticidade sináptica, bem como a um aumento da expressão de genes essenciais à consolidação de memórias. Além disso, nossos

dados indicam ainda que o tratamento com o VU0409551 promove um aumento do número e do nível de maturação de espinhas dendríticas.

Em condições fisiológicas, após a ativação por seus agonistas, os receptores de superfície celular são geralmente endocitados, em um mecanismo necessário para a dessensibilização, evitando a superestimulação crônica de receptores (Trivedi e Bhattacharyya, 2012). Nossos dados demonstraram que o VU0409551 estabiliza o mGluR5 na membrana plasmática de células neurais do estriado e formação hipocampal de camundongos BACHD, possivelmente através de um mecanismo que reduz a endocitose. O aumento de mGluR5 na superfície neuronal pode facilitar a ativação de vias celulares dependentes desse receptor. Por exemplo, a estimulação do mGluR5 modula a ativação de ERK1/2, CamK, adenilato ciclase, PKC, influenciando na expressão de genes por meio da ativação de CREB e do recrutamento de co-ativadores específicos (Wisniewski e Car, 2002). As vias de CREB têm sido bastante estudadas na DH, uma vez que sua atividade pode ser regulada pela HTT, a qual pode influenciar na transcrição de genes por meio de sua ligação a fatores de transcrição, influenciando a síntese de proteínas (Li e Li, 2004). As vias de CREB estão diretamente relacionadas à formação de LTP, consolidação da memória e plasticidade sináptica. Interessantemente, a redução da expressão dos alvos de CREB estão associados ao déficit de memória observados em um camundongo modelo da DH, o DhdQ^{7/Q111} (Giralt et al., 2012)

Nossos resultados demonstram que o tratamento com VU0409551 foi capaz de aumentar os níveis de mRNA de c-Fos, um alvo de CREB, indicando um aumento da atividade neuronal. Outro alvo de CREB, a Arg3.1/ARC, tem sido amplamente relacionado à plasticidade sináptica e seu mRNA é rapidamente aumentado após experiências de aprendizado ou indução de LTP por BDNF (Giralt et al., 2012).

Corroborando os dados da literatura, observamos um aumento tanto nos níveis de mRNA de BDNF quanto de Arg.31/ARC na formação hipocampal dos camundongos tratados com VU0409551. Em nosso estudo observamos ainda um aumento da expressão da sintaxina 1A, um outro alvo de CREB. A sintaxina 1A faz parte do complexo SNARE, o qual é formado por um conjunto de proteínas que medeiam a fusão e exocitose no terminal pré-sináptico. Além disso, e sua expressão também é mediada via receptores TrK e NMDA (Guo et al., 2010). Nossos dados demonstraram que o tratamento com VU05409551 aumenta os níveis de mRNA de sintaxina 1A especificamente em BACHD, e este resultado também foi encontrado com relação à PSD-95, um marcador da região pós-sináptica.

Como foi visto, o tratamento com VU0409551 promoveu o aumento da expressão de vários genes, incluindo BDNF, c-Fos, Arg3.1/ARC, sintaxina 1A e PSD-95, os quais são essenciais para o aumento da densidade e maturação das espinhas dendríticas. Além disso, os níveis de mRNA de Arg3.1/ARC, sintaxina 1A e PSD-95 foram aumentados apenas em BACHD tratados com VU0409551. Hipotetizamos que este aumento específico em BACHD ocorra pelo aumento da expressão de mGluR5 na superfície neuronal devido à redução da endocitose deste receptor, o que resultaria em um aumento da sua sinalização. A endocitose do mGluR5 pode ser regulada pela proteína calmodulina (CaM), uma vez que já foi demonstrado que a ligação da CaM ao mGluR5 estabiliza o receptor na membrana celular (Lee et al., 2008). Interessantemente, além de se ligar ao mGluR5, a CaM também interage diretamente com a HTT selvagem e mutante, ligando-se com maior afinidade à HTT mutante (Bao et al., 1996). Além disso, calmodulina é ativada por Ca^{2+} , e a mobilização de Ca^{2+} via mGluR5 aumenta a ligação da CaM a este receptor (Ko et al., 2012). Foi demonstrado que o VU0409551 potencializa a mobilização de Ca^{2+} via mGluR5 na presença de

glutamato, e esta mobilização é independente de NMDA (Rook et al., 2015). Assim, sugerimos que o Ca^{2+} mobilizado aumenta a atividade de CaM, e que sua ligação ao mGluR5 pode estar aumentada devido à presença da HTT mutada, resultando no aumento da expressão de mGluR5 na superfície neuronal e, conseqüentemente, no aumento da ativação de vias de sinalização celular que promovem o aumento da expressão de vários genes importantes para a plasticidade sináptica.

Sabe-se que no SNC, mais de 90% das sinapses axo-dendríticas são excitatórias e ocorrem em espinhas dendríticas (Kater e Harris, 1994). Ao longo do desenvolvimento, as espinhas dendríticas sofrem alterações em sua morfologia em um mecanismo diretamente relacionado a sua função. Por exemplo, as formas imaturas das espinhas (filopodia, finas, longas) são altamente móveis e podem iniciar o contato sináptico (Ziv e Smith, 1996). As formas maduras (*stubby*, cogumelo e ramificado) são mais estáveis e contêm uma abundância de receptores que mantêm os altos níveis de atividade sináptica (Risher et al., 2014). Nossas análises mostraram que os camundongos BACHD possuem menos espinhas dendríticas que os camundongos WT e que o tratamento com VU0409551 reverteu esta perda. A redução na densidade de espinhas dendríticas já foi reportada em pacientes com DH (Graveland et al., 1985) e camundongos BACHD (Simmons et al., 2013). Nossos dados indicam que o tratamento com VU0409551, além de aumentar o número de espinhas do tipo cogumelo em camundongos BACHD e WT, também aumentam o número de espinhas ramificadas em WT. Corroborando esses resultados, dados da literatura demonstram que o tratamento sub-crônico com CDPPB promove o aumento da densidade e no número de espinhas formato cogumelo em ratos treinados para se auto-administrarem álcool (Gass et al., 2014). Juntos, esses dados sugerem que o

VU0409551 é um fármaco com potencial terapêutico para reverter o comprometimento da memória, um achado comum de uma série de doenças neurodegenerativas.

7. Conclusão

Neste estudo nós demonstramos o potencial dos MAPs do mGluR5, CDPPB e VU0409551, como ferramentas terapêuticas para tratar doenças neurodegenerativas, especialmente a DH. Por meio deste estudo, demonstramos que a modulação do mGluR5 leva a ativação de vias que favorecem neuroproteção, prevenindo a morte neuronal que ocorre na HD. Além disso, os MAPs do mGluR5 melhoram a memória de camundongos BACHD por promoverem o aumento de parâmetros relacionados à plasticidade sináptica.

ANEXOS

CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

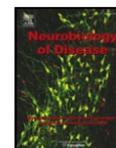
Vigência do Projeto	25/09/2016 a 01/09/2020
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico7
Nº de animais	68
Peso/Idade	30g / 3(meses)
Sexo	feminino
Origem	The Jackson Laboratory
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout8
Nº de animais	34
Peso/Idade	30g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	The Jackson Laboratory
*Espécie/linhagem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



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi



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



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

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

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

^c DB Biotech, Kosice 040 11, Slovakia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 May 2014

Revised 1 July 2014

Accepted 14 August 2014

Available online 24 August 2014

Keywords:

CDPPB

Metabotropic glutamate receptors

Huntington's disease

BDNF

Neuroprotection

Memory and cognition

ABSTRACT

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

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

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

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

of inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) and release of intracellular Ca²⁺ and mutant htt can enhance this cell signaling pathway, leading to toxic levels of intracellular Ca²⁺ (Ribeiro et al., 2010; Tang et al., 2005; Tang et al., 2003). However, mGluR5 stimulation can also promote activation of neuroprotective cell signaling pathways, involving ERK1/2 and AKT (Doria et al., 2013; Ribeiro et al., 2010). We have recently demonstrated that mGluR5 positive allosteric modulators (PAMs) can promote neuronal survival by activating AKT without triggering Ca²⁺ release (Doria et al., 2013). Moreover, it has been shown that mGluR5 PAMs have a positive effect on memory, facilitating neurotransmission and improving spatial learning (Ayala et al., 2009) and rescuing pharmacologically induced object recognition memory impairment (Reichel et al., 2011; Uslaner et al., 2009). In contrast, both mGluR5 receptor antagonism and genetic deletion have been shown to cause deleterious effects on learning and memory (Simonyi et al., 2010). Thus, mGluR5 PAMs are potential drugs to treat HD.

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

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

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

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

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

Materials and methods

Materials

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

Mouse model

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

Neuronal primary culture preparation

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

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

Drug administration

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

EM48 and NeuN immunohistochemistry

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

Immunoblotting

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

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

Quantitative RT-PCR

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

Cell death assay

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

Routine histology and transmission electron microscopy (TEM)

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

TEM image analysis

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

Object recognition

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

Rotarod test

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

Data analysis

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

Results

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

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

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

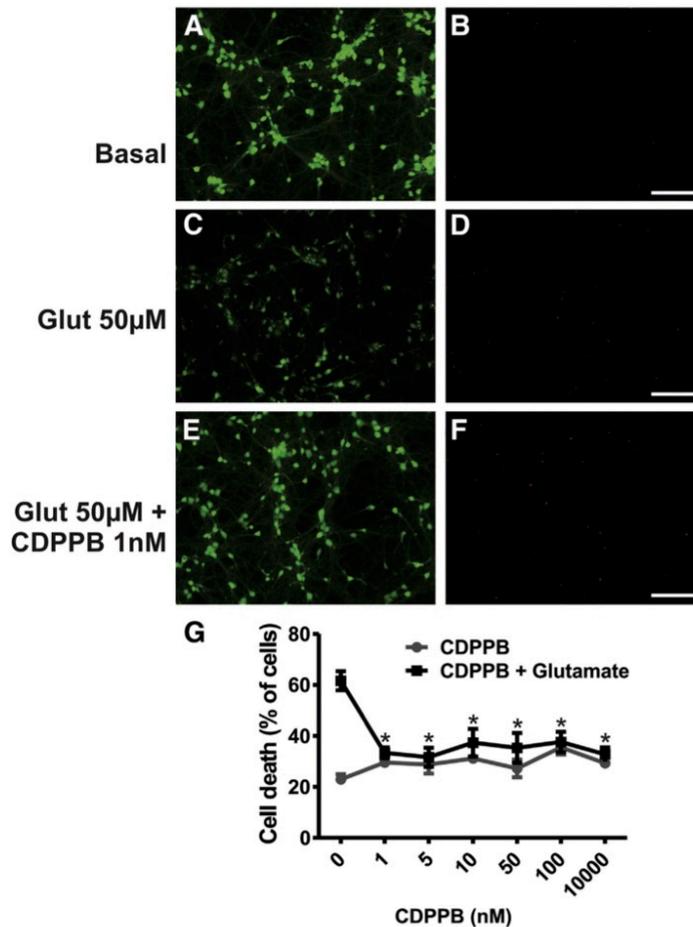


Fig. 1. CDPPB protects against glutamate-induced neuronal cell death. Shown is a representative image for primary cultured striatal neurons labeled with calcein AM (A, green, live cells) and ethidium homodimer-1 (B, red, dead cells) exhibiting basal neuronal death. Also shown is a representative image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

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

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

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

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

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

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

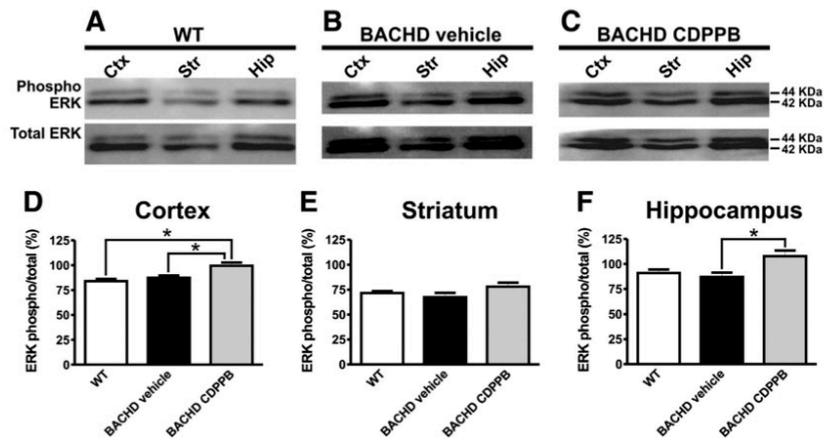


Fig. 2. ERK1/2 phosphorylation is augmented in 30 weeks old BACHD mice chronically treated with CDPPB. Shown are representative immunoblots for phospho-(upper panel) and total-ERK1/2 expression (lower panel) in the cortex (Ctx), striatum (Str) and hippocampus (Hip) of wild-type (WT) (A), vehicle-treated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

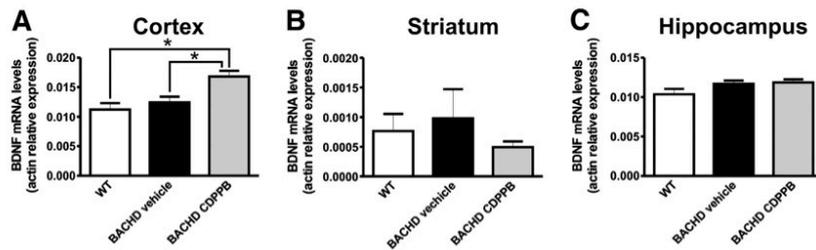


Fig. 3. BDNF gene expression is increased in 30 weeks old BACHD mice chronically treated with CDPPB. Graphs show mRNA levels of BDNF in the cortex, striatum and hippocampus of 30 weeks old wild-type (WT, $n = 3$) (D), vehicle-treated ($n = 3$) (E) and CDPPB-treated ($n = 3$) (F) BACHD mice determined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

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

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

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

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

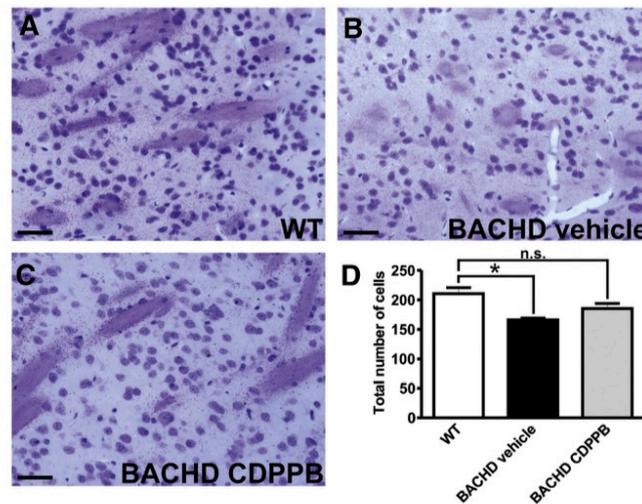


Fig. 4. CDPPB chronic treatment rescues cell loss in the striatum of 30 weeks old BACHD mice. Shown are representative histological images of the striatum from WT (A), vehicle-treated (B) and CDPPB treated (C) BACHD mice. Scale bar = 50 μ m. (D) Graph shows quantification of total number of cells found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

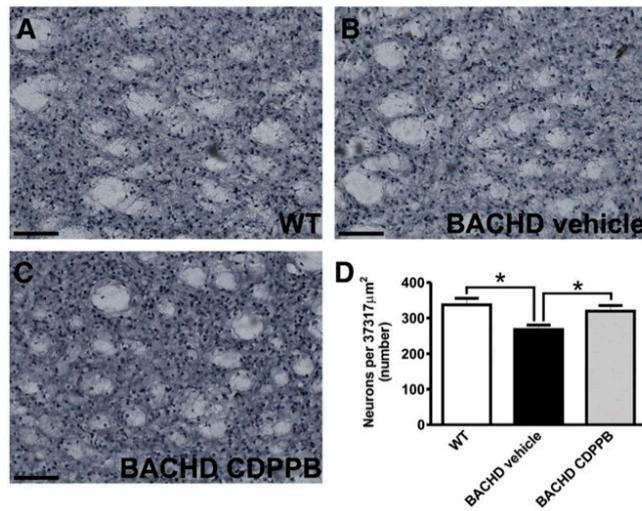


Fig. 5. CDPPB chronic treatment prevents neuronal cell loss in the striatum of 52 weeks old BACHD mice. Shown are representative images for NeuN immunostaining of the striatum from WT (n = 3) (A), vehicle-treated (n = 3) (B) and CDPPB-treated (n = 3) (C) BACHD mice. Scale bar = 100 μm. Graph shows quantification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

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

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

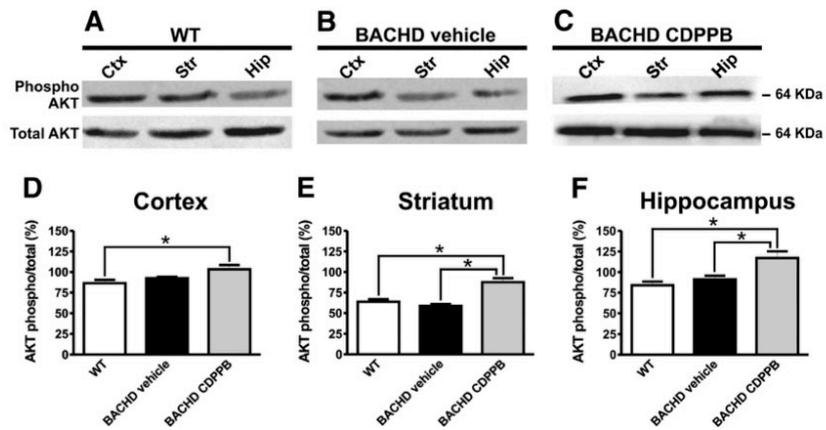


Fig. 6. AKT phosphorylation is augmented in 30 weeks old BACHD mice chronically treated with CDPPB. Shown are representative immunoblots for phospho- (upper panel) and total-AKT expression (lower panel) in the cortex (Cx), striatum (Str) and hippocampus (Hip) of wild-type (WT) (A) vehicle-treated (B)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

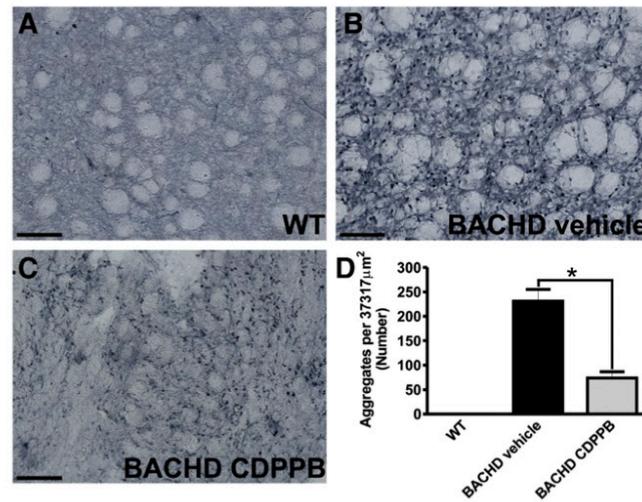


Fig. 7. Number of huntingtin aggregates in the striatum of 52 weeks old BACHD mice is reduced upon CDPPB chronic treatment. Shown are representative images for EM48 immunostaining of the striatum from WT (A), vehicle-treated (B) and CDPPB-treated (C) BACHD mice. Scale bar = 100 μm. Graph shows quantification of the number of EM48 labeled huntingtin aggregates per 37,317 μm² in the striatum from WT (n = 3), vehicle-treated (n = 3) and CDPPB-treated (n = 3) BACHD mice. Data represent the means ± SEM obtained from 9 images taken from 3 histological slices per mouse. * indicates significant difference as compared to vehicle-treated BACHD mice (p < 0.05).

Discussion

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

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

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

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

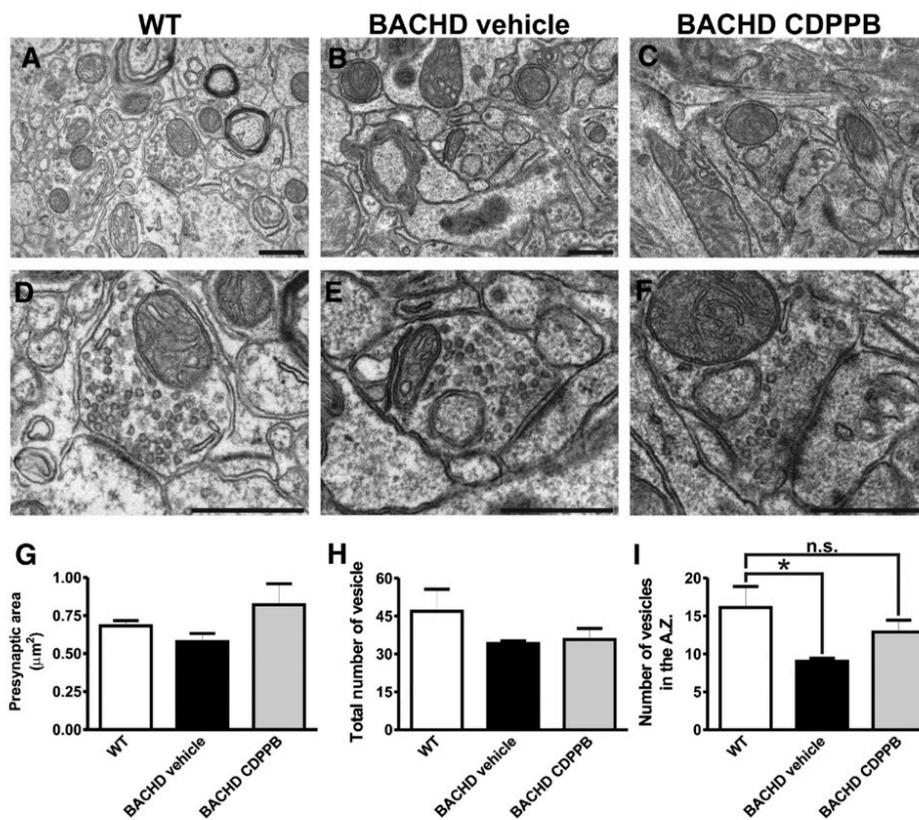


Fig. 8. CDPPB chronic treatment normalizes the number of synaptic vesicles in the active zone of 30 weeks old BACHD mice. Shown are representative panoramic electron micrographs (EMs) of the striatum from WT (A), vehicle-treated (B), and CDPPB-treated (C) BACHD mice. Scale bar = 500 nm. Magnification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

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

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

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

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

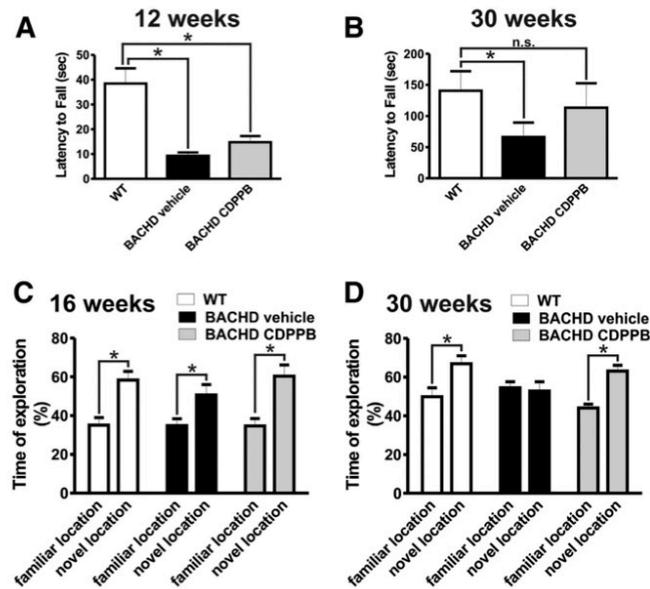


Fig. 9. CDPBP treatment improved BACHD mice performance on the rotarod and rescued object recognition memory. Graphs show latency to fall from accelerating rotarod by WT ($n = 11$), vehicle-treated ($n = 10$) and CDPBP-treated ($n = 8$) BACHD mice at 12 (A) and 30 weeks (B) of age. Each animal was tested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

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

Abbreviations

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

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

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

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

References

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

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

**EXPERT
OPINION**

1. Huntington's disease
2. Metabotropic glutamate receptors
3. mGluR5 as a therapeutic target in Huntington's disease
4. Conclusion
5. Expert opinion section: the future of mGluR5 as a target for the treatment of HD

informa
healthcare

Metabotropic glutamate receptor 5 as a potential therapeutic target in Huntington's disease

Fabiola M Ribeiro, Alison Hamilton, Juliana G Doria, Isabella M Guimaraes, Sean P Cregan & Stephen SG Ferguson[†]

[†]University of Western Ontario, Robarts Research Institute, Department of Physiology and Pharmacology, J. Allyn Taylor Centre for Cell Biology, London, Canada

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, which underlies the loss of striatal and cortical neurons. Glutamate has been implicated in a number of neurodegenerative diseases, and several studies suggest that the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) may represent a target for the treatment of HD.

Areas covered: The main goal of this review is to discuss the current data in the literature regarding the role of mGluR5 in HD and evaluate the potential of mGluR5 as a therapeutic target for the treatment of HD. mGluR5 is highly expressed in the brain regions affected in HD and is involved in movement control. Moreover, mGluR5 interacts with htt and mutated htt profoundly affects mGluR5 signaling. However, mGluR5 stimulation can activate both neuroprotective and neurotoxic signaling pathways, depending on the context of activation.

Expert opinion: Although the data published so far strongly indicate that mGluR5 plays a major role in HD-associated neurodegeneration, htt aggregation and motor symptoms, it is not clear whether mGluR5 stimulation can diminish or intensify neuronal cell loss and HD progression. Thus, future experiments will be necessary to further investigate the outcome of drugs acting on mGluR5 for the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: cell signaling, glutamate, huntingtin, Huntington's disease, metabotropic glutamate receptor 5, neurodegeneration

Expert Opin. Ther. Targets (2014) 18(11):1293-1304

1. Huntington's disease

Huntington's disease (HD), as first described by George Huntington in 1872, is an autosomal dominant neurodegenerative disorder, involving the loss of striatal and cortical neurons [1]. The most prominent HD symptoms are motor deterioration, cognitive decay and psychiatric alterations that inevitably lead to the death of HD patients within 15 – 20 years of disease onset [2]. HD clinical manifestations are progressive following disease onset and include involuntary movements (chorea) that intensify during the course of the disease, causing the impairment of daily life activities [3]. HD patients also suffer gait dysfunctions that are characterized by postural instability, lack of balance and motor incoordination, leading to common falls [3]. These problems are accompanied by eye movement abnormalities and progressive dysarthria and dysphagia. In early stages, HD patients display chorea, but in later stages patients manifest akinesia and sometimes dystonia [3]. Moreover, psychiatric and cognitive disturbances typically appear during disease progression and include personality alterations, obsession, compulsion, major depression and dementia.

COMMENTARY

mGluR5: a potential target for the treatment of Huntington's disease



Fabiola M Ribeiro¹, Juliana G Doria¹ & Stephen SG Ferguson^{*2}

Huntington's disease

Huntington's disease (HD) is a progressive neurodegenerative disorder with an age of onset between 35 and 50 years. At first, HD patients experience chorea and psychiatric alterations, associated with intellectual decline and inevitable death within 15–20 years [1,2]. HD is caused by a polyglutamine expansion in the amino terminus of the htt protein [3]. The length of the polyglutamine repeat inversely correlates with the age of disease onset and directly correlates with the severity of symptoms [4].

Pathological analyses of HD-affected brains has revealed neuronal loss of the GABAergic medium-sized spiny neurons (MSN) present in the striatum [5]. Although it is well established that the htt polyglutamine expansion is the cause of HD, it is unknown why this ubiquitously expressed mutant protein selectively results in the loss of MSNs. Moreover, it remains unclear whether HD occurs as the consequence of either the loss of normal htt protein or as a toxic gain of function due to the polyglutamine expanded form of the protein. Wild-type htt protein is both antiapoptotic [6] and essential for normal embryonic

development [7,8]. Nevertheless, the resulting polyglutamine stretch confers neurotoxic functions of the htt protein, resulting in the activation of cell signaling pathways involved in neuronal dysfunction as a consequence of increased oxidative stress, gene transcriptional alterations, glutamate excitotoxicity, apoptosis, mitochondrial dysregulation and energy depletion [9–11].

Cleavage of the mutant htt amino-terminal region results in the generation of insoluble nuclear aggregates, which are suggested to play a key role in HD-related neuronal cell death. Notably, HD symptom severity is strongly correlated with htt aggregate formation and loss of striatal neurons [12]. Htt aggregates and inclusions are found first in the striatum and, over time, in the rest of the basal ganglia, followed by progressive localization throughout the substantia nigra and cortex. It is not known whether htt aggregates and inclusions are toxic as other evidences suggest that htt nuclear inclusions may be neuroprotective for MSNs [13,14].

mGluR5

The excitatory neurotransmitter, glutamate, is localized to most synapses in the

KEYWORDS

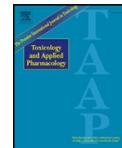
- cell signaling • glutamate
- Huntington's disease • mGluR5
- neurodegeneration

“At first, Huntington's disease patients experience chorea and psychiatric alterations, associated with intellectual decline and inevitable death within 15–20 years.”

¹Departamento de Bioquímica & Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²J Allyn Taylor Centre for Cell Biology, University of Western Ontario, London, ON, Canada

*Author for correspondence. Tel: +1 519 931 5706; Fax: +1 519 931 5252; ferguson@robarts.ca



Enhancement of endocannabinoid signaling protects against cocaine-induced neurotoxicity



Luciano R. Vilela^a, Pedro H. Gobira^b, Thercia G. Viana^b, Daniel C. Medeiros^c, Talita H. Ferreira-Vieira^c, Juliana G. Doria^a, Flávia Rodrigues^d, Daniele C. Aguiar^b, Grace S. Pereira^c, André R. Massessini^c, Fabíola M. Ribeiro^d, Antonio Carlos P. de Oliveira^b, Marcio F.D. Moraes^{c,*}, Fabricio A. Moreira^{b,*}

^a Graduate Program in Neuroscience, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Department of Physiology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2015

Revised 15 April 2015

Accepted 21 April 2015

Available online 29 April 2015

Keywords:

Endocannabinoid

Anandamide

FAAH

Cocaine

Seizures

PI3K

ABSTRACT

Cocaine is an addictive substance with a potential to cause deleterious effects in the brain. The strategies for treating its neurotoxicity, however, are limited. Evidence suggests that the endocannabinoid system exerts neuroprotective functions against various stimuli. Thus, we hypothesized that inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH), the main enzyme responsible for terminating the actions of the endocannabinoid anandamide, reduces seizures and cell death in the hippocampus in a model of cocaine intoxication. Male Swiss mice received injections of endocannabinoid-related compounds followed by the lowest dose of cocaine that induces seizures, electroencephalographic activity and cell death in the hippocampus. The molecular mechanisms were studied in primary cell culture of this structure. The FAAH inhibitor, URB597, reduced cocaine-induced seizures and epileptiform electroencephalographic activity. The cannabinoid CB₁ receptor selective agonist, ACEA, mimicked these effects, whereas the antagonist, AM251, prevented them. URB597 also inhibited cocaine-induced activation and death of hippocampal neurons, both in animals and in primary cell culture. Finally, we investigated if the PI3K/Akt/ERK intracellular pathway, a cell surviving mechanism coupled to CB₁ receptor, mediated these neuroprotective effects. Accordingly, URB597 injection increased ERK and Akt phosphorylation in the hippocampus. Moreover, the neuroprotective effect of this compound was reversed by the PI3K inhibitor, LY294002. In conclusion, the pharmacological facilitation of the anandamide/CB₁/PI3K signaling protects the brain against cocaine intoxication in experimental models. This strategy may be further explored in the development of treatments for drug-induced neurotoxicity.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Addiction is a major public health problem with a high prevalence worldwide. Among the most commonly addictive drugs is cocaine, a psychostimulant and psychotomimetic compound (Degenhardt and Hall, 2012), which may induce acute and chronic psychiatric and

neurological effects, including psychosis, agitation and seizures (Cadet et al., 2014). The molecular targets underlying cocaine-induced psychosis and behavioral stimulation include inhibition of neuronal monoamine uptake, particularly dopamine (Wise, 1984; Koob and Nestler, 1997). Accordingly, these effects are reversed by antipsychotic drugs, mainly through antagonism at dopamine D₂ receptor (Kishi et al., 2013). The mechanisms underlying the neurotoxic effects of this drug are less understood, since several intracellular biochemical processes seem to be involved (Cunha-Oliveira et al., 2008; Planeta et al., 2013). Thus, experimental models of cocaine intoxication are relevant for studying its biological mechanisms as well as new treatment approaches (Connors and Hoffman, 2013; Heard et al., 2011).

One possible strategy to reduce cocaine-induced neural damage would be facilitating protective mechanisms already at play in the brain. In this context, the endocannabinoid system has been proposed as an on-demand defense mechanism against neural hyper-excitability (Lutz, 2004; van der Stelt and Di Marzo, 2005; Fowler et al., 2010). This

Abbreviations: Akt, protein kinase B; CB₁, cannabinoid type-1 receptor; CB₂, cannabinoid type-2 receptor; D₂, dopamine type-2 receptor; Δ⁹-THC, Δ⁹-tetrahydrocannabinol; EEG, electroencephalography; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FAAH, fatty acid amide hydrolase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; TRPV1, transient receptor potential type-1 channel.

* Corresponding authors at: Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. Fax: +55 31 3409 2924.

E-mail addresses: mfdm@icb.ufmg.br (M.F.D. Moraes), fabriciomoreira@icb.ufmg.br (F.A. Moreira).

¹ These authors share senior authorship.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2015.04.013>
0041-008X/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

RESEARCH

Open Access

Orchestrated activation of mGluR5 and CB₁ promotes neuroprotection



Edleusa M. L. Batista¹, Juliana G. Doria¹, Talita H. Ferreira-Vieira¹, Juliana Alves-Silva¹, Stephen S. G. Ferguson², Fabricio A. Moreira³ and Fabiola M. Ribeiro^{1*}

Abstract

The metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) and the cannabinoid receptor 1 (CB₁) exhibit a functional interaction, as CB₁ regulates pre-synaptic glutamate release and mGluR5 activation increases endocannabinoid synthesis at the post-synaptic site. Since both mGluR5 and CB₁ promote neuroprotection, we delineated experiments to investigate a possible link between CB₁ and mGluR5 activation in the induction of neuroprotection using primary cultured corticostriatal neurons. We find that either the pharmacological blockade or the genetic ablation of either mGluR5 or CB₁ can abrogate both CB₁- and mGluR5-mediated neuroprotection against glutamate insult. Interestingly, decreased glutamate release and diminished intracellular Ca²⁺ do not appear to play a role in CB₁ and mGluR5-mediated neuroprotection. Rather, these two receptors work cooperatively to trigger the activation of cell signaling pathways to promote neuronal survival, which involves MEK/ERK1/2 and PI3K/AKT activation. Interestingly, although mGluR5 activation protects postsynaptic terminals and CB₁ the presynaptic site, intact signaling of both receptors is required to effectively promote neuronal survival. In conclusion, mGluR5 and CB₁ act in concert to activate neuroprotective cell signaling pathways and promote neuronal survival.

Keywords: mGluR5, CB₁, Cell death, AKT, ERK1/2

Abbreviations: 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; ACEA, Arachidonyl-2'-Chloroethylamide; AM, Acetoxymethyl Ester; AM251, 1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-1-piperidinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide; anandamide, N-arachidonylethanolamine; APP, Amyloid Precursor Protein; Aβ, Amyloid-β Peptide; BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor; CB₁, Cannabinoid Receptor 1; CDPPB, 3-cyano-N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl) benzamide; DAG, Diacylglycerol; DAGL-α, Diacylglycerol Lipase-α; DIV, Days In Vitro; ERK, Extracellular-Signal-Regulated Kinase; FAAH, Fatty Acid Amide Hydrolase; GABA, Gamma-Aminobutyric Acid; GPCR, G-protein Coupled Receptor; HBSS, Hank's Balanced Salt Solution; HD, Huntington's Disease; IP₃, Inositol-1,4,5-triphosphate; JZL184, 4-[Bis(1,3-benzodioxol-5-yl)-hydroxymethyl]piperidine-1-carboxylate 4-nitrophenyl ester; LTD, Long Term Depression; LY294002, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride; MEK, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase; MGL, Monoacylglycerol Lipase; mGluR5, Metabotropic Glutamate Receptor 5; MPEP, 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine; NC, Negative Control; PAM, Positive Allosteric Modulator; PD98059, 2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4h-1-benzopyran-4-one; PDK1, Phosphoinositide-Dependent Kinase; PI3K, Phosphatidylinositol-3 kinase; PIKE, PI3K Enhancer; PLC, Phospholipase C; PSD95, Postsynaptic Density Protein; Pyk2, Proline-Rich Tyrosine Kinase 2; siRNA, Small Interfering RNA; URB597, Cyclohexyl Carbamic Acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester; Δ⁹-THC, Δ⁹-tetrahydrocannabinol

* Correspondence: fmribeiro@icb.ufmg.br

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Ave. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG CEP: 31270-901, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 The Author(s). **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Neuroprotective effects of the anticancer drug NVP-BEZ235 (dactolisib) on amyloid- β 1–42 induced neurotoxicity and memory impairment

Received: 29 June 2015
Accepted: 12 April 2016
Published: 04 May 2016

Paula Maria Quaglio Bellozi¹, Isabel Vieira de Assis Lima¹, Juliana Guimarães Dória², Érica Leandro Marciano Vieira³, Alline Cristina Campos⁴, Eduardo Candelario-Jalil⁵, Helton José Reis¹, Antônio Lúcio Teixeira³, Fabíola Mara Ribeiro² & Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira¹

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease and the main cause of dementia. Substantial evidences indicate that there is over-activation of the PI3K/Akt/mTOR axis in AD. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effects of NVP-BEZ235 (BEZ; dactolisib), a dual PI3K/mTOR inhibitor that is under phase I/II clinical trials for the treatment of some types of cancer, in hippocampal neuronal cultures stimulated with amyloid- β (A β) 1–42 and in mice injected with A β 1–42 in the hippocampus. In cell cultures, BEZ reduced neuronal death induced by A β . BEZ, but not rapamycin, a mTOR inhibitor, or LY294002, a PI3K inhibitor that also inhibits mTOR, reduced the memory impairment induced by A β . The effect induced by A β was also prevented in PI3K $\gamma^{-/-}$ mice. Neuronal death and microgliosis induced by A β were reduced by BEZ. In addition, the compound increased IL-10 and TNF- α levels in the hippocampus. Finally, BEZ did not change the phosphorylation of Akt and p70s6K, suggesting that the involvement of PI3K and mTOR in the effects induced by BEZ remains controversial. Therefore, BEZ represents a potential strategy to prevent the pathological outcomes induced by A β and should be investigated in other models of neurodegenerative conditions.

Alzheimer's Disease (AD) is the main cause of dementia and affects more than 35 million people^{1,2}. It is a neurodegenerative progressive disease associated with memory deficits³, and its major risk factor is aging¹. The classical neuropathological markers of AD are extracellular plaques of amyloid- β (A β) peptide and neurofibrillary intracellular tangles of hyperphosphorylated tau protein⁴.

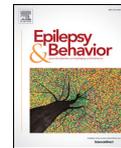
The A β peptide is originated from the amyloid protein precursor (APP) cleavage by β - and γ -secretase^{2,4,5}. The peptide aggregates and accumulates in the brain as diffuse and compact plaques⁶. Indeed, a wide range of studies shows that intracerebral injection of this peptide in mice can induce AD related cognitive and cerebral changes^{7–12}. The disease is characterized by synaptic impairment⁷, neurotrophin and neurotransmitter imbalance, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, intracellular calcium increase and cell cycle failure¹³. The most severe changes are in hippocampus, as well as in cortical and subcortical regions¹⁴, which are associated with the AD memory deficits¹⁵.

Neuroinflammation is also an important component of the disease, which starts as a defense mechanism against the A β deposition in the brain, but can lead to neurodegeneration⁹. The neuroinflammatory process in AD includes disruption of blood-brain barrier and overactivation of glial cells, such as microglia¹⁶. The microglia

¹Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil.

²Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil. ³Department of Internal Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Brazil.

⁴Department of Pharmacology, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 14049-900, Brazil. ⁵Department of Neuroscience, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.C.P.d.O. (email: antoniooliveira@icb.ufmg.br)



Postictal alterations induced by intrahippocampal injection of pilocarpine in C57BL/6 mice



Isabel Vieira de Assis Lima^a, Alline Cristina de Campos^b, Paula Maria Quaglio Bellozi^a,
Juliana Guimaraes Doria^c, Fabiola Mara Ribeiro^c,
Marcio Flavio Dutra Moraes^{d,*}, Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira^{a,**,1}

^a Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

^b Department of Pharmacology, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil

^c Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

^d Department of Biophysics and Physiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 May 2016
Revised 3 August 2016
Accepted 4 August 2016
Available online xxxx

Keywords:
Temporal lobe epilepsy
Pilocarpine
Memory
Neurodegeneration
Microglia

ABSTRACT

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common form of epilepsy in adults. The pilocarpine (PILo) experimental model of TLE portrays behavioral and pathophysiological changes in rodents that are very similar to those found in humans with TLE. However, this model is associated with an unfortunate high mortality rate. Studies have shown that intrahippocampal injection of PILo, while having a much smaller mortality rate, induces *status epilepticus* (SE) that secondarily leads to TLE. To the best of our knowledge, the present study was the first to evaluate the cognitive and histological alterations 72 h after intrahippocampal microinjection of PILo in C57BL/6 mice. Seventy percent of mice developed *status epilepticus* (SE) after PILo administration, and all animals survived after SE. Seventy-two hours after SE, mice presented memory impairment in both Novel Object Recognition (recognition index – vehicle: $67.57 \pm 4.46\%$ vs PILo: $52.33 \pm 3.29\%$) and Contextual Fear Conditioning (freezing time – vehicle: 203 ± 20.43 vs PILo: 107.80 ± 25.17 s) tasks. Moreover, using Nissl and NeuN staining, we observed in PILo-treated mice a significant decrease in cell viability and an increase in neuronal loss in all three hippocampal regions analyzed, cornu ammonis (CA) 1, CA3, and dentate gyrus (DG), in comparison with the control group. Additionally, using Iba-1 staining, we observed in PILo-treated mice a significant increase in microglial proliferation in CA1, CA3, and DG of the hippocampus. Therefore, intrahippocampal PILo microinjection is an efficient route to induce SE and acute postictal epileptogenic-like alterations in C57BL/6 mice.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Epilepsy is a common neurological disorder characterized by a state of recurrent, spontaneous seizures, which consist of periods of abnormal and simultaneous firing of a neuronal population [1]. It is estimated that about 50 million people worldwide are affected by epilepsy, with 55/100,000 new cases appearing each year [2].

Seizures can be caused by an imbalance between inhibition and excitation resulting in hyperexcitability of neuronal populations. This process can originate in a specific neuronal population, producing

partial seizures, or simultaneously in several brain areas, causing generalized seizures [3].

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common type of adult epilepsy and is characterized by seizures that initiate locally may spread throughout the entire brain. It is a devastating disease, which leads to, among different dysfunctions, memory impairment [4]. Currently, none of the antiepileptic drugs cure the disease, while in approximately one-third of the patients [5,6], pharmacological control of seizures is not achieved. The precise causes of TLE are, in most cases, unknown. However, it is believed that hippocampal sclerosis associated with TLE may occur after an initial precipitating insult such as brain injury, tumors, meningitis, encephalitis, *status epilepticus* (SE), or febrile seizures during childhood [7]. Specifically, SE is defined as continuous seizure activity or multiple seizures without regaining consciousness for more than 30 min [8]. Nevertheless, the period between this initial insult and the onset of spontaneous recurrent seizures (SRSs) may be months to years. During this latent period, a variety of cellular changes can occur in the hippocampus, such as neuronal loss in cornu ammonis (CA) 1,

* Correspondence to: M.F.D. Moraes, Department of Biophysics and Physiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.

** Correspondence to: A.C.P. de Oliveira, Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.

E-mail addresses: mfdm@icb.ufmg.br (M.F.D. Moraes), antoniooliveira@icb.ufmg.br (A.C.P. de Oliveira).

¹ These authors contributed equally to this work.

mGluR5, CB1 and neuroprotection

Toniana G. Carvalho, Juliana G. Doria and Fabiola M. Ribeiro

The metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) is a $G\alpha_{q/11}$ -coupled receptor, mainly found at the postsynaptic site. mGluR5 stimulation leads to the activation of phospholipase C β 1 (PLC β), promoting diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP $_3$) formation, which leads to the release of Ca^{2+} from the intracellular stores and the activation of protein kinases, including protein kinase C. Additionally, stimulation of mGluR5 also triggers the activation of other cell signaling pathways that are important for cell proliferation and survival, such as the activation of the extracellular signal regulated protein kinase (ERK) and AKT. Recently, we have demonstrated that the mGluR5 positive allosteric modulator (PAM), CDPPB, activates AKT without increasing intracellular Ca^{2+} and protects neurons from glutamate-induced neuronal cell death [1]. Furthermore, we have shown that CDPPB treatment prevents the cognitive deficit and diminishes neuronal cell loss and huntingtin aggregate formation in a mouse model of Huntington's disease, the BACHD mice [2]. In addition, mGluR5 has also been implicated in the pathology of other neurodegenerative diseases, including Alzheimer and Parkinson's disease, as well as in physiological processes, including memory and motor coordination [3].

The cannabinoid receptor 1 (CB1) is a $G\alpha_{i/o}$ -coupled receptor mainly present at the presynaptic terminals and that can be activated by synthetic, plant-derived and endogenous cannabinoids, including anandamide and 2-arachidonoylglycerol (2-AG). CB1 has been implicated in several biological and pathological processes, playing a role in the regulation of cell proliferation, apoptosis and metastasis formation [4]. CB1 activation can limit the release of neurotransmitters, such as gamma-aminobutyric acid (GABA) and glutamate, from the presynaptic site, as well as activate neuroprotective pathways, decreasing excitotoxicity [5].

More recently, we have demonstrated that mGluR5 and CB1 can act together to promote neuroprotection [6]. Using primary cultured corticostriatal neurons, we have shown that CDPPB-mediated neuroprotection against glutamate insult can be reversed by both MPEP, which is a mGluR5 blocker, and AM251, a CB1 antagonist. Moreover, the neuroprotection induced by URB597 and JZL184, which are inhibitors of anandamide and 2-AG degradation, respectively, can also be abrogated by MPEP and AM251. Corroborating these data, CDPPB, URB597 and JZL184 were unable to promote neuroprotection of

either mGluR5 $^{-/-}$ or CB1 knockdown neurons. In addition, neuroprotection by CDPPB, URB597 and JZL184 was dependent on the activation of pathways that lead to the stimulation of AKT and ERK1/2, but was independent of alterations in intracellular Ca^{2+} concentration or glutamate release.

In several neurodegenerative diseases, neuronal cell death is preceded by synaptic loss, which is usually responsible for the early cognitive deficits. The study by Batista et al, 2016 [6], showed that CDPPB protected the postsynaptic site and that this protection was blocked by MPEP and AM251. In addition, JZL184 protected the presynaptic terminals and, to a lesser extent, the postsynaptic site. Curiously, AM251 reversed JZL-mediated protection of both the pre and postsynapse, while

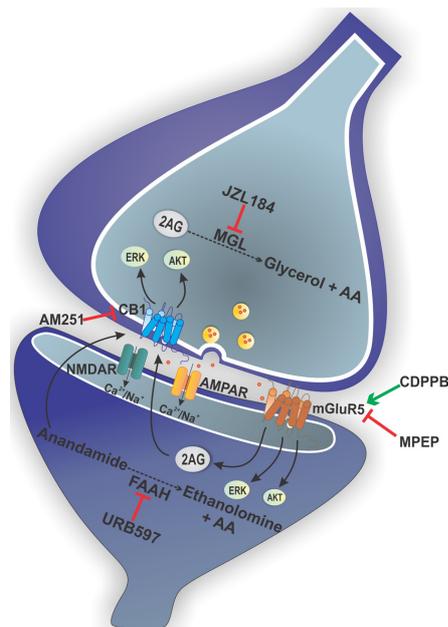


Figure 1: Schematic cartoon displaying summary of the cell signaling pathways activated by mGluR5 and CB1 to promote neuroprotection.



N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor Blockade Prevents Neuronal Death Induced by Zika Virus Infection

Vivian V. Costa,^{a,b} Juliana L. Del Sarto,^a Rebeca F. Rocha,^a Flavia R. Silva,^c Juliana G. Doria,^c Isabella G. Olmo,^c Rafael E. Marques,^a Celso M. Queiroz-Junior,^d Giselle Foureaux,^d Julia Maria S. Araújo,^b Allysson Cramer,^{a,e} Ana Luiza C. V. Real,^c Lucas S. Ribeiro,^{a,b} Sílvia I. Sardi,^f Anderson J. Ferreira,^d Fabiana S. Machado,^{a,e} Antônio C. de Oliveira,^g Antônio L. Teixeira,^h Helder I. Nakaya,ⁱ Danielle G. Souza,^{a,b} Fabiola M. Ribeiro,^c Mauro M. Teixeira^a

Immunopharmacology Lab, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brazil^a; Host-Interaction Microorganism Lab, Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil^b; Neurobiochemistry Lab, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brazil^c; Cardiac Biology Lab, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil^d; Immunoregulation of Infectious Disease Lab, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brazil^e; Virology Lab, Department of Virology, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brazil^f; Neuropharmacology Lab, Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil^g; Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical Houston, University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, Texas, USA^h; Metabolomics Applied to Health Lab, Department of Clinical Analyses and Toxicology, School of Pharmaceutical Science, Universidade de Sao Paulo (USP), Sao Paulo, Brazilⁱ

ABSTRACT Zika virus (ZIKV) infection is a global health emergency that causes significant neurodegeneration. Neurodegenerative processes may be exacerbated by N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)-dependent neuronal excitotoxicity. Here, we have exploited the hypothesis that ZIKV-induced neurodegeneration can be rescued by blocking NMDA overstimulation with memantine. Our results show that ZIKV actively replicates in primary neurons and that virus replication is directly associated with massive neuronal cell death. Interestingly, treatment with memantine or other NMDAR blockers, including dizocilpine (MK-801), agmatine sulfate, or ifenprodil, prevents neuronal death without interfering with the ability of ZIKV to replicate in these cells. Moreover, *in vivo* experiments demonstrate that therapeutic memantine treatment prevents the increase of intraocular pressure (IOP) induced by infection and massively reduces neurodegeneration and microgliosis in the brain of infected mice. Our results indicate that the blockade of NMDARs by memantine provides potent neuroprotective effects against ZIKV-induced neuronal damage, suggesting it could be a viable treatment for patients at risk for ZIKV infection-induced neurodegeneration.

IMPORTANCE Zika virus (ZIKV) infection is a global health emergency associated with serious neurological complications, including microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Infection of experimental animals with ZIKV causes significant neuronal damage and microgliosis. Treatment with drugs that block NMDARs prevented neuronal damage both *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that overactivation of NMDARs contributes significantly to the neuronal damage induced by ZIKV infection, and this is amenable to inhibition by drug treatment.

KEYWORDS NMDA receptor, Zika virus, intraocular pressure, memantine, microgliosis, mouse model, neuronal death

Received 28 February 2017 Accepted 28 March 2017 Published 25 April 2017

Citation Costa VV, Del Sarto JL, Rocha RF, Silva FR, Doria JG, Olmo IG, Marques RE, Queiroz-Junior CM, Foureaux G, Araújo JMS, Cramer A, Real ALCV, Ribeiro LS, Sardi SI, Ferreira AJ, Machado FS, de Oliveira AC, Teixeira AL, Nakaya HI, Souza DG, Ribeiro FM, Teixeira MM. 2017. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor blockade prevents neuronal death induced by Zika virus infection. *mBio* 8:e00350-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00350-17>.

Editor Michael J. Buchmeier, University of California, Irvine

Copyright © 2017 Costa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Fabiola M. Ribeiro, fmribeiro@icb.ufmg.br, or Mauro M. Teixeira, mmtext.ufmg@gmail.com.

V.V.C. and J.L.D.S. contributed equally to this article.

Referências Bibliográficas

- Albin RL, et al., 1992. Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol* 31:425–430.
- Anborgh PH, et al., 2005. Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin. *J Biol Chem* 280:34840–34848.
- Arrasate M, et al., 2004. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431:805–810.
- Bailey CH, Kandel ER, Harris KM. 2015. Structural Components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. :1–30.
- Bailey KR, Crawley JN. 2009. Chapter 5 Anxiety -Related Behaviors in Mice. *Methods Behav Anal Neurosci*:1–24.
- Balázs R, et al., 1997. Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulation. *J Neurochem* 69:151–163.
- Bao J, et al., 1996. Expansion of polyglutamine repeat in huntingtin leads to abnormal protein interactions involving calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5037–5042.
- Bertaso F, et al., 2010. Homer1a-Dependent Crosstalk Between NMDA and Metabotropic Glutamate Receptors in Mouse Neurons. *PLoS One* 5.
- Bikbaev A, Manahan-Vaughan D. 2017. Metabotropic glutamate receptor, mGlu5, regulates hippocampal synaptic plasticity and is required for tetanisation-triggered changes in theta and gamma oscillations. *Neuropharmacology* 115:20–29.
- Bliss T V, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31–39.
- Brini M, et al., 2014. Neuronal calcium signaling: Function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci* 71:2787–2814.
- Bruno V, et al., 2001. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for

neuroprotective drugs. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1013–33.

Van der Burg JM, Björkqvist M, Brundin P. 2009. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol* 8:765–774.

Calabresi P, et al., 1999. Metabotropic Glutamate Receptors and Cell-Type-Specific Vulnerability in the Striatum: Implication for Ischemia and Huntington's Disease. *Exp Neurol* 108:97–108.

Canals JM, et al., 2004. Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 24:7727–7739.

Chen T, 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.

Chen Y, Goudet C, Pin J-P, Conn PJ. 2008. 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* 73:909–18.

Chowdhury S, et al., 2006. Arc/Arg3.1 Interacts with the Endocytic Machinery to Regulate AMPA Receptor Trafficking. *Neuron* 52:445–459.

Christie BR. 1996. Long-term depression (LTD) in the hippocampus. *Hippocampus* 6:1–2.

Cisbani G, Cicchetti F. 2012. An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity. *Cell Death Dis* 3:e382.

Culver BP, et al., 2012. Proteomic analysis of wild-type and mutant huntingtin-associated proteins in mouse brains identifies unique interactions and involvement in protein synthesis. *J Biol Chem* 287:21599–21614.

DiFiglia M. 1990. Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* 13:286–289.

Doria JG, et al., 2013. Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease. *Br J Pharmacol* 169:909–921.

Doria JG, et al., 2015. The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPBB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis [Internet]* 73:163–173.

Dowie MJ, Scotter EL, Molinari E, Glass M. 2010. The therapeutic potential of G-protein coupled receptors in Huntington's disease. *Pharmacol Ther* 128:305–23.

El-Husseini A, Schnell E, Chetkovich D. 2000. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science (80-)* 290:1364–8.

Faideau M, Kim J, Cormier K, Gilmore R, Welch M, Auregan G, Dufour N, Guillemier M, Brouillet E, Hantraye P, DéGlon N, Ferrante RJ, Bonvento G. 2010. In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: A correlation with Huntington's disease subjects. *Hum Mol Genet* 19:3053–3067.

G. Vonsattel JP, DiFiglia M. 1998. Huntington Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:369–384.

Gafni J, Ellerby LM. 2002. Calpain Activation in Huntington's Disease. *J Neurosci* 22:4842–4849.

Gass JT, et al., 2014. Enhancement of extinction learning attenuates ethanol-seeking behavior and alters plasticity in the prefrontal cortex. *J Neurosci* 34:7562–74.

Gauthier LR, et al., 2004. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118:127–

138.

Gil-mohapel JM, Rego AC. 2011. Doença de Huntington : Uma Revisão dos Aspectos Fisiopatológicos. 19:724–734.

Giralt A, et al., 2012. Long-term memory deficits in Huntington's disease are associated with reduced CBP histone acetylase activity. *Hum Mol Genet* 21:1203–1216.

Goldberg YP, et al., 1996. Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* 14:353–6.

Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M. 1985. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 227:770–3.

Gray M, 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.

Guhan N, Lu B. 2004. Homer-PIKE complex: A novel link between mGluRI and PI 3-kinase. *Trends Neurosci* 27:645–648.

Guo CH, Senzel A, Li K, Feng ZP. 2010. De novo protein synthesis of syntaxin-1 and dynamin-1 in long-term memory formation requires creb1 gene transcription in *lymnaea stagnalis*. *Behav Genet* 40:680–693.

Haettig J, et al., 2011. HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. *Learn Mem* 18:71–79.

Harjes P, Wanker EE. 2003. The hunt for huntingtin function: Interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* 28:425–433.

Hasson CJ, Caldwell GE, Emmerik REA Van. 2009. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and

tissue injury? *Motor Control* 27:590–609.

Henley JM, Wilkinson KA. 2013. AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues Clin Neurosci* 15:11–27.

Hering H, Sheng M. 2001. Dendritic Spines: Structure, Dynamics and Regulation. *Nat Rev Neurosci* 2:880–888.

Ho LW, et al., 2001. Wild type Huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant Huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease. *J Med Genet* 38:450–452.

Huber L, Menzel R. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761–766.

Humbert 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.

Iasevoli F, Tomasetti C, De Bartolomeis A. 2013. Scaffolding proteins of the post-synaptic density contribute to synaptic plasticity by regulating receptor localization and distribution: Relevance for neuropsychiatric diseases. *Neurochem Res* 38:1–22.

Kater SB, Harris KM. 1994. Dendritic spines: Cellular specializations. *Annu Rev Neurosci* 17:341–371.

Kennedy MB. 2000. Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* (80-) 290:750–4.

Kinney GG, et al., 2005. 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* 313:199–206.

Ko SJ, et al., 2012. PKC phosphorylation regulates mGluR5 trafficking by enhancing binding of Siah-1A. *J Neurosci* 32:16391–401.

Kremer B, et al., 1994. A Worldwide Study of the Huntington's Disease Mutation: The

Sensitivity and Specificity of Measuring CAG Repeats. *N Engl J Med* 330:1401–1406.

Kwon H-B, Sabatini BL. 2011. Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. *Nature* 474:100–4.

Lamprecht R, Ledoux J. 2004. STRUCTURAL PLASTICITY AND MEMORY. *Nat Rev Neurosci.* 5(1):45-54.

Landles C, Bates GP. 2004. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep* 5:958–63.

Lea IV PM, Faden AI. 2006. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonists MPEP and MTEP. *CNS Drug Rev* 12:149–166.

Leavitt BR, et al., 2006. Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity. *J Neurochem* 96:1121–1129.

Lee JH, et al., 2008. Calmodulin dynamically regulates the trafficking of the metabotropic glutamate receptor mGluR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12575–12580.

Li C, et al., 2004. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc Natl Acad Sci* 101:2185–2190.

Li SH, Li XJ. 2004. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 20:146–154.

Lindsley CW, et al., 2004. 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* 47:5825–5828.

Lyford G, et al., 1995. A Growth Factor and Activity-Regulated Gene, Encodes a Novel C oskeleton-Associated Protein That Is Enriched in Neuronal Dendrites. *Neuron*

14:433–445.

Mao L, et al., 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.

Masu M, et al., 1991. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 349:760–5.

Matsuzaki M, et al., 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4:1086–92. A

McBean GJ, Roberts PJ. 1984. Chronic infusion of l-glutamate causes neurotoxicity in rat striatum. *Brain Res* 290:372–375.

Mehta A, et al., 2013. Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 698:6–18.

Miller J, et al., 2010. Quantitative relationships between huntingtin levels, polyglutamine length, inclusion body formation, and neuronal death provide novel insight into huntington's disease molecular pathogenesis. *J Neurosci* 30:10541–10550.

Morgan JI, et al., 1987. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237:192–197.

Moser MB, et al., 1997. Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *J Comp Neurol* 380:373–381.

Moutin E, et al., 2012. Dynamic remodeling of scaffold interactions in dendritic spines controls synaptic excitability. *J Cell Biol* 198:251–263.

Myers R, et al., 1991. Factors associated with slow progression in Huntington's disease. *Arch Neurol* 48:800–804.

Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. 2002. Structure and Function of Dendritic Spines. *Annu Rev Physiol* 64:313–353.

O'Brien J a, et al., 2003. A family of highly selective allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Mol Pharmacol* 64:731–40.

Panov A V., et al., 2003. In vitro effects of polyglutamine tracts on Ca²⁺ -dependent depolarization of rat and human mitochondria: Relevance to Huntington's disease. *Arch Biochem Biophys* 410:1–6.

De Paulis T, et al., 2006. 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* 49:3332–3344.

Phillips RG, LeDoux JE. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274–285.

Pisani A, et al., 1997. Enhancement of NMDA responses by group I metabotropic glutamate receptor activation in striatal neurones. *Br J Pharmacol* 120:1007–1014.

Radwanska K, Medvedev NI, Pereira GS, Engmann O, Thiede N, Moraes MFD, Villers A, Irvine EE, et al., 2011. Mechanism for long-term memory formation when synaptic strengthening is impaired. *Proc Natl Acad Sci* 108:18471–18475.

Reiner A, et al., 1988. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci* 85:5733–5737.

Ribeiro FM, et al., 2010. Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 30:316–24.

Ribeiro FM, Pires RGW, Ferguson SSG. 2011. Huntington's disease and group I metabotropic glutamate receptors. *Mol Neurobiol* 43:1–11.

Rigamonti D, et al., 2001. Huntingtin's Neuroprotective Activity Occurs via Inhibition of

Procaspase-9 Processing. *J Biol Chem* 276:14545–14548.

Risher WC, et al., 2014. Rapid golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines. *PLoS One* 9.

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.

Rodrigues SM, Schafe GE, Ledoux JE. 2004. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* 44:75–91.

Rook JM, et al., 2015. Biased mGlu5-Positive Allosteric Modulators Provide In Vivo Efficacy without Potentiating mGlu5 Modulation of NMDAR Currents. *Neuron* 86:1029–40.

Rosas HD, et al., 2010. Ever-Changing Brain in Huntingtons Disease ? :196–205.

Ross CA, Tabrizi SJ. 2011. Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* 10:83–98.

Sala C, et al., 2001. Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* 31:115–130.

Saudou F, et al., 1998. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95:55–56.

Saudou F, Humbert S. 2016. The Biology of Huntingtin. *Neuron* 89:910–926.

Schoepp DD, Jane DE, Monn JA. 1999. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 38:1431–1476.

Sheng M. 2002. Postsynaptic Signaling and Plasticity Mechanisms. *Science* (80-) 298:776–780.

Shigemoto R, et al., 1993. Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. *Neurosci Lett* 163:53–7.

Silva FR, et al., 2017. N-type Ca²⁺ channels are affected by full-length mutant huntingtin expression in a mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Aging* 55:1–10.

Simmons D a, et al.,. 2013. A small molecule TrkB ligand reduces motor impairment and neuropathology in R6/2 and BACHD mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci* 33:18712–27.

Sokol DK, et al., 2011. Autism, Alzheimer disease, and fragile X: APP, FMRP, and mGluR5 are molecular links. *Neurology* 76:1344–1352.

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.

Spacer J, et al., 2011. Preclinical profile of a novel metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulator. *Eur J Pharmacol* 659:146–154.

Steward O, Worley PF. 2001. Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* 30:227–240.

Sun Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF. 2001. Polyglutamine-expanded Huntingtin Promotes Sensitization of N-Methyl-D-aspartate Receptors via Post-synaptic Density 95. *J Biol Chem* 276:24713–24718.

Tanaka Y, et al., 2006. Progressive phenotype and nuclear accumulation of an amino-terminal cleavage fragment in a transgenic mouse model with inducible expression of full-length mutant huntingtin. *Neurobiol Dis* 21:381–391.

Tang T-S, et al.,2005. Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci* 102:2602–2607.

Tang T, et al., 2003. Huntingtin and Huntingtin-Associated Protein 1 Influence Neuronal Calcium Signaling Mediated by Inositol- (1 , 4 , 5) Triphosphate Receptor

Type 1. 39:227–239.

Tartari M, et al., 2008. Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin. *Mol Biol Evol* 25:330–338.

Testa CM, Standaert DG, Young a B, Penney JB. 1994. Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in the basal ganglia of the rat. *J Neurosci* 14:3005–3018.

Trivedi RR, Bhattacharyya S. 2012. Constitutive internalization and recycling of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5). *Biochem Biophys Res Commun* 427:185–190.

Trushina E, et al., 2004. Mutant Huntingtin Impairs Axonal Trafficking in Mammalian Neurons In Vivo and In Vitro. *Mol Cell Biol* 24:8195–8209.

Tyler WJ, Pozzo-Miller L. 2003. Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *J Physiol* 553:497–509.

Uslaner JM, Parmentier-Batteur S, Flick RB, Surlles NO, Lam JSH, McNaughton CH, Jacobson M a., Hutson PH. 2009. Dose-dependent effect of CDPBB, the mGluR5 positive allosteric modulator, on recognition memory is associated with GluR1 and CREB phosphorylation in the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuropharmacology* 57:531–538.

Valor LM. 2014. Transcription, Epigenetics and Ameliorative Strategies in Huntington's Disease: a Genome-Wide Perspective. *Mol Neurobiol* 51:406–423.

Walker FO, Walker FO. 2007. Huntington's disease. *Lancet* 369:218–28.

Wang H, Zhuo M. 2012. Group I metabotropic glutamate receptor-mediated gene transcription and implications for synaptic plasticity and diseases. *Front Pharmacol* 3 NOV.

Wisniewski K, Car H. 2002. (S)-3,5-DHPG: A Review. *CNS Drug Rev* 8:101–116.

Xiao B, Cheng Tu J, Worley PF. 2000. Homer: A link between neural activity and

glutamate receptor function. *Curr Opin Neurobiol* 10:370–374.

Yang L, Mao L, Tang Q, Samdani S, Liu Z, Wang JQ. 2004. A novel Ca²⁺-independent signaling pathway to extracellular signal-regulated protein kinase by coactivation of NMDA receptors and metabotropic glutamate receptor 5 in neurons. *J Neurosci* 24:10846–10857.

Young AB. 2003. Huntingtin in health and disease. *J Clin Invest* 111:299–302.

Zeron MM, et al.,. 2001. Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol Cell Neurosci* 17:41–53.

Zeron MM, 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, et al.,. 2006. Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *EMBO J* 25:5896–5906.

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.

Ziv NE, Smith SJ. 1996. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91–102.

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

Zuccato C, et al.,. 2003. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 35:76–83.