

Excitotoxicidade em Células Granulares do Cerebelo  
que Expressam Ataxina-3 Mutante – Relevância  
para a Patogénese da Doença de Machado-Joseph

**Sofia Isabel Oliveira Sousa**

**Setembro 2011**

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Cristina Rego, orientadora, pelo exemplo, pela experiência, pela oportunidade, sugestões e contribuição na execução desse trabalho.

Ao Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e à Professora Doutora Patrícia Maciel, pela colaboração e pela oportunidade científica que me proporcionaram.

Ao Dr. Clévio Nóbrega, pela disponibilidade e ajuda na minha ‘experiência viral’ e à Sara Silva pela disponibilidade e cooperação no trabalho de genotipagem dos ‘transgénicos’.

Ao pessoal do laboratório, Luísa, Tatiana, Teresa, Ana, Carla, Luana, Márcio, Rita e Sandra pela partilha diária, pelo suporte técnico e emocional para a elaboração deste trabalho. E em especial, ao Mário, supervisor, pelas horas no laboratório a ensinar, pelo apoio e por todas as explicações científicas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Às meninas e aos meninos do nº 9 e da Chãs, Raquel, Filipa, Elorena, Vanessa, Daniel, Mónica, Lino, Susana, Leonor que me ensinaram o sentido de camaradagem e pela óptima convivência e amizade. Aos amigos “biomédicos que levo comigo p’ra a vida” à Sara, Vitor, João, Carla e André.

À Silvana por ser a amiga de sempre, à Mariana pela amizade incondicional, à Marta por ser a minha casa em Coimbra, à Carolina pelas conversas só nossas, à Cristiana pela amizade familiar, ao Zé e ao Rui por saberem estar onde os verdadeiros amigos estão.

À minha maravilhosa família Oliveira Sousa (avós, tios, tias, tios-avós, tias-avós, primos, primas, priminhos e priminhas) por saber o lugar que ocupo nos seus corações (e eles no meu).

Ao padrinho Nando que nunca deixou de me acompanhar...

Ao Nuno pelo apoio, perseverança, dedicação, companheirismo, por seres a pessoa que eu sempre esperei que fosses. Só tu sabes como te gosto. À família Machado pelo incentivo.

Aos meus irmãos, Ana e Gabriel, porque são a minha essência. Obrigada pelas alegrias, por me aturarem, pelo amor e carinho que sempre me entregaram. Ao Alexandre pela persistência e à Lara por ser a minha princesa. Obrigada por existirem!

Aos meus pais, António e Elisa, que amo profundamente e me sinto lisonjeada por ser vossa filha, por todos os sacrifícios que fizeram e por estarem sempre ao meu lado. Muito obrigada.

A todos os meus amigos e colegas que de algum modo contribuíram para a realização do presente trabalho o meu obrigado.

## Lista de Abreviaturas

AMPA – do inglês “ $\alpha$ -amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) propanoic acid”  
APAF-1 – do inglês, “apoptotic protease-activating factor-1”  
ATP – adenosina trifosfato, do inglês “adenosine triphosphate”  
Atx3 – ataxina-3  
ATX3 MUT – lentivírus para a Atx3 humana expandida com 72Q  
ATX3 WT – lentivírus para a Atx3 humana *wild-type* com 27Q  
CAG – citosina-adenina-guanina  
CGC – células granulares do cerebelo  
CGC C57 – isoladas de murganhos da estirpe C57BL/6J e não infectadas  
CGC transgênicas – CGC obtidas de murganhos transgênicos que expressam a Atx3 humana expandida (135Q)  
CGC *wild-type* – CGC obtidas de murganhos *wild-type*  
CNQX – do inglês “6-cyano-7-nitro-quinoline-2,3-dione”  
CTR – controlo  
CTZ – ciclotiazida  
DMJ – doença de Machado-Joseph  
DNA – ácido desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid”  
DNQX – do inglês “6,7-dinitro-quinoline-2,3-dione”  
DUB – enzima de desubiquitinação, do inglês “deubiquitinating enzyme”  
ER – retículo endoplasmático, do inglês “endoplasmic reticulum”  
ERAD – degradação associada ao retículo endoplasmático, do inglês “endoplasmic-reticulum-associated degradation”  
FCCP – do inglês “carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenyl-hydrazone”  
GFP – do inglês “green fluorescent protein”  
Gli – glicina  
LV – lentivírus  
HIV – do inglês “Human immunodeficiency virus”  
MAP – do inglês “microtubule associated protein”  
MK-801 – do inglês “(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo-[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate”  
NBQX – do inglês “6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)-quinoline-2,3-dione”  
NES – sinal de exportação nuclear, do inglês “nuclear export signal”  
NLS – sinal de importação nuclear, do inglês “nuclear localization signal”  
NMDA – *N*-metil-D-aspartato, do inglês “*N*-methyl-D-aspartic”  
PBS – solução-tampão de fosfato, do inglês “phosphate buffer solution”  
PGK – fosfoglicerato cinase, do inglês “phosphoglycerate kinase”  
PTP – poro de transição de permeabilidade, do inglês “permeability transition pore”  
Q – glutaminas  
R-AMPA – receptor AMPA  
R-cainato – receptores cainato  
R-NMDA – receptor NMDA  
ROS – espécies reativas de oxigénio, do inglês “reactive oxygen species”  
SCA – ataxia espinocerebelosa, do inglês “spinocerebellar ataxia”  
SDS – do inglês “sodium dodecyl sulfate”  
SDS-PAGE – do inglês “sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis”  
SEM – do inglês “standard error of the mean”  
TMRM<sup>+</sup> – do inglês “tetramethylrhodamine methyl ester”  
u.a. – unidades arbitrárias  
UIM – domínios de interacção de ubiquitina, do inglês “ubiquitin-interacting motif”  
VCP/p97 – do inglês “valosin-containing protein/p97”

## Resumo

A doença de Machado-Joseph (DMJ), também conhecida por ataxia espinocerebelosa do tipo 3 (SCA3, do inglês "spinocerebellar ataxia type 3"), é uma das nove doenças de poliglutaminas. A DMJ é causada por uma expansão do trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) no gene *ATXN3*, que codifica para a proteína ataxina-3 (Atx3). O aparecimento dos sintomas surge quando a expansão de CAGs é superior a 51 repetições. A sequência de poliglutaminas localiza-se no terminal carboxílico e induz alterações na conformação da proteína Atx3 expandida, levando à forma '*misfolded*' e à acumulação nuclear de inclusões ubiquitinadas. Apesar da expressão generalizada da proteína Atx3 mutante, a neurodegenerescência ocorre em áreas selectivas do cérebro humano, tais como os núcleos pontinos, o cerebelo, o núcleo dentado, a substância negra e o estriado, entre outras. Este estudo teve como objectivo avaliar o mecanismo excitotóxico associado ao processo de neurodegenerescência no cerebelo. O mecanismo de excitotoxicidade é causado pela sobre-activação dos receptores ionotrópicos do glutamato, nomeadamente os receptores NMDA (do inglês "*N*-methyl-D-aspartate") e AMPA (do inglês " $\alpha$ -amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) propanoic acid") em culturas primárias de células granulares do cerebelo (CGC) infectadas com vectores lentivirais que codificam para Atx3 humana *wild-type* (ATX3 WT, com 27 glutaminas) ou mutante (ATX3 MUT, com 72 glutaminas) ou CGC obtidas de murganhos *wild-type* (CGC *wild-type*) e transgênicos (CGC transgênicas, que expressam Atx3 mutante com 135 glutaminas). A determinação da viabilidade celular permitiu observar um efeito citotóxico após exposição a NMDA ou AMPA em CGC ATX3 WT e CGC *wild-type*, que não foi potenciado pela expressão da Atx3 mutante. De modo a caracterizar o efeito excitotóxico observado após estimulação selectiva dos receptores NMDA, determinaram-se as alterações simultâneas dos níveis de cálcio intracelular e do potencial de membrana mitocondrial em célula única. As CGC infectadas com vectores lentivirais para ATX3 WT ou ATX3 MUT induziram aumentos semelhantes dos níveis de cálcio intracelular e uma manutenção do potencial de membrana mitocondrial (avaliado pela libertação para o citosol da sonda TMRM+) após o estímulo inicial de NMDA/glicina. Contudo, a expressão de ATX3 MUT (com 72 glutaminas) aumentou a capacidade da mitocôndria em armazenar cálcio, associado a uma maior despolarização da membrana mitocondrial, comparativamente à ATX3 WT. Porém, as CGC isoladas de murganhos transgênicos apresentaram uma diminuição dos níveis de cálcio intracelular (provavelmente associado a uma diminuição da capacidade de activação dos receptores) e uma ligeira diminuição do potencial mitocondrial (avaliado pela pequena diferença na libertação citosólica de TMRM+)

após o estímulo de NMDA/glicina, comparativamente às CGC *wild-type*. De acordo com o decréscimo na entrada de cálcio após abertura dos receptores NMDA, ocorreu uma diminuição na captação de cálcio mitocondrial e, conseqüentemente, um maior potencial mitocondrial (maior retenção da sonda TMRM+) nas CGC transgênicas, relativamente às CGC *wild-type*. Em suma, os dois modelos de culturas de CGC usados sugerem alterações dos níveis de cálcio citosólico e função mitocondrial na resposta ao estímulo excitotóxico após a expressão da Atx3 mutante. Estes resultados sublinham a importância da realização de estudos adicionais para avaliar a função mitocondrial na DMJ num contexto celular, a fim de clarificar o papel do processo excitotóxico na patogênese da DMJ.

Palavras-chave:

Poliglutaminas; doença de Machado-Joseph; células granulares do cerebelo; excitotoxicidade; receptores ionotrópicos do glutamato.

## Abstract

Machado-Joseph disease, also known as spinocerebellar ataxia type 3, is one of nine polyglutamine disorders caused by the expansion of cytosine-adenine-guanine (CAG) trinucleotide repeats within the coding region of ATXN3 gene, which codifies for ataxin-3 (Atx3). Machado-Joseph's disease pathological symptoms become apparent when the CAG expansion is higher than 51 repeats. The polyglutamine tract, located at the C-terminus of expanded Atx3, induces conformational changes in the protein, leading to its misfolding and accumulation of ubiquitinated nuclear inclusions. Despite widespread expression of expanded Atx3 protein, neurodegeneration occurs in specific brain regions, such as pontine nuclei, cerebellum, substantia nigra and striatum, among others. Our study aimed to evaluate changes in excitotoxicity upon selective activation of ionotropic glutamate receptors, namely the NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) and AMPA ( $\alpha$ -amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) propanoic acid) receptors, in cultured cerebellar granule cells (CGC). We used CGC transduced with lentiviral vectors encoding for expanded (ATX3 MUT with 72 glutamines) *versus wild-type* (ATX3 WT with 27 glutamines) human Atx3 or CGC cultures isolated from *wild-type* (CGC *wild-type*) or transgenic (CGC transgenic, with 135 glutamines) mice. Exposure to NMDA or AMPA caused a decrease in cell viability in the CGC ATX3 WT and CGC *wild-type*, which was not significantly affected upon expression of mutant Atx3. In order to characterize the effect observed after selective excitotoxic stimulation of NMDA receptors, we determined the *in situ* simultaneous changes of intracellular calcium levels and mitochondrial potential in the single CGCs. CGCs expressing ATX3 WT or ATX3 MUT showed similar rise in intracellular calcium and concomitant similar release of TMRM<sup>+</sup> from mitochondria following NMDA/Glycine stimulation. Expression of ATX3 MUT increased mitochondrial calcium loading capacity and concomitant decreased mitochondrial membrane potential (evaluated through decreased release of accumulated TMRM<sup>+</sup>). Conversely, CGC isolated from transgenic mice exhibited decreased levels of intracellular calcium (suggesting decrease capacity to fully activate the NMDA receptor) and slight decreased mitochondrial membrane potential upon NMDA/Glycine stimulation, in relation to CGC *wild-type*. Interestingly, transgenic CGC showed decreased mitochondrial calcium accumulation (probably related with decreased calcium entry) and increased mitochondrial potential (evidenced through increased overall accumulation of TMRM<sup>+</sup>). In summary, the two models CGC cultures used suggest changes in calcium and mitochondrial function in response to excitotoxic stimuli in the presence of mutant Atx3. These results stress the importance of performing additional studies to assess the mitochondrial function in pathogenic cellular

context, in order to clarify the role of excessive glutamate in Machado-Joseph's disease pathogenesis.

Keywords:

Polyglutamines, Machado-Joseph disease; cerebellar granule cells; excitotoxicity; ionotropic glutamate receptors

## Índice

Resumo .....	5
Abstract .....	7
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Doenças causadas por expansão de trinucleótidos.....	12
1.2. Doenças de Poliglutaminas .....	12
1.3. Ataxias espinocerebelosas.....	13
1.4. Doença de Machado-Joseph.....	13
1.4.1. Características Clínicas da Doença de Machado-Joseph .....	14
1.4.2. Neuropatia na Doença de Machado-Joseph .....	14
1.4.2.1. Modelos celulares e animais da Doença de Machado-Joseph .....	15
1.4.3. Genética da Doença de Machado-Joseph .....	16
1.4.4. Ataxina-3.....	17
1.4.5. Mecanismos Patogénicos na Neurodegenerescência .....	18
1.4.5.1. Excitotoxicidade .....	19
2. OBJECTIVOS .....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Cultura de células granulares do cerebelo.....	28
3.2. Infecção de Cultura de Células Granulares do Cerebelo .....	28
3.3. Western Blotting .....	29
3.4. Imunocitoquímica .....	30
3.5. Ensaio Colorimétrico de Alamar Blue®.....	30
3.6. Microscopia Fluorescência (Single Cell Calcium Imaging).....	32
3.7. Análise Estatística .....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.1. Análise da Expressão da Ataxina-3 <i>Wild-type</i> e Mutante após Infecção Células Granulares do Cerebelo utilizando Lentivírus .....	35
4.2. Análise de Excitotoxicidade em Células Granulares do Cerebelo.....	37
4.2.1. CGC Infectadas com Lentivírus que Codificam para Ataxina-3 <i>Wild-type</i> ou Mutante .....	38
4.2.2. CGC obtidas de murganhos <i>Wild-type</i> e Transgênicos.....	42
4.3. Determinação simultânea dos níveis de cálcio intracelular e do potencial mitocondrial em CGC individuais após activação dos receptores NMDA .....	47
4.3.1. Análise em Células Granulares do Cerebelo Infectadas com Lentivírus que Codificam para a Ataxina-3 <i>Wild-type</i> ou Mutante .....	47
4.3.2. Análise em Células Granulares do Cerebelo <i>Wild-type</i> e Transgênicas.....	50

5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Doenças causadas por expansão de trinucleótidos

A expansão instável de repetições durante a transmissão génica foi descoberta na década de 90. De forma interessante, verificou-se que quando um limiar de repetições é excedido podem ocorrer doenças neurológicas (La Spada *et al.*, 1991).

As doenças por expansão de trinucleótidos podem ser divididas com base na localização das repetições, nomeadamente, se estas se situam na região codificante ou não codificante do gene. A classe de doenças que integra a região codificante (exões) está associada a quase duas dezenas de doenças, algumas das quais são neurodegenerativas e resultam da expansão da repetição do trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) que codifica para o aminoácido glutamina (Orr and Zoghbi, 2007). Para além da expansão de glutaminas (poliglutaminas) surgem repetições de outros aminoácidos, como é o caso das alaninas. De entre as nove doenças de poliglutaminas actualmente identificadas salienta-se a doença de Machado-Joseph (DMJ) e a doença de Huntington (a mais comum) (Albrecht and Mundlos, 2005).

Algumas características que definem as doenças causadas por expansão de repetição de trinucleótidos, nomeadamente:

(i) as repetições expandidas apresentam instabilidade somática e germinal, devido a mutações dinâmicas, que tendem a expandir mais do que a retrair em gerações sucessivas (Pearson *et al.*, 2005);

(ii) muitas vezes estas doenças estão associadas a fenótipos mais graves e de aparecimento precoce em gerações sucessivas de famílias afectadas (fenómeno conhecido, como antecipação) (Igarashi *et al.*, 1992) e

(iii) a origem do alelo mutado pode influenciar a antecipação, uma vez que, a transmissão paterna é associada a um maior risco de expansão em muitas destas doenças (Lutz, 2007).

## 1.2. Doenças de Poliglutaminas

As doenças de poliglutaminas são doenças neurológicas geralmente associadas a um ganho de função, causadas por uma expansão da cadeia de poliglutaminas, que pode variar de uma extensão normal de 4 a 36 resíduos para uma extensão patológica com mais 36 resíduos em diferentes proteínas (Gatchel and Zoghbi, 2005). As nove doenças de poliglutaminas, incluem a DMJ e outras ataxias espinocerebelosas do tipo 1, 2, 6, 7 e 17, a doença de Huntington, a atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana e a atrofia muscular espinobulbar, com excepção desta última que é uma doença recessiva, as restantes são doenças hereditárias autossómicas dominantes (Hands *et al.*, 2008). Apesar das diferentes proteínas afectadas, as

doenças de poliglutaminas partilham algumas características, tais como a idade de início da doença mais comum na meia-idade, a perda progressiva de células neuronais, declínio de funções motoras e cognitivas (Jana and Nukina, 2003) e uma proporcionalidade inversa entre o número de repetições de CAG e a idade de início da doença; contudo, factores familiares e ambientais podem alterar esta correlação (Maciel *et al.*, 1995). Gerações de famílias afectadas com esta mutação dinâmica experienciam a antecipação com o início precoce da doença e uma mais rápida progressão da mesma, devido à instável repetição intergeracional, que é particularmente acentuada em transmissões paternas (Zoghbi and Orr, 2000). A conformação anormal da proteína mutada, resulta na sua agregação proteica a nível citosólico, nuclear e/ou noutros organelos (tais como a mitocôndria) é também uma característica comum às doenças de poliglutaminas (Gatchel and Zoghbi, 2005).

### **1.3. Ataxias espinocerebelosas**

As ataxias espinocerebelosas (SCA, do inglês “spinocerebellar ataxia”) são causadas por um funcionamento anormal do cerebelo ou das suas conexões aferentes ou eferentes (Carlson *et al.*, 2009). As SCA são um grupo complexo e heterogéneo a nível clínico e genético. As SCA autossómicas dominantes, na qual se inclui a DMJ, são caracterizadas clinicamente por ataxia cerebelosa progressiva, que consiste numa falha de coordenação geral dos movimentos dos membros e da marcha, podendo ser acompanhadas por outros sintomas, tais como oftalmoplegias, sinais piramidais e extrapiramidais (incluindo parkinsonismo, distonia e coreia), demência, disartria e neuropatia periférica. A idade de início da doença é normalmente entre os 30 e os 50 anos de idade, evoluindo progressivamente para um estado fatal (Zoghbi and Orr, 2000).

### **1.4. Doença de Machado-Joseph**

O espectro clínico da DJ é pleomórfico, i.e. apresenta uma multiplicidade de manifestações clínicas. No final da década de 70, Coutinho e Andrade definiram as diferentes formas da patologia como – doença de Machado-Joseph (DMJ) (Carlson *et al.*, 2009; Coutinho and Andrade, 1978; Nakano *et al.*, 1972; Rosenberg *et al.*, 1976; Woods and Schaumburg, 1972).

A DMJ, também, conhecida como ataxia espinocerebelosa do tipo 3 (SCA3, do inglês “spinocerebellar ataxia type 3”), é a ataxia autossómica dominante mais comum

no mundo (Gan *et al.*, 2010; Schols *et al.*, 2004). Tal como na maioria destas doenças poliglutamínicas, os cérebros dos doentes com mutação no gene associado à doença apresentam agregados intranucleares e apresentam perda de células neuronais em áreas selectivas do cérebro (Paulson, 2007). Na DMJ essas áreas incluem o cerebelo, núcleo dentado, núcleos pontinos, a substância negra e o estriado, entre outras (Alves *et al.*, 2008b; Hands *et al.*, 2008).

#### **1.4.1. Características Clínicas da Doença de Machado-Joseph**

Clinicamente, envolve vários sistemas neurológicos e de acordo com a idade de início da doença e as manifestações clínicas foram descritos cinco subgrupos da DMJ. O subgrupo I apresenta severos sinais piramidais e extrapiramidais, tais como distonia, oftalmoplegia, e é o subgrupo com sintomas evolutivos mais graves e com início da doença numa fase mais precoce. O subgrupo II é o mais comum, com características clínicas que incluem sinais cerebelosos e piramidais e uma idade de início da doença entre os 20 e os 40 anos. O subgrupo III, com manifestações ligeiras e idade de início entre os 40 e os 75 anos é caracterizado por ataxia cerebelosa e neuropatia periférica predominante. Os doentes do subgrupo IV manifestam sinais cerebelosos, polineuropatias e parkinsonismo. Por último, o subgrupo V apresenta uma vincada paraplegia espástica, com ou sem ataxia cerebelosa; por vezes, este subgrupo é diagnosticado como pertencendo às paraplegias espásticas hereditárias.

Algumas características transversais a todos os subgrupos são ataxia, oftalmoplegia, perda de equilíbrio, falta de coordenação dos membros e da marcha, dificuldade na deglutição, fasciculação faciolingual, perda sensitiva e de massa muscular culminando na morte do portador da DMJ (Wang *et al.*, 2009), após cerca de 21 anos do início dos sintomas (Kieling *et al.*, 2007).

A prevalência da DMJ é elevada no Arquipélago dos Açores, especialmente na Ilha da Flores (1:239) (Bettencourt *et al.*, 2008), mas relativamente rara em Portugal e no Mundo (1:100000) (van de Warrenburg *et al.*, 2002).

#### **1.4.2. Neuropatia na Doença de Machado-Joseph**

À semelhança do que acontece com a clínica também o quadro patológico da DMJ é diversificado. Estudos anteriores da DMJ demonstraram degeneração da substância cinzenta em múltiplas áreas envolvendo o tracto cerebelo-tálamo-cortical, os gânglios basais, os sistemas visual, sensorial, auditivo e vestibular, o sistema pré-cerebelar do tronco cerebral relacionado com a ingestão; o sistema pontino

noradrenérgico e os sistemas colinérgico e dopaminérgico. A degeneração da matéria branca é notada no cerebelo, medula espinal e tronco cerebral (D'Abreu *et al.*, 2010).

#### **1.4.2.1. Modelos celulares e animais da Doença de Machado-Joseph**

Ao longo dos anos têm sido usados diversos modelos experimentais para o estudo dos mecanismos de neurodegenerescência associados à DMJ. Com o estudo desses modelos pretende-se conhecer as vias disfuncionais de modo a potenciar a investigação de estratégias terapêuticas efectivas. Por si só cada um dos modelos não mimetiza completamente as diferentes características da patologia ou os mecanismos patológicos envolvidos, e portanto, há um contínuo desenvolvimento de variados modelos. Existem modelos celulares para a DMJ como as culturas neuronais primárias, linhas celulares neurais e não-neurais (Jeub *et al.*, 2006; Paulson *et al.*, 1997). Para além disso, têm sido utilizados modelos animais invertebrados para DMJ, nomeadamente a *Caenorhabditis elegans* e a *Drosophila melanogaster* (Kuhlbrodt *et al.*, 2011; Mallik and Lakhotia, 2010). O uso de animais transgênicos desenvolvidos com variadas expansões de poliglutaminas é frequente na investigação da DMJ (Boy *et al.*, 2010; Chou *et al.*, 2008; Silva-Fernandes *et al.*, 2010), bem como a utilização de vectores virais e não virais que permitem a expressão de Atx3 mutante (Alves *et al.*, 2008b; Todi *et al.*, 2007).

As culturas de CGC utilizadas neste trabalho provieram de murganhos transgênicos e *wild-type*. A construção do murganho transgênico, da estirpe C57BL/6J, que expressa a Atx3 humana expandida sob a regulação do promotor de citomegalovírus, transporta 135 glutaminas na sequência de poliglutaminas é baseado no modelo animal transgênico para a DMJ caracterizado por Silva-Fernandes e colegas em 2010 (Silva-Fernandes *et al.*, 2010).

As culturas de CGC de murganho *wild-type*, e também da estirpe C57BL/6J, foram infectadas com lentivírus (LV). Os LV pertencem à vasta família dos retrovírus derivados dos HIV (do inglês “Human immunodeficiency vírus”), mantendo destes os elementos essenciais e não patogênicos para uma eficiente produção e transdução do vector viral. Os LV possuem uma alta capacidade intrínseca de integração no genoma (Zufferey *et al.*, 1997). Através da inserção aleatória da construção de interesse no genoma da célula hospedeira, os retrovírus têm o potencial de promover uma transdução eficiente, estável e duradoura numa grande variedade de modelos *in vitro* e *in vivo* (Gropp *et al.*, 2003). Além disso, os LV têm vantagem de poderem inserir genes específicos em cromossomas de células-alvo em divisão ou não (Follenzi *et al.*,

2000). Os vectores LV utilizados neste trabalho codificam para a proteína Atx3 completa com 72 glutaminas (72Q) sobre o controlo do promotor da fosfoglicerato cinase (PGK, do inglês “phosphoglycerate kinase”) (ATX3 MUT) ou com 27 glutaminas (27Q) (ATX3 WT) usado como controlo (ver **Figura 1**), descritos anteriormente por Alves e colaboradores em 2008 (Alves *et al.*, 2008a; Alves *et al.*, 2008b).



**Figura 1** – Esquema representativo da construção do vector lentiviral usado no desenvolvimento do modelo animal para a DMJ. O DNA complementar codifica para Atx3 humana *wild-type* (com 27Q) ou mutante (com 72Q), contém um Tag Myc e foi clonado no vector transmissão SIN-W-PGK (Adaptado de Alves *et al.* 2008) (Alves *et al.*, 2008b).

### 1.4.3. Genética da Doença de Machado-Joseph

O locus responsável pela DMJ foi mapeado no braço longo do cromossoma 14 (14q32.1) e o gene causador é denominado por gene *ATXN3* (também, conhecido por gene *MJD* ou *MJD1*). O gene *ATXN3* codifica a proteína ataxina-3 (Atx3). A mutação encontrada em doentes portadores da DMJ é uma expansão de um triplete de CAG, que ocorre no exão 10 do gene *ATXN3*, a 5', que conduz à expressão da Atx3 com uma sequência de poliglutaminas expandida no C-terminal da proteína (Bettencourt *et al.*, 2010). Na DMJ os alelos patológicos possuem mais de 51 repetições no gene *ATXN3* (ver **Figura 2**). Os alelos normais apresentam um número variável de poliglutaminas entre os 12 e os 47. Os portadores de repetições no intervalo de 47 a 51 estão associados a um risco crescente de desenvolverem a patologia (D'Abreu *et al.*, 2010). Uma vez que a DMJ é uma doença autossómica dominante, significa que basta que um dos progenitores seja portador da mutação para que haja um risco de 50% da descendência ser afectada. A antecipação é uma característica da DMJ (e das restantes doenças de poliglutaminas) e, como referido anteriormente, a transmissão paterna está associada a um maior risco de expansão do trinucleótido CAG (Maruyama *et al.*, 1995). Os casos de homozigotia na repetição da expansão de CAG no gene *ATXN3* são raros, embora já tenham sido descrito na literatura e apresenta um fenótipo mais severo do que os casos de heterozigotia (Carvalho *et al.*, 2008).



**Figura 2** – Número de repetições de CAG na DMJ com caris patológico (adaptado de Paulson, 2007) (Paulson, 2007).

#### 1.4.4. Ataxina-3

A proteína ataxina-3 (Atx3) tem um peso molecular aproximado de 42 kDa em indivíduos normais, mas é significativamente maior em portadores da doença. É a proteína mais pequena envolvida em doenças de poliglutaminas (Kawaguchi *et al.*, 1994) e foi identificada no genoma de várias espécies, desde os nemátodos à espécie humana (Albrecht *et al.*, 2003).

A proteína Atx3 apresenta uma porção N-terminal (terminal amínico) que coincide com o domínio globular Josefina. Estudos anteriores mostraram que o domínio Josefina pertence à família das cisteínas-proteases e contém uma tríade de aminoácidos com actividade de ubiquitina protease. A proteína Atx3 contém ainda um sinal de exportação nuclear (NES, do inglês “nuclear export signal”) e dois ou três domínios de interacção de ubiquitina (UIM, do inglês “ubiquitin-interacting motif”) seguidos pela sequência de poliglutaminas na porção variável C-terminal (terminal carboxílico) (**Figura 3**) (Riess *et al.*, 2008). O terceiro domínio de interacção depende da variante de ‘splicing’ da proteína e a sequência de poliglutaminas é antecedida pelo sinal de importação nuclear (NLS, do inglês “nuclear localization signal”) que promove a passagem da proteína para o núcleo (Macedo-Ribeiro *et al.*, 2009). A proteína Atx3 normal pode estar presente tanto no núcleo como no citoplasma, no entanto, a proteína mutante localiza-se preponderantemente no núcleo (Fujigasaki *et al.*, 2000).



**Figura 3** – Esquema representativo da estrutura da proteína Atx3. Sinal de exportação nuclear (NES), domínio Josefina, domínios de interacção de ubiquitina (UIM1, UIM2 e UIM3) e sinal de importação nuclear (NLS) (Adaptado de Nicastro *et al.*, 2001; Breuer *et al.*, 2010 e Albrecht *et al.*, 2004) (Albrecht *et al.*, 2004; Breuer *et al.*, 2010; Nicastro *et al.*, 2010).

Apesar da função biológica da Atx3 não estar ainda completamente esclarecida, a proteína parece estar associada à via da ubiquitinação, pois possui dois ou três domínios para interação com a ubiquitina (Donaldson *et al.*, 2003), e interage com proteínas envolvidas na via proteolítica tais como subunidades do proteassoma, hHR23 e a VCP/p97 (do inglês “valosin-containing protein/p97”) (Doss-Pepe *et al.*, 2003).

A Atx3 liga-se e hidrolisa preferencialmente proteínas poliubiquitinadas conjugadas com quatro ou mais ubiquitinas, sendo também designadas por enzima de desubiquitinação (DUB, do inglês “deubiquitinating enzyme”) (Winborn *et al.*, 2008). Zhong e Pittman em 2006 (Zhong and Pittman, 2006) demonstraram que a proteína Atx3 pode ter como outra função, a regulação dos níveis de substratos da degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD, do inglês “endoplasmic-reticulum-associated degradation”); de facto, os níveis celulares de substrato ERAD aumentaram em células transfectadas com Atx3 normal. No entanto, os níveis de substratos não-degradados pelo retículo endoplasmático (ER, do inglês “endoplasmic reticulum”) não foram alterados, uma hipótese sustentada pela ligação da Atx3 à VCP/p97, proteína responsável pela extracção de substratos ERAD do ER (Zhong and Pittman, 2006).

Um estudo demonstrou ainda que a Atx3 pode estar envolvida no mecanismo repressor da regulação transcricional, envolvendo histonas e receptores nucleares co-activadores do processo de transcrição (Evert *et al.*, 2006).

Também no citosqueleto, a Atx3 parece ter um papel preponderante, pois a sua perda parcial de funções, no contexto da doença, pode afectar a rede neuronal do citosqueleto (Rodrigues *et al.*, 2010).

Em *Caenorhabditis elegans* foi identificada uma cooperação sinérgica entre a Atx3 e a CDC-48 (homóloga da chaperona VCP/p97) na regulação da proteólise e da longevidade (Kuhlbrodt *et al.*, 2011).

A identificação destas e de outras interacções da Atx3, concomitantemente com o conhecimento da sua actividade biológica e estrutural, têm desempenhado uma contribuição importante para o conhecimento patológico da DMJ e para a futura aplicação em terapias específicas.

#### **1.4.5. Mecanismos Patogénicos na Neurodegenerescência**

Diversos mecanismos parecem estar envolvidos na neurodegenerescência, quer das doenças de poliglutaminas, quer das ataxias espinocerebelosas. A mutação associada à expansão das repetições de CAG tem sido relacionada a múltiplos mecanismos, nomeadamente, disfunção mitocondrial, stresse oxidativo, alterações no

transporte axonal, desregulação transcricional, apoptose, alteração na remoção de proteínas por disfunção do sistema ubiquitina proteassoma ou no processo de autofagia, alterações na homeostase do cálcio e excitotoxicidade. Estas vias podem actuar de forma independente ou interagir entre si, causando um aumento da disfunção celular e, em última análise, à morte neuronal pela multiplicidade dos eventos (Duenas *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2010). Neste trabalho, pretende-se dar ênfase ao mecanismo de excitotoxicidade na DMJ, associado à perda de homeostase dos níveis intracelulares de cálcio e à disfunção mitocondrial.

#### 1.4.5.1. Excitotoxicidade

No sistema nervoso central a neurotransmissão excitatória é mediada fundamentalmente pelo neurotransmissor glutamato (**Figura 4**). A neurotransmissão pelo glutamato é um componente importante da modificação da actividade sináptica, que está associada à aquisição e armazenamento de informação nova, nomeadamente à aprendizagem e formação da memória, bem como, um desenvolvimento normal do sistema nervoso (Ghiani *et al.*, 2007; Riedel *et al.*, 2003). O glutamato é libertado por exocitose para a fenda sináptica interage com os receptores ionotrópicos ou metabotrópicos na superfície da membrana pós-sináptica (Greene and Greenamyre, 1996). A activação de receptores ionotrópicos induz o fluxo de iões de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e de sódio ( $\text{Na}^+$ ). Este fluxo de iões produz uma despolarização da membrana pós-sináptica (devido ao influxo de  $\text{Na}^+$ ) e modifica a cascada de sinalização intracelular que leva a alterações na expressão génica (promovida pela entrada de cálcio) (Cohen and Greenberg, 2008).

Os receptores ionotrópicos glutamatérgicos dividem-se em subgrupos, denominados pelo agonista que especificamente os estimula. Estes incluem o receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA, do inglês “*N*-methyl-D-aspartic”), o receptor ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propiónico (AMPA, do inglês “ *$\alpha$ -amino-3-5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl propanoic acid*”) e o receptor cainato (R-cainato) (Ankarcrona *et al.*, 1995).

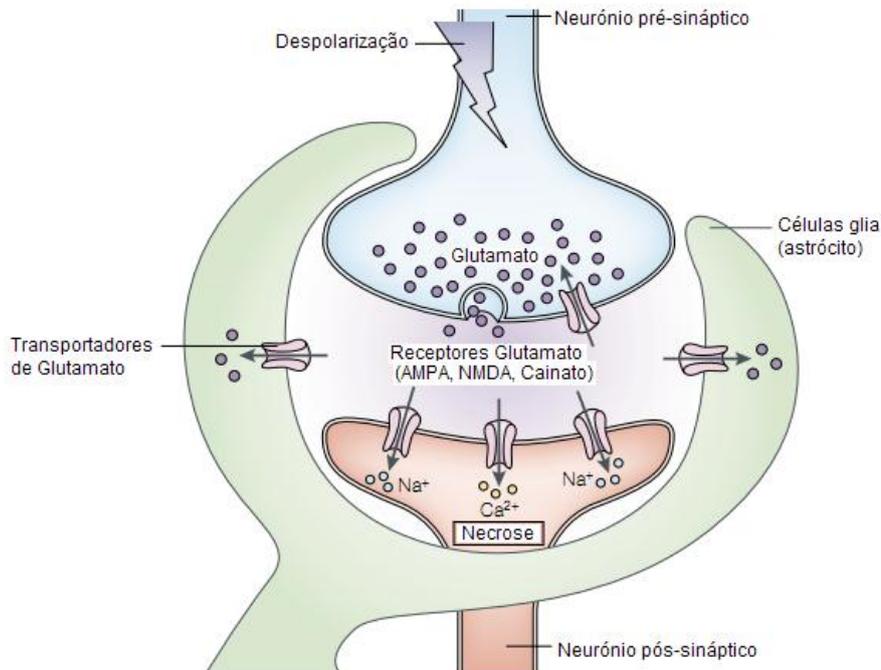
Os receptores AMPA/cainato, também denominados receptores não-NMDA, são os primeiros mediadores nas transmissões excitatórias (que possuem maior afinidade para o glutamato), a maioria destes receptores são permeáveis ao ião  $\text{Na}^+$  e potássio ( $\text{K}^+$ ). Alguns receptores AMPA (R-AMPA) endógenos exibem altas condutâncias a  $\text{Ca}^{2+}$  se tiverem na sua constituição a subunidade GluA1 (anteriormente denominada por GluR-A ou GluR1), em contrapartida os R-AMPA que

tiverem na sua presença a subunidade GluA2 demonstram baixa permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Engelman *et al.*, 1999). A translocação de  $\text{Ca}^{2+}$  do espaço extracelular para o compartimento intracelular tem uma acção importante na regulação dos sistemas de segundos mensageiros. Assim, a permeabilidade de alguns R-AMPA ao  $\text{Ca}^{2+}$  pode ter uma grande importância funcional, particularmente em células que não tenham receptores NMDA (R-NMDA). Os R-AMPA/R-cainato podem ser bloqueados selectivamente por quinoxalina-2,3-dionas, como é o caso do CNQX (do inglês “6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione”), do DNQX (do inglês “6,7-dinitro-quinoxaline-2,3-dione”) e do NBQX (do inglês “6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)-quinoxaline-2,3-dione”). O NBQX é o antagonista mais potente e mais selectivo para os R-AMPA. Por outro lado, a ciclotiazida (CTZ) funciona como um modulador alostérico que suprime a dessensibilização dos R-AMPA, aumentando assim as suas respostas, a concavalina A tem um efeito semelhante nos R-cainato (Nakagawa, 2010).

Os R-NMDA são canais iónicos que requerem a ligação simultânea de glutamato e glicina (Gli), que funciona como co-agonista, no domínio extracelular do receptor antes da abertura transmembranar do poro. Esta característica singular dos R-NMDA resulta dos sítios específicos para a ligação do glutamato na subunidade GluN2 e da Gli na subunidade GluN1 e a incorporação de duas subunidades GluN1 e de duas subunidades GluN2 no receptor funcional heteromérico (Kussius *et al.*, 2010). Quando a membrana neuronal está em repouso o canal dos R-NMDA encontra-se bloqueado pelo ião magnésio, presente no meio extracelular dos neurónios, participando na regulação do fluxo transmembranar de iões e no metabolismo energético, entre outras. De facto a rápida activação dos R-AMPA/R-cainato após libertação de glutamato na fenda sináptica e subsequente despolarização da zona vizinha facilita a remoção do ião magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) do poro associado ao R-NMDA conduzindo à sua activação. O desbloqueio do ião  $\text{Mg}^{2+}$  é dependente de voltagem, com repulsão electrostática do ião (Masuko *et al.*, 1999). Ocorrendo de seguida o fluxo de iões  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (com baixa permeabilidade) e  $\text{Ca}^{2+}$  (com elevada condutância e permeabilidade) através dos R-NMDA (Ozawa *et al.*, 1998). A dessensibilização por R-NMDA é, por isso, relativamente lenta, contribuindo para indução da potenciação de longa duração, alteração na eficácia da sinapse (Cohen and Greenberg, 2008).

Os R-NMDA apresentam diversos locais de modulação da sua função, além dos descritos anteriormente. Locais de ligação para modulação alostérica incluem locais para as poliaminas (os resíduos de aminoácidos envolvidos neste processo localizam-se no primeiro e terceiro segmento transmembranar adjacentes ao poro), para o ião zinco e para o MK-801 (do inglês “(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo-[a,d]cyclohepten-5,10-imine”) é um antagonista não-competitivo dos R-NMDA, que

inibe o canal iónico associado ao receptor (Michaelis, 1998). O ácido quinurénico inibe o local de ligação do co-agonista Gli, enquanto o ifenprodil modula o canal por alteração da sensibilidade a prótons, que actuam como moduladores endógenos negativos (Mothet *et al.*, 2000).



**Figura 4** – Sinapse excitatória glutamatérgica. A libertação exocitótica (vesicular) de glutamato surge após ocorrência de um potencial de acção e consequente despolarização da membrana. Na fenda sináptica o glutamato activa diferentes receptores para este neurotransmissor, nomeadamente os receptores ionotrópicos AMPA, cainato e NMDA. A concentração de glutamato no espaço membranar é controlada pela actividade do transportador para o glutamato, localizado na membrana pré-sináptica e nos astrócitos (Adaptado de Syntichaki & Tavernarakis 2003) (Syntichaki and Tavernarakis, 2003).

Para além da rápida comunicação entre neurónios, o glutamato também actua como uma molécula sinalizadora, com efeitos duradouros na estrutura e função neuronal. O glutamato é sintetizado nos neurónios e degradado nas células glia, por actuação das enzimas glutaminase e glutamina sintetase, respectivamente. Apesar das várias acções benéficas do glutamato no sistema nervoso central de mamíferos (Choi, 1992). A excitotoxicidade representa a cascata de eventos resultante da entrada excessiva de iões Ca<sup>2+</sup> para o interior dos neurónios despoletada por glutamato e outros agonistas do R-NMDA conduzindo a alterações da homeostase iónica, activação de enzimas hidrolíticas, disfunção mitocondrial, formação de espécies

reactivas de oxigénio (ROS, do inglês “reactive oxygen species”) culminando na perda de integridade celular (Norenberg and Rao, 2007).

A concentração de cálcio na célula varia devido a diversos sinais em ambiente celular, dependendo da sua origem (intra ou extracelular), ou da sua natureza química, mecânica ou eléctrica. Tal como no caso da sinalização de outros iões ou moléculas, geralmente um aumento na concentração citosólica de cálcio corresponde a uma activação de funções celulares. A especificidade de activação das funções celulares depende de vários factores, nomeadamente da coordenação do transporte a  $\text{Ca}^{2+}$  e da ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  a proteínas, bem como da compartimentalização celular, representada pelos organelos, que contribuem para gerar o sinal de  $\text{Ca}^{2+}$  na sua complexidade espacial e temporal. Inicialmente considerava-se que os organelos tinham um papel físico e funcional diferente no controlo da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  (Brini, 2003). Mas com o desenvolvimento da biologia molecular e de técnicas de imagem aplicadas às células verificou-se que todos estes compartimentos estão estritamente interligados e o controlo da sua homeostase está não só relacionado com o controlo da actividade dos organelos, mas também com a modulação dinâmica do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$ . A mitocôndria, de entre outros organelos como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, actua como um grande reservatório de  $\text{Ca}^{2+}$ . E portanto, está envolvida na modulação das funções reguladas pelas variações do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Berridge *et al.*, 2000).

De facto, as doenças do sistema nervoso central, incluindo doenças de poliglutaminas como a doença de Huntington (Milnerwood *et al.*, 2010), podem resultar de uma libertação excessiva de glutamato (aguda ou crónica) e sobreactivação dos receptores pós-sinápticos (Michaelis, 1998), e conseqüentemente alterações no metabolismo energético, nomeadamente na síntese de adenosina trifosfato (ATP, do inglês “adenosine triphosphate”) e perturbação na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Brini, 2003).

A mitocôndria acumula a partir de um valor limite, o cálcio livre no citoplasma após a activação excessiva dos R-NMDA em culturas neuronais. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pode despolarizar a mitocôndria de duas formas. A primeira envolve uma despolarização parcial, que ocorre como consequência do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  para a matriz mitocondrial e conseqüente alteração no gradiente protónico (Nicholls and Ward, 2000). A inversão desta despolarização ocorre quando a acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$  é completa e dependente da produção de ATP pela mitocôndria. O segundo mecanismo pelo qual a acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$  pode despolarizar a mitocôndria é muito diferente e resulta de lesões induzidas pela entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e por stresse oxidativo, que pode causar a activação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP, do

inglês “permeability transition pore”) na membrana interna e ‘despejar’ todo o  $\text{Ca}^{2+}$  da matriz mitocondrial de volta para o citoplasma (Nicholls and Ward, 2000). Por sua vez, a indução do PTP pode causar a libertação do citocromo c e de outras moléculas até ao tamanho de 1,5 KDa (Reynolds, 1999).

Contudo, após vários anos de investigação nesta matéria, continua ainda por esclarecer, se o intumescimento mitocondrial, a produção de ROS e a perda do gradiente eletroquímico que é vital para a síntese de ATP se se tratam de processos causais ou consequentes da formação do PTP (Tsujiimoto *et al.*, 2006). Se os efeitos atrás descritos forem considerados consequentes, então a transição de permeabilidade desempenha um importante papel na indução da apoptose. A apoptose celular é um processo de morte celular dependente de energia e procede de forma controlada mediante a acção de uma família de proteínas ricas em resíduos de cisteína e com actividade protease.

A activação das caspases pode ser desencadeada por duas vias apoptóticas principais: a via de receptores de morte (extrínseca) e a via dependente da mitocôndria (intrínseca). Na via extrínseca, a ligação de determinadas moléculas a receptores de morte, possibilitam a activação da caspase 8 que pode fazer a ligação entre as duas vias apoptóticas, através da clivagem da proteína Bid, a sua forma truncada Bid migra para a mitocôndria e/ou activa as caspases 3, 6, 7. A migração da Bid (truncada) para a mitocôndria promove a activação das proteínas pro-apoptóticas Bax or Bak (membros da família de proteínas Bcl-2), que uma vez ligadas à membrana externa da mitocôndria, podem formar poros, permitindo a passagem intermembranar factores apoptóticos como o citocromo c e Smac/DIABLO, entre outros para fora mitocôndria. Na via intrínseca, após um estímulo apoptótico, o citocromo c libertado para o citoplasma inicia a formação de um complexo multimérico, formado pelo citocromo c, APAF-1 (do inglês, “apoptotic protease-activating factor-1”) e pró-caspase-9 – o apoptossoma. Na presença de ATP, o apoptossoma é responsável pela activação da caspase-9, um processo irreversível e que leva inevitavelmente à activação da caspase-3, culminando com a condensação da cromatina e a fragmentação do ADN levando à morte celular por apoptose (Roth and D'Sa, 2001). As caspases-3 e 9 também poderão ser clivadas por calpaínas (inactivando-as) podendo direccionar um processo de morte celular por apoptose para necrose (Bizat *et al.*, 2003) com perda das reservas energéticas, por diminuição dos níveis de ATP e será causa preponderante deste tipo de morte celular (Lemasters, 1999).

A exposição de culturas de células granulares do cerebelo a aminoácidos excitatórios demonstrou ter efeitos no potencial de membrana mitocondrial, uma vez, que altera o valor de fluorescência da sonda TMRM<sup>+</sup> (do inglês, “tetramethylrhodamine

methyl ester”) (Ward *et al.*, 2007). Sendo portanto, a análise do potencial de membrana mitocondrial um parâmetro fulcral para o controlo da acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro da matriz mitocondrial, respiração e síntese de ATP (Nicholls and Ward, 2000).

## **2. OBJETIVOS**

Neste trabalho foram usadas culturas primárias de células granulares do cerebelo (CGC) por duas razões principais: i) o cerebelo é uma das áreas afectadas na DMJ (D'Abreu *et al.*, 2010); e ii) as culturas primárias de CGC foram anteriormente utilizadas para a análise de processos de excitotoxicidade associados ao estudo da função neuronal (Rego *et al.*, 2001).

No cerebelo mais de 90% dos seus neurónios são neurónios granulares e, constituem a maior população homogénea de células do cérebro de mamíferos. Em muitos casos, incluindo roedores e humanos, a neurogénese de CGC ocorre predominantemente após o nascimento e de forma sequencial. Assim, as culturas de CGC são uma mais-valia como culturas neuronais primárias viáveis, não só pelo facto da neurogénese ocorrer numa fase pós-natal, mas também por serem culturas neuronais bem caracterizadas (Contestabile, 2002).

O mecanismo pelo qual as mutações dinâmicas, nas doenças de poliglutaminas, levam à neurodegenerescência ainda não é totalmente compreendido. Alterações na regulação transcricional, homeostase do cálcio, excitotoxicidade e disfunção na degradação proteica são alguns dos eventos recorrentes nas doenças de poliglutaminas (Matilla-Duenas *et al.*, 2008; Milnerwood *et al.*, 2010). Contrariamente à doença de Huntington (Oliveira *et al.*, 2006), na doença de Machado-Joseph os processos excitotóxicos não são inteiramente conhecidos. Desta forma, os objectivos deste trabalho foram os seguintes:

- Determinar a susceptibilidade à excitotoxicidade por activação selectiva dos receptores de glutamato (R-NMDA e R-AMPA);
- Avaliar, simultaneamente *in situ* os níveis de cálcio intracelular e o potencial de membrana mitocondrial, em célula única.

Os estudos serão desenvolvidos com base em dois modelos de culturas primárias, nomeadamente, culturas de CGC obtidas de murganhos transgénicos *versus wild-type* para a Atx3 humana, e culturas CGC de murganhos *wild-type* infectadas com LV que expressam diferentes extensões da Atx3 (27Q e 72Q).

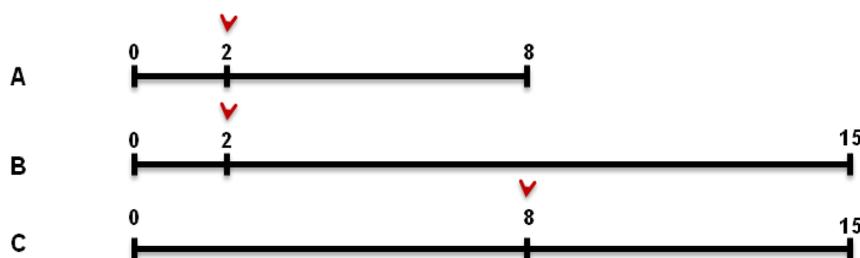
### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1. Cultura de células granulares do cerebello

Duas linhas de murganho (*wild-type* e transgênicos) foram utilizadas para obtenção de crias para o isolamento de CGC. Os murganhos transgênicos, gentilmente cedidos pela Prof. Doutora Patrícia Maciel (Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde, Universidade do Minho, Braga), eram da estirpe C57BL/6J e foram geneticamente modificados para expressarem a Atx3 mutante humana com uma sequência de 135 glutaminas. Os murganhos *wild-type* pertenciam à mesma estirpe. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*, nas instalações do Biotério Central do CNC/FMUC, em conformidade com as regras veterinárias para o uso de animais desta instituição. As culturas de CGC foram isoladas de murganhos de ambos os sexos com 6-7 dias pós-natal. As células foram cultivadas a uma densidade de 500 mil células/mL em meio Neurobasal (Gibco), em caixas previamente revestidas com poli-L-lisina (Sigma) e mantidas na estufa a 37°C numa atmosfera controlada, com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio Neurobasal foi suplementado com glutamina (Sigma) (0,5mM), gentamicina (Gibco) (50ug/mL), suplemento B27 (Gibco) e cloreto de potássio (2M). No dia seguinte ao isolamento, adicionou-se citosina arabinose (Sigma) (10 µM) ao meio de cultura, para impedir a proliferação de glia. A adição de citosina arabinose não foi realizada nas culturas destinadas a infecção lentiviral. O meio Neurobasal enriquecido nas culturas de CGC foi renovado a cada 3-4 dias.

### 3.2. Infecção de Cultura de Células Granulares do Cerebello

Lentivírus (LV) codificantes para a Atx3 humana expandida com 72Q (ATX3 MUT) e para a Atx3 humana *wild-type* com 27Q (ATX3 WT) foram usados para infectar CGC, segundo o protocolo de infecção (ver **Figura 5**). Um LV a expressar uma proteína fluorescente verde, LV – GFP (do inglês “green fluorescent protein”) foi utilizado como controlo interno para a transdução dos LV. Os LV foram gentilmente cedidos pelo Prof. Doutor Luís Pereira de Almeida (Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra).



**Figura 5** – Esquema do protocolo de infecção das CGC com lentivírus que codificam para a ATX3 WT (27Q) ou para a ATX MUT (72Q), nas três condições diferentes de infecção (**A**, **B** e **C**). O 0 (zero) representa o dia do isolamento das CGC e a seta vermelha o dia em que ocorre a infecção.

Os vectores LV foram produzidos em células 293T usando um sistema 4-plasmídico, descrito anteriormente (Hottinger *et al.*, 2000). As partículas de LV foram produzidas e ressuspendidas em solução-tampão de fosfato (PBS, do inglês “phosphate buffer solution”) com 1% de albumina de soro bovino (BSA) (Alves *et al.*, 2008b). Os stocks foram guardados a -80°C até serem utilizados.

Em experiências de imunocitoquímica as culturas de CGC, previamente cultivadas em lamelas de vidro de 16mm revestidas com poli-L-lisina, foram infectadas com uma densidade de LV de 30ng/500mil células. Para as experiências de Alamar Blue a densidade de LV usada foi de 20 ng/150 mil células, e para as de microscopia de fluorescência de célula única, a densidade de LV foi de 60 ng/1 milhão de células. Durante a infecção, foi retirado metade do volume do meio de cultura, sendo restituído seis horas após a incubação com os LV.

### 3.3. Western Blotting

Electroforese em géis de poli-acrilamida (SDS-PAGE, do inglês “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”) seguida da técnica de western blotting foi aplicada para testar o melhor protocolo de infecção tendo em conta a quantidade de proteína expressa. As amostras de CGC infectadas foram colhidas após a infecção com LV ATX3 WT e MUT, nas condições A, B e C (**Figura 5**). As amostras foram aplicadas em géis de poli-acrilamida 10%. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução-tampão Tris/ 0,1% Tween/ 5% leite e posteriormente incubada com o anticorpo anti-ataxina-3 (1H9) (Chemicon MAB5360) (1:1000), durante a noite, a 4°C. Após lavagens com TBS/ 0,1% Tween/1% leite, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-mouse 1:20000 (Sigma),

durante 2 horas. Após lavagens com TBS/ 0,1% Tween, a detecção da através do método de quimiofluorescência (Quantity One Program da Bio-Rad).

### 3.4. Imunocitoquímica

Produziram-se estudos de imunocitoquímica para caracterizar a cultura de CGC infectadas com LV. As lamelas contendo as CGC infectas foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com uma solução de metanol/acetona (1:1) (Panreac/MERCK), durante 15 minutos em gelo. De seguida as lamelas foram lavadas com PBS e bloqueadas durante uma hora com uma solução de soro de cabra a 5%, com Triton-X a 0,2% em PBS. A incubação com os anticorpos primários anti-MAP2 (origem: coelho) (1:200) (Chemicon) e anti-ataxina-3 (origem: murganho) (1:500) (Chemicon) decorreu durante uma hora, numa solução de soro. Procedeu-se a nova lavagem e incubação, com os anticorpos secundários anti-rabbit 594 (Invitrogene – Molecular Probes) e anti-mouse 488 (Invitrogene – Molecular Probes) diluídos de 1:200, no escuro durante uma hora. Segue-se nova lavagem com PBS e a incubação com a sonda Hoechst (1 µg/mL) (Invitrogen) em PBS durante 5 minutos. Finalmente as lamelas foram montadas em 20 µL de *fluorescent mounting medium* (Dako) sob uma lâmina.

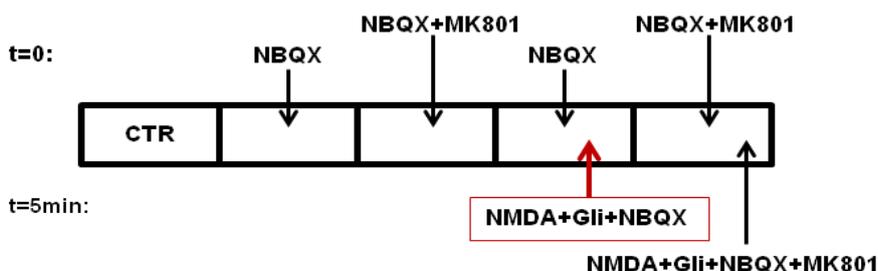
### 3.5. Ensaio Colorimétrico de Alamar Blue®

A resazurina, conhecido comercialmente por Alamar Blue, como indicador de oxidação-redução. A forma oxidada do Alamar Blue apresenta-se não-fluorescente com coloração azul. Este composto pode ser reduzido intracelularmente, permitindo uma avaliação da actividade celular metabólica. Assim, a análise da alteração por espectrometria do Alamar Blue é um método rápido, sensível e não-tóxico para analisar a viabilidade celular neuronal em culturas primárias, contribuindo para a investigação de mecanismos de toxicidade em modelos celulares de doenças neurológicas (Page *et al.*, 1993). Na literatura foi descrito que a fluorescência de Alamar Blue diminui quando CGC foram tratadas com aminoácidos excitatórios, nomeadamente glutamato, ou SDS (do inglês “sodium dodecyl sulfate”) (White *et al.*, 1996). No ensaio de viabilidade celular utilizou-se a resazurina (Alamar Blue), como indicador de viabilidade celular. Foi usado o protocolo esquematizado na **Figura 6**.

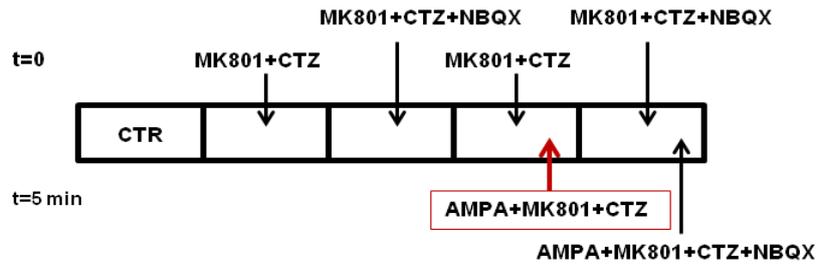


**Figura 6** – Esquema do protocolo de estimulação excitotóxica por Alamar Blue.

A resazurina, de cor azul e não fluorescente, é reduzida a resofurin, de cor rosa e fluorescente, e não precipita após ser reduzida em meio de crescimento devido à actividade celular (nomeadamente pelo consumo de oxigénio durante o metabolismo). CGC em cultura durante 15 dias em placas de 48 poços com 150mil células/poço/300  $\mu$ L de meio Neurobasal foram utilizadas para avaliar a sua susceptibilidade à excitotoxicidade provocada por AMPA e NMDA. Inicialmente, adicionam-se os inibidores dos receptores de glutamato no tempo 0 em solução iónica de Krebs (NaCl, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaSO}_4$ , HEPES,  $\text{pH}=7.4$ ). Decorridos 5 minutos, adicionam-se os estímulos de 100  $\mu$ M NMDA (Tocris) + 10  $\mu$ M Gli (Sigma) ou AMPA (Tocris) na ausência ou presença dos respectivos antagonistas, 5  $\mu$ M MK-801, 20  $\mu$ M NBQX e ainda do dessensibilizador de R-AMPA, 30  $\mu$ M ciclotiazida (CTZ) (ver **Figuras 7 e 8**). Os inibidores e agonistas estavam dissolvidos em Solução iónica de Krebs ( $\text{pH}=7.4$ ).



**Figura 7** – Esquema da aplicação dos inibidores dos receptores de glutamato ( $t=0$ ) e posteriormente ( $t=5\text{min}$ ) aplica-se o estímulo de NMDA+Gli (100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) na ausência (seta vermelha) ou na presença de antagonistas de R-AMPA (NBQX, 20  $\mu$ M), e de R-NMADA (MK-801, 5  $\mu$ M). Ao controlo (CTR) aplica-se apenas solução iónica de Krebs.



**Figura 8** – Esquema da aplicação dos inibidores dos receptores de glutamato ( $t=0$ ) e posteriormente aplica-se o estímulo de AMPA ( $100 \mu\text{M}$ ) na ausência (seta vermelha) ou na presença dos antagonistas de R-NMDA (MK-801,  $5 \mu\text{M}$ ), e de R-AMPA (NBQX,  $20 \mu\text{M}$ ), e ainda do dessensibilizador de R-AMPA (CTZ,  $30 \mu\text{M}$ ). Ao controlo (CTR) aplica-se apenas solução iônica de Krebs.

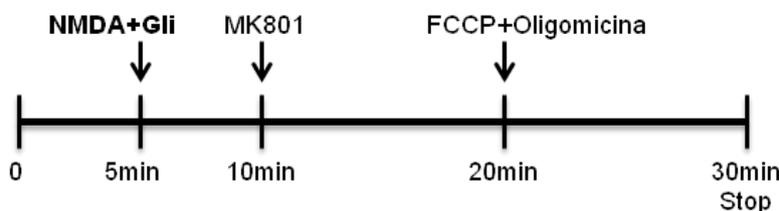
Decorridos 15 minutos da incubação com os agonistas na ausência ou presença dos inibidores, aspiraram-se as soluções dos poços e repôs-se o meio Neurobasal enriquecido. 22 horas após o início da experiência, aplicou-se a solução de Alamar Blue diluído 1:100 em meio Neurobasal enriquecido. Por último, passadas 2 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , fez-se a leitura da densidade óptica, com filtro de  $570\text{nm}$ . Os ensaios foram realizados com três réplicas e, com exceção dos momentos de aplicação dos compostos, a experiência decorreu sempre a  $37^\circ\text{C}$ .

### 3.6. Microscopia Fluorescência (Single Cell Calcium Imaging)

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado pelo uso da sonda fluorescente TMRM<sup>+</sup> tem sido amplamente utilizada na análise do potencial de membrana mitocondrial, por apresentar fototoxicidade mínima, baixo *photobleaching*, e a capacidade de poder ser usada em modo *quenched* (agregação da sonda) ou não-*quenched* (sem agregação da sonda) (Nicholls and Ward, 2000). A sonda TMRM<sup>+</sup> que se acumula predominantemente em mitocôndrias polarizadas. Assim, as variações da retenção de TMRM<sup>+</sup> foram avaliadas para verificar as alterações no potencial de membrana mitocondrial, com emissão de fluorescência aos  $548\text{nm}$ . Os níveis de cálcio intracelular foram registados fluorimetricamente utilizando a sonda sensível a cálcio Fura 2-AM (acetoxymethyl ester). O Fura 2-AM é um fluorocromo dependente da ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , quando está ligado ao  $\text{Ca}^{2+}$  absorve para o comprimento de onda  $\sim 340 \text{ nm}$ , na forma não ligada absorve para  $\sim 380 \text{ nm}$ . Deste modo, podem-se avaliar os níveis de cálcio intracelular comparando a razão  $F_{340}/F_{380}$ , portanto um aumento

no valor da razão entre esses comprimentos de onda (F340/F380) permite-nos deduzir um aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular livre.

As lamelas contendo CGC foram incubadas durante 40 minutos, a  $37^{\circ}\text{C}$ , em solução de incubação (em mM): 120 NaCl; 3,5 KCl; 0,4  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20 HEPES; 5  $\text{NaHCO}_3$ ; 1,2  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 1,2  $\text{MgCl}_2$ ; 1,3  $\text{CaCl}_2$  e 15 glucose; pH 7,4 suplementadas com as sondas  $\text{TMRM}^+$  (50 nM) (Molecular Probes) e Fura 2-AM (2  $\mu\text{M}$ ) (Molecular Probes), ácido plurónico (20 mg/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen) e BSA (1mg/mL) (Sigma). De seguida, efectuou-se a montagem da lamela no microscópio e colocou-se solução de microscopia (em mM): 120 NaCl; 3,5 KCl; 0,4  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20 HEPES; 5  $\text{NaHCO}_3$ ; 1,2  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 1,3  $\text{CaCl}_2$  e 15 glucose; pH 7,4 e ainda a sonda  $\text{TMRM}^+$  (50 nM) (Molecular Probes). Procedeu-se ao protocolo experimental esquematizado na **Figura 9**, com o estímulo de NMDA+Gli (100  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$ ) aos 5 minutos, seguida da adição do antagonista dos R-NMDA, MK-801 (5  $\mu\text{M}$ , Calbiochem), aos 10 minutos de experiência, posteriormente adicionaram-se FCCP (do inglês, “carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenyl-hydrazone”) (2,5  $\mu\text{M}$ ; Sigma) e oligonomicina (2  $\mu\text{g/mL}$ , Fluka) em simultâneo aos 20 minutos de experiência. Deixou-se decorrer a experiência durante mais 10 minutos. Os registos fluorimétricos foram seguidos durante todo o tempo da experiência.



**Figura 9** – Esquema do estímulo de NMDA+Gli nas CGC por microscopia de fluorescência.

### 3.7. Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como médias  $\pm$  SEM (do inglês “standard error of the mean”) com a indicação do número de experiências nas legendas das figuras. A significância estatística foi determinada através do teste *t* Student quando se pretendia a análise entre duas populações Gaussianas e pelo teste de análise de variância (one way ANOVA), seguida do teste Bonferroni para comparações múltiplas, para comparações múltiplas. Os dados estatísticos, os gráficos e as tabelas foram produzidos utilizando os programas informáticos GraphPad Prism<sup>®</sup> version 5, BioRad Quantity One e Microsoft Office Excel.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

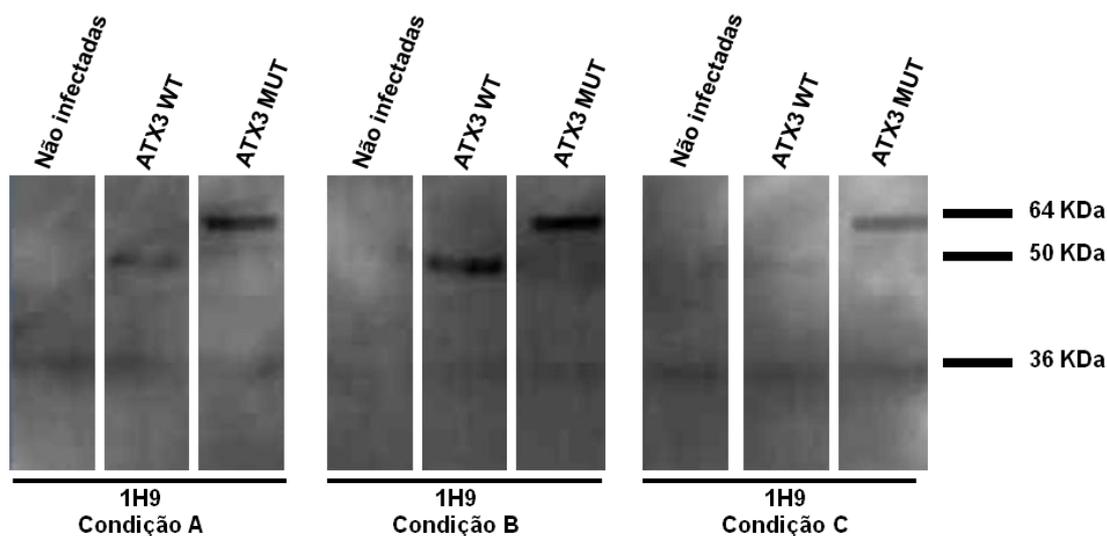
#### 4.1. Análise da Expressão da Ataxina-3 *Wild-type* e Mutante após Infecção Células Granulares do Cerebelo utilizando Lentivírus

Investigações neuropatológicas da doença e estudos de abordagens terapêuticas requerem modelos celulares e animais que mimetizem cautelosamente a patologia humana. O uso de vectores virais em estudos de culturas de células tem demonstrado ser uma boa opção para modelar patologias do sistema nervoso central (de Almeida *et al.*, 2002).

Um dos objectivos deste trabalho era avaliar o processo de excitotoxicidade em células granulares do cerebelo (CGC) em cultura que expressam ataxina-3 (Atx3) *wild-type* e mutante usando um sistema lentiviral. Os lentivírus (LV) utilizados (gentilmente cedidos pelo Prof. Doutor Luís Pereira de Almeida, Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra) foram previamente desenvolvidos e utilizados em modelos animais da DMJ (Alves *et al.*, 2008a; Alves *et al.*, 2008b).

De modo a avaliar a melhor condição de expressão das culturas de CGC com LV que codificam para Atx3 humana mutante, com 72 glutaminas (ATX3 MUT, 72Q) ou para a Atx3 humana *wild-type*, com 27 glutaminas (ATX3 WT, 27Q), usado como controlo.

As células foram infectadas em diferentes fases da cultura celular de acordo com o protocolo experimental descrito na **Figura 5**. Como se pode visualizar na **Figura 10**, a infecção com os LV ATX3 WT ou ATX3 MUT foi bem sucedida para as três condições (**A**, **B** e **C**). A sobre-expressão durante 13 dias, num total de 15 dias em cultura, demonstrou ser o protocolo de infecção que, qualitativa (**Figura 10**) e quantitativamente (**Tabela I**), produziu uma maior expressão da proteína Atx3, e portanto, o mais indicado para analisar a excitotoxicidade em CGC infectadas.

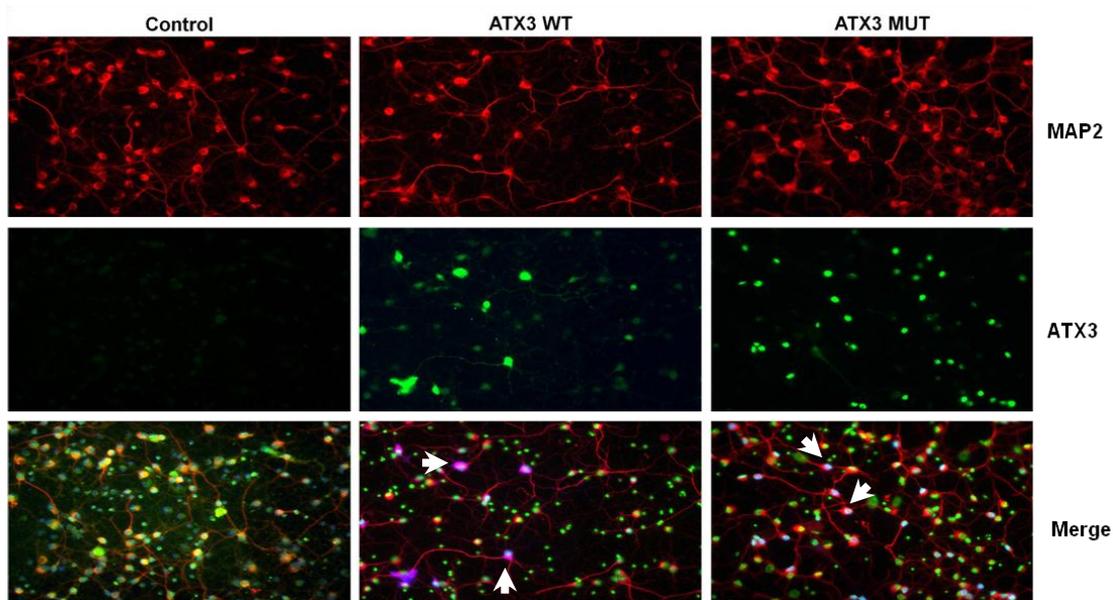


**Figura 10** – Análise da expressão proteica da ataxina-3 em extractos obtidos das CGC, mantidas durante 6 (condição **A**) ou 13 (condições **B** e **C**) dias pós-infecção com LV que codificam para ATX3 WT ou ATX3 MUT. A análise foi feita por Western Blotting. A membrana foi incubada com anti-ataxina-3 (1H9).

De forma, a caracterizar a cultura de células infectadas procedeu-se à imunocitoquímica das CGC após infecção segundo a condição **B** (**Figuras 5B, 10B e 11**). Nas imagens da **Figura 11** destaca a presença de células infectadas, nomeadamente neurónios maduros (marcados para a proteína MAP-2, do inglês “microtubule associated protein”), que sobre-expressam *Atx3 wild-type* ou que expressam a forma mutante da proteína **Figura 11**. As setas brancas indicam a infecção dos neurónios com LV ATX3 WT ou ATX3 MUT (**Figura 11**).

**Tabela I** – Análise quantitativa do Western blotting representado na **Figura 10**. As bandas foram detectadas por quimiofluorescência e quantificadas através do programa BioRad Quantity One, com unidades arbitrárias.

	Condição A	Condição B	Condição C
ATX3 WT	118275,88	134929,40	99246,73
ATX3 MUT	126155,19	140929,22	103997,44



**Figura 11** – Infecção de CGC com ataxina-3 humana *wild-type* (ATX3 WT) ou mutante (ATX3 MUT) utilizando a condição B (**Figura 10B**) e células controlo não infectadas. As CGC mantidas em cultura durante 15 dias foram fixadas com metanol/acetona (1:1), seguido de imunocitoquímica usando os anticorpos anti-Atx3 (1:500, a verde) e anti-MAP2 (1:200, a vermelho). Os núcleos foram marcados com Hoechst 33342 (4 mg/mL). As setas brancas indicam a infecção dos neurónios com LV ATX3 WT ou ATX3 MUT.

#### 4.2. Análise de Excitotoxicidade em Células Granulares do Cerebelo

A activação dos receptores de glutamato ionotrópicos medeia a transmissão sináptica excitatória mais rápida do cérebro, mas a exacerbada exposição ao glutamato pode converter-se num processo excitotóxico que induz morte neuronal (Jekabsons and Nicholls, 2004).

O Alamar Blue (ou resazurina) é um indicador redox colorimétrico e também fluorimétrico que fornece uma rápida quantificação de viabilidade celular em organismos vivos desde bactérias a células de mamíferos, podendo ser usado para detectar diferentes tipos de insultos contribuindo para o estudo de mecanismos celulares em doenças neurológicas. Na reacção de oxidação-redução do Alamar Blue existe uma correlação directa entre a sua redução em meio de crescimento e número de células vivas (O'Brien *et al.*, 2000).

A redução de Alamar Blue foi avaliada após a activação selectivas dos receptores de glutamato ionotrópicos, não-NMDA e NMDA, na ausência ou presença dos respectivos agonistas e na ausência de  $Mg^{2+}$  (bloqueia o canal associado aos R-

NMDA) em CGC infectadas com LV ou CGC oriundas de murganhos transgênicos e *wild-type*.

#### **4.2.1. CGC Infectadas com Lentivírus que Codificam para Ataxina-3 *Wild-type* ou Mutante**

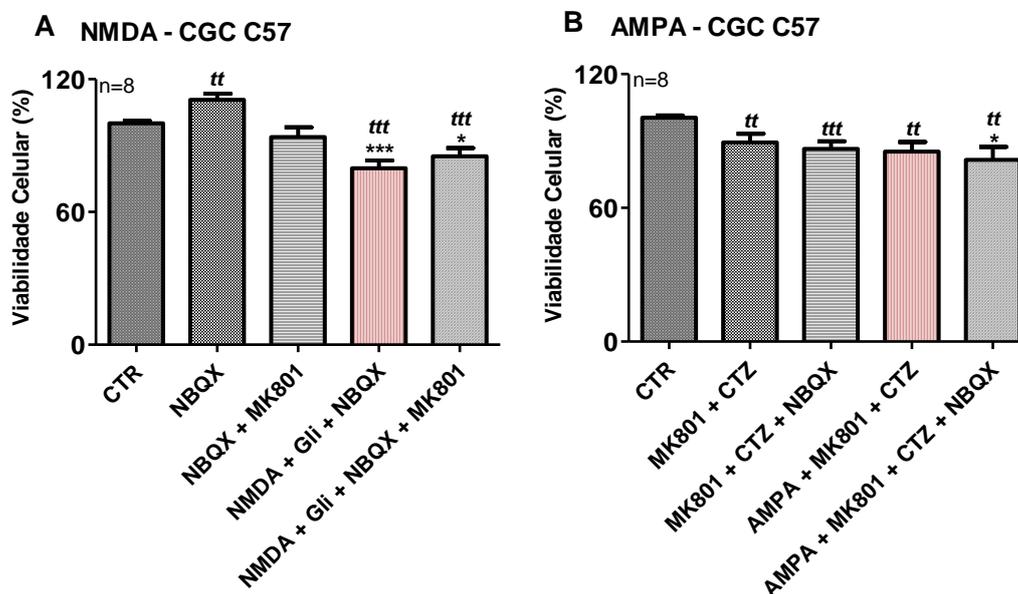
As CGC isoladas de murganhos da estirpe C57BL/6J (CGC C57) não infectadas (**Figura 12**) ou infectadas com LV que codificam para ATX3 WT (27Q) ou ATX3 MUT (72Q) (**Figuras 13 e 14**) foram usadas para a avaliação do processo excitotóxico após activação selectiva dos R-NMDA ou R-AMPA, utilizando o teste de redução do Alamar Blue.

Inicialmente foi avaliada a excitotoxicidade induzida após a activação selectiva dos R-NMDA na presença do seu agonista selectivo (NMDA), glicina (Gli, co-agonista) e NBQX (para inibir a contribuição dos receptores do tipo não-NMDA) em CGC C57 não infectadas (**Figura 12**) e na ausência de  $Mg^{2+}$  (para prevenir o bloqueio dos R-NMDA) (Nicholls and Budd, 1998).

Nestas condições de activação selectiva de R-NMDA observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular de 20,3% em relação à condição controlo (CTR, na ausência dos compostos) (**Figura 12A**). A exposição a MK-801 (antagonista não-competitivo dos R-NMDA) permitiu uma ligeira recuperação da viabilidade celular (~5,4%) nas CGC C57 expostas a NMDA/Gli (e NBQX) relativamente ao estímulo tóxico. Curiosamente, a exposição a NBQX parece ter um efeito preventivo (10,6%) relativamente ao CTR (**Figura 12A**). Em estudos prévios realizados em culturas de CGC expostas verificou-se uma maior susceptibilidade destas células a aminoácidos excitatórios através da diminuição da redução do indicador redox, sugerindo uma diminuição da viabilidade celular destas culturas (White *et al.*, 1996).

A activação selectiva dos R-AMPA em CGC C57 não infectadas induziu alterações significativas de toxicidade, na ausência ou presença do antagonista dos receptores não-NMDA, o NBQX, juntamente com a ciclótiazida (CTZ, um bloqueador não-endógeno da dessensibilização dos R-AMPA) e o MK-801 (inibidor dos receptores do tipo NMDA). A maior diminuição de viabilidade celular ocorrem na presença de NBQX (~18,9%), enquanto na sua ausência a viabilidade diminui 15,2% em relação ao CTR (**Figura 12B**). De facto, a adição de MK-801+CTZ na ausência ou presença de NBQX induz um efeito tóxico nas CGC (**Figura 12B**), possivelmente pela inibição da rápida dessensibilização dos R-AMPA induzida pela CTZ, induzindo processos

apoptóticos, anteriormente descritos (Cebers *et al.*, 1998). Tal como descrito nas células de Purkinje e de Golgi, em culturas cerebelares e do hipocampo, a activação de R-AMPA é neurotóxica (Garthwaite and Garthwaite, 1991).

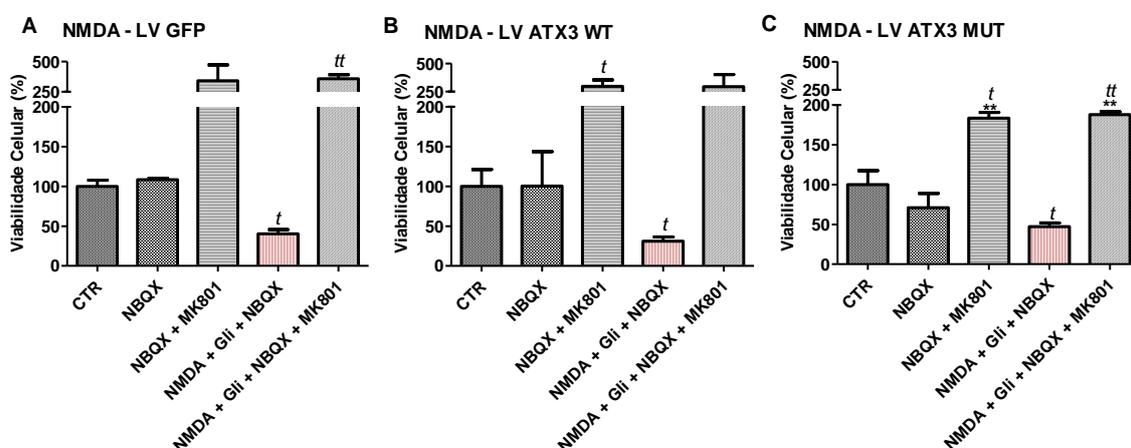


**Figura 12** – Activação selectiva dos receptores NMDA (**A**) e dos receptores AMPA (**B**) em culturas primárias de CGC não infectadas, isoladas de murganhos da estirpe C57BL/6J (CGC C57). As CGC foram mantidas em cultura durante 15 dias e expostas a: (**A**) 100  $\mu$ M NMDA e 10  $\mu$ M glicina (Gli) (na ausência de  $Mg^{2+}$ ) na ausência ou presença do inibidor dos receptores NMDA (MK-801, 5  $\mu$ M); foi adicionado NBQX (20  $\mu$ M) para inibir a contribuição dos receptores do tipo não-NMDA; e (**B**) 100  $\mu$ M AMPA e 30  $\mu$ M CTZ, um inibidor da dessensibilização dos R-AMPA, na ausência ou presença do inibidor dos receptores do tipo não-NMDA (NBQX, 20  $\mu$ M), durante 15 minutos; nestas condições adicionou-se MK-801 (5  $\mu$ M) para inibir a contribuição dos receptores do tipo NMDA. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do Alamar Blue. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de 8 experiências individuais realizadas em triplicados. Análise estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  pelo teste one-way ANOVA (teste Bonferroni para comparações múltiplas) e *tt*  $p < 0,01$ ; *ttt*  $p < 0,001$  pelo teste t-Student relativamente ao CTR.

Seguidamente as CGC foram infectadas com LV (segundo o protocolo da **Figura 5B**), que codificam para GFP, ATX3 WT ou ATX3 MUT.

As CGC infectadas apresentaram uma diminuição da viabilidade celular, quando expostas ao estímulo NMDA+Gli na ausência de  $Mg^{2+}$ , relativamente à condição controlo, de 59,6% (**Figura 13A**); de 68,9% (**Figura 13B**); e de 52,9% (**Figura 13C**), respectivamente após expressão de GFP, ATX3 WT e ATX3 MUT.

Estes resultados sugerem que a expressão de ATX3 MUT não confere um aumento da susceptibilidade celular, comparativamente à expressão de ATX3 WT ou mesmo de GFP. Observou-se ainda um efeito preventivo e exacerbado da resposta na presença de MK-801 após activação selectiva dos R-NMDA (**Figura 13**). De salientar que nestas culturas de CGC infectadas com LV não foi aplicada citosina arabinose, que bloqueia a proliferação de células da microglia, por inibição da síntese de DNA, de modo a que houvesse expressão das novas proteínas humanas. Portanto, o efeito do uso de MK-801 nas culturas infectadas pode ter sido alterado pela presença adicional de outras células não-neuronais (e.g. astrócitos) que também expressam R-NMDA.



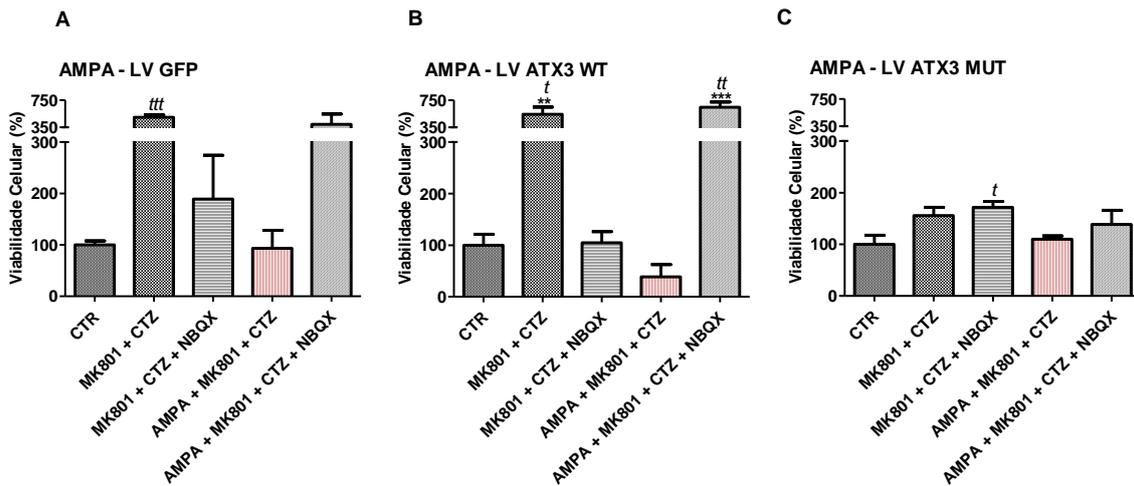
**Figura 13** – Activação selectiva dos receptores NMDA em culturas primárias de CGC infectadas com LV que codificam para GFP (controlo interno viral) (**A**), Atx3 humana *wild-type* (ATX3 WT) (**B**), ou para Atx3 humana mutante (ATX3 MUT) (**C**). As CGC foram mantidas em cultura durante 15 dias (na ausência de citosina arabinose) e expostas a 100  $\mu$ M NMDA, 10  $\mu$ M Gli (na ausência de  $Mg^{2+}$ ), na ausência ou presença do inibidor dos receptores NMDA (MK-801, 5  $\mu$ M), durante 15 minutos. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do Alamar Blue. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de uma experiência individual em triplicados correspondente a infecções independentes. Análise estatística: \*\*p < 0,01 pelo teste one-way ANOVA (teste Bonferroni para comparações múltiplas) e t p < 0,05; tt p < 0,01 pelo teste t-Student relativamente ao CTR.

As CGC que expressam GFP, ATX3 WT ou ATX3 MUT foram também expostas a AMPA, CTZ e MK-801, de modo a activar de forma selectiva os receptores do tipo AMPA. Apesar de não se terem observado alterações estatisticamente significativas da viabilidade celular após o estímulo excitotóxico em comparação com o respectivo controlo (**Figura 14**), ocorreu uma diminuição da viabilidade celular mais acentuada para as CGC que sobre-expressam ATX3 WT (61,3%, **Figura 14B**), comparativamente à verificada nas CGC que expressam GFP (6,7%, **Figura 14A**) ou mesmo um ligeiro aumento (não significativo) de 9,9% no caso da ATX3 MUT relativamente ao CTR (**Figura 14C**) sugerindo uma possível inactivação destes receptores após expressão de ATX3 MUT.

A incubação adicional com NBQX preveniu de forma exacerbada a excitotoxicidade induzida por activação selectiva dos R-AMPA em CGC que expressam GFP e ATX3 WT (**Figuras 14A e 14B**). Contudo, não se observou um efeito significativo induzido por NBQX após activação selectiva dos receptores do tipo AMPA em CGC que expressam ATX3 MUT. Por outro lado, e tal como observado anteriormente, o bloqueio dos receptores do tipo NMDA em condições basais foi suficiente para induzir um efeito protector, sugerindo a libertação basal de glutamato endógeno e activação preferencial destes receptores (Tallaksen-Greene *et al.*, 2003).

No entanto, e de forma inesperada, na presença de NBQX e CTZ, o composto MK-801 não induziu um efeito protector (**Figura 14**), indicando claramente a necessidade de repetir este tipo de experiências.

A análise estatística foi efectuada numa única experiência por termos três valores correspondentes a três infecções individuais para cada um dos LV.



**Figura 14** – Activação selectiva dos receptores AMPA em culturas primárias de CGC infectadas com LV que codificam para GFP (controlo interno viral) (A), Atx3 humana *wild-type* (ATX3 WT) (B), ou Atx3 humana mutante (ATX3 MUT) (C). As CGC foram mantidas em cultura durante 15 dias (na ausência de citosina arabinose) e expostas a 100  $\mu$ M AMPA, CTZ (30  $\mu$ M, que bloqueia a dessensibilização dos R-AMPA) e MK-801 (5  $\mu$ M, para inibir a contribuição dos R-NMDA, na ausência ou presença do inibidor dos receptores AMPA (NBQX, 20  $\mu$ M), durante 15 minutos. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do Alamar Blue. Os valores representam a média  $\pm$  SEM uma experiência individual com triplicados correspondentes a infecções independentes. Análise estatística: \*\*p < 0,001; \*\*\*p < 0,0001 pelo teste one-way ANOVA (teste Bonferroni para comparações múltiplas) e t p < 0,01; tt p < 0,001; ttt p < 0,0001 pelo teste t-Student relativamente ao CTR.

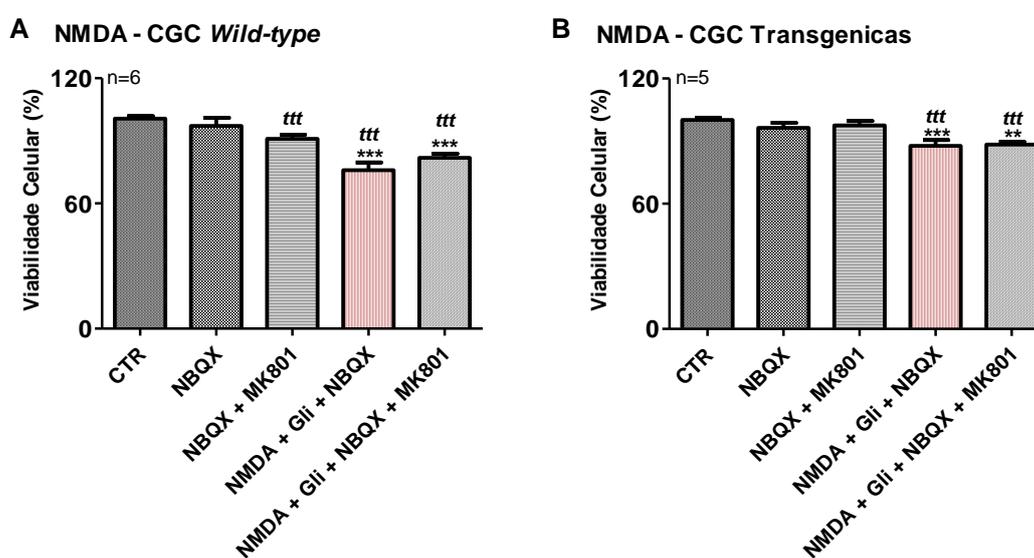
#### 4.2.2. CGC obtidas de murganhos *Wild-type* e Transgênicos

Também o desenvolvimento e estudo de vários modelos animais transgênicos contribuíram, em larga medida, para uma melhor compreensão da DMJ (Ikeda *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 2010).

A toxicidade induzida por activação selectiva dos receptores do glutamato foi ainda avaliada em CGC obtidas de murganhos *wild-type* (denominadas CGC *wild-type*) e transgênicos (denominadas CGC transgênicas) (gentilmente cedidos pela Prof. Doutora Patrícia Maciel, Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde, Universidade do Minho, Braga). Este modelo animal da DMJ expressa Atx3 mutante com 135Q.

A activação selectiva dos R-NMDA obtida após exposição ao seu agonista e co-agonista (a glicina) induziu uma diminuição na viabilidade celular, relativamente à condição CTR (**Figura 15**), analisado através do Alamar Blue. Surpreendentemente a diminuição na viabilidade celular foi superior nas CGC *wild-type* (~24,8%, **Figura**

15A), comparativamente à ocorrida nas células transgênicas (~12,4%, **Figura 15B**), mostrando-se mais resistentes à excitotoxicidade induzida por NMDA/Gli. Mas são as CGC *wild-type* (**Figura 15A**) que tal como as CGC C57 (**Figura 12A**) recuperam ligeiramente (~5%) a viabilidade celular com administração de MK-801, um antagonista não-competitivo dos R-NMDA. A adição de NBQX nestas condições permitiu inibir a actividade basal dos receptores não-NMDA, que possuem uma maior afinidade para o glutamato endógeno relativamente aos R-NMDA. Salienta-se ainda que a adição de MK-801 e/ou NBQX não induziu alterações significativas na viabilidade celular em células *wild-type* ou transgênicas.

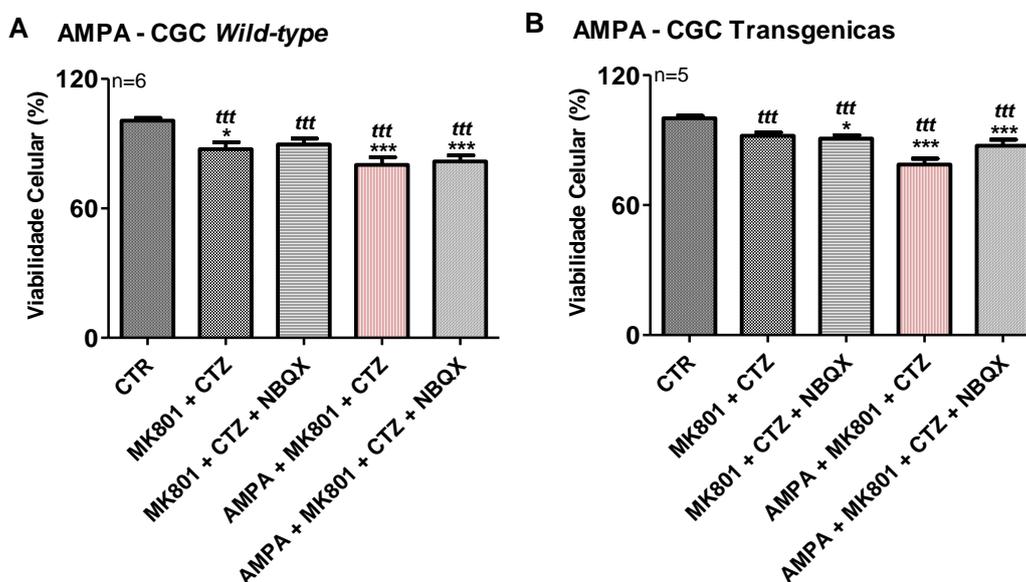


**Figura 15** – Activação selectiva dos receptores NMDA em culturas primárias de CGC isoladas de murganhos *wild-type* (**A**) ou transgênicos (**B**). As CGC foram mantidas em cultura durante 15 dias e expostas a 100  $\mu$ M NMDA e 10  $\mu$ M glicina (na ausência de  $Mg^{2+}$ ), na ausência ou presença do inibidor dos receptores NMDA (MK-801, 5  $\mu$ M), durante 15 minutos, seguida de uma pós-incubação em meio de cultura durante 22 horas. Durante a exposição a NMDA foi adicionado NBQX (20  $\mu$ M) para inibir a contribuição dos receptores do tipo não-NMDA. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do Alamar Blue. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de 5-6 experiências individuais realizadas em triplicados. Análise estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  pelo teste one-way ANOVA (teste Bonferroni para comparações múltiplas) e ttt  $p < 0,001$  pelo teste t-Student relativamente ao CTR.

Neste estudo avaliou-se ainda o efeito citotóxico da estimulação aguda de R-AMPA após exposição a CTZ, o bloqueador da dessensibilização dos R-AMPA. A exposição a AMPA e CTZ, após bloqueio dos receptores do tipo NMDA demonstrou ser tóxica para as CGC *wild-type* (**Figura 16A**) ocorrendo uma diminuição de 20,5%

(\*\*\*p <0,001) da viabilidade celular comparativamente à condição CTR. De notar, também uma diminuição significativa de viabilidade celular (18,9%) nas CGC *wild-type* (**Figura 16A**) quando expostas ao antagonista dos R-NMDA, o MK-801, e ao inibidor da dessensibilização dos R-AMPA, a CTZ.

Nas CGC transgênicas (**Figura 16B**) verificou-se também um aumento de toxicidade (~21,4%) após estimulação dos R-AMPA de forma selectiva, i.e., na presença de CTZ e MK-801, contudo não significativo relativamente às CGC *wild-type*. Nestas células verificou-se uma pequena recuperação da viabilidade celular, embora não seja estatisticamente significativa, após bloqueio dos receptores AMPA com NBQX. Nas CGC transgênicas (**Figura 16B**) observou-se ainda uma diminuição significativa da viabilidade celular (~12,7%) quando expostas a MK-801e CTZ, na ausência ou presença de NBQX.



**Figura 16** – Activação selectiva dos receptores AMPA em culturas primárias de CGC isoladas de murganhos *wild-type* (**A**) ou transgênicos (**B**). As CGC foram mantidas em cultura durante 15 dias e expostas a 100  $\mu$ M AMPA e 30  $\mu$ M CTZ (bloqueia a dessensibilização rápida dos receptores AMPA), na ausência ou presença do inibidor dos receptores AMPA (NBQX, 20  $\mu$ M), durante 15 minutos, seguida de uma pós-incubação em meio de cultura durante 22 horas. Durante a exposição a AMPA foi adicionado MK-801 (5  $\mu$ M) para inibir a contribuição dos receptores do tipo NMDA. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do Alamar Blue. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de 5-6 experiências individuais realizadas em triplicados. Análise estatística: \*p <0,05; \*\*\*p <0,001 pelo teste one-way ANOVA (teste Bonferroni para comparações múltiplas) e *t*t p <0,001 pelo teste t-Student relativamente ao CTR.

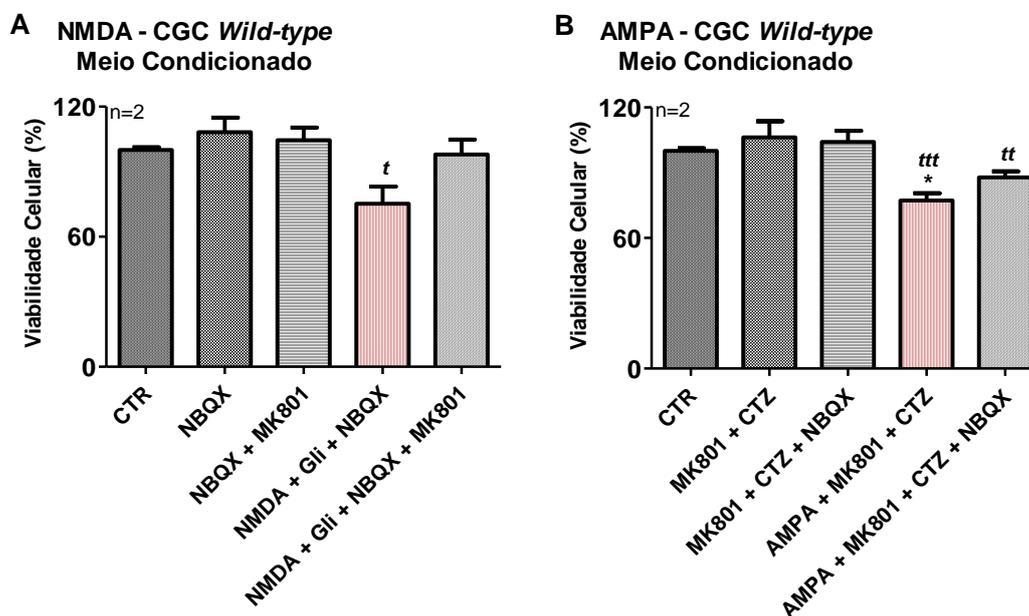
Em condições patológicas, a alteração da actividade de receptores de glutamato ionotrópicos tem sido implicada na excitotoxicidade e no stresse oxidativo. Estes receptores são importantes pela sua função na modulação das concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , no desenvolvimento de novas sinapses e na modulação da plasticidade sináptica em processos como a memória, entre outros (Michaelis, 1998). No entanto, a análise dos resultados obtidos nestas experiências permitiu-nos verificar que a exposição aos estímulos excitotóxicos não foi grandemente exacerbada após estimulação selectiva dos receptores do tipo NMDA ou AMPA, e os antagonistas dos receptores não recuperaram significativamente o efeito tóxico.

Uma vez que estas experiências foram realizadas depois da reposição de meio Neurobasal novo enriquecido, decidimos avaliar o efeito da reposição de meio Neurobasal condicionado, i.e., meio Neurobasal retirado da cultura imediatamente antes da exposição ao estímulo excitotóxico. Em princípio, este meio de cultura terá os factores de crescimento e restantes componentes que as próprias células produzem.

Procedeu-se então à estimulação de CGC *wild-type* com NMDA/Gli na presença de NBQX durante 15 minutos, seguida de uma pós-incubação em meio de cultura condicionado. Nestas condições, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular (~24,7%), embora não estatisticamente significativa, quando comparada com a condição CTR (**Figura 17A**). Se compararmos a activação selectiva dos receptores de NMDA entre as CGC *wild-type* com meio condicionado (**Figura 17A**) e as CGC *wild-type* com meio novo (**Figura 15A**), verifica-se que não existem alterações significativas de toxicidade. No entanto, observa-se que o efeito do MK-801 varia de acordo com o protocolo utilizado. De facto não se observa uma protecção mediada por MK-801 em condições em que a pós-incubação foi feita em meio de cultura novo (recuperação da viabilidade celular ~6%) (tal como observado na **Figura 15A**). Contudo quando a pós-incubação foi efectuada em meio condicionado observa-se uma prevenção significativa da toxicidade mediada por activação dos R-NMDA na presença do antagonista (recuperação da viabilidade celular ~23%), neste caso verificámos que a toxicidade induzida foi mediada essencialmente através dos R-NMDA, uma vez que a diminuição de viabilidade foi quase completamente revertida por MK-801 (~97,9% de viabilidade celular) (**Figura 17A**).

No que concerne à activação selectiva dos R-AMPA (na presença de AMPA, CTZ e MK-801), seguida da incubação em meio de cultura condicionado (22,7%, **Figura 17B**) verificam-se valores de perda de viabilidade similares aos observados em meio novo (20,5%, **Figura 15B**). Após exposição a NBQX observa-se no entanto, uma ligeira prevenção da toxicidade estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) para o valor ~12,2% após activação dos R-AMPA (**Figura 17B**), cuja percentagem é semelhante à

observada nas CGC transgênicas em que a pós-incubação foi feita em meio de cultura novo (12,7%) (**Figura 16B**).



**Figura 17** – Activação selectiva dos receptores NMDA (**A**) e dos receptores AMPA (**B**) em culturas primárias de CGC isoladas de murganhos *wild-type*. As CGC foram mantidas em cultura durante 15 dias e expostas a 100  $\mu$ M NMDA, 10  $\mu$ M glicina (Gli) e 20  $\mu$ M NBQX, na ausência ou presença do inibidor dos receptores NMDA (MK-801, 5  $\mu$ M) (na ausência de  $Mg^{2+}$ ) (**A**), ou a 100  $\mu$ M AMPA, CTZ (30  $\mu$ M) e MK-801 (5  $\mu$ M) na ausência ou presença do inibidor dos receptores AMPA (NBQX, 20  $\mu$ M) (**B**), durante 15 minutos seguida da reposição de meio de cultura condicionado. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do Alamar Blue. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de 2 experiências individuais realizadas em triplicados. Análise estatística: \*p <0,05; pelo teste one-way ANOVA (teste Bonferroni para comparações múltiplas) e t p <0,05; tt p <0,01; ttt p <0,001 pelo teste t-Student relativamente ao CTR.

Na doença de Huntington, uma doença de poliglutaminas tal como a DMJ, foi demonstrado que a sobre-activação dos receptores de glutamato ionotrópicos devido ao aumento de resposta ou alteração na captação de glutamato podem resultar em stress neuronal e culminar na morte celular por influxo excessivo de água e iões, principalmente  $Ca^{2+}$ . Em células mutantes obtidas de murganhos transgênicos para a doença de Huntington verificou-se um aumento de morte celular por activação destes receptores (Heng *et al.*, 2009). Surpreendentemente, a maior perda de viabilidade celular após activação selectiva dos receptores de glutamato ionotrópicos, nos dois

modelos estudados para mimetizar a DMJ, ocorreu para as CGC que expressam Atx3 humana *wild-type* e para as CGC *wild-type*.

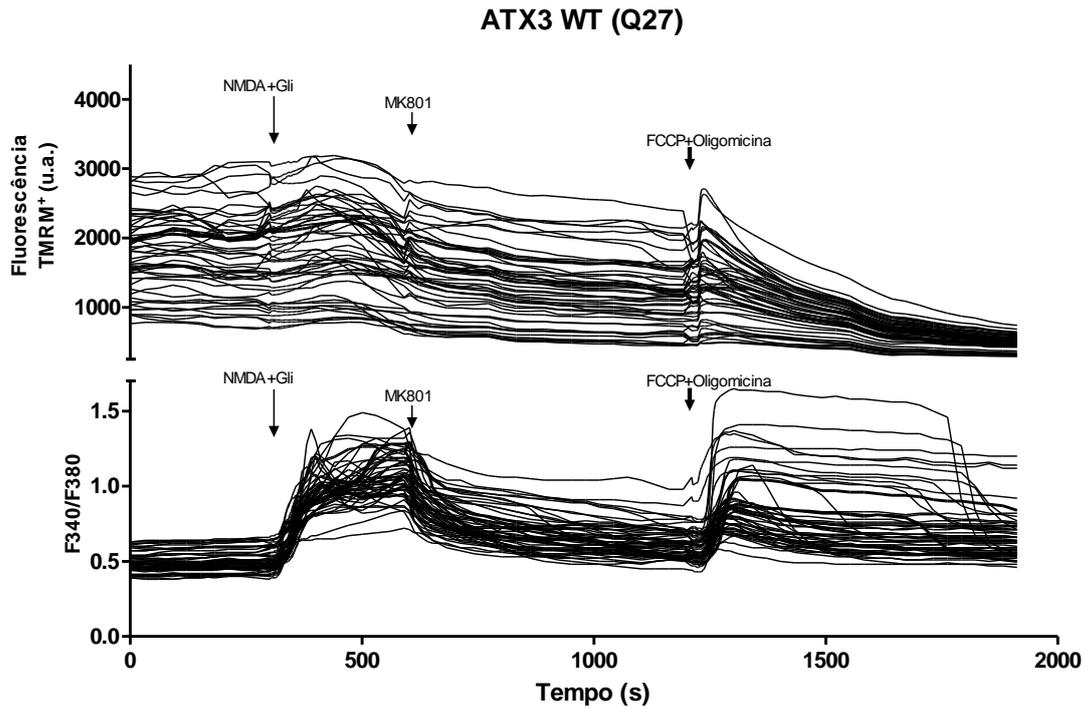
### **4.3. Determinação simultânea dos níveis de cálcio intracelular e do potencial mitocondrial em CGC individuais após activação dos receptores NMDA**

A activação prolongada dos receptores de glutamato ionotrópicos resulta numa rápida lesão necrótica de células neuronais, que se sabe ser dependente da excessiva entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e podem levar a alterações bioenergéticas na mitocôndria, perda de homeostase iónica e diminuição da integridade celular (Ward *et al.*, 2000). Portanto a acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$  na mitocôndria tem duas importantes funções fisiológicas, a primeira prende-se com a satisfação das necessidades energéticas com aumento de produção de ATP para activação das enzimas mitocondriais e a segunda, na modulação dinâmica espaço-temporal do sinal de cálcio, que contribui para funções específicas na célula. A disfunção mitocondrial tem sido associada à morte programada por apoptose e mesmo por necrose (Brini, 2003).

Desta forma, avaliámos também as alterações simultâneas do potencial de membrana mitocondrial e do nível de cálcio intracelular, nos dois modelos em estudo de CGC da DMJ utilizados anteriormente neste trabalho, estes parâmetros foram analisados em célula única após estimulação dos R-NMDA com NMDA/Gli (na ausência de  $\text{Mg}^{2+}$ ), ou após exposição a FCCP (um ionoforo transportador de prótons e desacoplador da síntese de ATP a nível da cadeia respiratória mitocondrial) e oligomicina (um inibidor selectivo da ATP sintetase, que evita a reversão deste complexo da cadeia respiratória mitocondrial e consequentemente a hidrólise de ATP), de modo a despolarizar completamente a mitocôndria, de acordo com o protocolo representado na **Figura 9**.

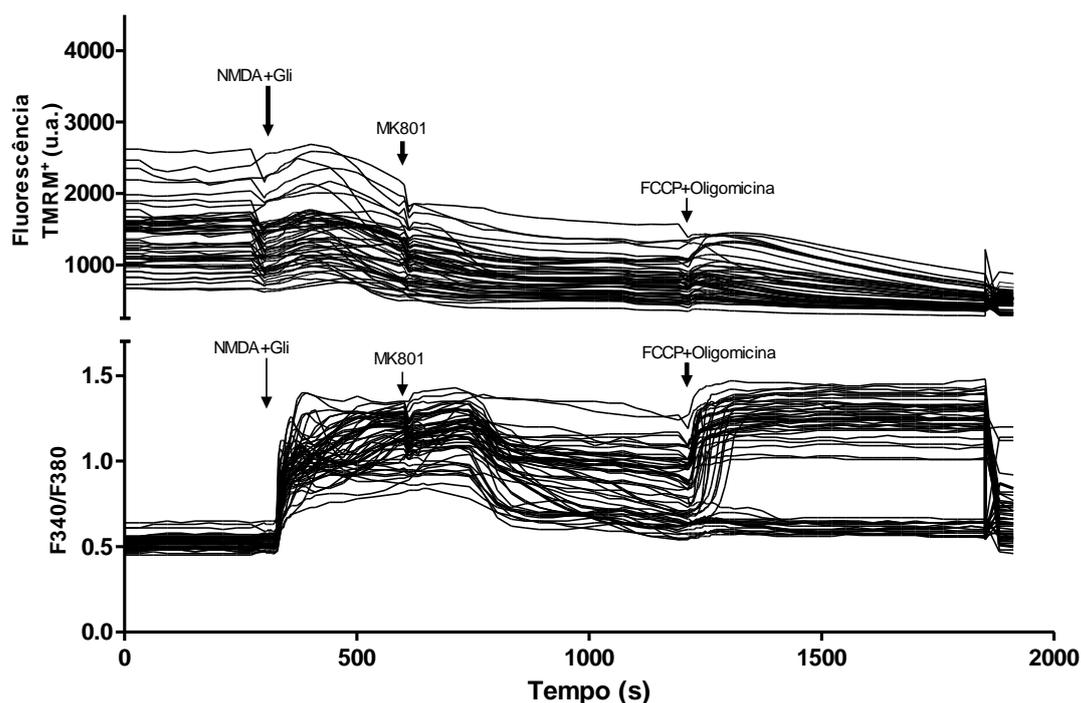
#### **4.3.1. Análise em Células Granulares do Cerebelo Infectadas com Lentivírus que Codificam para a Ataxina-3 *Wild-type* ou Mutante**

As CGC infectadas com LV que codificam para a Atx3 humana *wild-type* (ATX3 WT (27Q)) ou mutante (ATX3 MUT (72Q)) responderam ao estímulo NMDA e Gli e FCCP/oligomicina, tal como representado nas **Figuras 18 e 19**.



**Figura 18** – Análise individual das alterações nos níveis de cálcio intracelular e de fluorescência de TMRM<sup>+</sup> em CGC individuais infectadas com LV que codificam para a ATX3 WT sujeitas a NMDA em meio de glucose suplementado com Na<sup>+</sup> (na ausência de citosina arabinose). CGC foram estimuladas com NMDA/Gli (100 μM/10 μM) em meio com glucose (15 mM) (na ausência de Mg<sup>2+</sup>). MK-801 (5 μM, antagonista não-competitivo dos R-NMDA) foi aplicado aos 10 minutos. 2,5 μM FCCP (desacoplador mitocondrial) e 2 μg/mL oligomicina (inibidor da ATP sintetase) adicionados após 20 minutos para avaliar a acumulação máxima de TMRM<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> para o interior da mitocôndria. O traçado superior é representativo da fluorescência ao TMRM<sup>+</sup> (u.a. – unidades arbitrárias) e o traçado inferior é representativo do rácio F340/F380 de células individuais. O gráfico traduz a resposta individual de 52 células.

### ATX3 MUT (Q72)

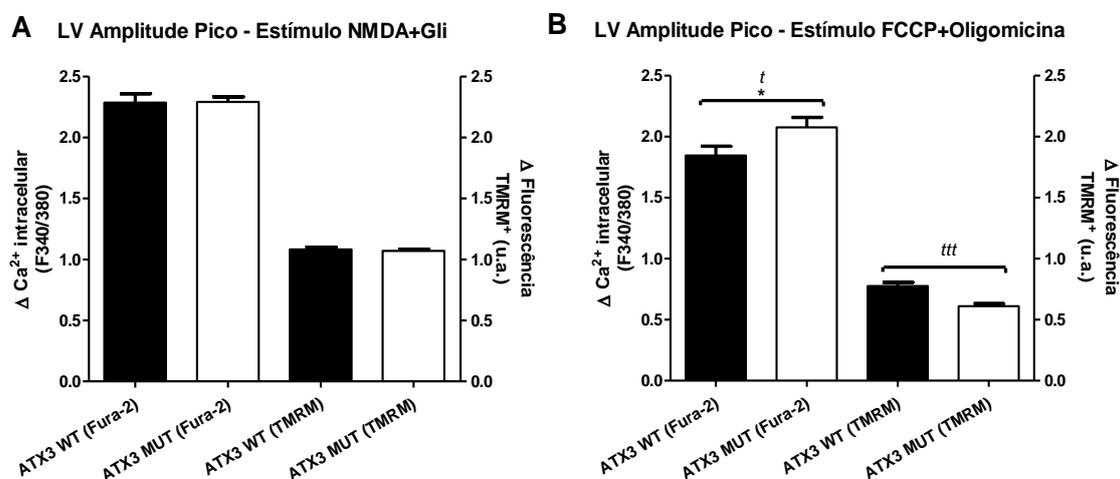


**Figura 19** – Análise individual das alterações nos níveis de cálcio intracelular e de fluorescência de TMRM<sup>+</sup> em CGC individuais infectadas com LV que codificam para a ATX3 MUT sujeitas a NMDA em meio de glucose suplementado com Na<sup>+</sup> (na ausência de citosina arabinose). CGC foram estimuladas com NMDA/Gli (100 μM/10 μM) em meio com glucose (15 mM) (na ausência de Mg<sup>2+</sup>). MK-801 (5 μM, antagonista não-competitivo dos R-NMDA) foi aplicado aos 10 minutos. 2,5 μM FCCP (desacoplador mitocondrial) e 2 μg/mL oligomicina (inibidor da ATP sintetase) adicionados após 20 minutos para avaliar a acumulação máxima de TMRM<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> para o interior da mitocôndria. O traçado superior é representativo da fluorescência ao TMRM<sup>+</sup> (u.a. – unidades arbitrárias) e o traçado inferior é representativo do rácio F340/F380 de células individuais. O gráfico traduz a resposta individual de 52 células

As respostas das CGC infectadas com os LV ATX3 WT e MUT a NMDA/Gli foram similares, quer para os valores de cálcio quer nas alterações ao potencial de membrana mitocondrial (**Figura 20A**). Após o estímulo de FCCP e oligomicina, conducente a uma despolarização completa da mitocôndria, as CGC ATX3 MUT (72Q) exibiram um valor superior dos níveis de Ca<sup>2+</sup>, acumulado a nível mitocondrial, apesar de uma menor libertação mitocondrial da sonda TMRM<sup>+</sup>, sugerindo uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, relativamente às CGC ATX3 WT (27Q). Uma vez que se trata de uma experiência, esta análise terá necessariamente de ser repetida para permitir chegar a uma conclusão sobre os níveis de Ca<sup>2+</sup> citosólicos e

mitocondriais em CGC que expressam ATX3 MUT *versus* CGC que expressam ATX3 MUT.

Nas CGC infectadas o aumento de cálcio intracelular após a adição de FCCP+oligomicina foi mais elevado nas CGC que expressavam ATX3 MUT do que para as CGC ATX3 WT (**Figura 20B**), sugerindo uma maior capacidade das mitocôndrias em reterem o  $\text{Ca}^{2+}$  após o estímulo excitotóxico. Nestas condições as CGC que expressavam ATX3 MUT apresentaram uma diminuição da liberação de TMRM<sup>+</sup>, indicando uma diminuição do potencial mitocondrial transmembranar.

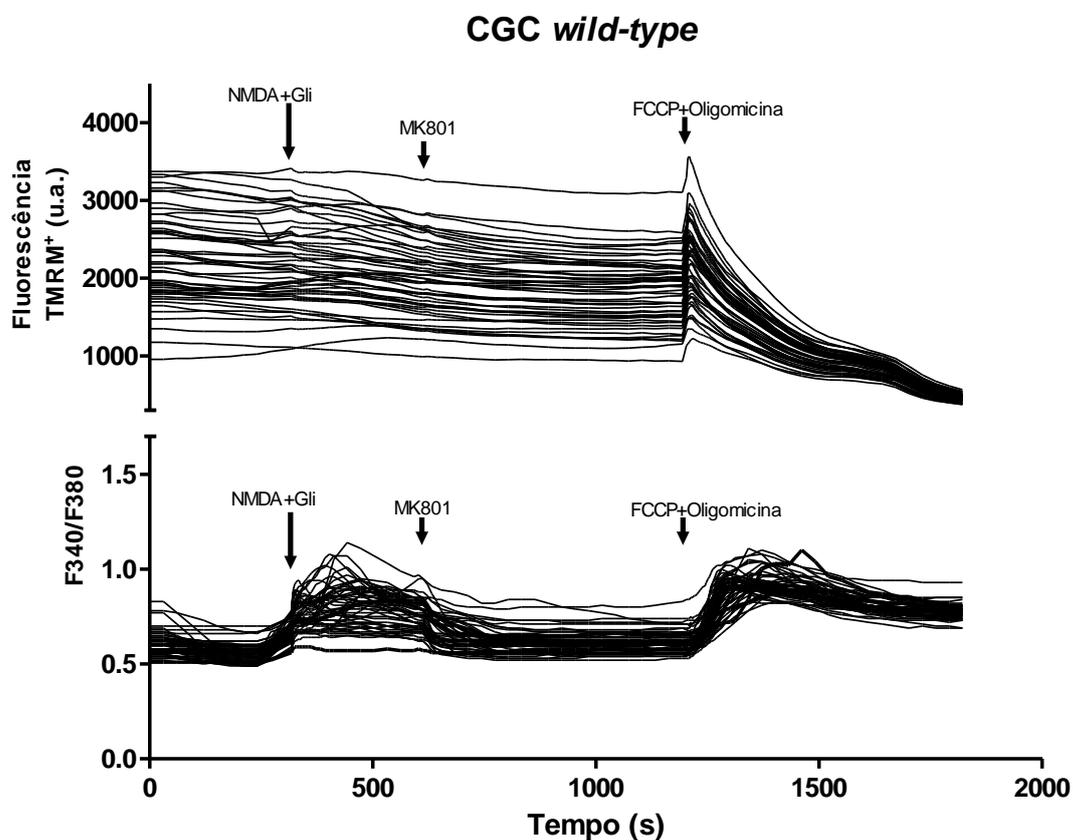


**Figura 20** – Amplitude dos picos de fluorescência ao Fura-2 e TMRM<sup>+</sup> em CGC infectadas com LV ATX3 WT ou ATX3 MUT após o estímulo com NMDA/Gli (100  $\mu\text{M}$ /10  $\mu\text{M}$ ) na ausência de  $\text{Mg}^{2+}$  (**A**); ou com FCCP/oligomicina (2,5  $\mu\text{M}$ /2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (**B**). Os valores representam a média  $\pm$  SEM de 1 experiência individual realizada num total de 104 células analisadas. Análise estatística: \* $p < 0,05$  pelo teste one-way ANOVA (teste Bonferroni para comparações múltiplas) e  $t p < 0,01$ ;  $ttt p < 0,001$  pelo teste t-Student quando comparado com células infectadas com LV ATX3 WT (27Q).

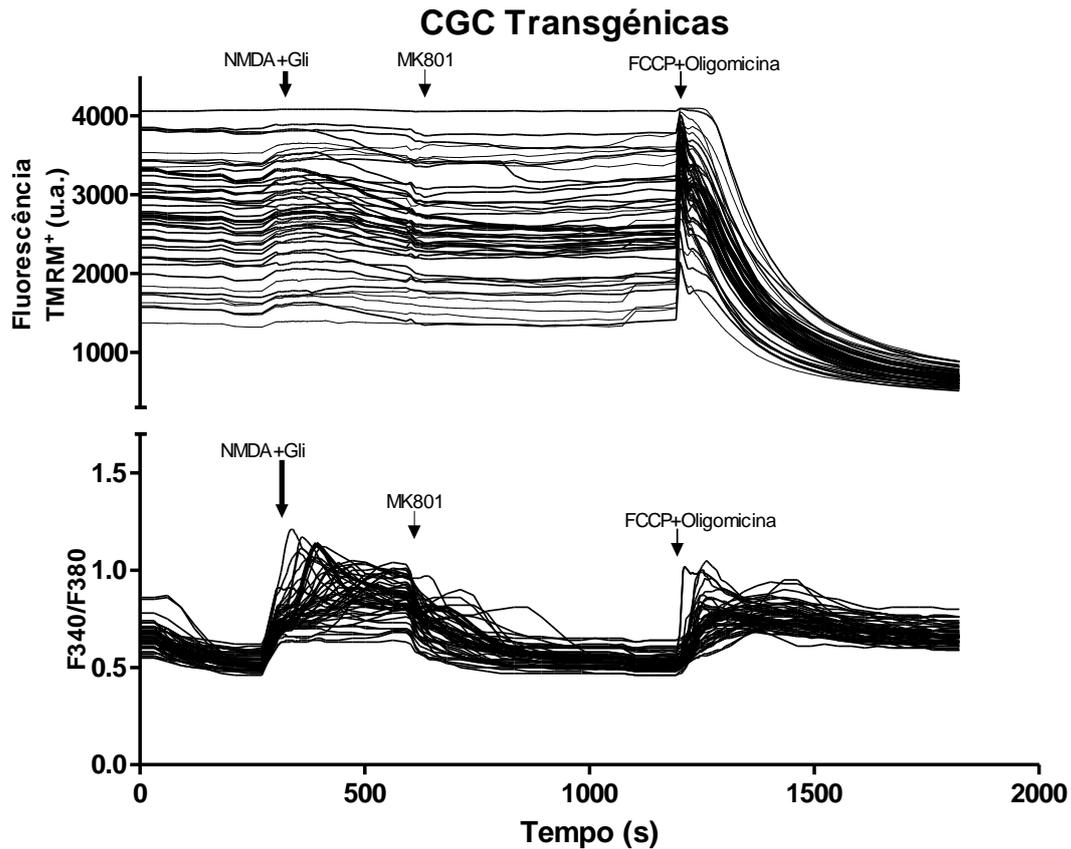
#### 4.3.2. Análise em Células Granulares do Cerebelo *Wild-type* e Transgênicas

As CGC isoladas de murganhos (*wild-type* e transgênicos) reagiram ao estímulo de NMDA e glicina com um aumento do valor de cálcio intracelular relativamente ao valor inicial (**Figuras 21 e 22**). Há uma franca recuperação das células após a exposição ao inibidor do receptor de NMDA, MK-801, porém a recuperação não é completa. A resposta das CGC é visível também após o estímulo de FCCP e oligomicina em que o aumento do valor de cálcio intracelular é

acompanhado por um aumento evidente do potencial de membrana da mitocôndria avaliado pela liberação da sonda TMRM<sup>+</sup> deste organelo quer nas CGC *wild-type*, quer nas transgênicas (**Figuras 21 e 22**).



**Figura 21** – Análise individual das alterações nos níveis de cálcio intracelular e de fluorescência de TMRM<sup>+</sup> em CGC *wild-type* sujeitas a NMDA em meio de glucose suplementado com Na<sup>+</sup>. CGC foram estimuladas com NMDA/Gli (100 µM/10 µM) em meio com glucose (15 mM) (na ausência de Mg<sup>2+</sup>). MK-801 (5 µM, antagonista não-competitivo dos R-NMDA) foi aplicado aos 10 minutos. 2,5 µM FCCP (desacoplador mitocondrial) e 2 µg/mL oligomicina (inibidor da ATP sintetase) adicionados após 20 minutos para avaliar a acumulação máxima de TMRM<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> para o interior da mitocôndria. O traçado superior é representativo da fluorescência ao TMRM<sup>+</sup> (u.a. – unidades arbitrárias) e o traçado inferior é representativo do rácio F340/F380 de células individuais. O gráfico traduz a resposta individual de 49 células.



**Figura 22** – Análise individual das alterações nos níveis de cálcio intracelular e de fluorescência de TMRM<sup>+</sup> em CGC transgênicas sujeitas a NMDA em meio de glucose suplementado com Na<sup>+</sup>. CGC foram estimuladas com NMDA/Gli (100 μM/10 μM) em meio com glucose (15 mM) (na ausência de Mg<sup>2+</sup>). MK-801 (5 μM, antagonista não-competitivo dos R-NMDA) foi aplicado aos 10 minutos. 2,5 μM FCCP (desacoplador mitocondrial) e 2 μg/mL oligomicina (inibidor da ATP sintetase) adicionados após 20 minutos para avaliar a acumulação máxima de TMRM<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> para o interior da mitocôndria. O traçado superior é representativo da fluorescência ao TMRM<sup>+</sup> (u.a. – unidades arbitrárias) e o traçado inferior é representativo do rácio F340/F380 de células individuais. O gráfico traduz a resposta individual de 50 células.

Para aferir se ocorreram alterações na resposta aos estímulos, nomeadamente NMDA/Gli e FCCP/oligomicina, comparam-se as respostas das CGC *wild-type* e transgênicas através da variação do pico máximo relativamente ao valor inicial.

Os resultados apresentados na **Figura 23A** demonstram uma diminuição do valor de Ca<sup>2+</sup> intracelular nas CGC transgênicas (1,69 u.a. – unidades arbitrárias) relativamente às CGC *wild-type* (1,94 u.a.) após exposição a NMDA/Gli, eventualmente devido à menor selectividade dos R-NMDA das CGC transgênicas à passagem de Ca<sup>2+</sup>. Tal como anteriormente descrito em culturas primárias neuronais

de cerebelo, estriado e hipocampo, a activação prolongada dos R-NMDA é associada a uma perda da capacidade da célula em manter a homeostase intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  (Ward *et al.*, 2000), podendo conduzir à apoptose celular, morte programada da célula (Orrenius *et al.*, 2003).

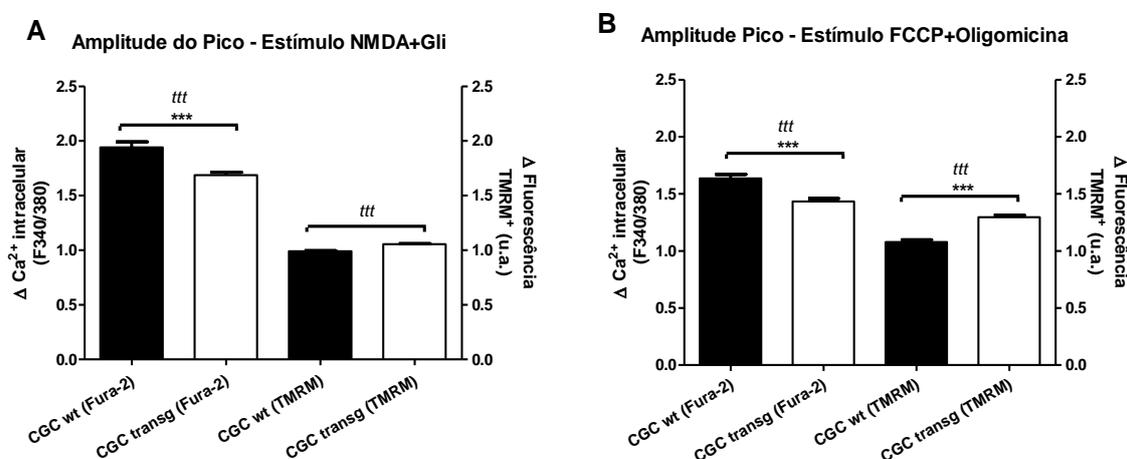
Paralelamente, ocorreu uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, aferida pela libertação da sonda TMRM<sup>+</sup>; nas CGC transgénicas (1,06 u.a.) face às CGC *wild-type* (0,99 u.a.), correspondente a uma pequena despolarização mitocondrial, muito provavelmente em resultado da entrada de cálcio proveniente da abertura do canal associado ao R-NMDA (**Figura 23A**).

Decorridos 20 minutos após o estímulo excitotóxico verificou-se que a libertação completa da sonda Fura-2 foi menor nas CGC transgénicas (1,43 u.a.) sugerindo uma diminuição da capacidade da mitocôndria para tamponizar  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 23B**). Em CGC expostas a glutamato, a inibição induzida por MK-801 também não foi suficiente para induzir a manutenção da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  (Castilho *et al.*, 1998), de facto pela análise individual das alterações nos níveis de cálcio intracelular das CGC infectadas (**Figuras 18 e 19**), das CGC *wild-type* (**Figura 21**) e das CGC transgénicas (**Figuras 22**) os níveis de cálcio citosólico não recuperam completamente para valores iniciais. Contudo, a despolarização completa da mitocôndria com FCCP e oligomicina induziu um aumento estatisticamente significativo da sonda TMRM<sup>+</sup> para o citosol nas CGC transgénicas, indicativo de uma maior acumulação mitocondrial da sonda em resultado de uma hiperpolarização deste organelo (**Figura 23B**), comparativamente às CGC *wild-type*.

Em CGC estimuladas com glutamato para activação dos receptores não-NMDA, os R-cainato, demonstrou-se reversão da ATP sintetase da membrana mitocondrial (Rego *et al.*, 2001). Esta reversão da ATP sintetase está associada à hidrólise de ATP, muito provavelmente resultante da glicólise e pode ser explicada pela inibição de componentes da cadeia respiratória mitocondrial. No entanto, esta observação não permite explicar a menor captação de  $\text{Ca}^{2+}$  para a mitocôndria em CGC transgénicas. Estes resultados também não estão de acordo com o demonstrado num modelo animal da doença de Huntington, que expressa huntingtina mutante, neste observou-se uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, bem como uma diminuição da capacidade da mitocôndria para captar  $\text{Ca}^{2+}$ , comparativamente a mitocôndrias controlo (Panov *et al.*, 2002).

O objectivo da adição do MK-801, antagonista dos R-NMDA, seria cessar as alterações dos níveis de cálcio e do potencial de membrana mitocondrial induzidas pelo estímulo NMDA/Gli. De facto, os níveis de cálcio intracelular em ambos os

modelos CGC (infectadas e não-infectadas) diminuiram após a adição de MK-801, embora a diminuição não tenha ocorrido para valores iniciais.



**Figura 23** – Amplitude dos picos de fluorescência ao Fura-2 e TMRM<sup>+</sup> em CGC *wild-type* e transgênicas após o estímulo com NMDA/Gli (100  $\mu$ M/10  $\mu$ M) (na ausência de Mg<sup>2+</sup>) (**A**); ou com FCCP/oligomicina (2,5  $\mu$ M/2  $\mu$ g/mL) (**B**). Os valores representam a média  $\pm$  SEM de 3 experiências individuais realizadas num total de 133 células analisadas. Análise estatística: \*\*\*p <0,001 pelo teste one-way ANOVA (teste Bonferroni para comparações múltiplas) e *ttt* p <0,001 pelo teste t-Student quando comparado com CGC *wild-type*.

Tendo em conta os resultados obtidos, o estudo das alterações dos níveis de cálcio intracelular, em concomitância com o potencial de membrana mitocondrial, utilizando o modelo de CGC transgênicas e *wild-type* parece ser mais adequado ao estudo da patologia, muito embora sejam necessárias mais experiências utilizando os modelos em estudo, em especial com as CGC infectadas com LV, de forma a consolidar os resultados apresentados nesta tese.

A disfunção neuronal pode ser modelada através do efeito de estímulos excitotóxicos em modelos celulares ou animais. Uma limitação desta aproximação ao nosso trabalho é o facto das culturas de células neuronais serem obtidas de animais em período neonatal, não permitindo mimetizar as alterações inerentes à idade, que se sabe terem um papel de relevo em doenças neurodegenerativas como a DMJ.

## **5. CONCLUSÕES**

A elaboração deste trabalho permitiu obter os seguintes resultados:

- O melhor protocolo testado de infecção com LV que codificam para a ATX3 WT e ATX3 MUT (72Q) foi obtido após 13 dias de expressão.
- A exposição aos estímulos excitotóxicos induziu uma maior diminuição da viabilidade celular após activação selectiva dos:
  1. R-NMDA e R-AMPA em células que expressavam ATX3 WT (CGC infectadas com LV);
  2. R-NMDA em CGC *wild-type* e R-AMPA em CGC isoladas de murganhos transgénicos (135Q).

A maior recuperação induzida pelos antagonistas MK-801 e NBQX após activação selectiva dos R-NMDA e R-AMPA, respectivamente, foi observada em CGC *wild-type* expostas a meio condicionado, pelo que será necessário repetir estas experiências utilizando este protocolo.

- Na análise simultânea dos níveis de cálcio intracelular e do potencial de membrana mitocondrial:
  - As CGC infectadas com LV para ATX3 WT ou ATX3 MUT exibiram aumentos semelhantes de cálcio citosólico e do potencial mitocondrial (avaliado pela libertação da sonda TMRM<sup>+</sup> da mitocôndria) após o estímulo de NMDA/glicina.
  - A expressão de ATX3 MUT (72 Q) aumentou a capacidade da mitocôndria em armazenar Ca<sup>2+</sup> que poderá ter contribuído uma maior despolarização da membrana mitocondrial, comparativamente à expressão de ATX3 WT (27Q).
  - As CGC transgénicas (Q135) apresentaram uma diminuição nos níveis de cálcio intracelular e uma ligeira diminuição do potencial mitocondrial, em relação às CGC *wild-type*.
  - Nestas condições, as CGC transgénicas apresentaram uma diminuição da captação de cálcio mitocondrial e, conseqüentemente um maior potencial mitocondrial transmembranar.

De acordo com os resultado obtidos, o modelo das culturas primárias de CGC obtidas de murganhos transgénicos *versus wild-type* parece ser o que melhor

mimetiza a patogénese da DMJ, embora com a ressalva de que serão necessárias experiências adicionais utilizando o modelo lentiviral. De facto, a análise detalhada do processo excitotóxico em célula única, envolvendo a activação dos receptores do tipo NMDA, na ausência ou presença de Atx3 mutante, permitirá definir o papel da disfunção mitocondrial na morte neuronal cerebelar que ocorre na DMJ. Nesta perspectiva, as alterações mitocondriais poderão determinar a susceptibilidade neuronal aos estímulos excitotóxicos evocados por activação selectiva dos receptores do tipo NMDA ou AMPA.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Albrecht, A., and Mundlos, S. (2005). The other trinucleotide repeat: polyalanine expansion disorders. *Curr Opin Genet Dev* 15, 285-293.
- Albrecht, M., Golatta, M., Wullner, U., and Lengauer, T. (2004). Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. *Eur J Biochem* 271, 3155-3170.
- Albrecht, M., Hoffmann, D., Evert, B.O., Schmitt, I., Wullner, U., and Lengauer, T. (2003). Structural modeling of ataxin-3 reveals distant homology to adaptins. *Proteins* 50, 355-370.
- Alves, S., Nascimento-Ferreira, I., Auregan, G., Hassig, R., Dufour, N., Brouillet, E., Pedroso de Lima, M.C., Hantraye, P., Pereira de Almeida, L., and Deglon, N. (2008a). Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. *PLoS One* 3, e3341.
- Alves, S., Regulier, E., Nascimento-Ferreira, I., Hassig, R., Dufour, N., Koeppen, A., Carvalho, A.L., Simoes, S., de Lima, M.C., Brouillet, E., *et al.* (2008b). Striatal and nigral pathology in a lentiviral rat model of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 17, 2071-2083.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., and Nicotera, P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15, 961-973.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.
- Bettencourt, C., Santos, C., Kay, T., Vasconcelos, J., and Lima, M. (2008). Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees. *J Hum Genet* 53, 920-923.
- Bettencourt, C., Santos, C., Montiel, R., Costa Mdo, C., Cruz-Morales, P., Santos, L.R., Simoes, N., Kay, T., Vasconcelos, J., Maciel, P., *et al.* (2010). Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph disease gene (ATXN3). *Neurogenetics* 11, 193-202.
- Bizat, N., Hermel, J.M., Boyer, F., Jacquard, C., Creminon, C., Ouary, S., Escartin, C., Hantraye, P., Kajewski, S., and Brouillet, E. (2003). Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci* 23, 5020-5030.
- Boy, J., Schmidt, T., Schumann, U., Grasshoff, U., Unser, S., Holzmann, C., Schmitt, I., Karl, T., Laccone, F., Wolburg, H., *et al.* (2010). A transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 resembling late disease onset and gender-specific instability of CAG repeats. *Neurobiol Dis* 37, 284-293.
- Breuer, P., Haacke, A., Evert, B.O., and Wullner, U. (2010). Nuclear aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3: fragments escape the cytoplasmic quality control. *J Biol Chem* 285, 6532-6537.
- Brini, M. (2003). Ca<sup>2+</sup> signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. *Cell Calcium* 34, 399-405.

- Carlson, K.M., Andresen, J.M., and Orr, H.T. (2009). Emerging pathogenic pathways in the spinocerebellar ataxias. *Curr Opin Genet Dev* 19, 247-253.
- Carvalho, D.R., La Rocque-Ferreira, A., Rizzo, I.M., Imamura, E.U., and Speck-Martins, C.E. (2008). Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatr Neurol* 38, 296-299.
- Castilho, R.F., Hansson, O., Ward, M.W., Budd, S.L., and Nicholls, D.G. (1998). Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18, 10277-10286.
- Cebers, G., Cebere, A., and Liljequist, S. (1998). Metabolic inhibition potentiates AMPA-induced Ca<sup>2+</sup> fluxes and neurotoxicity in rat cerebellar granule cells. *Brain Res* 779, 194-204.
- Choi, D.W. (1992). Bench to bedside: the glutamate connection. *Science* 258, 241-243.
- Chou, A.H., Yeh, T.H., Ouyang, P., Chen, Y.L., Chen, S.Y., and Wang, H.L. (2008). Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation. *Neurobiol Dis* 31, 89-101.
- Cohen, S., and Greenberg, M.E. (2008). Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 183-209.
- Contestabile, A. (2002). Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum* 1, 41-55.
- Coutinho, P., and Andrade, C. (1978). Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology* 28, 703-709.
- D'Abreu, A., Franca, M.C., Jr., Paulson, H.L., and Lopes-Cendes, I. (2010). Caring for Machado-Joseph disease: current understanding and how to help patients. *Parkinsonism Relat Disord* 16, 2-7.
- de Almeida, L.P., Ross, C.A., Zala, D., Aebischer, P., and Deglon, N. (2002). Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci* 22, 3473-3483.
- Donaldson, K.M., Li, W., Ching, K.A., Batalov, S., Tsai, C.C., and Joazeiro, C.A. (2003). Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8892-8897.
- Doss-Pepe, E.W., Stenroos, E.S., Johnson, W.G., and Madura, K. (2003). Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol Cell Biol* 23, 6469-6483.
- Duenas, A.M., Goold, R., and Giunti, P. (2006). Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 129, 1357-1370.

Engelman, H.S., Allen, T.B., and MacDermott, A.B. (1999). The distribution of neurons expressing calcium-permeable AMPA receptors in the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn. *J Neurosci* 19, 2081-2089.

Evert, B.O., Araujo, J., Vieira-Saecker, A.M., de Vos, R.A., Harendza, S., Klockgether, T., and Wullner, U. (2006). Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation. *J Neurosci* 26, 11474-11486.

Follenzi, A., Ailles, L.E., Bakovic, S., Geuna, M., and Naldini, L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 25, 217-222.

Fujigasaki, H., Uchihara, T., Koyano, S., Iwabuchi, K., Yagishita, S., Makifuchi, T., Nakamura, A., Ishida, K., Toru, S., Hirai, S., *et al.* (2000). Ataxin-3 is translocated into the nucleus for the formation of intranuclear inclusions in normal and Machado-Joseph disease brains. *Exp Neurol* 165, 248-256.

Gan, S.R., Shi, S.S., Wu, J.J., Wang, N., Zhao, G.X., Weng, S.T., Murong, S.X., Lu, C.Z., and Wu, Z.Y. (2010). High frequency of Machado-Joseph disease identified in southeastern Chinese kindreds with spinocerebellar ataxia. *BMC Med Genet* 11, 47.

Garthwaite, G., and Garthwaite, J. (1991). AMPA Neurotoxicity in Rat Cerebellar and Hippocampal Slices: Histological Evidence for Three Mechanisms. *Eur J Neurosci* 3, 715-728.

Gatchel, J.R., and Zoghbi, H.Y. (2005). Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* 6, 743-755.

Ghiani, C.A., Beltran-Parrazal, L., Sforza, D.M., Malvar, J.S., Seksenyan, A., Cole, R., Smith, D.J., Charles, A., Ferchmin, P.A., and de Vellis, J. (2007). Genetic program of neuronal differentiation and growth induced by specific activation of NMDA receptors. *Neurochem Res* 32, 363-376.

Greene, J.G., and Greenamyre, J.T. (1996). Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol* 48, 613-634.

Gropp, M., Itsykson, P., Singer, O., Ben-Hur, T., Reinhartz, E., Galun, E., and Reubinoff, B.E. (2003). Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors. *Mol Ther* 7, 281-287.

Hands, S., Sinadinos, C., and Wytttenbach, A. (2008). Polyglutamine gene function and dysfunction in the ageing brain. *Biochim Biophys Acta* 1779, 507-521.

Heng, M.Y., Detloff, P.J., Wang, P.L., Tsien, J.Z., and Albin, R.L. (2009). In vivo evidence for NMDA receptor-mediated excitotoxicity in a murine genetic model of Huntington disease. *J Neurosci* 29, 3200-3205.

Hottinger, A.F., Azzouz, M., Deglon, N., Aebischer, P., and Zurn, A.D. (2000). Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J Neurosci* 20, 5587-5593.

Igarashi, S., Tanno, Y., Onodera, O., Yamazaki, M., Sato, S., Ishikawa, A., Miyatani, N., Nagashima, M., Ishikawa, Y., Sahashi, K., *et al.* (1992). Strong correlation between

the number of CAG repeats in androgen receptor genes and the clinical onset of features of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology* 42, 2300-2302.

Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S., and Kakizuka, A. (1996). Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 13, 196-202.

Jana, N.R., and Nukina, N. (2003). Recent advances in understanding the pathogenesis of polyglutamine diseases: involvement of molecular chaperones and ubiquitin-proteasome pathway. *J Chem Neuroanat* 26, 95-101.

Jekabsons, M.B., and Nicholls, D.G. (2004). In situ respiration and bioenergetic status of mitochondria in primary cerebellar granule neuronal cultures exposed continuously to glutamate. *J Biol Chem* 279, 32989-33000.

Jeub, M., Herbst, M., Spauschus, A., Fleischer, H., Klockgether, T., Wuellner, U., and Evert, B.O. (2006). Potassium channel dysfunction and depolarized resting membrane potential in a cell model of SCA3. *Exp Neurol* 201, 182-192.

Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., *et al.* (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8, 221-228.

Kieling, C., Prestes, P.R., Saraiva-Pereira, M.L., and Jardim, L.B. (2007). Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet* 72, 543-545.

Kuhlbrodt, K., Janiesch, P.C., Kevei, E., Segref, A., Barikbin, R., and Hoppe, T. (2011). The Machado-Joseph disease deubiquitylase ATX-3 couples longevity and proteostasis. *Nat Cell Biol* 13, 273-281.

Kussius, C.L., Popescu, A.M., and Popescu, G.K. (2010). Agonist-specific gating of NMDA receptors. *Channels (Austin)* 4, 78-82.

La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E., and Fischbeck, K.H. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352, 77-79.

Lemasters, J.J. (1999). V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 276, G1-6.

Lutz, R.E. (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Semin Pediatr Neurol* 14, 26-33.

Macedo-Ribeiro, S., Cortes, L., Maciel, P., and Carvalho, A.L. (2009). Nucleocytoplasmic shuttling activity of ataxin-3. *PLoS One* 4, e5834.

Maciel, P., Gaspar, C., DeStefano, A.L., Silveira, I., Coutinho, P., Radvany, J., Dawson, D.M., Sudarsky, L., Guimaraes, J., Loureiro, J.E., *et al.* (1995). Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 57, 54-61.

Mallik, M., and Lakhotia, S.C. (2010). Modifiers and mechanisms of multi-system polyglutamine neurodegenerative disorders: lessons from fly models. *J Genet* 89, 497-526.

Maruyama, H., Nakamura, S., Matsuyama, Z., Sakai, T., Doyu, M., Sobue, G., Seto, M., Tsujihata, M., Oh-i, T., Nishio, T., *et al.* (1995). Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 4, 807-812.

Masuko, T., Kashiwagi, K., Kuno, T., Nguyen, N.D., Pahk, A.J., Fukuchi, J., Igarashi, K., and Williams, K. (1999). A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Mol Pharmacol* 55, 957-969.

Matilla-Duenas, A., Goold, R., and Giunti, P. (2008). Clinical, genetic, molecular, and pathophysiological insights into spinocerebellar ataxia type 1. *Cerebellum* 7, 106-114.

Michaelis, E.K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54, 369-415.

Milnerwood, A.J., Gladding, C.M., Pouladi, M.A., Kaufman, A.M., Hines, R.M., Boyd, J.D., Ko, R.W., Vasuta, O.C., Graham, R.K., Hayden, M.R., *et al.* (2010). Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice. *Neuron* 65, 178-190.

Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Jr., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A., and Snyder, S.H. (2000). D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4926-4931.

Nakagawa, T. (2010). The biochemistry, ultrastructure, and subunit assembly mechanism of AMPA receptors. *Mol Neurobiol* 42, 161-184.

Nakano, K.K., Dawson, D.M., and Spence, A. (1972). Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 22, 49-55.

Nicastro, G., Todi, S.V., Karaca, E., Bonvin, A.M., Paulson, H.L., and Pastore, A. (2010). Understanding the role of the Josephin domain in the PolyUb binding and cleavage properties of ataxin-3. *PLoS One* 5, e12430.

Nicholls, D.G., and Budd, S.L. (1998). Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1366, 97-112.

Nicholls, D.G., and Ward, M.W. (2000). Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci* 23, 166-174.

Norenberg, M.D., and Rao, K.V. (2007). The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. *Neurochem Int* 50, 983-997.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267, 5421-5426.

Oliveira, J.M., Chen, S., Almeida, S., Riley, R., Goncalves, J., Oliveira, C.R., Hayden, M.R., Nicholls, D.G., Ellerby, L.M., and Rego, A.C. (2006). Mitochondrial-dependent Ca<sup>2+</sup> handling in Huntington's disease striatal cells: effect of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci* 26, 11174-11186.

- Orr, H.T., and Zoghbi, H.Y. (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 30, 575-621.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.
- Ozawa, S., Kamiya, H., and Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54, 581-618.
- Page, B., Page, M., and Noel, C. (1993). A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *Int J Oncol* 3, 473-476.
- Panov, A.V., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., and Greenamyre, J.T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5, 731-736.
- Paulson, H.L. (2007). Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol* 27, 133-142.
- Paulson, H.L., Perez, M.K., Trottier, Y., Trojanowski, J.Q., Subramony, S.H., Das, S.S., Vig, P., Mandel, J.L., Fischbeck, K.H., and Pittman, R.N. (1997). Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19, 333-344.
- Pearson, C.E., Nichol Edamura, K., and Cleary, J.D. (2005). Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 6, 729-742.
- Rego, A.C., Ward, M.W., and Nicholls, D.G. (2001). Mitochondria control ampa/kainate receptor-induced cytoplasmic calcium deregulation in rat cerebellar granule cells. *J Neurosci* 21, 1893-1901.
- Reynolds, I.J. (1999). Mitochondrial membrane potential and the permeability transition in excitotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 893, 33-41.
- Riedel, G., Platt, B., and Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140, 1-47.
- Riess, O., Rub, U., Pastore, A., Bauer, P., and Schols, L. (2008). SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum* 7, 125-137.
- Rodrigues, A.J., do Carmo Costa, M., Silva, T.L., Ferreira, D., Bajanca, F., Logarinho, E., and Maciel, P. (2010). Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death. *Biochim Biophys Acta* 1803, 1154-1163.
- Rosenberg, R.N., Nyhan, W.L., Bay, C., and Shore, P. (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology* 26, 703-714.
- Roth, K.A., and D'Sa, C. (2001). Apoptosis and brain development. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7, 261-266.
- Schols, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., and Riess, O. (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 3, 291-304.

Silva-Fernandes, A., Costa Mdo, C., Duarte-Silva, S., Oliveira, P., Botelho, C.M., Martins, L., Mariz, J.A., Ferreira, T., Ribeiro, F., Correia-Neves, M., *et al.* (2010). Motor uncoordination and neuropathology in a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease lacking intranuclear inclusions and ataxin-3 cleavage products. *Neurobiol Dis* 40, 163-176.

Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2003). The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci* 4, 672-684.

Takahashi, T., Katada, S., and Onodera, O. (2010). Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? *J Mol Cell Biol* 2, 180-191.

Tallaksen-Greene, S.J., Ordway, J.M., Crouse, A.B., Jackson, W.S., Detloff, P.J., and Albin, R.L. (2003). Hprt(CAG)146 mice: age of onset of behavioral abnormalities, time course of neuronal intranuclear inclusion accumulation, neurotransmitter marker alterations, mitochondrial function markers, and susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Comp Neurol* 465, 205-219.

Todi, S.V., Laco, M.N., Winborn, B.J., Travis, S.M., Wen, H.M., and Paulson, H.L. (2007). Cellular turnover of the polyglutamine disease protein ataxin-3 is regulated by its catalytic activity. *J Biol Chem* 282, 29348-29358.

Tsujimoto, Y., Nakagawa, T., and Shimizu, S. (2006). Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1757, 1297-1300.

van de Warrenburg, B.P., Sinke, R.J., Verschuuren-Bemelmans, C.C., Scheffer, H., Brunt, E.R., Ippel, P.F., Maat-Kievit, J.A., Dooijes, D., Notermans, N.C., Lindhout, D., *et al.* (2002). Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 58, 702-708.

Wang, Y.G., Du, J., Wang, J.L., Chen, J., Chen, C., Luo, Y.Y., Xiao, Z.Q., Jiang, H., Yan, X.X., Xia, K., *et al.* (2009). Six cases of SCA3/MJD patients that mimic hereditary spastic paraplegia in clinic. *J Neurol Sci* 285, 121-124.

Ward, M.W., Huber, H.J., Weisova, P., Dussmann, H., Nicholls, D.G., and Prehn, J.H. (2007). Mitochondrial and plasma membrane potential of cultured cerebellar neurons during glutamate-induced necrosis, apoptosis, and tolerance. *J Neurosci* 27, 8238-8249.

Ward, M.W., Rego, A.C., Frenguelli, B.G., and Nicholls, D.G. (2000). Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci* 20, 7208-7219.

White, M.J., DiCaprio, M.J., and Greenberg, D.A. (1996). Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures. *J Neurosci Methods* 70, 195-200.

Winborn, B.J., Travis, S.M., Todi, S.V., Scaglione, K.M., Xu, P., Williams, A.J., Cohen, R.E., Peng, J., and Paulson, H.L. (2008). The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J Biol Chem* 283, 26436-26443.

Woods, B.T., and Schaumburg, H.H. (1972). Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci* 17, 149-166.

Zhong, X., and Pittman, R.N. (2006). Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. *Hum Mol Genet* 15, 2409-2420.

Zoghbi, H.Y., and Orr, H.T. (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 23, 217-247.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 871-875.

