

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

BÁRBARA CAMPOS DE ARAGÃO

**Análise óptica da junção neuromuscular de diafragma em modelo de camundongo
transgênico para Doença de Huntington**

Belo Horizonte

2013

BÁRBARA CAMPOS DE ARAGÃO

**Análise óptica da junção neuromuscular de diafragma em modelo de camundongo
transgênico para Doença de Huntington**

Dissertação submetida ao Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca

Co-orientadora: Profa. Fabíola Mara Ribeiro

Belo Horizonte

2013

À minha mãe Marlene pelo amor e dedicação incondicionais, por me apoiar e estar sempre ao meu lado, por ser exemplo de mulher e profissional. Ao meu pai por sempre me incentivar na busca de novas realizações. Ao Léo pelo apoio, compreensão, paciência e amor. Aos meus amigos e familiares pelo carinho. Tê-los ao meu lado tornou minha caminhada mais suave e me deu forças para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo seu amor, suas bênçãos e por cumprir sua vontade em minha vida. Sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Marlene e Aragão, por se esforçarem para que eu me tornasse quem eu sou. A base de tudo em minha vida. Obrigada!

Ao meu irmão Diego pelo carinho.

Aos meus avós, Ernani e Judite, por sempre se orgulharem da “netinha”.

Ao Léo pela paciência e cumplicidade, pelo companheirismo, por mesmo distante se fazer presente.

Ao meu padrinho Wellington por sempre acreditar em mim, pelo apoio e incentivo.

A todos os meus familiares que sempre torceram pelo meu sucesso, em especial a Keila Estefânia e Hortência, as irmãs que eu não tive.

Às minhas queridas amigas Linzi, Sarah e Bella pelos momentos compartilhados, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado.

Aos amigos da Cia de dança Oficina de Adoração que no último ano estiveram presentes, com os quais eu pude compartilhar o dia-a-dia dessa conquista.

À Profa. Cristina Guatimosim pelos ensinamentos, por me abrir as portas e acreditar em mim.

À Profa. Janice Henriques por ter me iniciado no mundo da morfologia.

À Profa. Fabíola Ribeiro pelo apoio e colaboração.

Ao querido amigo Hermann por estar sempre disposto a me ajudar, pelos ensinamentos e pelo carinho, muito obrigada!

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia da Neurotransmissão: Marina, Matheus, Rubens, Rayara, Luana e Jéssica pelos constantes momentos de alegria e aprendizado. Em especial à Prica e Matheusinho, companheiros de todas as manhãs, tardes e noites.

À Leidiane do Laboratório de Neurobioquímica pela colaboração no desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas e professores do curso de Pós-graduação em Biologia Celular da UFMG.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

À Fundação de amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro para realização desta pesquisa e às demais agências financiadoras, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Os meus sinceros agradecimentos.

APOIO INSTITUCIONAL

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia da Neurotransmissão do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca e co-orientação da Profa. Dra. Fabíola Mara Ribeiro (Departamento de Bioquímica e Imunologia) e com apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*"É preciso ter um caos dentro de
si para dar à luz uma estrela
dançante" (Frederich Nietzsche)*

RESUMO

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por um declínio progressivo das funções motoras e cognitivas, incluindo movimentos involuntários dos membros e da face, alterações de personalidade e demência. Ela é causada pela repetição do trinucleotídeo CAG que leva a uma expansão poliglutamínica da proteína huntingtina. Sabe-se que huntingtina é altamente expressa nos sistemas nervoso central e periférico. No interior dos neurônios, esta proteína se liga a vesículas sinápticas e interage com várias proteínas associadas ao transporte vesicular. Assim, sugere-se que a huntingtina mutante pode interferir com a liberação de neurotransmissores causando disfunção sináptica, o que pode agravar a deficiência motora característica da doença. Dados anteriores indicam uma redução da neurotransmissão colinérgica em neurônios do Sistema Nervoso Central, bem como comprometimento motor em modelos animais para DH. Baseado nestas evidências, este estudo tem como objetivo principal avaliar as possíveis alterações na junção neuromuscular do músculo diafragma de camundongos BACHD^{Q97}, modelo transgênico para DH, cuja progressão da doença é mais lenta quando comparada às linhagens previamente estabelecidas. Esse modelo representa um novo e robusto paradigma *in vivo* para estudar a patogênese da DH. Resumidamente, para análise óptica, as preparações nervo ciático-músculo diafragma foram isoladas e coradas com a sonda vital FM1-43 (4 μ M) e α -bungarotoxina-Alexa 594 (12 μ M) para visualizar terminais pré-sinápticos e aglomerados de receptores nicotínicos, respectivamente. A sonda FM1-43 é uma ferramenta útil para se acompanhar exocitose, endocitose e reciclagem de vesículas sinápticas. Utilizando a microscopia de fluorescência e confocal foram realizadas análises de parâmetros morfológicos em animais BACHD^{Q97} e WT. Nós observamos que os elementos pré e pós-sinápticos de animais BACHD^{Q97} apresentaram-se menos fluorescentes quando comparados aos de animais WT. Vimos também que a taxa de desmarcação/exocitose dos terminais previamente marcados com o FM1-43 foi menor nos animais transgênicos. Além disso, estudos ultraestruturais foram realizados utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET), para caracterizar o aspecto morfológico das sinapses neuromusculares nestes animais. Vimos que os elementos sinápticos das junções neuromusculares de camundongos BACHD^{Q97} apresentaram morfologia ultraestrutural geral semelhante aos dos animais WT. Nossos resultados indicam uma deficiência funcional de elementos pré e pós-sinápticos que podem afetar a função motora em animais BACHD^{Q97}.

ABSTRACT

The Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive decline of motor and cognitive functions including involuntary movements of the limbs and face, personality changes and dementia. It is caused by a CAG trinucleotide repetition that leads to a polyglutamine expansion in the huntingtin protein. It is known that huntingtin is highly expressed in the central and peripheral nervous systems. Within neurons, this protein binds to synaptic vesicles and interacts with several proteins associated with vesicular transport. Thus, it is suggested that the mutant huntingtin may interfere with the release of neurotransmitters causing synaptic dysfunction, which may lead to motor impairment characteristic of the disease. Previous data indicate a reduction in cholinergic neurotransmission, as well as motor impairment in animal models of HD. Based on this evidence, this study aims to assess the possible changes in the neuromuscular junction of diaphragm muscle of mice BACHD^{Q97}, a transgenic model for HD, which disease progression is slower when compared to other previously established strains. This model represents a new and robust in vivo paradigm for studying the pathogenesis of HD. Briefly, for optical analysis, neuromuscular preparations were isolated and stained with the dye FM1-43 (4 μ M) and α -bungarotoxin-Alexa 594 (12 μ M) to visualize presynaptic terminals and acetylcholine receptors clusters, respectively. The styryl dye FM1-43 is a powerful tool to track exocytosis, endocytosis and recycling of synaptic vesicles. Through confocal and fluorescence microscopy, morphological parameters were analyzed in BACHD^{Q97} and WT animals. We observed that pre and post-synaptic elements presented less fluorescent in BACHD^{Q97} animals when compared to WT. We also notice that in the nerve terminals previously labeled with FM1-43 the destaining/exocytosis rates were lower in the transgenic animals. Moreover, ultrastructural studies were performed using electron microscopy transmission (TEM) technique to characterize the morphological aspect of neuromuscular synapses in these animals. Concerning the TEM, we saw that the synaptic elements of the neuromuscular junctions in BACHD^{Q97} mice show ultrastructural morphology resembling the WT animals. Thereby, our evidences suggest a quantitative and functional impairment of BACHD^{Q97} mice presynaptic elements what might affect motor function.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de toxicidade na doença de Huntington representados em um esquema de sinapse axossomática	16
Figura 2: A junção neuromuscular de camundongo	18
Figura 3: Etapas básicas da neurotransmissão	21
Figura 4: Modelo de formação do complexo SNARE	23
Figura 5: Desenho esquemático indicando a localização e o papel de diversas proteínas envolvidas na exocitose, endocitose e sinalização em modelo de sinapse	26
Figura 6: O marcador fluorescente FM1-43 é utilizado para monitoramento dos passos de endocitose e exocitose de vesículas sinápticas em neurônios	33
Figura 7: Terminais motores de WT e BACHD ^{Q97} marcados com FM1-43 durante a endocitose de vesículas sinápticas	40
Figura 8: Alterações dos elementos sinápticos de junções neuromusculares de animais BACHD ^{Q97} vistos por microscopia confocal	43
Figura 9: Alteração na exocitose de vesículas sinápticas em animais BACHD ^{Q97}	46
Figura 10: Análise ultraestrutural de junção neuromuscular de camundongos WT e BACHD ^{Q97} ..	48

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAG	Citosina-Adenina-Guanina
Ca ²⁺	Íon cálcio
ChAT	Colina acetiltransferase
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
CO ₂	Dióxido de carbono
CSP	<i>Cysteine string protein</i>
DH	Doença de Huntington
DMP-30	2,4,6-tridimetil-aminometil fenol
HCl	Ácido clorídrico
FM1-43	<i>N-(3-triethylammonium-propyl)-4-(4(dibutylamino)-styryl) pyridinium dibromide</i>
HAP1	Proteína1 de associação à huntingtina
HIP1	Proteína1 de interação à huntingtina
Htt	Huntingtina
JNM	Junção neuromuscular
KCl	Cloreto de potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
LAS	<i>Leica Application Suite</i>
M	Molar
mm ²	Milímetros quadrados
mM	Milimolar
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
nm	Nanômetros

O ₂	Oxigênio
Rab3A	Rabfilina-3A
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>
SNAP-25	Proteína de 25 kDa associada ao sinaptosoma
SNC	Sistema Nervoso Central
T-SNARE	<i>Target SNARE</i>
VACht	Transportador vesicular da acetilcolina
VAMP	Proteína de membrana associada à vesícula
V-SNARE	<i>Vesicular SNARE</i>
WT	<i>Wild-type</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Doença de Huntington	14
1.2. Morfologia da Junção Neuromuscular	17
1.3. Neurotransmissão colinérgica periférica	19
1.4. Função da huntingtina sobre o ciclo de vesículas sinápticas.....	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Animais.....	30
3.2. Obtenção da junção neuromuscular de camundongo	30
3.3. Monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas utilizando o marcador fluorescente FM1-43	30
3.4. Marcação e desmarcação de vesículas sinápticas com FM1-43 em junção neuromuscular de camundongo	34
3.5. Marcação com FM1-43 fx e α -bungarotoxina em junção neuromuscular de camundongo	34
3.6. Análise ultraestrutural de terminações motoras periféricas.....	35
3.7. Obtenção de imagens através de microscopia de fluorescência	36
3.8. Obtenção de imagens através de microscopia confocal	36
3.9. Obtenção de imagens através de microscopia eletrônica de transmissão.....	36
3.10. Análise estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Elementos pré-sinápticos de músculo diafragma BACHD ^{Q97} não apresentam diferenças significativas quando comparados aos WT	39
4.2. Elementos pré e pós-sinápticos de músculo diafragma BACHD ^{Q97} apresentam-se alterados em imagens de microscopia confocal	41
4.3. Animais BACHD ^{Q97} apresentam alterações no processo de exocitose de vesículas sinápticas	44
4.4. Elementos sinápticos de JNM de diafragma BACHD ^{Q97} não apresentam alterações no plano ultraestrutural	47
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Doença de Huntington

A Doença de Huntington (DH) é uma doença genética e neurodegenerativa de herança autossômica-dominante que geralmente surge na idade adulta e pode levar à morte entre 15-20 anos após seu início (ROZAS *et al.*, 2010, BANO *et al.*, 2011). Possui uma incidência estimada de 5-10 casos por 100.000 indivíduos (SMITH; BRUNDIN; LI, 2005).

Os primeiros registros que poderiam corresponder à DH surgiram em meados do século XIX quando foram descritas formas de “coréias hereditárias” com características semelhantes às da enfermidade. Até 1872 não se fazia distinção entre a DH e outras condições que se manifestavam com coréia¹. Neste mesmo ano, o médico norte-americano George Huntington, publicou o artigo intitulado “*On Chorea*” no “*Philadelphia Medical and Surgical Reporter*” contendo as observações de seu pai, Abel Huntington e de seu avô George Lee Huntington. Neste artigo, George Huntington descreveu de forma precisa e detalhada as principais características da doença (HUNTINGTON, 1872), (DEJONG, 1973; MARTIN, 1984; revisto por GARRET, 1992). Huntington realçou três particularidades desta condição: natureza hereditária, tendência ao suicídio e manifestação como uma doença grave na idade adulta.

A DH é clinicamente caracterizada por distúrbios motores que incluem: movimentos involuntários dos membros e da face (tipo de coréia), anormalidades de marcha e perda de coordenação motora (WALLING; BALDASSARE; WESTFALL, 1998). Esses sintomas normalmente aparecem na fase inicial da doença. Pacientes em estágios mais avançados podem apresentar sinais como rigidez muscular, bradiscinesia e distonia, limitando sua capacidade de realizar movimentos voluntários (RIBCHESTER *et al.*, 2004).

Alterações comportamentais e declínio cognitivo também são frequentes, associados ou precedendo os movimentos coreóicos (FOLSTEIN *et al.*, 1986), assim como o desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos (SHIRENDEB *et al.*, 2012).

A DH é causada por uma expansão dos trinucleotídeos citosina-adenina-guanina (CAG) no exon-1 do gene que codifica a proteína huntingtina (htt). O gene está localizado no braço curto do cromossomo 4 e sua mutação promove o acúmulo de repetidas unidades de glutaminas próximo à porção N-terminal da htt. Indivíduos normais possuem entre 6 e 35 repetições de CAG enquanto pacientes com DH têm apresentado acima de 40 repetições de trinucleotídeos (BANO *et al.*, 2011). O número de repetições de CAG correlaciona-se com

¹ O termo coréia se origina do latim (choreus) que vem do grego coreia (“choros”) e significa dança. Na idade média essa “dança” era atribuída a possessões demoníacas (HAYDEN, 1981; revisado por AZAMBUJA, 2006).

início, a progressão e a gravidade da doença, e tende a ser aumentada através da transmissão paterna (WALLING; BALDASSARE; WESTFALL, 1998).

A htt foi descoberta em 1993 (*The Huntington's Disease Collaborative Research Group*, 1993) e sua função ainda não está bem estabelecida. Esta proteína encontra-se amplamente distribuída no organismo, presente em diversos tipos celulares e associada a uma variedade de organelas, incluindo o núcleo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias. Sendo assim, sugere-se que esta proteína seja essencial para a sobrevivência da célula (LI & LI, 2004). A htt interage também com proteínas da vesícula sináptica, proteínas envolvidas no transporte axonal e microtúbulos, o que indica sua importância no transporte vesicular e função sináptica (SMITH; BRUNDIN; LI, 2005).

O mecanismo pelo qual a htt mutante leva à DH ainda não está esclarecido. Estudos em animais transgênicos apoiaram um mecanismo de “ganhos de função” da proteína em neurônios do sistema nervoso central (SNC), resultando em toxicidade e consequente disfunção neuronal e morte. No entanto, evidências recentes sugeriram que a perda da função normal da htt também pode ter um papel na patogênese da doença (Di PROSPERO & FISCHBECK, 2005). A mutação resulta em várias alterações celulares fundamentais, a saber: distúrbios do sistema ubiquitina-proteassoma, interrupções na transcrição gênica, síntese de proteínas, função mitocondrial e interações proteicas (Figura 1) (SMITH; BRUNDIN; LI, 2005).

Além das disfunções supracitadas, convém ressaltar que a expansão da htt pode levar à toxicidade através de mecanismos moleculares importantes envolvidos na neurotransmissão, tais como: defeitos na endocitose, déficit no transporte axonal, disfunção no estoque intracelular de Ca^{2+} , dentre outros (ROZAS *et al.*, 2010).

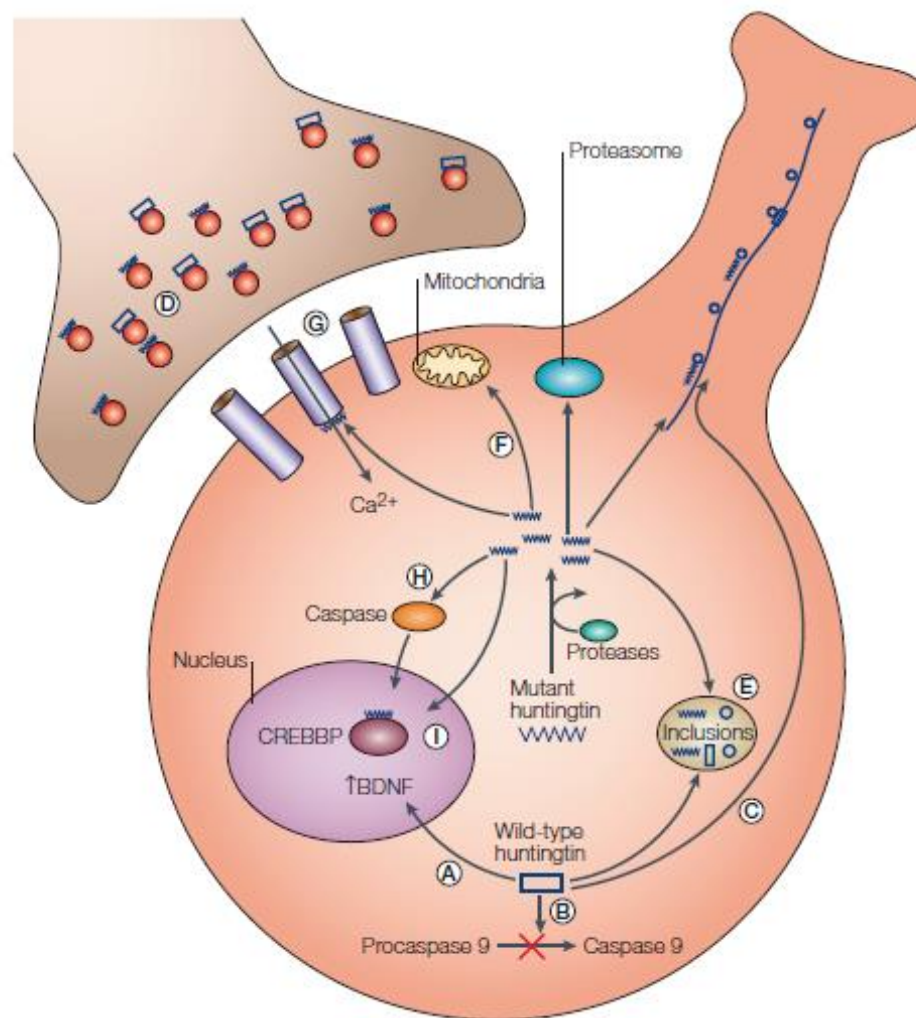


Figura 1: Mecanismos de toxicidade na Doença de Huntington representados em um esquema de sinapse axossomática. A huntingtina do tipo selvagem é importante para o desenvolvimento celular normal e parece estar envolvida na regulação da transcrição do fator neurotrófico BDNF (A), na prevenção da apoptose (B), no transporte de vesículas do soma para o terminal nervoso (C) e na liberação de vesículas sinápticas (D). A huntingtina mutante pode comprometer processos celulares por vários mecanismos: através do sequestro de proteínas (E), disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (F), interferindo na liberação alterada de neurotransmissores e na função de receptores (G), através da ativação de caspases que iniciam a cascata apoptótica (H) e interações com fatores nucleares que resultam em desregulação transcricional (I) (Di PROSPERO & FISCHBECK, 2005).

1.2. Morfologia da Junção Neuromuscular

As sinapses são áreas especializadas de contato celular onde sinais são transferidos, de forma rápida e regulada, de um neurônio para uma célula alvo (SHERINGTON, 1906). Nas sinapses químicas, um sinal elétrico é convertido em um sinal químico, este representado pela liberação de neurotransmissores que irão atuar sobre o órgão efector (KATZ, 1966; revisado por ZHAI & BELLEN, 2004).

A junção neuromuscular (JNM) é um modelo experimental valioso para o estudo da neurotransmissão sináptica devido a suas dimensões amplas, sua forma simples e fácil acessibilidade (KUMMER *et al.*, 2006). Em vertebrados, a JNM é uma sinapse química especializada em transmitir impulsos nervosos do cone de implantação do neurônio motor para uma fibra muscular, desencadeando a contração através do neurotransmissor acetilcolina (KATZ, 1966). Morfologicamente, as JNMs de um animal adulto possuem uma arborização terminal ramificada (Figura 2A) e são formadas por três compartimentos distintos: o terminal neuronal pré-sináptico, a fenda sináptica e a membrana pós-sináptica (Figura 2B) (ENGEL, 2003).

No terminal neuronal pré-sináptico, o axônio motor próximo à fibra muscular perde sua bainha de mielina e se ramifica de modo variável em botões sinápticos que contém, em grandes proporções, mitocôndrias e vesículas sinápticas (ENGEL, 2003). As vesículas sinápticas são pequenas organelas de tamanho uniforme, cujo diâmetro aproximado é de 40-50 nm. Sua membrana apresenta uma diversidade de proteínas envolvidas na captação e armazenamento de neurotransmissores (JAHN & SÜDHOF, 1994), (TAKAMORI *et al.*, 2006). Os aglomerados vesiculares localizam-se em uma região subcelular conhecida como “zona ativa²” (SÜDHOF, 2012). Morfologicamente essa região é definida como sítio de ancoragem e fusão vesicular e, fisiologicamente, como local de liberação de neurotransmissor. Intimamente associados à zona ativa e bem próximos aos aglomerados vesiculares estão dispostos os canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem, que permitem a rápida entrada de Ca^{2+} durante a exocitose, processo que se repete muitas vezes no terminal nervoso e é essencial para neurotransmissão (NUDLER *et al.*, 2003), (SCHENEGGENBURGER, 2012).

² O termo “zona ativa” foi definido em 1970 por Couteaux e Pecot-Dechavassine durante estudos ultraestruturais com músculo de rã onde observou que a abertura das vesículas sinápticas ocorria imediatamente adjacente a bandas pré-sinápticas elétricas-densas (revisado por ZHAI & BELLEN, 2004).

A fenda sináptica consiste no espaço extracelular, de aproximadamente 50 nm, situado entre as membranas pré e pós-sinápticas. O compartimento pós-sináptico é composto pela membrana plasmática da fibra muscular. O sarcolema é pregueado, contendo dobras juncionais com cerca de 1 μm de profundidade que aumentam a superfície pós-sináptica e portanto a eficácia da neurotransmissão (SANES; LITCHMAN, 1999). Nas cristas das dobras se concentram os aglomerados de receptores nicotínicos. Esse arranjo permite aos receptores detectar, de forma rápida e eficiente, a acetilcolina liberada durante a exocitose das vesículas (HALL; SANES, 1993).

Diante do exposto, torna-se evidente que o estabelecimento da JNM é fundamental, uma vez que implica na sobrevivência do animal após seu nascimento garantindo uma integração perfeita entre o sistema nervoso e as células musculares.

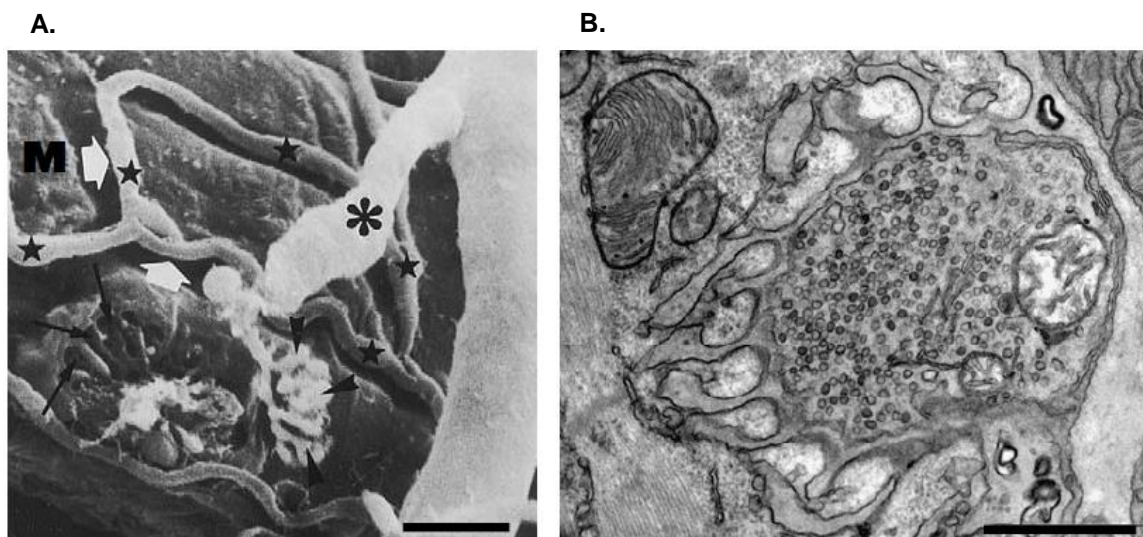


Figura 2: A Junção neuromuscular de camundongo. (A) Micrografia eletrônica de varredura de junção neuromuscular de camundongo. É possível observar um terminal axonal (cabeças de setas) disposto de forma circular sobre uma célula muscular estriada esquelética (M) que apresenta na membrana pós-sináptica diversas dobras juncionais (setas pretas) nas cristas das quais encontram-se aglomerados de receptores nicotínicos (TORREJAIS *et al*, 2002). Sob os terminais axonais existem áreas de contato sináptico como evidenciado em “B” (Barra de escala = 10 μm). (B) Micrografia eletrônica de transmissão da junção neuromuscular de camundongo (gentilmente cedida por Hermann A. Rodrigues). O componente pré-sináptico apresenta diversas vesículas sinápticas e duas mitocôndrias. A célula muscular, pós-sináptica, apresenta em sua membrana dobras pós juncionais. Os elementos pré e pós sinápticos são separados por uma estreita fenda sináptica (Barra de escala = 10 μm).

1.3. Neurotransmissão colinérgica periférica

A transmissão sináptica envolve eventos pré e pós-sinápticos altamente regulados e para que ela ocorra os seguintes passos são fundamentais: (1) Síntese do neurotransmissor no terminal pré-sináptico; (2) Armazenamento do neurotransmissor em vesículas sinápticas; (3) Liberação regulada de neurotransmissor na fenda sináptica; (4) A presença de receptores específicos para o neurotransmissor no terminal pós-sináptico; (5) O término da ação do neurotransmissor (SÜDHOF & RIZO, 2012).

A manutenção da transmissão sináptica depende da disponibilidade de vesículas sinápticas preenchidas com neurotransmissores (SCHWEIZER & RYAN, 2006). Os neurotransmissores clássicos são sintetizados na própria terminação axonal, armazenados no interior de vesículas e liberados na fenda sináptica, próximo aos seus receptores (KATZ, 1966).

A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor responsável pela sinalização química na JNM de músculo estriado esquelético. Ela é sintetizada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT), a partir dos substratos colina e acetil coenzima A (acetil-CoA) e posteriormente transportada para o interior de vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Após ser liberada na fenda sináptica, a ACh interage com os receptores nicotínicos e é hidrolisada, pela acetilcolinesterase (AChE), em colina e acetato. A colina é então recaptada para o neurônio pré-sináptico pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1) e utilizada para a síntese de novas moléculas de ACh (PRADO *et al.*; 2002), (revisado por RIBEIRO *et al.*, 2006).

No terminal do neurônio motor, a ACh encontra-se estocada em um grande número de vesículas sinápticas que se enquadram em um de três aglomerados vesiculares: (1) Grupo de vesículas disponíveis para liberação rápida (*Ready Releasable Pool*), ou seja, apto para a exocitose imediata. Geralmente suas vesículas estão ancoradas na zona ativa. (2) Grupo de reciclagem (*Recycling Pool*), definido como o conjunto de vesículas que mantém a liberação de neurotransmissores em estimulação fisiológica moderada. (3) Grupo de reserva (*Reserve Pool*) consiste em um depósito de vesículas sinápticas cuja liberação ocorre mediante intensa estimulação (RIZZOLI & BETZ, 2005).

A transmissão sináptica é iniciada quando um potencial de ação chega ao terminal nervoso e despolariza a membrana provocando a abertura dos canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem. O influxo de Ca^{2+} resultante aumenta a concentração intracelular do íon e desencadeia a exocitose das vesículas, resultando na liberação do neurotransmissor (KATZ, 1966). A ACh liberada na fenda sináptica difunde até atingir os receptores nicotínicos. A abertura dos canais

iônicos pós-sinápticos permite a entrada de sódio para o sarcoplasma, gerando um potencial despolarizante que levará à contração muscular (RUFF *et al.*, 2003). Paralelamente, no terminal pré-sináptico, a abertura de canais de potássio dependentes de voltagem restaura o potencial de repouso da membrana e, após a exocitose, as vesículas sinápticas submetem-se à endocitose, reciclagem e reenchimento com neurotransmissores para permitir um novo ciclo (Figura 3) (SÜDHOF, 2004).

Todas as funções pré-sinápticas, direta ou indiretamente, envolvem um tráfego cíclico de vesículas sinápticas que passam pelo terminal nervoso o qual pode ser resumido em dois grandes eventos: (1) Exocitose: neste passo os neurotransmissores são transportados para dentro das vesículas. Estas se agrupam frente à zona ativa, ancoram-se a ela, amadurecem, tornam-se competentes para fusão e conseqüente exocitose, processo este desencadeado pela abertura dos canais para Ca^{2+} (SÜDHOF, 2004). (2) Endocitose: após a exocitose de seu conteúdo, as vesículas sinápticas são recuperadas a partir da membrana plasmática (endocitose), preenchidas com neurotransmissor e direcionadas a se juntarem ao conjunto de vesículas já existentes, processo denominado reciclagem de vesículas. A reciclagem acontece por uma de três vias alternativas: (a) endocitose mediada por capa de clatrina, onde após a fusão completa da membrana da vesícula com a membrana do terminal, é formada uma capa de clatrina, que, auxiliada por fatores acessórios, fornecem força motora para a invaginação da membrana. Em seguida a vesícula é reacidificada e reenchida diretamente, ou ao passar por um endossoma intermediário (HEUSER & REESE, 1973), (RICHARDS *et al.*, 2000); (b) endocitose por meio de amplas invaginações de membrana e formação de cisternas (TAKEI *et al.*, 1996), (RICHARDS *et al.*, 2000), (RIZZOLI, RICHARDS, BETZ, 2003); (c) endocitose designada como *Kiss and Run* na qual vesículas liberam seu conteúdo sem se integrarem completamente a membrana pré-sináptica, sendo localmente reacidificadas e novamente preenchidas com neurotransmissores (CECCARELLI, *et al.*, 1973), (PYLE *et al.*, 2000), (GANDHI & STEVENS, 2003).

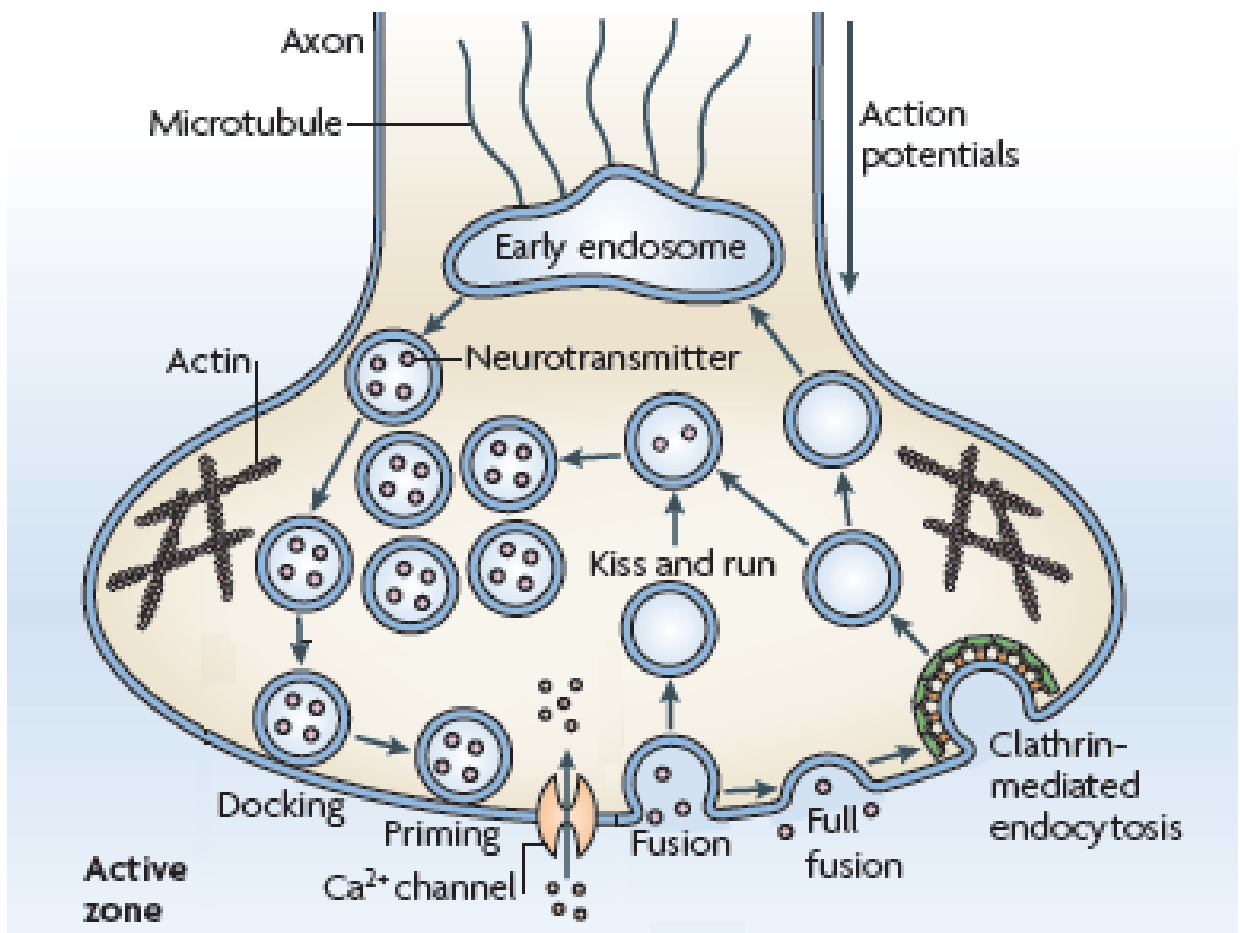


Figura 3: Etapas básicas da neurotransmissão. Durante a despolarização, após a abertura de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem, íons Ca^{2+} penetram no terminal pré-sináptico levando a um aumento da concentração intracelular deste cátion. Vesículas sinápticas, contendo neurotransmissores, se acumulam nas adjacências das zonas ativas que são sítios subcelulares de liberação vesicular. As vesículas que se ancoram na zona ativa (*docking*) sofrem uma reação de amadurecimento (*priming*) que as tornam competentes para abertura de um poro de fusão (*fusion*) e exocitose dos neurotransmissores. Após a exocitose, os aglomerados vesiculares são reconstituídos por meio de endocitose compensatória (SAINT BASILE *et al.*, 2010).

É importante destacar que uma série de interações moleculares está envolvida com o controle do ciclo sináptico. Nesse amplo conjunto molecular coordenador do ciclo sináptico, é bem definido o papel do complexo SNARE e da sinaptotagmina I.

As proteínas SNAREs pertencem a uma grande família de proteínas que medeiam a fusão intracelular entre vários compartimentos da célula. Fazem parte desse complexo sinaptobrevina/VAMP, a syntaxina e SNAP-25. A sinaptobrevina está localizada na membrana da vesícula e é, portanto denominada v-SNARE (*vesicular SNARE*), a syntaxina e SNAP-25 situam-se na membrana plasmática do terminal pré-sináptico e são chamadas t-SNARE (*target SNARE*). Estas são as proteínas SNAREs mais relevantes para a exocitose (BECHERER & RETTIG, 2006). Estas três proteínas regem, por meio do seu entrelaçamento e estabelecimento de um complexo heterotrimérico, o ancoramento e fusão vesicular com a membrana pré-sináptica, possibilitando a liberação regulada de neurotransmissor (WEBER *et al.*, 1998; revisado por SÜDHOF, 2004).

Por sua vez, a sinaptotagmina I é uma proteína integral de membrana da vesícula sináptica que funciona como sensor de Ca^{2+} . A presença do Ca^{2+} induz alterações conformacionais nas proteínas do complexo SNARE e conseqüente aproximação da membrana da vesícula com a membrana do terminal (CHAPMAN, 2008). Dados da literatura sugerem que a sinaptotagmina apresenta um papel fundamental no processo de fusão e sua interação com a SNAP-25 implicada na ancoragem das vesículas à zona ativa (CHIEREGATTI *et al.*, 2002; revisto por BECHERER & RETTIG, 2006). Vale mencionar que outras proteínas acessórias têm sido propostas por contribuírem para montagem e desmontagem do complexo SNARE, acelerando e otimizando o processo de fusão de vesículas sinápticas. Estas incluem as proteínas de vesícula sináptica Rab3a e sinaptofisina, juntamente com proteínas citosólicas α -SNAP e complexinas I e II (MORTON; FAULL; EDWARDSON, 2001), (RIZO & SUDHOF, 2002).

A perda pré-sináptica de proteínas SNAREs, bem como a diminuição da expressão de complexina II, tem sido descritas em outras doenças neurodegenerativas, como Doença de *Alzheimer* e esquizofrenia. Essas mudanças ocorrem em paralelo à neurodegeneração e provavelmente refletem na perda de sinapses, contribuindo para o desenvolvimento destas patologias (SHIMOHAMA *et al.*, 1997), (SUTTON *et al.*, 1998). Morton, Faull e Edwardson (2001) mostraram que camundongos R6/2, transgênicos para DH, também apresentam perda seletiva e progressiva destas proteínas, além de redução nos níveis de expressão de Rab3A,

sugerindo a importância desse complexo na fisiopatologia da DH através de alterações no mecanismo da neurotransmissão.

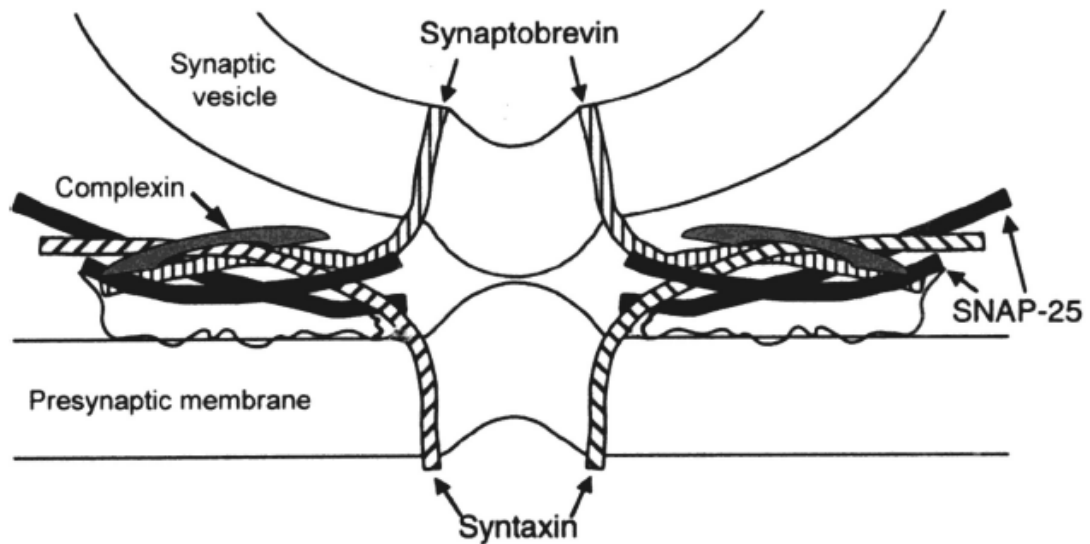


Figura 4: Modelo de formação do complexo SNARE. A sinaptobrevina e syntaxina são ancoradas por regiões transmembrana localizadas na bicamada lipídica da vesícula sináptica (acima) e da membrana pré-sináptica (abaixo), respectivamente. A SNAP-25 está ligada à membrana pré-sináptica por uma cadeia polipeptídica (indicada pela linha fina e ondulada). O complexo é estabilizado pela proteína acessória complexina que se liga sob a conformação de uma hélice para vedar o espaço entre a syntaxina e a sinaptobrevina. Os domínios citoplasmáticos da v-SNARE e t-SNAREs, regulados pela presença de Ca^{2+} , são responsáveis pela estreita aproximação entre a vesícula sináptica e a membrana pré-sináptica. A fusão iminente é sugerida pelo abaulamento das regiões das membranas vesicular e pré-sináptica (*Handbook of Clinical Neurology, third edition. Edited by ENGEL, 2009*).

1.4. Função da huntingtina sobre o ciclo de vesículas sinápticas

Muitos estudos têm identificado proteínas de interação com a htt a fim de entender sua função e seus efeitos patológicos. Dentre estas proteínas de ligação estão aquelas com função importante na regulação da transcrição gênica, no tráfego intracelular e na organização do citoesqueleto, sugerindo sua participação no transporte vesicular e função sináptica (LI & LI, 2004). Muitas das proteínas conhecidas por interagirem com a htt têm papéis importantes no processo de endocitose e exocitose de vesículas e algumas delas devem ser destacadas.

A complexina II participa da liberação de neurotransmissor por sua interação com o complexo SNARE. Outra proteína, a Rab3A, está envolvida na ancoragem, amadurecimento e exocitose de vesículas sinápticas. O mecanismo pelo qual esta proteína interage com a htt ainda não é claro, no entanto há evidências na literatura de que a DH é capaz de reduzir sua expressão. A sinapsina1 é descrita por regular a associação de vesículas sinápticas ao citoesqueleto através de sua fosforilação. É sugerido que a htt seja capaz de interferir neste processo. A HAP1 (proteína de associação à huntingtina) encontra-se ligada à dinactina e está envolvida no transporte axonal dependente de microtúbulo. Já a HIP1 (proteína de interação à huntingtina) é um ortólogo da proteína de levedura Sla2p, importante na montagem e função do citoesqueleto além de participar da endocitose em *Saccharomyces cerevisiae*. Vários estudos têm demonstrado que HIP1 se liga à clatrina e à α -adaptina podendo assim constituir um conjunto de proteínas envolvido na endocitose mediada por clatrina. Por fim, é proposto que a htt interage também com proteínas envolvidas no influxo de Ca^{2+} para o citosol, como exemplo a CSP (*cysteine string protein*). A CSP é uma chaperona presente nos terminais sinápticos e funciona como inibidor dos canais de Ca^{2+} do tipo N (LI & LI, 2004), (LI; PIOMANN; BRUNDIN, 2003), (Revisado por SMITH; BRUNDIN; LI, 2005) (Figura 6).

É importante ressaltar que diversas pesquisas têm demonstrado que a htt mutante pode comprometer estas interações proteicas, bem como alterar os níveis de proteínas acessórias envolvidas no processo de exocitose e endocitose de vesículas (ROZAS *et al.*, 2011), (STEINERT *et al.*, 2012). Sendo assim, é sugerido que a DH é capaz de alterar os componentes sinápticos e assim comprometer a neurotransmissão (SMITH; BRUNDIN; LI, 2005).

A maioria das investigações sobre a DH e outras doenças neurodegenerativas concentram-se em elucidar os mecanismos subjacentes à neurodegeneração e intervenções terapêuticas no

SNC. No entanto é claro que a disfunção neuronal e sináptica, ocorrida antes da morte das células nervosas, desempenha um papel importante na patogênese da doença.

Existem fortes evidências na literatura sobre as alterações provocadas pela htt mutante em neurônios do SNC, no entanto, os dados a respeito do que acontece em neurônios motores ainda são escassos. Uma vez que a DH é caracterizada principalmente por desordens motoras, é de suma importância conhecer os mecanismos celulares e moleculares subjacentes a esta doença no plano do sistema nervoso periférico. Desta forma, este trabalho pretende investigar eventos importantes na JNM, tanto em animais normais, quanto em camundongos BACHD^{Q97}, transgênicos para DH na idade de 3 meses, que corresponde ao início da doença quando comparado a um indivíduo adulto. Os resultados obtidos a partir deste estudo poderão contribuir para uma melhor compreensão dos aspectos relacionados à disfunção colinérgica envolvidos no comprometimento motor, podendo assim servir como subsídio para futuros estudos clínicos.

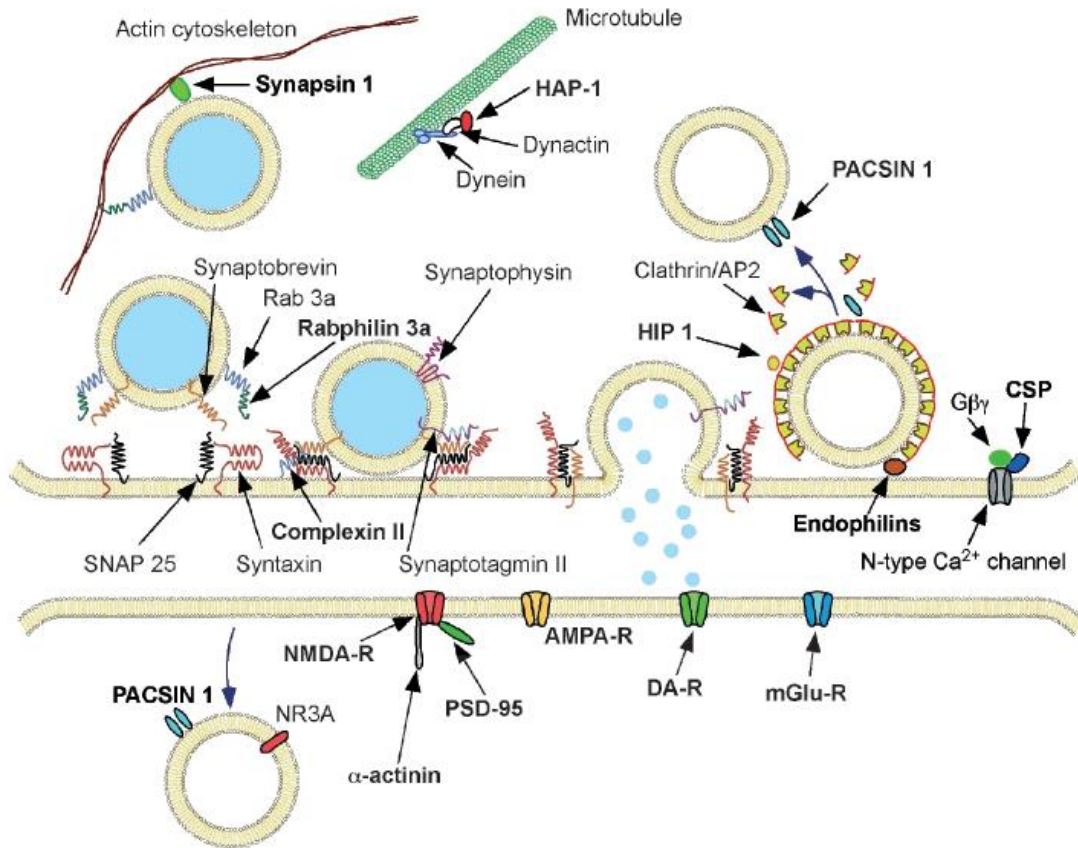


Figura 5: Desenho esquemático indicando a localização e o papel de diversas proteínas envolvidas na exocitose, endocitose e sinalização em modelo de sinapse. As proteínas em negrito mostraram-se envolvidas na DH segundo relatos prévios (SMITH; BRUNDIN; LI, 2005).

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar possíveis alterações morfofuncionais na junção neuromuscular de diafragma de camundongos BACHD^{Q97}, um modelo experimental para doença de Huntington.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar as possíveis alterações no processo de reciclagem de vesículas sinápticas em terminais motores pré-sinápticos de camundongos WT e BACHD^{Q97} na idade de três meses.
- Quantificar, no plano óptico, o número de elementos pré e pós-sinápticos em músculos diafragma de camundongos selvagens (WT) e transgênicos (BACHD^{Q97}) na idade de três meses.
- Realizar análise quantitativa da área dos elementos pré e pós-sinápticos de camundongos WT e BACHD^{Q97} na idade de três meses.
- Caracterizar, no plano ultraestrutural, possíveis alterações morfológicas em terminações nervosas motoras de músculo esquelético proveniente de camundongos WT e BACHD^{Q97} na idade de três meses.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Para a realização deste estudo foram utilizadas linhagens de camundongos FVB/NJ *wild-type* (WT) e FVB/N-Tg (BACHD^{Q97}), transgênicos para doença de Huntington, na idade de 3 meses e adquiridos no *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA). Os camundongos BACHD^{Q97} consistem em um modelo transgênico recém-desenvolvido para DH. Ele foi gerado a partir da micro-injeção de um cromossomo bacteriano artificial contendo o comprimento total da htt modificado, com 97 repetições de CAG. Estes animais demonstram semelhanças anatômicas e fisiológicas consistentes com o início da doença na idade adulta e tem sido considerado um novo e robusto paradigma *in vivo* para investigação da patogênese e tratamento da DH. Camundongos BACHD^{Q97} exibem, além de disfunção sináptica neuronal e neuropatologia de início tardio e seletivo, déficits motores progressivos que aparecem antes das alterações neuropatológicas detectáveis (GRAY *et al.*, 2008).

Os animais ficaram alojados na unidade de cuidado de animais do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG de acordo com as normas do CETEA-UFMG, sob a responsabilidade da Profa. Fabíola Mara Ribeiro, co-orientadora e colaboradora deste projeto.

3.2. Obtenção da junção neuromuscular de camundongo

Para este estudo foi dissecado o músculo diafragma dos camundongos, associado ao nervo frênico, responsável por sua inervação. O conjunto nervo-músculo foi seccionado em dois hemidiafragmas e estes foram montados em placas cobertas por gel de silicone Sylgard[®] e fixados com alfinetes entomológicos. As preparações foram mantidas em solução Ringer normal para camundongo contendo 135 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 12 mM de NaHCO₃, 1 mM de NaH₂PO₄, 11 mM de D-glicose e aeradas com uma mistura de 5% CO₂/ 95% O₂. O pH do meio foi corrigido para 7.4 com solução de HCl.

3.3. Monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas utilizando o marcador fluorescente FM1-43

A reciclagem de vesículas sinápticas é uma etapa importante do processo de neurotransmissão, sendo possível estudar a exocitose e endocitose compensatória de novas

vesículas através de marcadores fluorescentes vitais que são captados durante a endocitose e liberados durante a exocitose (LICHTMAN *et al.*, 1985; BETZ *et al.*, 1992; RIBCHESTER, *et al.*, 1994). O desenvolvimento de sondas fluorescentes para estudar a reciclagem de vesículas sinápticas revolucionou a maneira pela qual esse processo pode ser investigado por permitir a visualização de um mecanismo neuronal que por muito tempo vinha sendo inacessível (COUSIN & ROBINSON, 1999).

Marcadores do tipo FM, como o FM1-43, originalmente produzidos por Fei Mao, têm sido utilizados para marcar e então monitorar vesículas sinápticas, grânulos secretórios e outras estruturas endocíticas em uma variedade de preparações vivas (GAFFIELD & BETZ, 2006). A utilidade dos marcadores FM deve-se às suas características estruturais fundamentais: em primeiro lugar, as moléculas são anfipáticas e possuem uma cauda lipofílica ligada a uma cabeça carregada positivamente via ligações duplas, o que impede o marcador de atravessar livremente as membranas celulares, mantendo-o preso no interior de endossomas ou vesículas (Figura 5A). Por sua vez, o comprimento da cauda lipofílica determina a afinidade da molécula por membranas biológicas. A região central contém dois anéis aromáticos que criam o fluoróforo. Finalmente, o número de duplas ligações unindo a cabeça à cauda determina o espectro de fluorescência do marcador. Por exemplo, o FM1-43 tem uma dupla ligação e pode ser excitado no espectro da fluoresceína enquanto o FM4-64 apresenta 3 ligações duplas entre cabeça e cauda, sendo excitado no espectro da rodamina (BETZ, *et al.*, 1996),(BRUMBACK *et al.*, 2004).

Marcadores do tipo FM apresentam três propriedades que os tornam úteis para estudo do tráfego de vesículas: (1) se ligam reversivelmente à membrana celular. Desta forma, quando a sonda é aplicada à preparação, toda superfície de membrana exposta ao meio contendo FM torna-se marcada. Quando a preparação é lavada em meio desprovido de FM, as moléculas do marcador são removidas da superfície celular. (2) Moléculas de FM marcam seletivamente o folheto externo da bicamada lipídica. Isto possibilita que as vesículas em reciclagem capturem o marcador e o mantenham aprisionado em seu interior. Além disso, as moléculas de FM estão permanentemente carregadas, impedindo que elas se difundam através das membranas e se tornem livres no citoplasma. (3) Sondas do tipo FM são menos fluorescentes quando estão em ambiente aquoso, mas sua fluorescência aumenta aproximadamente 350 vezes quando estão agregadas ao ambiente hidrofóbico das membranas (BETZ *et al.*, 1996; BRUMBACK *et al.*, 2004). Portanto, em meio contendo FM1-43, após fusão e incorporação da membrana das vesículas à membrana da zona ativa durante a exocitose, a endocitose compensatória promoverá reciclagem dos grupos vesiculares com membrana marcada com FM de modo que

as vesículas recicladas apresentarão o marcador aprisionado em seu interior e aderido a sua membrana (Figura 6B). Isto possibilitará, após a lavagem do corante remanescente (Figura 6C), a visualização de aglomerados vesiculares marcados com a sonda em microscópio de fluorescência sob a forma de pontos fluorescentes.

Caso a preparação seja estimulada por algum agente que dispare a exocitose de vesículas, como por exemplo, o estímulo elétrico, ocorrerá uma nova etapa de liberação de neurotransmissores e exposição da sonda ao meio aquoso, possibilitando difusão do FM1-43 para a solução salina na qual se encontra a preparação (Figura 6D). Isso determinará redução do sinal fluorescente dos pontos que representavam os aglomerados vesiculares que continham o marcador (Figura 6E).

Em neurônios, ciclos de exo e endocitose são controlados por atividade elétrica. Marcação e desmarcação de terminais nervosos livres com marcadores fluorescentes, tais como o FM1-43, acontece de modo atividade-dependente e permite estudar mecanismos de liberação de neurotransmissores, tais como reciclagem de vesículas sinápticas, exocitose e endocitose (BETZ *et al.*, 1996; COCHILLA *et al.*, 1999).

De uma maneira sucinta, após a obtenção de uma preparação neuromuscular devidamente alocada em solução contendo marcador, aplica-se um estímulo que evoca a exocitose das vesículas sinápticas. Estas então liberam seu conteúdo no meio extracelular e ocorre a exposição da face luminal da membrana para o meio durante a exocitose. O corante então se liga ao folheto externo da membrana das vesículas e é internalizado durante endocitose compensatória. Em seguida, o meio externo é lavado, retirando-se o excesso de marcador que não foi endocitado e permaneceu ligado externamente à membrana do terminal axonal. Posteriormente, a preparação é examinada por microscopia de fluorescência permitindo a visualização das estruturas endocitadas marcadas, sob a forma de aglomerados vesiculares. Após um novo estímulo despolarizante, as vesículas marcadas com FM1-43 sofrem exocitose e como o corante se liga de uma maneira reversível à bicamada lipídica, ele é liberado para a fenda sináptica juntamente com o conteúdo vesicular.

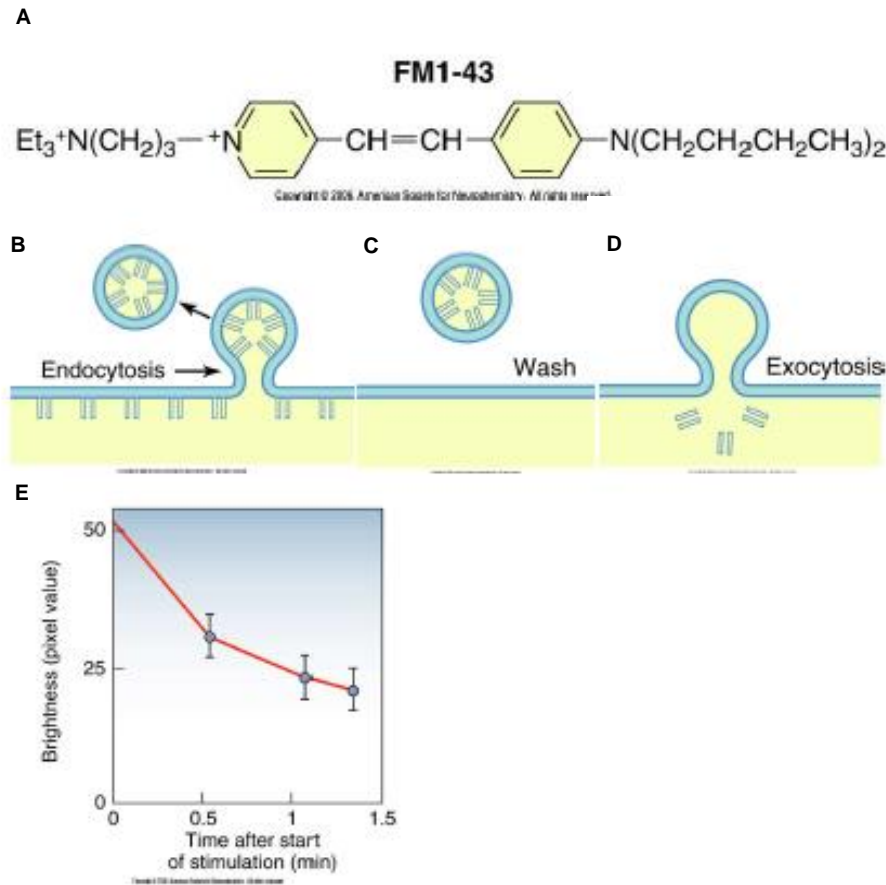


Figura 6: O marcador fluorescente FM1-43 é utilizado para monitoramento dos passos de endocitose e exocitose de vesículas sinápticas em neurônios. **(A)** A estrutura química da sonda fluorescente FM1-43. **(B)** Marcação da membrana da terminação pré-sináptica com o FM1-43 adicionado à solução salina. O neurônio foi estimulado eletricamente na presença de FM1-43. Notar que a membrana que originou uma nova vesícula sináptica está marcada com a sonda. **(C)** Uma breve lavagem remove as moléculas de FM que não foram internalizadas. **(D)** Um segundo ciclo de exocitose induzido por estímulo elétrico resulta na liberação da sonda que foi internalizada durante a endocitose. **(E)** Declínio da fluorescência da sonda FM1-43 durante exocitose de vesículas induzida por estímulo elétrico. Essa perda de fluorescência resulta da passagem da sonda de um meio hidrofóbico (membrana da vesícula sináptica) para um meio aquoso (solução salina) durante a exocitose (*Basic Neurochemistry, seventh edition. Edited by SIEGEL et al., 2006*).

3.4. Marcação e desmarcação de vesículas sinápticas com FM1-43 em junção neuromuscular de camundongo

As preparações neuromusculares foram estimuladas através da aplicação de uma solução salina contendo alta concentração de potássio (60mM KCl), na presença da sonda vital FM1-43 (4 μ M), durante 10 minutos. O FM1-43 foi usado para marcar o aglomerado de reciclagem de vesículas sinápticas (BETZ *et. al.*, 1992). Após a estimulação, a preparação foi mantida em repouso por 10 minutos em meio contendo FM1-43 para garantir a captação do marcador durante endocitose compensatória. Em seguida, a preparação foi lavada em meio Ringer desprovido de FM1-43, por no mínimo, 20 minutos para que o excesso de marcador aderido à membrana do terminal sináptico e à membrana da célula muscular fosse removido, permitindo melhor visualização dos grupamentos vesiculares contendo FM1-43 nas terminações axonais. Após a lavagem do excesso de sonda, as vesículas endocitadas foram desmarcadas através de uma segunda etapa de estimulação (BETZ & BEWICK, 1992). As preparações foram incubadas na presença de *d*-tubocurarina (16 μ M) para evitar contrações musculares durante todo o procedimento experimental. Para cada animal nós utilizamos apenas uma terminação pré-sináptica para acompanhamento do processo de desmarcação (exocitose).

3.5. Marcação com FM1-43 fx e α -bungarotoxina em junção neuromuscular de camundongo

Após a dissecação o conjunto nervo-músculo foi marcado com α -bungarotoxina – Alexa Fluor 594 na concentração de 12 μ M (BETZ *et al.*, 1992), por 20 minutos, a fim de visualizarmos os aglomerados de receptores nicotínicos para acetilcolina na membrana pós-sináptica. Durante estimulação com solução Ringer contendo alta concentração de potássio (60 mM KCl), as vesículas sinápticas em reciclagem foram marcadas com a sonda fluorescente FM1-43 fx (análogo fixável do FM1-43), na concentração de 8 μ M, por 10 minutos (BETZ *et al.*, 1992). Após a estimulação, a preparação foi mantida em repouso por 10 minutos para garantir a captação máxima de FM1-43 fx durante endocitose compensatória. O excesso de FM1-43 fx, aderido à membrana do terminal sináptico e à membrana da célula muscular, foi removido durante um período de lavagem da preparação. A lavagem foi realizada em Ringer contendo Advasep-7 (1mM) e isento de marcador por 15 minutos. As preparações foram fixadas em paraformaldeído a 4% por no mínimo 50 minutos. Após a fixação, os músculos foram lavados com glicina em tampão fosfato (0,1 M) para redução do

sinal fluorescente do fixador. Finalmente, os músculos foram seccionados em dois hemidiafragmas e montados em lâmina de vidro usando o meio de montagem ProLong® Gold (*Invitrogen, SP, Brazil*).

3.6. Análise ultraestrutural de terminações motoras periféricas

Para os experimentos de caracterização das JMN's de diafragma os camundongos WT e BACHD^{Q97} foram destinados a experimentos de microscopia eletrônica de transmissão. Para examinar diferenças morfológicas no plano ultraestrutural, as preparações neuromusculares foram fixadas em solução recém preparada de paraformaldeído 4,0%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M (pH 7.4) (solução de *Karnovsky* modificada), overnight à 4° C. Após fixados os músculos foram recortados em fragmentos de cerca de 3 mm de comprimento, próximos à ramificação principal do nervo frênico e lavados com solução tampão cacodilato 0,1M. Em seguida os fragmentos de tecido foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0.1M (pH 7.4) por 90 minutos a 4 °C. Ferrocianeto de potássio foi adicionado a esta solução na concentração 1,6% (solução de tetróxido de ósmio reduzido). Os fragmentos de tecido foram lavados em solução tampão cacodilato 0.1M contendo cloreto de Ca²⁺ 0,05% (pH 7.4) em três banhos de 10 minutos à temperatura ambiente seguido da contrastação “em bloco” por imersão em acetato de uranila 2,0% overnight à 4° C. A etapa seguinte consistiu em lavagem dos fragmentos com água deionizada por 10 minutos em temperatura ambiente e desidratação em uma série ascendente de etanol (35, 50, 70, 85, 95 e 100%) e acetona absoluta à temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada uma pré-infiltração em resina epon diluída em acetona, nas respectivas proporções: 1:2, 1:1 e 2:1, na ausência do polimerizador. Por fim, os fragmentos foram infiltrados em resina epon, contendo o polimerizador DMP-30, por no mínimo 2 horas à temperatura ambiente, 1 hora em estufa de 40° C e 48 horas em estufa de 60° C. Após a polimerização dos blocos de resina contendo os fragmentos do tecido foi realizada a microtomia com navalha de vidro (cortes semifinos de 300 nm) para seleção das áreas de interesse e, em seguida, a ultra-microtomia com navalha de diamante (cortes ultrafinos de 50 nm) apenas da região selecionada. Os cortes foram montados em grades de cobre de 200 ou 300 *mesh* e contrastados com citrato de chumbo (solução de *Reynolds*) para posterior visualização.

3.7. Obtenção de imagens através de microscopia de fluorescência

As imagens dos terminais nervosos marcados com FM1-43 foram obtidas com o auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica DM2500®) acoplado a uma câmera leica DFC 345FX utilizando-se objetivas de imersão em água (63x com abertura numérica de 0,95). As imagens coletadas pela câmera foram processadas e visualizadas em microcomputador utilizando-se o programa *Leica Application Suite* (LAS), para o acompanhamento das etapas de marcação e desmarcação das junções neuromusculares. A luz utilizada para iluminar a preparação foi obtida através de uma lâmpada de mercúrio e foram utilizados filtros de 505/530 nm para seleção do espectro da fluoresceína, adequado à excitação do marcador FM1-43. Todas as variáveis de ajuste da imagem como, por exemplo, tempo de exposição e *binning* foram mantidas constantes para imagens obtidas num mesmo experimento.

3.8. Obtenção de imagens através de microscopia confocal

Os músculos foram examinados através de um microscópio confocal de escaneamento a laser (Zeiss LSM 510META - localizado no CEMEL ICB/UFMG), utilizando uma objetiva de imersão em óleo (40x) para quantificação dos elementos pré e pós-sinápticos. A luz de excitação partiu de um laser de Argônio, com comprimento de onda de 488 nm e, também, de um laser Hélio-Neônio, com comprimento de onda de 543 nm. O espectro da fluorescência emitida foi de 510 – 620 nm para o FM1-43 fx e, de 610 – 680 nm para a α -bungarotoxina – Alexa Fluor 594. As secções ópticas foram coletadas em intervalos de 2,0 μ m. Durante a aquisição de imagens foi realizada a varredura completa de um dos hemidiafragmas.

3.9. Obtenção de imagens através de microscopia eletrônica de transmissão

A aquisição das fotografias digitais dos cortes ultrafinos foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai-G2-Spirit-FEI/Quanta, com voltagem de aceleração de 120 kV do Centro de Microscopia da UFMG e microscópio eletrônico de transmissão Zeiss-EM10 do Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) – UFMG.

3.10. Análise estatística

A análise das imagens obtidas através da microscopia de fluorescência convencional e a mensuração dos níveis de fluorescência foi realizada utilizando-se os programas ImageJ e Microsoft Excel®. Estes dois programas também foram utilizados na análise das imagens obtidas através da microscopia confocal e na quantificação do número e área dos elementos pré e pós-sinápticos. Os elementos sinápticos foram circulos em sua totalidade para mensuração da área. A densidade de junções foi determinada pela relação entre o número de elementos sinápticos analisados dividido pela área total em mm^2 . As imagens de JNM obtidas através de microscópio confocal também foram submetidas à análise da intensidade do sinal fluorescente para ambos os genótipos através da definição de um valor limiar para análise entre 40 e 255 níveis de cinza utilizando o programa ImageJ. Elementos sinápticos que apresentaram estes níveis de fluorescência foram circulos e através do programa a intensidade de fluorescência foi medida em pixel. Os dados obtidos foram normalizados percentualmente e convertidos em representações gráficas através do programa GraphPad Prisma 4.0.

A análise das imagens de microscopia eletrônica de transmissão e a mensuração dos terminais nervosos, assim como a quantificação das vesículas sinápticas, foram realizadas utilizando-se os programas Image J e Microsoft Excel®. A densidade total de vesículas sinápticas foi calculada pela relação número de vesículas pela área do terminal (BECHERER *et al.*, 2001).

A análise estatística das imagens foi realizada pela aplicação do teste-t de Student. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Elementos pré-sinápticos de músculo diafragma BACHD^{Q97} não apresentam diferenças significativas quando comparados aos WT

Neste trabalho investigamos inicialmente se JNMs de diafragma de animais BACHD^{Q97} apresentavam comprometimento no processo de reciclagem de vesículas sinápticas.

Para realização deste estudo, terminações nervosas motoras de camundongos WT e BACHD^{Q97} foram marcadas com FM1-43 por meio da aplicação de um estímulo despolarizante³ sobre a preparação neuromuscular de diafragma, em meio contendo o corante fluorescente. A figura 7A mostra as imagens representativas de terminações axonais marcadas e visualizadas ao microscópio óptico de fluorescência. Nota-se que os terminais sinápticos apresentaram um padrão característico de pontos fluorescentes dispostos em formato arborizado. Cada ponto representa aglomerados de vesículas sinápticas que, após o estímulo e consequente liberação vesicular, internalizaram o marcador FM1-43 durante a endocitose compensatória.

A taxa de marcação, ou endocitose vesicular, foi avaliada através da análise de intensidade de fluorescência de diversos terminais pré-sinápticos para cada um dos animais estudados. É interessante observar que aglomerados vesiculares de terminais motores dos animais BACHD^{Q97} apresentaram-se menos fluorescentes quando comparados aos de animais WT, no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa, conforme pode ser visto na figura 7B, onde $p=0,0545$.

A fim de avaliar possíveis alterações morfológicas em terminações motoras de animais BACHD^{Q97} que pudessem comprometer a endocitose e exocitose de vesículas, foi mensurada a área de diversos elementos pré-sinápticos correspondentes a cada grupo experimental. A figura 7C mostra que não houve diferença significativa entre as áreas dos terminais sinápticos de animais selvagens e transgênicos para DH.

A análise destes dados sugere que, mesmo não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, existe um indicativo de que o processo de endocitose de vesículas sinápticas possa estar comprometido nos animais transgênicos para DH. Para que esta hipótese fosse investigada foi necessária uma análise mais detalhada dos elementos sinápticos utilizando a microscopia confocal.

³ Ringer contendo alta concentração de KCl 60 mM

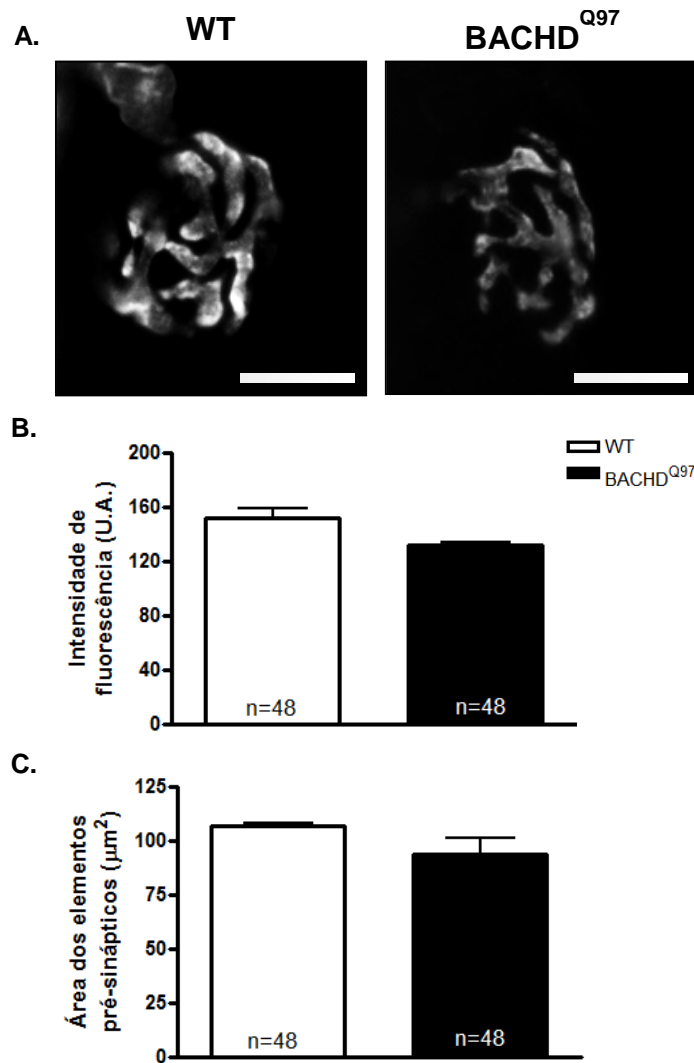


Figura 7: Terminais motores de WT e BACHD^{Q97} marcados com FM1-43 durante a endocitose de vesículas sinápticas. **(A)** Imagens representativas de terminações axonais de músculo diafragma de animais WT e BACHD^{Q97}, marcadas com FM1-43 e visualizadas ao microscópio óptico de fluorescência. **(B)** Gráfico representativo comparando a intensidade do sinal fluorescente dos elementos pré-sinápticos entre camundongos WT (barra branca) e BACHD^{Q97} (barra preta), $p=0,0545$. **(C)** Gráfico representativo comparando a área dos terminais pré-sinápticos entre os dois grupos experimentais, $p=0,1327$. As barras representam a média \pm EPM de oito experimentos independentes e um total de 48 terminais analisados para cada grupo de animais. $n=4$. Barra de escala=10 μm .

4.2. Elementos pré e pós-sinápticos de músculo diafragma BACHD^{Q97} apresentam-se alterados em imagens de microscopia confocal

Com o objetivo de verificar se os elementos pré e pós sinápticos de JNMs de diafragma encontravam-se alterados em animais BACHD^{Q97}, podendo assim refletir em disfunção sináptica nestes animais, foi realizada uma análise mais detalhada utilizando a microscopia confocal. Esta técnica permite analisar uma área maior de cada músculo bem como quantificar os níveis de fluorescência de um número maior de terminais nervosos.

Terminais pré-sinápticos de JNMs foram então marcados com FM1-43fx (8 μ M) e os aglomerados de receptores nicotínicos pós-sinápticos foram evidenciados com α -bungarotoxina conjugada a Alexa Fluor 594 (12 μ M).

A figura 8A corresponde a imagens representativas dos elementos sinápticos de animais WT (painel superior) e BACHD^{Q97} (painel inferior). Em verde, são mostrados terminais pré-sinápticos marcados com a sonda fluorescente FM1-43fx, em vermelho os elementos pós-sinápticos marcados com a α -bungarotoxina, e em amarelo está representada a sobreposição das duas marcações. Nossas imagens sugerem que existe alteração no padrão de distribuição dos elementos pré e pós-sinápticos. Camundongos BACHD^{Q97} apresentaram leve dispersão no padrão de alinhamento desses elementos ao passo que os WT mostraram um padrão esperado de distribuição.

Nota-se que os elementos pré e pós-sinápticos de animais BACHD^{Q97} apresentaram-se menos fluorescentes quando comparados aos de animais WT e esta diferença foi estatisticamente significativa, conforme pode ser visto na figura 8B. A figura 8C mostra um gráfico representativo comparando o número de elementos sinápticos encontrados, por hemidiafragma, em animais selvagens e transgênicos. O número de elementos, tanto pré quanto pós-sinápticos, foi estatisticamente menor nos camundongos BACHD^{Q97}. De acordo com a figura 8D, não houve diferença significativa entre as áreas dos elementos sinápticos de animais selvagens e transgênicos para DH. A área total analisada no músculo foi a mesma para animais WT e BACHD^{Q97} conforme pode ser visto pelo gráfico representado na figura 8E. A densidade de elementos sinápticos foi avaliada através da quantificação do número de elementos sinápticos dividida pela área total ocupada por estes para cada um dos animais estudados. O gráfico da figura 8F comparou a densidade dos elementos sinápticos nos animais WT e BACHD^{Q97}. Pode-se observar que a densidade dos elementos sinápticos foi menor nos animais transgênicos para DH, sendo que esta diferença foi estatisticamente significativa tanto para elementos pré quanto pós-sinápticos.

Estes resultados sugerem que a DH pode comprometer o processo de reciclagem de vesículas, bem como promover alterações em receptores pós-sinápticos para acetilcolina.

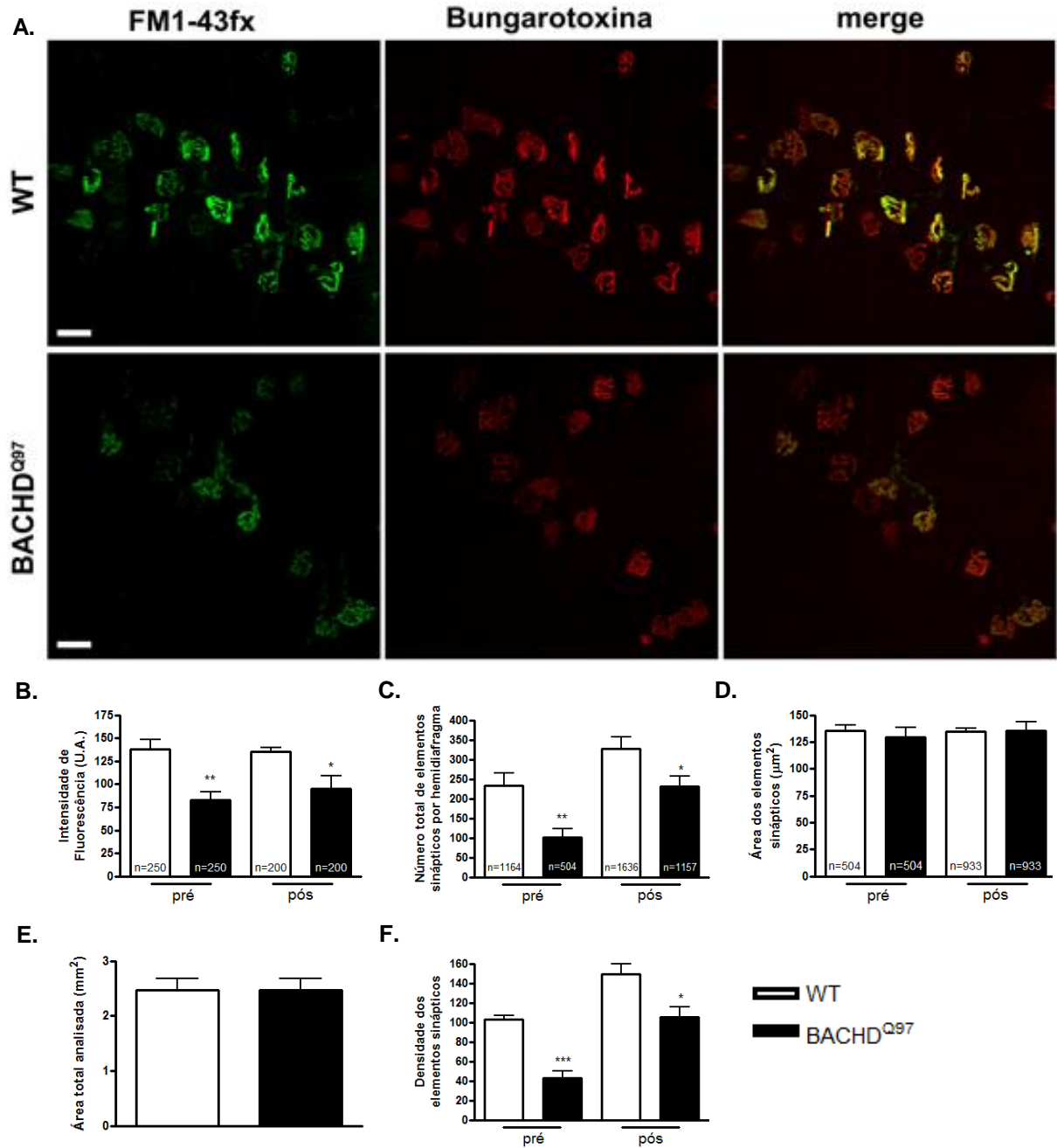


Figura 8: Alterações dos elementos sinápticos de JNMs de animais BACHD^{Q97} vistos por microscopia confocal. (A) Imagens representativas dos elementos pré (verde) e pós-sinápticos (vermelho) de JNMs de músculo diafragma de animais WT (painel superior) e BACHD^{Q97} (painel inferior). Em amarelo está representada a colocalização de ambos os elementos. (B) Gráfico representativo comparando a intensidade de fluorescência dos elementos pré e pós-sinápticos em camundongos WT (barra branca) e BACHD^{Q97} (barra preta). As barras representam a média de 250 elementos mais fluorescentes encontrados para ambos os genótipos. (C) Gráfico representando a média do número de elementos pré e pós-sinápticos contados por hemidiafragma em cada grupo de animais. (D) Gráfico representativo comparando a área dos elementos sinápticos entre animais WT e BACHD^{Q97}. Para a medida da área, foi analisado o mesmo número de elementos sinápticos para cada grupo. (E) A área total analisada foi a mesma para ambos os grupos experimentais. (F) Gráfico comparando a densidade dos elementos sinápticos em animais selvagens e transgênicos. As barras representam a média \pm EPM de três experimentos independentes para cada genótipo. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$). Barra de escala = 10 μm .

4.3. Animais BACHD^{Q97} apresentam alterações no processo de exocitose de vesículas sinápticas

Diante das alterações encontradas nos elementos sinápticos em camundongos BACHD^{Q97} que podem, de alguma forma, refletir um comprometimento no processo de endocitose vesicular, nos perguntamos se poderia haver também alterações na exocitose de vesículas sinápticas. Com o objetivo de responder esta questão, terminais previamente marcados com o FM1-43 passaram por uma segunda etapa de estimulação onde foi possível medir a perda de fluorescência dos terminais nervosos. Essa variação entre fluorescência inicial e final corresponde à exocitose de vesículas sinápticas, consequente liberação do neurotransmissor e, juntamente com ele, a liberação da sonda fluorescente para o meio extracelular. Vale mencionar que o FM1-43, ao passar para o meio externo isento de marcador, dissocia-se da membrana da vesícula devido à diferença em seu gradiente de concentração e assim, por ser menos fluorescente em meio hidrofílico, ele sofre perda do sinal fluorescente permitindo a visualização da exocitose vesicular.

O marcador fluorescente FM1-43, quando exposto prolongadamente à luz polarizada, apresenta redução da intensidade do sinal fluorescente, fenômeno conhecido como fotodesmarcação (*photobleaching*). Para mensuração dos níveis de fotodesmarcação, terminações marcadas com FM1-43 foram submetidas à luz polarizada em intervalos de tempo de 0, 1, 3, 5 e 7 minutos, sendo o tempo de exposição equivalente ao tempo de obtenção das imagens, conforme pode ser visto na figura 9A.

Para mensuração dos níveis de desmarcação/exocitose, após a obtenção de imagens iniciais no tempo 0 minuto, as terminações marcadas com FM1-43 de animais WT e BACHD^{Q97} foram expostas ao estímulo despolarizante⁴ capaz de induzir a exocitose de vesículas sinápticas. As figuras 9B e 9C mostram imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes e ao longo de 7 minutos após a aplicação do estímulo, para animais WT e BACHD^{Q97} respectivamente. Pode-se observar que a queda do sinal fluorescente em terminais nervosos de animais WT foi maior quando comparada com a dos animais BACHD^{Q97}, conforme está representado na curva de desmarcação apresentada na figura 9D. De acordo com o gráfico representativo da figura 9E, enquanto JNMs de camundongos selvagens apresentaram uma taxa de desmarcação de aproximadamente 40%, terminações axonais de animais transgênicos perderam apenas 20% do sinal fluorescente. Estes dados indicam que nos terminais motores de BACHD^{Q97} um menor número de vesículas sinápticas, que

⁴ Ringer contendo alta concentração de KCl

continham o marcador fluorescente em seu interior, sofreram exocitose quando comparados aos WT. É importante ressaltar que as curvas de fotodesmarcação, respectivas para cada grupo estudado foram utilizadas como controle para todos os experimentos.

A análise destes resultados sugere que a huntingtina mutante pode, de alguma forma, comprometer a exocitose de vesículas sinápticas em terminais motores de animais BACHD^{Q97}, comprometendo a neurotransmissão justificando assim a presença e/ou agravamento de sintomas motores presentes da DH.

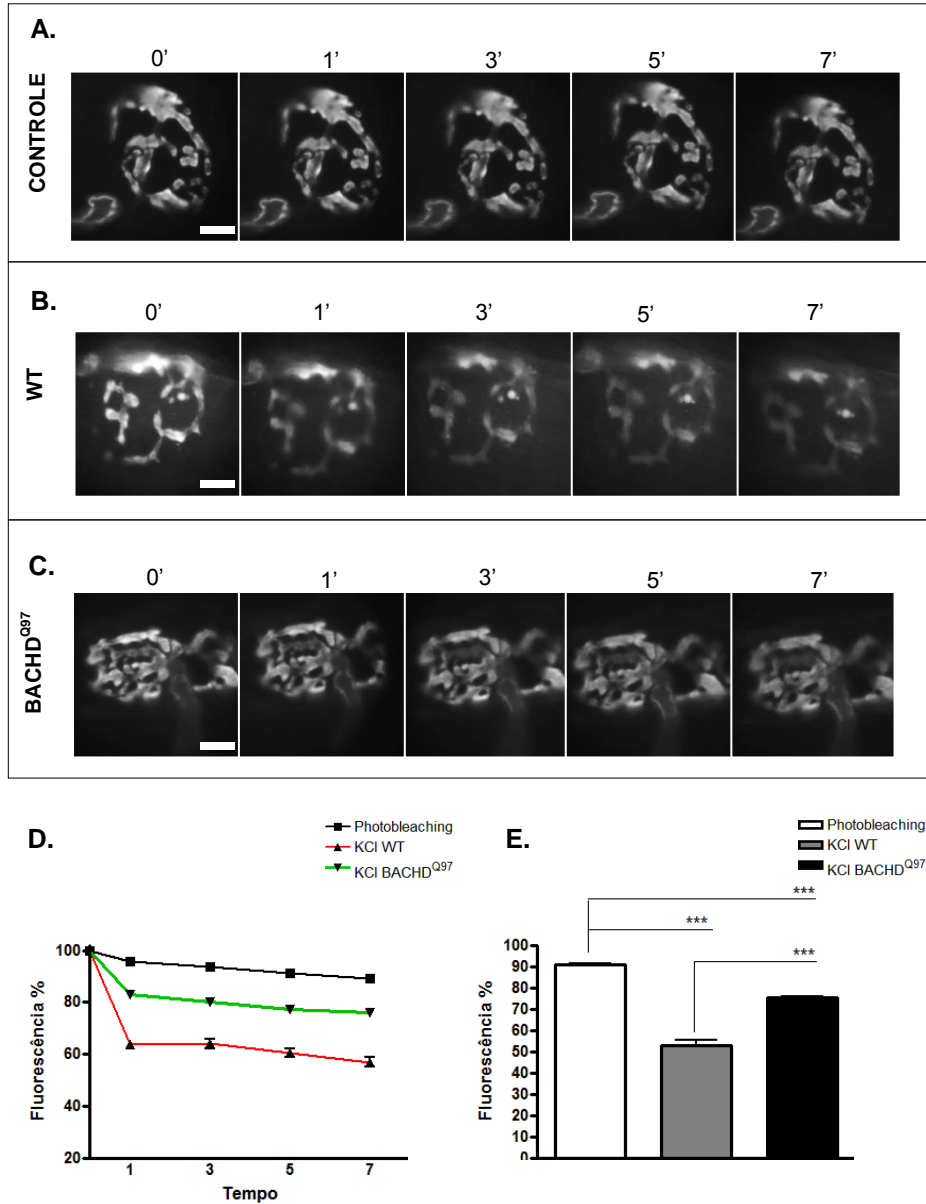


Figura 9: Alteração na exocitose de vesículas sinápticas em animais BACHD^{Q97}. **(A)** Imagens representativas de terminal axonal marcado com FM1-43 em Ringer normal no início do experimento (tempo 0') e após 1', 3', 5' e 7' de exposição à luz polarizada. **(B)** Imagens representativas da redução do sinal fluorescente em terminal motor de animal WT no tempo 0' e acompanhada durante 7' após a aplicação do estímulo despolarizante. **(C)** Imagens representativas da redução do sinal fluorescente em terminal motor de animal BACHD^{Q97} no tempo 0' e acompanhada durante 7', após a aplicação do estímulo despolarizante. **(D)** Curva representando o decaimento do sinal fluorescente ao longo de 7', após a exposição ao estímulo despolarizante em animais WT (vermelho) e BACHD^{Q97} (verde). Em preto está representada a curva controle (fotodesmarcação). **(E)** Gráfico representativo mostrando a quantificação da exocitose evocada por estímulo após 7' de exposição em animais WT (cinza) e BACHD^{Q97} (preto). A barra branca representa a fotodesmarcação. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Utilizamos um terminal nervoso de cada animal, sendo que para cada grupo experimental contamos com n=3 animais. Os resultados expressam a média ± EPM de 15 pontos fluorescentes para cada grupo experimental. (***) p<0,0001. Barra de escala=10 μm.

4.4. Elementos sinápticos de JNM de diafragma BACHD^{Q97} não apresentam alterações no plano ultraestrutural

Uma vez observado um possível comprometimento pré e pós-sináptico nas JNMs de animais BACHD^{Q97}, que refletem em alteração no processo de reciclagem de vesículas sinápticas, buscou-se investigar se existem alterações, no plano ultraestrutural, em termos de morfologia, número de vesículas, área do terminal pré-sináptico, comprimento das dobras pós-juncionais, dentre outros parâmetros que não podem ser analisados através da microscopia óptica de fluorescência.

Nossos resultados mostraram que os elementos sinápticos das JNM de camundongos BACHD^{Q97} apresentam morfologia ultraestrutural geral semelhante aos dos animais WT, conforme pode ser visto na figura 10A. Entretanto, em maior aumento, após uma avaliação qualitativa, nota-se que os animais transgênicos tendem a apresentar leve alteração na forma e tamanho das vesículas sinápticas. De acordo com o gráfico apresentado nas figuras 10B não existiu diferença na área de superfície de terminais nervosos encontrados entre os camundongos WT e BACHD^{Q97}. As figuras 10C e 10D mostraram que não houve diferença significativa em relação ao número de vesículas por μm^2 de terminal bem como número de mitocôndrias por μm^2 entre os grupos estudados. Nós também mensuramos o comprimento das dobras juncionais pós-sinápticas, considerando possíveis alterações compensatórias da célula muscular em decorrência do comprometimento sináptico. Apesar de animais BACHD^{Q97} apresentarem uma tendência à diminuição no comprimento das dobras ($p=0,1897$) essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 10E).

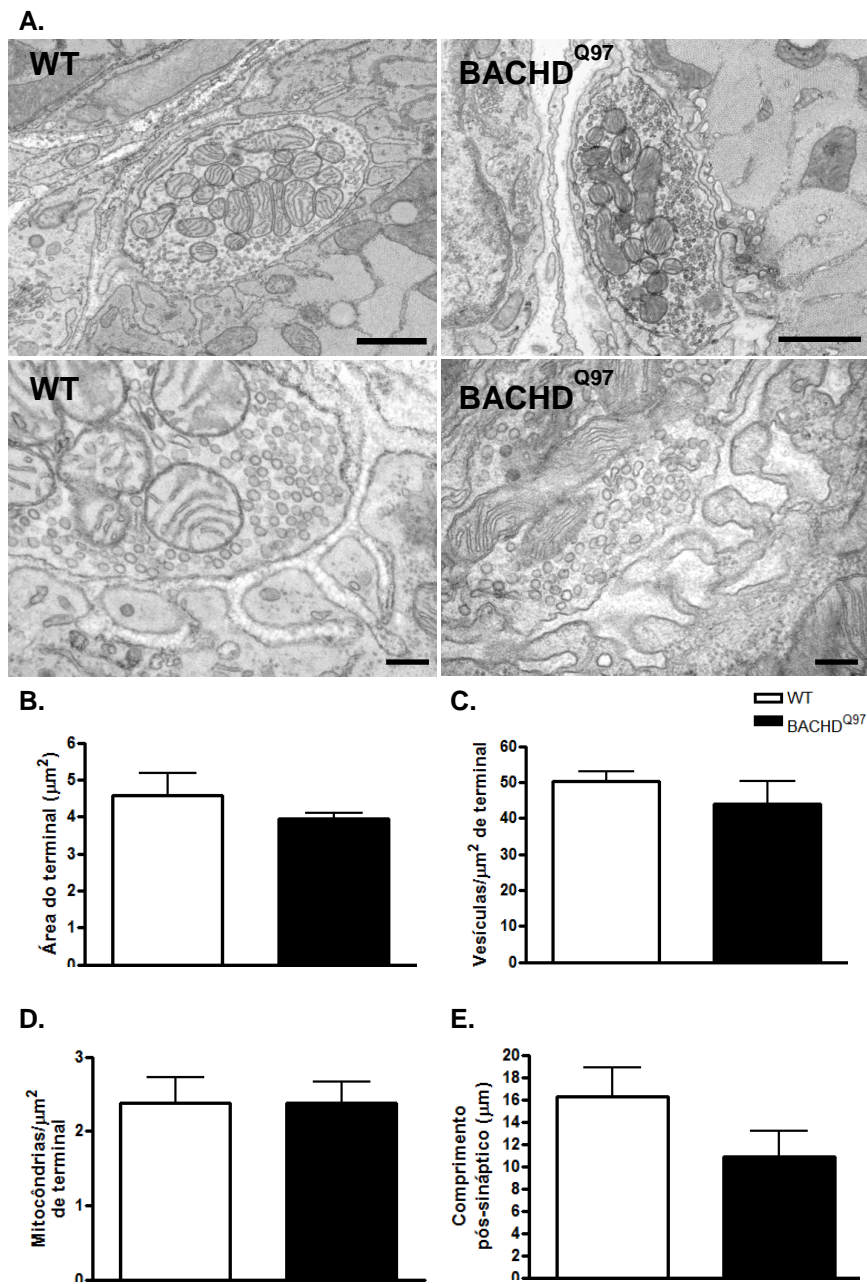


Figura 10: Análise ultraestrutural de JNM de camundongos WT e BACHD^{Q97}. **(A)** Imagens representativas da JNM de camundongos WT e BACHD^{Q97}. **(B)** Gráfico representativo comparando a área dos terminais sinápticos entre os grupos estudados ($p=0,3668$). **(C)** Gráfico representando a média do número de vesículas sinápticas encontradas por μm^2 de terminal nervoso em cada grupo de animais. **(D)** Gráfico representando a média do número de mitocôndrias encontradas por μm^2 de terminal nervoso em camundongos WT e BACHD^{Q97}. **(E)** Gráfico representativo comparando o comprimento das dobras juncionais pós-sinápticas entre animais selvagens e transgênicos ($p=0,1897$). Foram analisados 20 terminais nervosos para cada grupo experimental. As barras representam a média \pm EPM de, no mínimo, seis experimentos independentes. $n=3$. Barra de escala=10 μm . Barra de escala=200nm.

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

A DH é um transtorno neurodegenerativo progressivo fatal, cujos sintomas são graves e incluem déficits cognitivos, psiquiátricos e motores. Até o momento não existe cura, no entanto, grandes progressos têm sido feitos a fim de compreender os mecanismos fisiopatológicos que envolvem esta doença (REDDY & SHIRENDEB, 2012). Segundo Raymond *et al.*, (2012), o uso de modelos animais têm sido fundamental para elucidar a progressão das alterações comportamentais e fisiológicas que, até então, não tinha sido possível utilizando modelos de neurotoxinas clássicos.

Estudos envolvendo modelos experimentais têm corroborado com os aspectos neuropatológicos da DH, em especial, por perda neuronal em regiões do córtex e estriado. No entanto, o globo pálido, o tálamo, o hipotálamo, o núcleo subtalâmico, a substância negra e cerebelo também são afetados (revisado por RAYMOND *et al.*, 2012).

Apesar dos esforços realizados para esclarecer os mecanismos pelos quais a htt mutante leva à DH no SNC, não foi possível, até o momento, elucidar completamente os mecanismos celulares e moleculares da doença no nível periférico. É sabido que disfunções sinápticas envolvendo a JNM podem contribuir para o desenvolvimento de inúmeras desordens motoras tais como, Spinal muscular atrophy (SMA), Myotonic Distrophy and Myasthenia Gravis (FINSTERER *et al.*, 2011). Sendo assim, é fundamental compreender como a htt mutante atua nesta estrutura, uma vez que os distúrbios relacionados ao movimento na DH podem envolver uma neuropatologia periférica (RIBCHESTER *et al.*, 2004).

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar possíveis alterações morfofuncionais na JNM de diafragma de camundongos BACHD^{Q97}, que pudessem também, comprometer a neurotransmissão periférica e assim agravar os sintomas motores característicos da doença.

Existem fortes evidências de doenças sinápticas envolvendo o SNC de modelos transgênicos usados para o estudo da DH. Spanpanato *et al.*, (2008) investigaram a progressão das alterações sinápticas em células piramidais e interneurônios do córtex motor superficial em camundongos BACHD. Este grupo demonstrou que as alterações sinápticas foram detectadas já aos três meses de idade nestes animais e aos seis meses estes exibiram alterações progressivas, sob a forma de excitação cortical reduzida e perda de inibição em células piramidais, sugerindo que mudanças no circuito cortical superficial podem contribuir para o declínio da função motora em animais transgênicos para DH.

Smith *et al.*, (2006) relataram que a transmissão colinérgica é afetada em modelo de camundongo R6/2, transgênico para DH, e em tecidos de pacientes com a doença, uma vez que encontraram níveis reduzidos da proteína VACHT e de ChAT, bem como redução da atividade de AChE em regiões do córtex e estriado

Farrar, Callahan e Abercrombie (2011) foram os primeiros a demonstrar que a liberação de ACh é reduzida em animais transgênicos para DH previamente treinados e que apresentaram, de fato, comprometimento das funções motoras. A regulação da liberação da ACh estriatal por mecanismos dopaminérgicos tem sido tema de grande interesse em pesquisas, particularmente no que diz respeito à fisiopatologia da Doença de Parkinson. É sugerido que esta regulação é largamente inibitória, ou seja, a ativação de receptores D2 expressos em células estriatais colinérgicas inibe diretamente a liberação de ACh. A partir disso, este grupo observou também redução nos níveis basais de dopamina extracelular do estriado. Este dado foi consistente com vários outros estudos que relataram função reduzida da dopamina nigroestriatal em modelos de camundongos transgênicos para DH (PETERSEN *et al.*, 2002), (JOHNSON *et al.*, 2006), (CALLAHAN & ABERCROMBIE, 2011), (ORTIZ *et al.*, 2011).

Yuen *et al.*, (2012) encontraram também que a transmissão sináptica mediada por receptores GABA_A é significativamente comprometida em modelo de camundongo transgênicos para DH.

Shirendeb *et al.*, (2012) mostraram recentemente que a interação da htt mutante com a proteína mitocondrial Drp1 em cérebros post-mortem e cultura de células primárias de camundongos BACHD, causa excessiva fragmentação mitocondrial que leva ao defeito no transporte axonal e distribuição mitocondrial anormal, particularmente em neuritos e regiões de sinapses.

Em geral, estudos recentes de transporte e dinâmica mitocondrial, expressão de proteínas sinápticas, liberação de neurotransmissores, além de estudos anteriores, indicam que o dano sináptico é um evento precoce no processo da doença e pode estar ligado a htt mutante e distribuição anormal de mitocôndria nas sinapses de em DH (REDDY & SHIRENDEB, 2012).

Nessa perspectiva, terminações motoras de camundongos WT e BACHD^{Q97} foram inicialmente marcadas com a sonda fluorescente FM1-43 a fim de verificar se animais transgênicos apresentavam comprometimento no processo de reciclagem de vesículas sinápticas. A molécula de FM1-43 é anfipática e apresenta afinidade pela membrana celular graças a sua cauda hidrofóbica, possibilitando que o marcador seja captado pelas vesículas

durante a endocitose e que aglomerados vesiculares contendo o marcador sejam visualizados em microscópio de fluorescência (BETZ *et al.*, 1996).

Para mensuração dos níveis de marcação foram analisadas pelo menos dez terminações motoras marcadas com FM1-43 em cada par de animais estudado. Nós observamos que os terminais pré-sinápticos de camundongos BACHD^{Q97} apresentaram-se menos marcados quando comparados a animais WT, no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa, conforme visto na figura 7. Esses dados sugeriram, portanto, a realização de experimentos adicionais para o esclarecimento dessa variação.

Logo, terminais motores foram novamente marcados com FM1-43, no entanto com a adição de um novo marcador, a α -bungarotoxina-Alexa 594, que por se ligar de forma estável a receptores nicotínicos para acetilcolina permite a visualização dos elementos pós-sinápticos. Os hemidiafragmas foram então levados ao microscópio confocal com o objetivo de obter uma análise mais detalhada das JNMs, uma vez que a microscopia confocal nos permitiu varrer uma área maior do músculo além de analisar um número maior de terminações nervosas.

Este experimento mostrou que o número de terminais pré-sinápticos, assim como elementos pós-sinápticos marcados com α -bungarotoxina foi menor em animais BACHD^{Q97}. Além disso, os elementos sinápticos destes animais apresentaram uma intensidade de marcação, com o FM1-43 e α -bungarotoxina, menores quando comparada a WT. Ambos os resultados foram estatisticamente significativos. Estes dados estão de acordo com experimentos realizados por Ribchester *et al.*, (2004) que mostraram, em modelo animal semelhante, diminuição no número de elementos pós-sinápticos reveladas por JNMs com ausência de receptores para ACh em uma pequena fração de terminais. Além disso, assim como mostrado em nossos resultados, eles também não encontraram diferenças em relação à área dos elementos sinápticos de animais jovens. As zonas de placa terminal não apresentam fragmentação ou expansão que são comuns com a atrofia, no entanto, a área dos elementos diminuiu quando a atrofia progrediu em estágios mais avançados da doença. Nossos dados mostraram também leve alteração no padrão de distribuição dos elementos pré e pós-sinápticos em camundongos BACHD^{Q97} que se apresentaram mais dispersos quando comparados aos WT sugerindo que a htt mutante pode interferir na organização dos elementos sinápticos. No entanto, para confirmar esta observação, seria importante realizar novas imagens com objetivas de menor aumento, que permitiriam uma visão panorâmica da distribuição dos elementos sinápticos nos dois genótipos.

É interessante ressaltar que o FM1-43, conforme já mencionado, é captado pelas vesículas durante a endocitose, possibilitando a visualização de aglomerados vesiculares sob a forma de pontos fluorescentes em preparações de JNMs examinadas ao microscópio de fluorescência. Logo, a variação da captação do marcador entre os grupos estudados indica que podem existir alterações na maquinaria de endocitose/exocitose em camundongos transgênicos para DH e/ou um menor número de vesículas sinápticas funcionais em camundongos transgênicos para DH. Para testar esta hipótese, seriam necessários novos experimentos utilizando outros marcadores pré-sinápticos, como por exemplo, anticorpos que reconhecem proteínas de vesículas sinápticas e que não dependem de atividade sináptica para sua internalização.

É sugerido que a htt do tipo selvagem é necessária para endocitose mediada por clatrina durante a recuperação da vesícula sináptica pela membrana plasmática, sendo assim, é claro que vários fatores podem contribuir para alterações neste processo na DH. A desregulação pré-sináptica envolvendo a HIP1, proteína acessória para a endocitose mediada por clatrina, tem sido indicada na DH (PARKER *et al.*, 2007). Alterações na via de endocitose dependente de clatrina podem ser importantes para explicar nossa observação de menor marcação com FM1-43 em camundongos BACHD^{Q97}.

Singaraja *et al.*, mostraram também que a proteína de interação à htt HIP14 encontra-se diminuída na DH sugerindo que a redução na interação entre htt e HIP14 poderia contribuir para disfunção neuronal presente na doença, perturbando as vias normais de transporte intracelular. Essa proteína é expressa em neurônios, está localizada no complexo de Golgi e vesículas citoplasmáticas, e sua função está relacionada à endocitose.

Sendo assim, uma vez que os resultados anteriores indicaram comprometimento no processo de endocitose vesicular em animais BACHD^{Q97}, observado pela diminuição na intensidade de fluorescência dos elementos sinápticos, o objetivo seguinte buscou verificar a existência de algum tipo de variação na exocitose de vesículas.

Nossos resultados mostraram que a queda do sinal fluorescente, ou seja, taxa de exocitose vesicular foi menor em terminais motores de camundongos BACHD^{Q97} quando comparados aos animais WT. Estes dados indicam que além de comprometimento no processo de endocitose, revelados pela menor intensidade de marcação pelo FM1-43, animais transgênicos podem apresentar também alterações na exocitose de vesículas sinápticas.

Estes dados contradizem Rozas *et al.*, (2011) que mostraram pela primeira vez em linhagem de camundongos transgênicos R6/1 para DH, aumento inesperado na liberação de neurotransmissor em terminais motores evocados por estímulo. Os experimentos deste grupo foram realizados medindo o potencial de placa terminal (EPP) evocado pela estimulação do

nervo e através da desmarcação de terminais motores marcados com a sonda fluorescente FM2-10, semelhante ao FM1-43. O grupo explica que os resultados encontrados podem ser devido à desregulação nos níveis de proteína sinápticas. Sugerem também que a liberação aumentada de neurotransmissor pode ser causada por um aumento no pool de vesícula prontamente liberável ou mesmo de uma maior probabilidade de liberação uma vez que observaram também que, sob fortes estimulações a depressão sináptica era maior em R6/1 enquanto a recuperação de vesículas não foi alterada. Quanto maior a depressão sináptica maior a probabilidade de liberação. Sob essas condições um mecanismo de reciclagem eficiente e recarga dos conjuntos de vesículas são necessárias para sustentar a transmissão sináptica durante a chegada do potencial de ação (DELGADO *et al.*, 2000), (RIZZOLI & BETZ, 2005). O estudo não encontrou diferenças na reciclagem de vesículas sinápticas entre os animais controle e R6/1, bem como alteração dos níveis de ACh em vesículas individuais.

Já Ribchester *et al.*, (2004), no geral, não encontraram diferenças no mecanismo da neurotransmissão entre camundongos WT e da linhagem R6/2, no entanto eles sugeriram uma análise mais detalhada das características de liberação espontânea. É importante ressaltar que existem diferenças entre os modelos transgênicos usados para se estudar a DH. Como exemplo, camundongos R6/1 e R6/2, apesar de serem os mais estudados, são caracterizados por apresentarem rápida e progressiva degeneração dos terminais nervosos motores bem como atrofia muscular precoce que podem mascarar ou contrabalancear o fenótipo (MENALLED *et al.*, 2009), (revisado por SWITONSKI *et al.*, 2012)

Existem evidências na literatura de que a DH pode promover alterações na maquinaria de fusão de vesículas sinápticas. Esses dados podem servir de base para explicar os resultados obtidos neste trabalho. Shirendeb *et al.*, (2012) mostraram expressão diminuída da proteína sináptica sinaptofisina em cérebros post-mortem de paciente com DH. Esta proteína é sugerida por interagir com a sinaptobrevina, proteína do complexo SNARE relevante para exocitose de vesículas sinápticas (McMAHON *et al.*, 1996).

Morton & Edwardson (2001) descreveram a perda progressiva de complexina II e depleção de α -SNAP em cérebros de camundongos transgênicos para DH. Embora a função exata da complexina ainda não esteja clara, sugere-se que ela possa se ligar ao complexo SNARE assim como a α -SNAP e, portanto, envolvidas no controle da exocitose.

Morton, Faull e Edwardson (2001) mostraram também mudanças nos níveis de complexina II, da proteína SNARE sinaptobrevina2 e da Rab3A em cérebros de pacientes DH, que apresentaram diminuição da expressão em regiões do estriado, bem como em regiões cerebrais de camundongos R6/2, podendo assim contribuir para alterações no mecanismo de

neurotransmissão. Os níveis rab3A apresentaram-se diminuídos também em modelos de camundongos R6/1 transgênicos para DH conforme revelado nos estudos de Smith *et al.*, (2005, 2007). A rab3A interage com a SNAP-25 para regular a exocitose de vesículas sinápticas após o conjunto de vesículas prontamente liberáveis ser esgotado. Sendo assim, a diminuição na exocitose de vesículas sinápticas em camundongos BACHD^{Q97} demonstrada nesse trabalho poderia ser explicada por uma alteração nos níveis da proteína rab3A.

A CSP, proteína expressa em vesículas sinápticas, tem função vital na transmissão sináptica e tem sido descrita por interagir com a proteína G de canais para Ca²⁺ do tipo N. Essa associação bloqueia a abertura destes canais. Miller *et al.*, (2003) examinaram os efeitos da htt expandida no sistema CSP e encontraram que a htt mutante bloqueou a interação de CSP com a proteína G indicando que a modulação dos canais para Ca²⁺ é bloqueada na DH, desregulando os níveis intracelulares deste íon e podendo desta forma comprometer a liberação de neurotransmissor.

Sabe-se que o aumento intracelular de Ca²⁺ promove a exocitose de vesículas sinápticas. Alterações na homeostase deste íon foram relatadas em JNM de modelo de drosófila para DH (revisado por ROZAS *et al.*, 2010). Este grupo sugere, no entanto, que as elevações anormais de Ca²⁺, por si só, não são capazes de aumentar a liberação de vesículas sinápticas. Alguns autores propuseram que a interação entre a htt mutante e a maquinaria de liberação vesicular pode regular, de maneira eficaz, os níveis pré-sinápticos de Ca²⁺. Seria interessante medir em nosso modelo experimental os níveis Ca²⁺, intracelular basal e após estímulo despolarizante, a fim de verificar a existência de alguma alteração que poderia explicar uma menor exocitose de vesículas sinápticas nos camundongos BACHD^{Q97}.

Com o objetivo de verificar se terminações motoras de camundongos BACHD^{Q97} apresentavam alterações morfológicas no que se refere a número e formato das vesículas sinápticas, bem como área do terminal pré-sináptico e comprimento das dobras pós-juncionais, JNMs destes animais foram submetidas a análises ultraestruturais.

Nossos resultados mostraram que não houve diferença na área dos terminais nervosos bem como no número de vesículas encontradas por terminal, entre os camundongos WT e BACHD^{Q97}. Esses dados contradizem Li *et al.*, (2003) que, usando microscopia eletrônica de transmissão em secções de córtex cerebral de camundongos R6/1, observaram que os terminais axonais destes animais continham agregados de htt mutante, revelados através de marcação por *immunogold*, e frequentemente menos vesículas sinápticas quando comparados aos terminais axonais normais. Eles sugeriram, portanto, que a presença de grandes agregados intracelulares em alguns axônios conseguiria bloquear fisicamente o transporte de organelas e

outras moléculas podendo assim comprometer a neurotransmissão em animais transgênicos para DH. Baseado nestas evidências destacamos a necessidade de experimentos adicionais com o objetivo de identificar os agregados de htt mutante nos terminais nervosos motores de camundongos BACHD^{Q97}. No que diz respeito à morfologia das vesículas sinápticas, nossas eletron-micrografias revelam alterações no tamanho e forma dessas estruturas, concordando com a idéia deste grupo de pesquisadores de que a htt mutante se liga mais fortemente às vesículas sinápticas em relação à htt normal afetando assim a liberação de neurotransmissores. Steinert *et al.*, (2012) mostraram também tamanhos variados de vesículas sinápticas em JNMs de modelo de Drosófila transgênico para DH. Eles revelaram que a proteína Rab115 poderia estar envolvida nesta variação uma vez que a superexpressão desta proteína restaurou o diâmetro médio das vesículas sinápticas. O tamanho das vesículas sinápticas também pode ser alterado por ganhos de função aberrantes da htt mutante bem como por interação desta proteína com outras proteínas tais como a chaperona de vesícula sináptica CSP e a PACSIN1, que regula a recuperação vesicular (SMITH, BRUNDIN and LI, 2005).

Neste trabalho, nós também mensuramos o comprimento das dobras juncionais pós-sinápticas nas eletron-micrografias de terminais motores de diafragma de camundongos WT e BACHD^{Q97}. Nossos resultados mostraram que animais BACHD^{Q97} apresentaram uma tendência à diminuição no comprimento das dobras, apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa. Este achado pode ser reflexo da atrofia muscular progressiva relatada em DH (RIBCHESTER *et al.*, 2004).

Estudos recentes evidenciaram alterações mitocondriais nos animais transgênicos, no entanto nossas análises de ultraestrutura não revelaram qualquer tipo de modificação nessas organelas, tanto em relação ao número de mitocôndrias por terminal (dados não mostrados) quanto em relação à sua morfologia. Segundo Kim *et al.*, (2010) as primeiras evidências de alterações mitocondriais em DH foram observadas há aproximadamente três décadas atrás em estudos ultraestruturais de biópsias de tecido cerebral de pacientes com a doença. Esse grupo mostrou, através de análise quantitativa, que número de mitocôndrias identificadas por imunohistoquímica foi reduzido com o aumento da gravidade da doença, embora a perda mitocondrial não tenha sido significativa em neurônios colinérgicos do estriado. Paralelamente verificaram-se significativas alterações morfológicas e bioquímicas de fissão e fusão mitocondrial. Diversos estudos têm apoiado a hipótese de que a disfunção mitocondrial

⁵ Proteína envolvida na reciclagem endossomal.

é importante no processo fisiopatológico de diversas doenças neurodegenerativas, particularmente em DH. Em neurônios esse evento resulta em uma cascata de acontecimentos que incluem redução da produção de ATP, alteração na homeostase de Ca^{2+} , aumento de espécies reativas de oxigênio e morte neuronal além de fragmentação mitocondrial. Estas alterações podem prejudicar o transporte axonal e levar à disfunção sináptica em DH. A partir dessas evidências sugerimos a necessidade de uma análise ultraestrutural mais detalhada dos terminais motores de camundongos BACHD^{Q97} a fim de verificar alterações no padrão mitocondrial.

Diante do que foi exposto, sugerimos que a redução nos níveis de diversos neurotransmissores descritos anteriormente para DH e que possuem relação com distúrbios do movimento presentes na doença, pode ser devido não somente a defeitos no enchimento de vesículas, síntese e degradação, mas também a alterações na maquinaria de vesículas sinápticas. Além disso, o acúmulo de agregados intracelulares de htt bem como a fragmentação mitocondrial presentes na DH podem comprometer o tráfego vesicular.

Este trabalho é pioneiro em caracterizar alterações morfológicas e funcionais em JNMs de camundongos BACHD^{Q97} indicando que alterações semelhantes, envolvendo os processos de endocitose e exocitose de vesículas sinápticas, que acometem o SNC podem ocorrer também a nível periférico. Entretanto, ainda estamos no campo das hipóteses sendo necessários estudos mais aprofundados para esclarecer este provável mecanismo.

Contudo, os resultados obtidos a partir deste estudo poderão ajudar a entender as questões relacionadas ao déficit colinérgico envolvido no comprometimento motor e caracterizado em modelo animal cuja a progressão da doença é semelhante ao que acontece em um indivíduo adulto com DH.

6. CONCLUSÃO

6. Conclusão

A DH é caracterizada por sintomas motores e cognitivos sendo de suma importância entender os mecanismos celulares e moleculares que levam ao seu desenvolvimento no plano do sistema nervoso periférico. Esses dados ainda são escassos na literatura e de forma inédita nós estudamos as alterações morfofuncionais em JNMs de camundongos BACHD^{Q97}, transgênicos para a DH. Nossos resultados mostraram que a disfunção sináptica provocada pela htt mutante e conhecida no SNC têm acometido também terminais nervosos motores. Este estudo sugere que animais BACHD^{Q97} apresentam alterações no processo de reciclagem de vesículas, tanto na endocitose compensatória quanto na exocitose de vesículas sinápticas, bem como alteração na morfologia destas organelas nas terminações nervosas, indicando assim que a deficiência funcional de elementos pré e pós-sinápticos podem afetar, de alguma forma, a função motora neste modelo animal. A investigação detalhada de mecanismos sinápticos continuará sendo alvo de estudo para definição de papéis patológicos da htt mutante na progressão da DH envolvendo a estrutura da JNM.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

BANO, D.; ZANETTI, F.; MENDE, Y.; NICOTERA, P. Neurodegenerative process in Huntington's Disease. **Cell Death and Disease**, v.2, 2011

BECHERER, U.; GUATIMOSIM, C.; BETZ, W. J. Effects of Staurosporine on Exocytosis and Endocytosis at Frog Motor Nerve Terminals. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n.3, p.782-787, 2001.

BECHERER, U.; RETTING, J. Vesicle pools, docking, priming, and release. **Cell Tissue Research**, v.326, p.393-407, 2006

BETZ, W. J.; MAO F.; SMITH, C. B. Imaging Exocytosis and Endocytosis. **Current Opinion in Neurobiology**, v.6, n.3, p.365-71, 1996.

BETZ, W. J.; MAO, F.; BEWICK, G. S. Activity dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. **The Journal of Neuroscience**, v.12, p.363-375, 1992.

BRUMBACK, A. C.; LIEBER, J. L.; ANGLESON, J. K.; BETZ, W. J. Using FM1-43 to Study Neuropeptide Granule Dynamics and Exocytosis. **Methods**, v.33, n.4, p.287-94, ago. 2004.

CALLAHAN, J. W.; ABERCROMBIE, E. D. In vivo dopamine efflux is decreased in striatum of both fragment (R6/2) and full-length (YAC128) transgenic mouse models of Huntington's disease. **Frontiers in systems neuroscience**, v.5, p.61, 2011

CECCARELLI, B.; HULBURT, W. P.; MAURO, A. Turnover of Transmitter and Synaptic Vesicles at the Frog Neuromuscular Junction. **The Journal of Cell Biology**, v.57, p.499-524, 1973.

CHAPMAN, E. R. How Does Synaptotagmin Trigger Neurotransmitter Release ? **Annual Review of Biochemistry**, v.77, p.615-41, 2008.

CHIEREGATTI, E., WITKIN J. W., BALDINI G. SNAP-25 and synaptotagmin 1 function in Ca²⁺-dependent reversible docking of granules to the plasma membrane. **Traffic**, v.3, p.496-511

COCHILLA, A. J.; ANGLESON, J. K.; BETZ, W. J. Monitoring Secretory Membrane with FM1-43 Fluorescence. **Annual Review of Neuroscience**, v.22, p.1-10, 1999.

COUSIN, M. A.; ROBINSON, P. J. Mechanisms of Synaptic Vesicle Recycling Illuminated by Fluorescent Dyes. **Journal of Neurochemistry**, v.73, n.6, p.2227-39, 1999.

DEJONG R. S. The history of Huntington's chorea in the United States of America. In **Advances in Neurology**. 1973;1:19-27. Raven Press, New York.

DELGADO, R.; MAUREIRA, C.; OLIVA, C.; KIDOKORO, Y.; LABARCA, P. Size of vesicle pools, rates of mobilization, and recycling at neuromuscular synapses of a *Drosophila* mutant, shibire. **Neuron**, v.28, p.941-953, 2000.

Di PROSPERO, N. A; FISCHBECK, K. H. Therapeutics development for triplet repeat expansion diseases. **Nature**, v.6, p.756-765, 2005

ENGEL, A .G. The neuromuscular junction. In: ENGEL, A. G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology** – basic and clinical. 3.ed. New York: International Edition, 2003. p. 325-372. Vol.1.

ENGEL, A. G. The neuromuscular junction. In:ENGEL, A. G. **Handbook of Clinical Neurology**. 3^a ed. Rochester: Elsevier, 2008, v.91, cap3, p.103-148.

FARRAR, A. M.; CALLAHAN, J. W.; ABERCROMBIE, E. D. Reduced striatal acetylcholine efflux in the R6/2 mouse model of Huntington's disease: an examination of the role of altered inhibitory and excitatory mechanisms. **Experimental neurology**, v.232, n.2, p.119-125, 2011.

FINSTERER, J.; PAPIC, L.; AUER-GRUMBACH, M. Motor neuron, nerve, and neuromuscular junction disease. **Current Opinion in Neurology**, v.24, n.5, p.469-474, 2011.

Folstein SE, Leigh RJ, Parhad IM, Folstein MF. The diagnosis of Huntington's disease. **Neurology**, v.36, p.1279-83, 1986.

GAFFIELD, M. A.; BETZ, W. J. Imaging Synaptic Vesicle Exocytosis and Endocytosis with FM Dyes. **Nature Protocols**, v.1, n.6, p.2916-21, 2006.

GANDHI, S. P.; STEVENS, C. F. Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. **Nature**, v. 423, n. 6940, p. 591-2, 2003.

GARRET, M. C. L.A. 1992. **Doença de Huntington** - Contribuição para seu estudo. 241p. Tese (Doutorado em Medicina). Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, 1992.

GATCHEL, J. R.; ZOGHBI, H. Y. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. **Nature**, v.6, n.10, p.743-755, 2005.

GRAY M; SHIRASAKI D. I; CEPEDA C; ANDRE V. M; WILBURN B; LU X. H; TAO J; YAMAZAKI I; LI S. H; SUN Y. E; LI X. J; LEVINE M. S; YANG X. W. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. **The Journal of Neuroscience**. v.28, n.24, p.6182-95, 2008.

HALL, Z. W.; SANES, J. R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. **Cell**, Vol. 72, p. 99–121, 1993.

HEUSER, J. E.; REESE T. S. Evidence For Recycling of Synaptic Vesicle Membrane During Transmitter Release at the Frog Neuromuscular Junction. **The Journal of Cell Biology**, v.57, p.315-344, 1973.

HUNTINGTON, G. 1872. On Chorea. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**. v.15, p.109-112, 2003.

JAHN, R & SÜDHOF, T. C. Synaptic vesicles and exocytosis. **Rev. Neurosci**. v.17, p.219-46, 1994.

JOHNSON, M. A.; RAJAN, V.; MILLER, C. E.; WIGHTMAN, R. M. Dopamine release is severely compromised in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Journal of Neurochemistry**, v.97, n.3, p.737–746, 2006.

KATZ, B. **Nerve, Muscle and Synapse**. McGraw-Hill Book Company. 1966. 193p.
KIM, J.; MOODY, J. P.; EDGERLY, C. K.; BORDIUK, O. L.; CORMIER, K.; SMITH, K.; BEAL, M; F.; FERRANTE, R. J. Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. **Human molecular genetics**, v.19, n.20, p.3919-3935, 2010.

KUMMER, T. T.; MISGELD, T.; SANES, J. R. Assembly of the Postsynaptic Membrane at the Neuromuscular Junction: Paradigm Lost. **Current Opinion in Neurobiology**, v.16, n.1, p.74-82, 2006.

LAHN R; SIIDHOF T.E. Synaptic vesicle traffic: Rush hour in the nerve terminal. **Journal of Neurochemistry**, v.61, n.1, p.2-21, 1993.

LI, H.; WYMAN, T.; YU, Z. X.; LI, S. H.; LI, X. J. Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release. **Human Molecular Genetics**, v.12, n.16, p.2021-2030, 2003.

LI, J.Y.; PLOMANN, M.; BRUNDIN, P. Huntington's disease: a synaptopathy? **Trends in Molecular Medicine**, v.9, n.10, p.414-420, 2003.

LI, S. H.; LI, X. J. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. **Trends in Genetics**, v.20, n.3, 2004.

MARTIN J. B. Huntington's Disease: New approaches to an old problem. **Neurology**, v.34, p.1059-1072, 1984.

McMAHON, H. T.; BOLSHAKOV V. Y.; JANZ, R.; HAMMER, R. E.; SIEGELBAUM, S. A.; SÜDHOF, T. C. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, n.10, p.4760-4764, 1996

MENALLED L; EL-KHODOR B. F; PATRY M; SUAREZ-FARINAS M; ORENSTEIN S. J; ZAHASKY B; LEAHY C; WHEELER V; YANG X. W; MACDONALD M; MORTON A. J; BATES G; LEEDS J; PARK L; HOWLAND D; SIGNER E; TOBIN A; BRUNNER D. Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. **Neurobiology of Disease** v.35, n.3, p.319-36, 2009.

MILLER, L. C.; SWAYNE, L. A.; CHEN, L.; FENG, Z. P.; WACKER, J. L.; MUCHOWSKI, P. J.; ZAMPONI, G. W.; BRAUN, J. E. A. Cysteine String Protein (CSP) Inhibition of N-type Calcium Channels Is Blocked by Mutant Huntingtin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.52, p.53072-53081, 2003.

MORTON, A. J.; EDWARDSON, J. M.; Progressive depletion of complexin II in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Journal of neurochemistry**, v.76, p.166-172, 2001.

MURTHY, V. N.; DE CAMILLI, P. Cell Biology of the Presynaptic Terminal, **Annual Review of Neuroscience**, v.26, p.701–28, 2003.

NUDLER, S.; PIRIZ, J.; URBANO, F. J.; ROSATO-SIRI, M.D.; RENTERIA, E. K. P.; UCHITEL, O. D. Ca²⁺ Channels and Synaptic Transmission at the Adult, Neonatal, and P/Q-Type Deficient Neuromuscular Junction. **Myasthenia Gravis and Related Disorders: Biochemical basis for disease of the neuromuscular junction**, v.998, p11-17, 2003.

ORTIZ, A. N.; KURTH, B. J.; OSTERHAUS, G. L.; JOHNSON, M. A. Impaired dopamine release and uptake in R6/1 Huntington's disease model mice. **Neuroscience Letters**, v.492, p.11–14, 2011.

PARKER, J. A.; METZLER, M.; GEORGIU, J.; MAGE, M.; RODER, J. C.; ROSE, A. M.; HAYDEN, M. R.; NERI, C. Huntingtin-interacting protein 1 influences worm and mouse presynaptic function and protects *Caenorhabditis elegans* neurons against mutant polyglutamine toxicity. **The journal of neuroscience**, v.27, n.41, p.11056-11064, 2007.

PETÉRSSEN, A.; PUSCHBAN, Z.; LOTHARIUS, J.; NICNIOCAILL, B.; WIEKOP, P.; O'CONNOR, W. T.; BRUNDIN, P. Evidence for dysfunction of the nigrostriatal pathway in the R6/1 line of transgenic Huntington's disease mice. **Neurobiology of Disease**, v.11, p.134–146, 2002.

PRADO, M. A. M.; REIS, R. A. M.; PRADO, V. F.; MELLO, M. C.; GOMEZ, M. V.; PUN, S.; SIGRIST, M.; SANTOS, A. F.; RUEGG, M. A.; SANES, J. R.; JESSELL, T. M.; ARBER, S.; CARONI, P. An Intrinsic Distinction in Neuromuscular Junction Assembly and Maintenance in Different Skeletal Muscles. **Neuron**, v.34, p.357–370, 2002.

PRADO, V. F., *et al.* Mice Deficient for the Vesicular Acetylcholine Transporter are myasthenic and Have Deficits in Object and Social Recognition. **Neuron**, v.51, p.601-612, 2006.

PYLE, J. L.; KAVALALI, E. T.; PIEDRAS-RENTERIA, E. S.; TSIEN, R. W. Rapid reuse of readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. **Neuron**, v. 28, p.221-231, 2000.

RAYMOND, L. A.; ANDRE, V. M.; CEPEDA, D.; GLADDING, C. M.; MILNERWOOD, A. J.; LEVINE, M. S. Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. **Neuroscience**, v.198, p.252-273, 2011.

REDDY, P. H.; SHIRENDEB, U. P. Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease. **Biochimica et Biophysica acta**, v.1822, n.2, p.101-110, 2012.

RIBCHESTER, R. R.; THOMSON, D.; WOOD, N. I.; HINKS, T., GILLINGWATER, T. H.; WISHART, T. M.; COURT. F. A.; MORTON, J. A. Progressive Abnormalities in skeletal muscle and neuromuscular junctions of transgenic mice expressing the Huntington's disease mutation. **European Journal of Neuroscience**, v.20, p.3092-3114, 2004.

RIBCHESTER, R.R.; MAO F.; BETZ, W. J. Optical measurements of ctivitydependent membrane recycling in motor nerve terminals of mammalian skeletal muscle. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 255, n. 1342, p. 61-66, 1994.

RIBEIRO, F. M.; BLACK, S. A. G.; PRADO, V. F.; RYLETT, R. J.; FERGUSON, S. S. G.; PRADO, M. A. M. P. The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 1-12, 2006.

RICHARDS, D. A.; GUATIMOSIM, C.; BETZ, W. J. Two Endocytic Recycling Routes Selectively Fill Two Vesicle Pools in Frog Motor Nerve Terminals. **Neuron**, v.27, p.551-559, 2000.

RIZO, J.; SUDHOF, T. C. Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 8, p. 641-53, 2002.

RIZZOLI, S. O.; BETZ, W. J. Synaptic Vesicle Pools. **Nature reviews. Neuroscience**, v.6, n.1, p.57-69, 2005.

ROZAS, J. L.; GÓMEZ-SANCHEZ, L.; TOMÁS-ZAPICO, C.; LUCAS, J. J.; FERNADEZ-CHACÓN, R. Increased Neurotransmitter Release at the Neuromuscular Junction in a Mouse Modelo f Polyglutamine Disease. **Neurobioly of Disease**, v.31, n.3, p.1106-1113, 2011.

ROZAS, J. L.; GÓMEZ-SANCHEZ, L.; TOMÁS-ZAPICO, C.; LUCAS, J. J.; FERNANDEZ-CHACÓN, R. Presynaptic dysfunction in Huntington's Disease. **Biochemical Society Transactions**, v.11, n.38, p.488-492, 2010.

RUFF R.L. Neurophysiology of the neuromuscular junction: Overview. **Myasthenia Gravis and Related Disorders: Biochemical basis for disease of the neuromuscular junction**, v.998, p1-10, 2003.

SAINT BASILE, G.; MENASCHE, G.; FISCHER, A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. **Nature**, v.11, p.568-579, 2010.

SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Development of the Vertebrate Neuromuscular Junction, **Annual Review of Neuroscience**, v.22, p.389-442, 1999.

SANGO, K., MCDONALD, M. P., CRAWLEY, J.N., MACK, M. L., TIFFT, C. J., SKOP, E., STARR, C. M., HOFFMANN, A., SANDHOFF, K., SUZUKI, K., PROIA, R. L. Mice lacking both subunits of lysosomal beta-hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. **Nat. Genet.** v14, p.348-352, 1996.

SCHENEGGENBURGER, R.; HAN, Y.; KOCHUBEY, O. Ca²⁺ channels and transmitter release at the active zone. **Cell Calcium**, 2012;

SCHWEIZER, F. E.; RYAN, T. A. The Synaptic Vesicle: Cycle of Exocytosis and Endocytosis. **Current Opinion in Neurobiology**, v.16, p.298-304, 2006.

SHERRINGTON, C. S. The integrative action of the nervous system. New haven: Yale University Press. 1906. 411p.

SHIMOHAMA, S; KAMIYA, S; TANIGUCHI, T; AKAGAWA, K; KIMURA, J. Differential involvement of synaptic vesicle and presynaptic plasma membrane proteins in Alzheimer's disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.236, p.239-242, 1997.

SHIRENDEB, U. P.; CALKINS, M. J.; MANCZAK, M. ANEKONDA, V.; DUFOUR, B.; McBRIDE, J. L.; MAO, P.; REDDY, P. H. Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. **Human Molecular Genetics**, v.21, n.2, p.406-420, 2012.

SIEGEL, G.; ALBERS, R.; BRADY, S.; PRICE, D. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 16^o ed. San Diego, 2006, 779p.

SINGARAJA, R.R.; HADANO, S.; METZLER, M.; GIVAN, S.; WELLINGTON, C. L.; WARBY, S.; YANAI, A.; GUTEKUNST, C. A.; LEAVITT, B. R.; YI, H.; FICHTER, K.; GAN, L.; McCUTCHEON, K.; CHOPRA, V.; MICHEL, J.; HERSCHS. M.; IKEDA, J. E.; HAYDEN, M. R. HIP14, a novel ankyrin domain-containing protein, links huntingtin to intracellular trafficking and endocytosis. **Human molecular genetics**, v.11, n.23, p.2815-2828, 2002

SMITH, R.; BRUNDIN, P.; LY, J. Y. Synaptic dysfunction in Huntington's Disease: a new perspective. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, p.1901-1912, 2005.

SMITH, R.; CHUNG, H.; RUNDGUIST, S.; MAAT-SCHIEMAN, M. L.; COLGAN, L.; ENGLUND, E.; LIU, Y. J.; ROSS, R. A.; FAULL, R. L.; BRUNDIN, P.; LI, J. Y. Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease. **Human molecular genetics**, v.15, n.21, p.3119-3131, 2006.

SMITH, R.; KLIEN, P.; KOC-SCHMITZ, Y.; WALDVOGEL, H. J.; FAULL, R. L.; BRUNDIN, P.; PLOMANN, M.; LI, J. Y. Loss of SNAP-25 and rabphilin 3a in sensory-motor cortex in Huntington's disease. **Journal of neurochemistry**, v.103, p.115-123, 2007.

SMITH, R.; PETERSEN, A.; BATES, G.P.; BRUNDIN, P.; Li, J. Y. Depletion of rabphilin 3A in a transgenic mouse model (R6/1) of Huntington's disease, a possible culprit in synaptic dysfunction. **Neurobiology of Disease**, v.20, p.673-684, 2005.

SOLLNER, T.; BENNETT, M. K.; WHITEHEART, S. W.; SCHELLER, R. H.; ROTHMAN, J. E. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 409-18, 1993.

SPAMPANATO, J.; GU, X., YANG, X. W.; MODY, I. Progressive synaptic pathology of motor cortical neurons in a BAC transgenic mouse model of Huntington's disease. **Neuroscience**, v.157, n.3, p.606-620, 2008.

STEINERT, J. R.; CAMPESAN, S.; RICHARDS, P.; KYRIACOU, C. P.; FORSYTHE, I. D.; GIORGINI, F. Rab11 rescues synaptic dysfunction and behavioural deficits in Drosophila model of Huntington's disease. **Human Molecular Genetics**, v.21, n.13, p.2912-22, 2012.

SÜDHOF, T. C. The presynaptic active zone. **Neuron**, v.75, n.1, p.11-25, 2012.

SÜDHOF, T. C. The Synaptic Vesicle Cycle. **Annual Review of Neuroscience**, v.27, p.509-547, 2004.

SÜDHOF, T. C; RIZO, J. Synaptic vesicles exocytosis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2012.

SUTTON, B; FASSHAUER, D; JAHN, R; BRUNGER, A. T. Crystal structure of SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolutions. **Nature**, v.395, p.347-353, 1998.

SWITONSKI, P. M.; SZLACHCIC, P. M.; GABKA, A.; KRZYZOSIAK, W. J.; FIGIEL, M. Mouse Models of Polyglutamine Diseases in Therapeutic Approaches: Review and Data Table. Part II. **Molecular Neurobiology**, v.46, p.430-466, 2012.

TAKAMORI, S; HOLT, M; STENIUS, K; *et al.* Molecular anatomy of a trafficking Organelle. **Cell**, v.127, p.831–846, 2006.

TAKEI, K.; MUNDIGL, O.; DANIELL, L.; DE CAMILLI, P. The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. **The Journal of Cell Biology**, v. 133, p. 1237-1250, 1996.

TAYLOR & BROWN. **Basic Neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects, sixth edition**, Lippincott Williams & Wilkins. 1999.

TORREJAIS, M. M.; SOARES, J. C.; MATHEUS, S. M. M.; CASSEL, F. D.; MELLO, J. M.; BASSO, N. A. Histochemical and SEM evaluation of the neuromuscular junctions from alcoholic rats. **Cell & Tissue**, v.34, n.2, p117-123, 2002.

WALLING, H. W.; BALDASSARE, J. J.; WESTFALL, T. C. Molecular aspects of Huntington's Disease. **Journal of Neuroscience Research**, v.54, p.301-308, 1998.

WEBER, T.; ZEMELMAN, B. V.; MCNEW, J. A.; WESTERMANN, B.; GMACHL, M.; PARLATI, F.; SOLLNER, T. H.; ROTHMAN, J. E. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 759-72, 1998.

YUEN, E. Y.; WEI, J.; ZHONG, P.; YAN, Z. Disrupted GABAAR trafficking and synaptic inhibition in a mouse model of Huntington's disease. **Neurobiology of disease**, v. 46, n.2, p.497-502, 2012.

ZHAI R. G., BELLEN H. J. The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. **Physiology (Bethesda)** v.19, 262-270, 2004.