

Departamento de Morfologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Priscila Aparecida Costa Valadão

**Caracterização das alterações morfofuncionais  
de unidades motoras de um modelo murino para doença  
de Huntington (BACHD)**

Belo Horizonte – MG

Dezembro-2016

Priscila Aparecida Costa Valadão

**Caracterização das alterações morfofuncionais  
de unidades motoras de um modelo murino para doença  
de Huntington (BACHD)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular do Departamento de Morfologia do  
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Biologia Celular

Orientadora: Prof. Cristina Guatimosim Fonseca

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabíola Mara Ribeiro

Belo Horizonte – MG

Dezembro-2016

Este trabalho foi realizado no laboratório de Biologia da Neurotransmissão, pertencente ao Departamento de Morfologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Também foram utilizados o Centro de aquisição e processamento de imagens (CAPI) da UFMG e o Centro de Microscopia da UFMG. Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG e CNPq.

*Você mudou a minha história e fez o que ninguém podia imaginar. Você acreditou e  
isso é tudo! A honra, a glória, a força e o louvor a Deus!”*

(Kleber Lucas)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada de tudo que vivi e aprendi não teria sido possível. Agradeço por ter me amparado, me protegido, me dado saúde e esperanças para trilhar o meu caminho e que só ele sabe o quanto foi difícil. Mas também muito bonito e iluminado pelas pessoas certas que Ele colocou no meu caminho. E são também a estas pessoas que vou agradecer aqui.

Agradeço também ao Programa de Biologia Celular e as agências financiadoras CAPES, FAPEMIG e em especial ao CNPq que estiveram comigo durante este percurso.

Agradeço muito à Cristina, minha orientadora que além de ser exemplo de determinação, foco, inteligência, respeito e dedicação, é uma mulher forte que não mede esforços para que seus alunos tenham as melhores condições de trabalho, além de ser exemplo no entendimento de que o aluno possui suas individualidades e vidas pessoais distintas, e que mesmo assim, continua firme no propósito de formar Mestres e Doutores e acima de tudo pessoas que saibam se relacionar e conviver em harmonia em um ambiente acolhedor. Obrigada, Cristina, por tudo. Um dia almejo ter a mesma sensibilidade e habilidade que você tem em tudo que você faz.

Agradeço à Fabiola por estar sempre presente, pelo apoio em todas as etapas com muitas sugestões, por compartilhar conhecimento e por disponibilizar seu laboratório inúmeras vezes.

Agradeço também aos funcionários que me acolherem nesta jornada e que à sua maneira facilitaram e muito esta jornada como a Sheila ex-secretária da Pós graduação, a Rhuanna, ao Kender, a Paula, a Kayla e nossos cafés, ao Chico com sua alegria e disposição em me passar tudo que sabe sobre microtomia, Maria, Fidência e Rose da secretaria da morfologia que sempre estavam ali para me ajudar no que precisasse.

Agradeço aos meus pais, que mesmo tendo partido cedo, estiveram comigo em todos os momentos. À minha mãe que dizia que queria ter uma filha estudada e ao meu pai que mesmo não entendendo o que eu fazia, se orgulhava ao falar de mim. E repito o que eu

disse no meu discurso de formatura: Se um dia eu já feita mulher e realizada (como me sinto hoje), sentir que a terra cede aos meus pés, que minhas obras desmoronam e que não existe ninguém para me estender as mãos. Neste momento esquecerei minha maturidade, passarei pela minha adolescência dura, difícil e cruel, voltarei à minha infância maravilhosa e balbuciarei entre lágrimas e esperanças as últimas palavras que sempre me restarão na alma: MINHA MÃE E MEU PAI.

Agradeço ao meu marido e amor da minha vida Vinícius, que é meu porto seguro, minha inspiração, meu refúgio, minha força, meu orgulho. Pelo carinho, pela paciência, amizade, compreensão, pela beleza dos seus atos que são voltados para me fazer feliz em qualquer situação. Agradeço pela liberdade e pela confiança que ele sempre depositou em mim, cuidando de mim e sempre entendendo minhas particularidades. Obrigada! Te amo!

Agradeço ao meu irmão Andersom que mesmo longe sei que torce pela minha felicidade e tem muito orgulho de mim.

Agradeço à Ana e ao Enéias que foram as pessoas que mais acreditaram em mim e sempre estiveram comigo em todos os momentos até que eu chegasse aqui, me dando carinho, atenção e a estrutura familiar que eu precisava. Muito obrigada!

À Mari e à Lê que como irmãs, sempre torceram por mim e dividiram comigo seus pais e familiares e me deram muito amor. Ao Gú e Brunão que sempre perguntam como andam as coisas e ali sinto-me querida e bem acolhida. Obrigada!

Aos meus familiares mais próximos como minha avó Amélia, Tio Percy e Ângela que sempre estiveram comigo, mesmo apesar da distância. Sei que o amor de vocês por mim não tem medida e eu os amo!

A todos e quando escrevo “todos”, quer dizer muita gente, que são meus amigos queridos que nem ousa em começar a escrever, pois graças a Deus tenho muitos e todos eles sabem o quanto foram fundamentais pra manter-me bem e forte neste anos. Muito obrigada, meu povo amado.

Aos meus companheiros e amigos de Departamento que sabem as lutas e glórias, temores e delicias da Pós-graduação brasileira e que juntos fizeram destes anos, anos mais suaves e engraçados. Muito obrigada em especial, à Tati, Thalita, Marcos, Mônica, Gisele, Vanessa e Paulo.

Aos meus amados amigos do LABOD que são pessoas incríveis e que me acolheram como se eu fizesse parte do laboratório de vocês. Íria, Aline Copola, Aline Costa, Bruno, Samira, Juliano, Sara, Luiza, Cristiane Souza, Cristiane Toledo, Gerluza e Erika.

Aos meus amados e loucos amigos da vida Júlia, Rayan e Igor por dividirem comigo lágrimas, sorrisos, cuidados, torcidas, raspas de limão, amor, companheirismo, união e muitas e altas gargalhadas que me fazem muito feliz. Vocês são fundamentais na minha vida! Sempre.

Aos meus amigos e companheiros de Laboratório que passaram comigo muitos dias felizes e que sempre juntos trabalhamos e nos importamos com os outros como pessoas além de tudo. Obrigada Matheus de Castro pelos anos maravilhosos e pela amizade linda que construímos neste ambiente de trabalho e que me fez crescer muito; Hermann que com muito carinho e alegria me acolheu e me ensinou coisas essenciais para a vida e tudo com um bom humor espetacular; Jessica, menina linda que eu conheci e que hoje é uma mulher maravilhosa, realizada e que eu simplesmente adoro; Isadora, minha “Angica”, um anjo da guarda em uma fase em que eu realmente precisava de toda a luz que ela emana de tão bondosa e carinhosa; Ao Rubens, nosso “bem”, que só pensa em fazer bem e que ilumina tudo quando chega e abre aquele sorriso maravilhoso. Uma pessoa sensacional...incrível; Fernanda que eu adoro; Julliane pela presença constante e pelo carinho, pela disposição em ajudar sempre, por ser uma pessoa tão linda em tudo que faz, como diz o Arthur e eu concordo. Arthur, muito obrigada também!; Marina Ladeira que é a pessoa mais disposta em ajudar e a resolver coisas práticas que eu já conheci, um coração gigante e sempre disposto a ajudar; Marina Viveiros que é a manifestação pura da alegria e alguém que eu gosto muito; Viviane e Murilo que chegaram de mansinho e são pessoas únicas, alegres e dispostas que eu adoro estar perto. Meu muito obrigada!!

Um super obrigada à Babi, minha companheira de projeto, experimentos, de risadas, de experiências e que mesmo estando longe fazia dos meus dias mais “organizados” rrsrr e

engraçados, você muitas vezes foi um norte pra mim, Babi! Muito obrigada pelas nossas risadas que são momentos de pura identificação e você deixava muitas saudades cada vez que tinha que partir. Senti muito sua falta. Você é alguém que eu quero pra sempre comigo e que venha Larinha pra gente amar.

Um mega obrigada ao Matheuzito que é um verdadeiro anjo da guarda me auxiliando, me ajudando, pensando junto comigo, dividindo tarefas e deixando meu dia tão leve quanto à sua alma iluminada, sincera e bondosa. Você é simplesmente incrível. Eu sou sua fã, pode contar comigo pra sempre. Digo que está pra nascer uma pessoa tão linda, inteligente e acolhedora quanto você e eu sei que você vai chegar exatamente onde você quer, pois Deus sabe que você é puro e merecedor das mais altas bênçãos do céu! Muito obrigada!!

Obrigada aos colaboradores que mais que isso eram torcedores para o nosso sucesso, como Gisele, Patrícia e em especial ao Professor José Carlos que não mediu esforços para me ajudar e me ensinar muito durante todos estes anos de formação.

Agradeço aos professores que participaram da minha vida acadêmica e que foram fundamentais para minhas escolhas em especial, Márcia Bastos e José Dias.

Agradeço imensamente à Janice que é mais que uma amiga, conselheira e exemplo de ser humano e profissional. Alguém que me inspira e me faz acreditar que ainda existe esperança na Terra e entre os homens. Muito obrigada por tudo, Janice.

Agradeço à Juliana Dória, Isabela Olmo, Toniana, Jessica Mabele e Flávia que sempre estiveram presentes pra me auxiliar quando eu precisava de seus conselhos, conhecimentos, ombros amigos e abraços.

Agradeço aos técnicos e servidores que sempre estavam ali quando eu precisei e que nunca me negaram sequer um favor. Aos porteiros e faxineiras que facilitam a nossa vida e o dia a dia corrido.

E claro não deixaria de agradecer meu companheiro fiel, Manolo, que é um amor e que sempre está comigo com sua cumplicidade sem fim.

Obrigada a todos! Nos vemos pelo caminho!



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
LISTA DE TABELAS .....	14
LISTA DE FIGURAS .....	15
RESUMO .....	17
ABSTRACT .....	18
1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1. A doença de Huntington (DH).....	19
1.2. A huntingtina normal, a huntintina mutada (mHtt) e os mecanismos de neurodegeneração na DH.....	22
1.3. Modelos animais para a Doença de Huntington .....	23
1.3.1. Principais modelos genéticos murinos para a Doença de Huntington.....	25
1.3.2. O modelo BACHD .....	26
1.4. A unidade motora: dos motoneurônios às fibras musculares .....	28
1.5. A unidade motora e a Doença de Huntington.....	32
2. OBJETIVO GERAL .....	36
2.1. Objetivos Específicos .....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
3.1. Modelo animal-Camundongos BACHD.....	37
3.2. Genotipagem dos animais.....	38
3.2.1. Extração do DNA das amostras .....	38
3.2.2. Etapa de amplificação do DNA.....	38
3.3. Análises morfológicas e morfométricas .....	40
3.4. Imunofluorescência para determinação das isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC).....	41
3.5. Imunofluorescência em segmentos cervicais e lombares da medula espinhal ....	42

3.6. Análises de JNMs por microscopia confocal.....	43
3.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão e análises ultraestruturais.....	44
3.8. Testes comportamentais motores.....	46
3.9. Análise estatística .....	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1. Animais BACHD de 12 meses apresentam alterações comportamentais.....	50
4.2. Atrofia e perda de motoneurônios dos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal de camundongos BACHD de 12 meses.....	53
4.3. Alterações ultraestruturais nos segmentos cervical e lombar da medula espinhal de animais BACHD de 12 meses .....	57
4.4. A redução no número de motoneurônios em animais BACHD pode estar ocorrendo via ativação da cascata apoptótica .....	60
4.5. Em animais BACHD de 12 meses existem alterações que vão desde as raízes ventrais até as JNMs .....	62
4.5.1. Alterações em fibras nervosas mielínicas de animais BACHD.....	62
4.5.2. As JNMs de músculos ETM e TA estão alteradas em animais BACHD de 12 meses.....	66
4.6. Os animais BACHD de 12 meses apresentam atrofia das fibras musculares de ETM e TA .....	70
4.7. A atrofia vista nos músculos ETM e TA é acompanhada por alterações na expressão da <i>MyHC</i> de animais BACHD .....	72
4.8. Alterações morfológicas ultraestruturais de músculos ETM e TA de camundongos BACHD de 12 meses .....	75
5. DISCUSSÃO.....	79
6. CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
8. ANEXOS.....	111
8.1. ARTIGO 1: Changes in structure and function of diaphragm neuromuscular junctions from BACHD mouse model for Huntington's disease.....	111

8.2. ARTIGO 2: Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease. ....	111
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AST	Área de secção transversal
BSA	Buffer Serum Albumin
CAG	Citosina-Adenina-Guanina
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
ChAT	Colina acetiltransferase
DH	Doença de Huntington
DMP-30	2,4,6-tridimetil-aminometil fenol
EDL	Músculo Extensor Digitorius Longus
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ETM	Músculo Esternomastoide
HCl	Ácido clorídrico
Htt	Huntingtina
FF	Fast contracting fatigable motor unit
FR	Fatigable resistant
JNM	Junção neuromuscular
K <sup>+</sup>	Íon Potássio
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
M.E.E	Músculo estriado esquelético
MEPP	Potencial de Placa Motora em Miniatura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mHTT	Huntingtina Mutante
MyHC	Cadeia Pesada de Miosina (Myosin heavy chain)
LAS	Leica Application Suite
Na <sup>+</sup>	Íon Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NBF	Formalina neutra tamponada
nm	Nanômetros

nAChR	Receptor de acetilcolina
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OCT	Optimum cutting temperature
PBS	Phosphate buffer solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
RS	Retículo Sarcoplasmático
S	Slow
SCA	Spinocerebellar ataxia
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TA	Músculo Tibial Anterior
TE	Tris e EDTA (ácido etileno diamino tetracético)
UM	Unidade Motora
WT	Wild-type
$\alpha$ -btx	$\alpha$ -bungarotoxina

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Iniciadores utilizados no PCR convencional.....	39
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática do modelo BACHD.....	27
Figura 2- Componentes da Unidade motora.....	28
Figura 3- Representação esquemática dos diferentes tipos de motoneurônios.....	32
Figura 4- Estruturas moduladoras do movimento.....	33
Figura 5- Representação esquemática das interações entre córtex motor e a unidade motora.....	35
Figura 6- Quadro comparativo das fases de vida entre seres humanos e camundongos.....	37
Figura 7- Imagem representativa do gel de genotipagem de camundongos BACHD.....	39
Figura 8- Aparato de teste wire hang.....	46
Figura 9- O teste de campo aberto.....	47
Figura 10- Teste de força de agarre.....	48
Figura 11- Animais BACHD com 12 meses de idade apresentaram alterações no comportamento motor.....	52
Figura 12- Atrofia e perda de motoneurônios nos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal de camundongos BACHD de 12 meses.....	55
Figura 13- Quantificações gráficas da atrofia e perda de motoneurônios nos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal de camundongos BACHD de 12 meses.....	56
Figura 14- Alterações ultraestruturais em motoneurônios dos segmentos cervicais da medula espinhal de animais BACHD de 12 meses.....	58
Figura 15- Alterações ultraestruturais em motoneurônios dos segmentos lombares da medula espinhal de animais BACHD de 12 meses.....	59
Figura 16- A morte dos motoneurônios nos segmentos cervicais lombares podem ocorrer via apoptose.....	61

Figura 17- Alterações axonais em BACHD.....	64
Figura 18- Quantificações gráficas das alterações axonais em animais BACHD.....	65
Figura 19- Fragmentação e desnervação em JNMs de BACHD.....	68
Figura 20- Quantificações gráficas das alterações nas JNMs de ETM e TA.....	69
Figura 21- Diminuição da AST das fibras musculares de músculo ETM e TA de camundongos BACHD.....	71
Figura 22- Mudança no padrão de expressão de <i>MyHC</i> associado à atrofia dos músculos ETM e TA em animais BACHD.....	74
Figura 23- A ultraestrutura de músculo ETM mostra alterações morfológicas nos animais BACHD.....	76
Figura 24- Alterações morfológicas na ultraestrutura de músculo TA de animais BACHD.....	77
Figura 25- Desenho esquemático ilustrando as alterações na UM de camundongos WT e BACHD.....	78



## RESUMO

A doença de Huntington é uma desordem neurodegenerativa caracterizada por sintomas complexos com pronunciada disfunção motora e atrofia muscular. Os sintomas motores são progressivos e atribuídos à morte dos neurônios estriatais do cérebro causando os movimentos involuntários da musculatura dos membros, do tronco e da face. Na doença de Huntington ocorre expansão poliglutamínica na proteína huntingtina, o que resulta na formação de uma proteína mutada que interfere em vários processos no interior das células levando-as à morte. Apesar da causa dos movimentos involuntários na doença de Huntington ser bem estabelecida, também é reconhecido que tanto a Huntingtina normal quanto a mutada são expressas fora do Sistema Nervoso Central, como por exemplo nos músculos esqueléticos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar possíveis alterações em unidades motoras de músculos esternomastoide e tibial anterior de um modelo murino para a doença de Huntington, o BACHD, uma vez que esta estrutura está envolvida diretamente na execução dos movimentos por se tratar da via final do sistema motor. Nós utilizamos testes comportamentais, microscopia óptica, de fluorescência, confocal e eletrônica de transmissão para investigar possíveis alterações nos componentes da unidade motora de ambos os músculos, tais como motoneurônios dos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal, junções neuromusculares e musculatura esquelética. Nós identificamos primeiramente que os animais BACHD apresentavam déficit motores nos testes comportamentais. Em um segundo momento, observamos que nos camundongos transgênicos havia diminuição no número e pronunciada atrofia dos motoneurônios cervicais e lombares, fragmentação, desnervação e perda de colocação das junções neuromusculares. Além disso, observamos atrofia muscular acompanhada de mudança no padrão da cadeia pesada de miosina e anormalidades ultraestruturais dos músculos analisados. Em conjunto, nossos resultados indicam que as unidades motoras dos músculos esternomastoide e tibial anterior são afetadas em todos os seus componentes. Estes resultados, podem futuramente contribuir para novos alvos de intervenções terapêuticas com foco em estruturas ligadas ao movimento, porém fora dos circuitos cerebrais superiores.

## ABSTRACT

Huntington's disease is a complex neurodegenerative disorder characterized by motor dysfunction with severe muscle atrophy. The motor symptoms are progressive and attributed to the loss of striatal neurons in the brain, causing involuntary limbs, trunk and face movements. In Huntington's disease, there is a polyglutamine expansion of huntingtin protein leading to the formation of mutated protein that interferes in several processes in cells leading them to the death. Despite the cause of the involuntary movements in Huntington's disease be well established, it is known that both normal and mutated huntingtin are expressed outside the Central Nervous System, such as at the skeletal muscle. Thus, the aim of this study was to investigate possible changes in sternomastoid and tibialis anterior muscle's motor units from a murine model for Huntington's disease (BACHD) once this structure is directly involved in the execution of movements. We used behavioral tests, optical, fluorescence, confocal and electronic microscopy to investigate possible changes in the components of sternomastoid and tibialis anterior muscles motor units, such as motor neurons in the cervical and lumbar segment of the spinal cord, neuromuscular junctions and skeletal muscles. We first identified motor deficit in behavioral testes in BACHD mice. After, we observed in transgenic mice decrease in cervical and lumbar motoneurons number and atrophy. We also observed fragmentation, denervation and loss of pre and post-synaptic colocalization in neuromuscular junctions. In addition, we noticed ~~that~~ muscle atrophy that was accompanied by both changes in the pattern of the myosin heavy chain and muscle ultrastructural abnormalities in both muscle. Together, our results indicate that this muscle' motor unit is also affected in all its components. These results can further contribute to new targets for therapeutic interventions focusing on peripheral structures related to movement.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A doença de Huntington (DH)

A DH é uma doença neurodegenerativa com sintomas graves tais como distúrbios psiquiátricos, demência e alterações motoras progressivas (ROOS, 2010). Durante décadas, a DH foi conhecida como coreia de Huntington, uma vez que os sintomas motores causam movimentos involuntários parecidos com passos de dança - 'khoreia' na língua grega significa dança.

A característica clínica da DH e o seu padrão de transmissão hereditário foram identificados primeiramente pelo médico norte americano George Huntington em 1872 e descritos em uma publicação histórica no *The Medical and Surgical Reporter of Philadelphia*, intitulada "On Chorea" (BATES, 2005). Entretanto, foi somente no final do século 20 que a mutação gênica causadora da DH foi descrita como sendo localizada no cromossomo 4 humano (GUSELLA *et al.*, 1983). De fato, em 1993 o "Huntington's Disease Collaborative Research Group" identificou uma mutação na porção 5' do gene IT15 ou "Interesting Transcript 15" localizado no braço curto do cromossomo 4, responsável pela codificação da proteína Huntingtina (Htt). Esta descoberta foi um grande marco não só na história da DH, mas também para doenças que possuem expansões poliglutamínicas, estando neste momento, identificadas nove doenças neste grupo: Doença de Huntington, atrofia dentato-rubro-palido-luisiana, atrofia muscular espinhal e bulbar e as ataxias espinocerebelares, (SCAs - do inglês *Spinocerebellar ataxia*- 1, 2, 3, 6, 7 e 17) (BAUER & NUKINA, 2009).

A mutação do gene na DH resulta na expansão da sequência de nucleotídeos citosina, adenina e guanina (CAG - responsável pela codificação do aminoácido glutamina), levando à produção de uma proteína mutante com sequência de poliglutaminas (poli-Q) na porção amino-terminal da proteína Htt (HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993). Atualmente, sabe-se que, em indivíduos que não manifestam a doença, a proteína Htt apresenta menos de 35 repetições CAG. Acima de 37 resíduos de glutamina, os indivíduos podem manifestar os sinais clínicos da doença, sendo essa característica utilizada como parâmetro de diagnóstico (PEREZ-DE LA CRUZ & SANTAMARIA, 2007). Já foi descrito também

que, quanto maior a quantidade de repetições poliglutamínicas, mais precocemente a doença se manifesta e mais severos são seus sintomas, podendo haver casos juvenis da DH (ANDREW *et al.*, 1993; ROOS, 2010).

A prevalência da DH é estimada entre 4 a 10 casos para cada 100.000 habitantes na América do Norte e Europa (SMITH; BRUNDIN; LI, 2005; VONSATTEL & DIFIGLIA, 1998, RAWLINS *et al.*, 2016). Na América do Sul, a região do lago de Maracaibo na Venezuela, é o local com maior prevalência neste continente (700 por 100.000 habitantes) enquanto que no Brasil, segundo a Associação Brasil Huntington (2013, dados do último levantamento) e a Global Huntington América do Sul (dados de 2014), existem cerca de 100 mil indivíduos com a DH, sendo que a cidade de Feira Grande em Alagoas possui as maiores incidências neste país com 1 caso a cada 1.000 habitantes. Esta é uma doença que afeta igualmente homens e mulheres e é incomum no Japão e negros (HO *et al.*, 2001). A DH possui caráter autossômico dominante, seguindo as regras de hereditariedade Mendeliana, uma vez que o alelo normal transmite-se ao longo das gerações subsequentes. Já o alelo mutante é instável durante a meiose, o que acarreta alteração no seu comprimento quando ele é transmitido para outras gerações, fazendo com que haja aumento de 1 a 4 unidades de CAG ou até mesmo reduzindo 1 a 2 unidades por geração (GIL-MOHAPEL & REGO, 2011).

A DH é uma doença devastadora, uma vez que além dos sintomas motores severos, ela também causa intenso declínio cognitivo com prejuízo da memória, alterações nas capacidades visuo-espaciais, incapacidade no planejamento, organização e avaliação de tarefas que são característica das demências subcorticais (ROOS, 2010). Outros sintomas como comportamento maníaco-depressivo, alterações de personalidade, como irritabilidade, apatia, distúrbios sexuais e depressão podem ser enquadrados na síndrome psiquiátrica da DH (DEWHURST *et al.*, 1970; VAN DUIJN *et al.*, 2007). Como a DH é extremamente incapacitante e debilitante, os pacientes vem a óbito geralmente devido a complicações de caráter infeccioso no trato respiratório e alterações cardiovasculares, ou ainda acidentes como queda e engasgos por falta de controle da motricidade dos músculos envolvidos, e muitas vezes, por suicídio (ROOS, 2010).

Os sintomas motores da DH são progressivos causando prejuízo nas atividades de vida diária e econômica dos pacientes (WALLING *et al.*, 1998; PIIRA *et al.*, 2013). Estes sintomas são conhecidos por movimentos involuntários dos membros, tronco e da face, anormalidades de marcha que são caracterizadas pela instabilidade postural, falta de

equilíbrio, perda de coordenação motora e de força nos músculos dos membros inferiores, o que pode ocasionar quedas constantes (PIIRA *et al.*, 2013; BROŽOVÁ *et al.*, 2011), e disfunções dos movimentos dos olhos como nistagmo e alterações de sacadas (ANDERSON & MACASKILL, 2013). Estes sintomas são comuns na fase inicial da doença, entretanto, dependendo das áreas cerebrais afetadas, a manifestação clínica da DH altera-se ao longo da sua progressão, sendo que pacientes que se encontram em estágios mais avançados da doença podem apresentar sinais como rigidez muscular, bradiscinesia e distonia, limitando sua capacidade de realizar movimentos voluntários (HEEMSKERK *et al.*, 2011; SKODDA *et al.*, 2014).

Em relação ao diagnóstico clínico da DH, o mesmo é realizado através da pesquisa do histórico familiar, teste de coordenação e tônus muscular, observando características como o déficit motor progressivo associado à coreia ou rigidez, bem como alterações psiquiátricas com demência progressiva, excluindo qualquer outra causa (ROSS & TABRIZI, 2011). Após análise destas características e se o paciente apresentá-las, este será então submetido ao teste genético para avaliar a presença da mutação associada à DH e assim concluir o diagnóstico (GIL-MOHAPPEL & REGO, 2011).

A DH ainda não possui cura, e após muitos anos de estigmatização dos pacientes, hoje além do tratamento medicamentoso, estes podem contar com um atendimento multidisciplinar que visa minimizar os impactos dessa doença em suas vidas.

O tratamento farmacológico inclui agentes depletos e antagonistas dopaminérgicos para o controle dos movimentos coreicos, antidepressivos, antagonistas de receptores de glutamato, antiepilépticos dentre outros fármacos (ADAM & JANCOVIC, 2008). Outros tratamentos não medicamentosos incluem fonoaudiologia para ajudar na fala e deglutição, psicoterapia que visa auxiliar nos distúrbios de comportamento, fisioterapia para aprimorar habilidades motoras de força, flexibilidade, coordenação e equilíbrio, e terapia ocupacional para promover autonomia nas atividades de vida diária.

## 1.2. A huntingtina normal, a huntintina mutada (mHtt) e os mecanismos de neurodegeneração na DH

A Htt é uma proteína de múltiplos domínios com 348 kDa que normalmente é expressa em níveis elevados no sistema nervoso central (SNC) de humanos e roedores (DI FIGLIA *et al.*, 1997; FERRANTE *et al.*, 1997; FUSCO *et al.*, 1999), estando presente principalmente em neurônios piramidais corticais que se projetam para o corpo estriado. Além disso, estudos apontam que esta proteína é encontrada em todos os neurônios, assim como nas células gliais (LI *et al.*, 1993; FUSCO *et al.*, 1999). Tanto a forma normal quanto a mutada são expressas também em tecidos que se encontram fora do SNC como músculo esquelético, coração, fígado, pâncreas, rim, testículo e estômago (VAN DER BURG, BJÖRKQVIST, BRUNDIN, 2009). Nas células, sabe-se que a Htt normal é encontrada principalmente no citoplasma, associada a organelas como complexo de Golgi, mitocôndrias, retículo endoplasmático, vesículas sinápticas e componentes do citoesqueleto, sendo encontrada também no núcleo celular (HOFFNER & DJIAN, 2002; LANDLES & BATES, 2004).

É bem descrito na literatura que a Htt estabelece importantes interações com outros tipos de proteínas, cerca de 234, o que confere a ela importantes funções dentro da célula (HARJES & WANKER, 2003; ZUCCATO *et al.*, 2010). Esta proteína exerce um papel crucial na sobrevivência celular, pois controla vias de apoptose, sendo demonstrado por Rigamonti *et al.*, (2000), que a síntese de Htt normal protege as células do corpo estriado de uma variedade de estímulos apoptóticos. A Htt também pode estar envolvida na regulação do transporte intracelular, no tráfego e na liberação do conteúdo vesicular, além de mediar processos de endocitose, promover a sinalização celular e regulação transcricional (HARJES & WANKER, 2003; LI & LI, 2004).

Todas estas alterações nestas interações podem estar relacionadas com a disfunção, degeneração e conseqüente morte neuronal características da DH, uma vez que tanto a Htt normal quanto a mutada existem em todos os tecidos, tendo portanto uma expressão sistêmica (VAN DER BURG, BJÖRKQVIST, BRUNDIN, 2009). No entanto, a citotoxicidade causada pela presença da mutação parece eleger alguns grupos neuronais no SNC de forma específica (VONSATTEL & DIFIGLIA, 1998). Este fato sugere a existência de maior vulnerabilidade de grupos celulares seletivos, com condições locais que os tornam particularmente sensíveis ao efeito deletério do produto do gene mutado (GIL & REGO, 2008).

Para tentar elucidar o mecanismo pelo qual estes fenômenos ocorrem, existem duas hipóteses: A primeira é a hipótese do ganho tóxico de função da Htt, que sugere que a mutação da proteína confere uma nova função à Htt tornando-a tóxica para a célula (BROWNE & BEAL, 2006; IMARISIO *et al.*, 2008; ZUCCATO *et al.*, 2010). A segunda, é a hipótese de perda da função, que defende que a proteína normal seria então sequestrada para dentro de agregados que se formam pela presença da mHtt, levando assim, à perda da função da proteína normal (BROWNE & BEAL, 2006; IMARISIO *et al.*, 2008; ZUCCATO *et al.*, 2010).

Em resumo, a presença da mHtt leva a uma série de alterações como desregulação transcricional, comprometimento do sistema proteolítico, prejuízo no transporte axonal, comprometimento metabólico e disfunção mitocondrial, alteração na homeostase do cálcio, excitotoxicidade, estresse oxidativo, ativação de caspases, resposta inflamatória, entre outras que em conjunto, podem ser a chave para entender os possíveis mecanismos que levam a neurodegeneração na DH (KROBITSCH & KAZANTSEV, 2011).

### **1.3. Modelos animais para a Doença de Huntington**

Desde a identificação do gene causador da doença em 1993, um dos principais desafios no estudo da patogênese e no tratamento da DH é o desenvolvimento de modelos animais que sejam capazes de recapitular os aspectos genéticos e fenotípicos da doença.

Com este intuito, diferentes modelos foram gerados utilizando-se de diversos organismos como levedura, *Caenorhabditis elegans*, e *Drosophila* (MARSH & THOMPSON, 2006; SIIPIONE & CATTANEO, 2001).

A partir de 1970, vários modelos animais da DH foram desenvolvidos, sendo que o pioneiro foi o modelo de morte neuronal baseado na administração de ácido caínico, que se trata de um composto excitotóxico (COYLE & SCHWARCZ, 1976). Posteriormente vieram outros modelos que seguiam a linha de morte neuronal como o induzido pelo malonato, ácido quinolínico e ácido 3-nitropropiónico (COYLE & SCHWARCZ, 1976). Entretanto, apesar de todos os esforços empregados e avanços terapêuticos adquiridos através do estudo destes organismos, um passo de suma importância para o estudo da DH foi a criação e uso de modelos genéticos de mamíferos.

Em 1996 começaram a ser desenvolvidos os modelos transgênicos para a DH em camundongos (MANGIARINI *et al.*, 1996), primatas não humanos e outras espécies, os

quais expressam o gene mutante da proteína Htt (MARSH *et al.*, 2003; PARKER *et al.*, 2001). Dentre estes, o camundongo é um excelente modelo transgênico de mamíferos para doenças neurodegenerativas humanas, incluindo a DH, por três motivos: O primeiro, porque camundongos, em comparação com os modelos de organismos não mamíferos, possuem base genética mais similar à dos humanos, pois camundongos e humanos divergem “apenas” 75 milhões de anos na escala evolutiva, enquanto outras espécies como a *Drosophila* chegam a 600 milhões de anos de divergência (YANG & GRAY, 2011). Devido a esta relativa proximidade, eles possuem similaridades genômicas com cerca de 90% dos genes humanos tendo correspondência direta com os genes murinos, além disso, a organização genômica global e expressão gênica também são semelhantes entre humanos e camundongos (MOUSE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2002). Desta forma, esta semelhança genética, aumenta a probabilidade de resposta genômica para o gene da DH e também para possíveis intervenções terapêuticas.

Em segundo lugar, os camundongos possuem os circuitos neurais básicos e tipos de células neuronais que são afetados seletivamente na DH, bem como um rico repertório comportamental que podem identificar a disfunção e degeneração dos neurônios nos circuitos neurais relevantes na DH (WATASE & ZOGHBI, 2003). Com estas características, os camundongos são candidatos ideais para estudar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes à toxicidade neuronal, bem como outras características não neuronais envolvidas na patogênese da DH, o que não poderia ser realizado utilizando outros modelos.

O terceiro motivo são os ricos recursos e ferramentas de manipulação genética disponíveis para utilização em camundongos com possibilidade de análises sofisticadas para a patogênese da DH (CAPECCHI, 2005; HEINTZ, 2001). Camundongos são passíveis de manipulações tais como a introdução estável de um gene exógeno no seu genoma (transgênicos), deleção de um gene endógeno (knockout), e a substituição de um gene alvo endógeno com um gene ou sequência exógena (knockin) (YAMAMOTO *et al.*, 2000). Além de todas estas características, eles possuem pequeno porte, o que facilita o manuseio, e apresentam também curto tempo de gestação.

Mediante a todas estas características, camundongos proporcionam um poderoso modelo genético de mamífero para o estudo da DH.



### 1.3.1. Principais modelos genéticos murinos para a Doença de Huntington

A década de 1990 foi um marco para a criação de modelos murinos para a DH. Em 1996 foi criado o modelo R6/2, um dos modelos mais estudados e que possui aproximadamente 150 repetições de GAG. Contém 1 kilobase (kb), ou seja, um fragmento do promotor da Htt humana no genoma do camundongo, dirigindo a expressão da mHtt.

Dados de pesquisas comportamentais em animais R6/2 mostram que os animais exibem déficits motores como diminuição de atividade de corrida em suporte apropriado e hipoatividade no teste de campo aberto (HICKEY *et al.*, 2005). Apresentam diminuição da força de agarre e déficits no rotarod, que indicam alterações no equilíbrio e propriocepção (CARTER *et al.*, 1999; LIONE *et al.*, 1999; MURPHY *et al.*, 2000). Além disso, camundongos R6 / 2 exibem uma variedade de outros fenótipos como modificações nos ritmos circadianos (MORTON *et al.*, 2005), tremores, movimentos bruscos involuntários e convulsões (LI, POPOVIC, BRUNDIN, 2005; MANGIARINI *et al.*, 1996). Esses animais também apresentam déficits de aprendizagem espacial no teste de labirinto aquático de Morris (MURPHY *et al.*, 2000), bem como anormalidade sensoriais e motoras também vistas nos pacientes com DH (SWERDLOW *et al.*, 1995). Este modelo apresenta alterações neuropatológicas como atrofia do corpo estriado (LI, POPOVIC, BRUNDIN, 2005) e presença de inclusões nucleares, que são acúmulos de proteína mHtt, no cérebro e em tecidos que se encontram fora do SNC, como é o caso de músculos esqueléticos (VAN DER BURG, BJÖRKQVIST, BRUNDIN, 2009).

Apesar de ser um dos modelos mais amplamente estudados, o R6/2 ainda possui limitações como instabilidade da repetição CAG, que pode variar desde baixa (100 repetições) a altas (300 repetições). Esta instabilidade de repetições pode alterar significativamente o fenótipo do camundongo, sendo necessário rigoroso monitoramento das repetições CAG. Outra desvantagem desse modelo é seu curto tempo de vida, não ultrapassando 15 semanas, o que impede estudos longitudinais com maior durabilidade (YANG & GRAY, 2011).

Outro modelo utilizado para o estudo da DH é o HDH<sup>150</sup>, que possui no exon 1 150 repetições de CAG no lugar da curta sequência de CAG do camundongo selvagem

(LIN *et al.*, 2001). As alterações motoras apresentadas nestes camundongos são de caráter lento e progressivo (HENG *et al.*, 2007; WOODMAN *et al.*, 2007). Foi observado déficit exploratório leve (HENG *et al.*, 2007), alterações no teste de rotarod e de marcha, além de dificuldades de equilíbrio (HENG *et al.*, 2007). Neste modelo, alterações patológicas como agregação da mhTt foi detectada no corpo estriado e hipocampo aos 6 meses de idade e aos 10 meses presença destas estruturas de forma generalizada no cérebro (TALLAKSEN-GREENE *et al.*, 2005). Os camundongos HDH<sup>150</sup> possuem tempo de vida normal, porém apresentam perda de peso exacerbada e progressiva (TALLAKSEN-GREENE *et al.*, 2005).

Camundongos R6/2 são exemplos de animais transgênicos devido a inserção do fragmento da mHtt humana no seu genoma. Já animais HDH<sup>150</sup> são considerados modelos Knockin, pois substituem um gene endógeno por uma sequência de genes exógenas do próprio camundongo. Outro modelo semelhante a constituição genética do R6/2 é o N171<sup>Q82</sup> (SCHILLING *et al.*, 1999), e semelhante ao HDH<sup>150</sup> são o HDH<sup>Q111</sup> (WHEELER *et al.*, 1999) e o CAG<sup>140</sup> (MENALLED *et al.*, 2003).

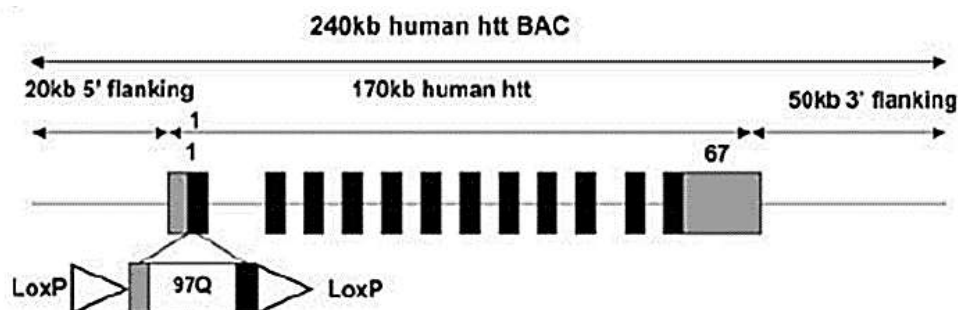
### 1.3.2. O modelo BACHD

O BACHD, é um modelo transgênico murino para a DH estabelecido em 2008 e conta com a introdução estável de um gene exógeno da mHtt humana no genoma do camundongo. Os camundongos BACHD, diferente dos animais descritos anteriormente, expressam o comprimento completo da mHtt humana a partir dos seus próprios elementos reguladores. Essa sequência inserida no Cromossomo Artificial Bacteriano (BAC) contém 240kb, sendo 170kb da Htt humana mutada, além de 20kb na extremidade 5' e 50kb na extremidade 3', flanqueando, assim, a sequência genômica da Htt (GRAY *et al.*, 2008) (Figura 1). Além disso, o BACHD, possui a sequência poliglutamínica “CAA/CAG” de forma mais estável, ou seja, ao contrário dos modelos HDH<sup>150</sup> e R6/2, o comprimento de repetição CAA / CAG em camundongos BACHD é estável em 97 repetições ao longo de muitas gerações, o que confere a este modelo maior confiabilidade para o estudo de características fenotípicas a longo prazo (KAZANTSEV *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 1997). Além dessas características, este modelo possui tempo de vida normal com progressão lenta da doença, o que permite realizar estudos longitudinais mais

detalhados quando comparado aos outros modelos de progressão rápida como o R6/2 (YANG & GRAY,2011).

Por essas razões, o BACHD, tem sido utilizado como ferramenta de estudo em relação às alterações comportamentais, patológicas e fenotípicas ligadas ao SNC. Já foram descritos déficits leves no rotarod aos 2, 6 e 12 meses de idade (HOLMES et al., 2002). Esses camundongos também exibem hipoatividade no teste de campo aberto e apresentam prejuízo significativo na tarefa de labirinto em T (YANG & GRAY,2011). Do mesmo modo, foi descrito que animais BACHD manifestam vários fenótipos comportamentais psiquiátricos (HOLMES et al., 2002), incluindo o aumento da ansiedade e comportamento depressivo (MENALLED et al., 2000).

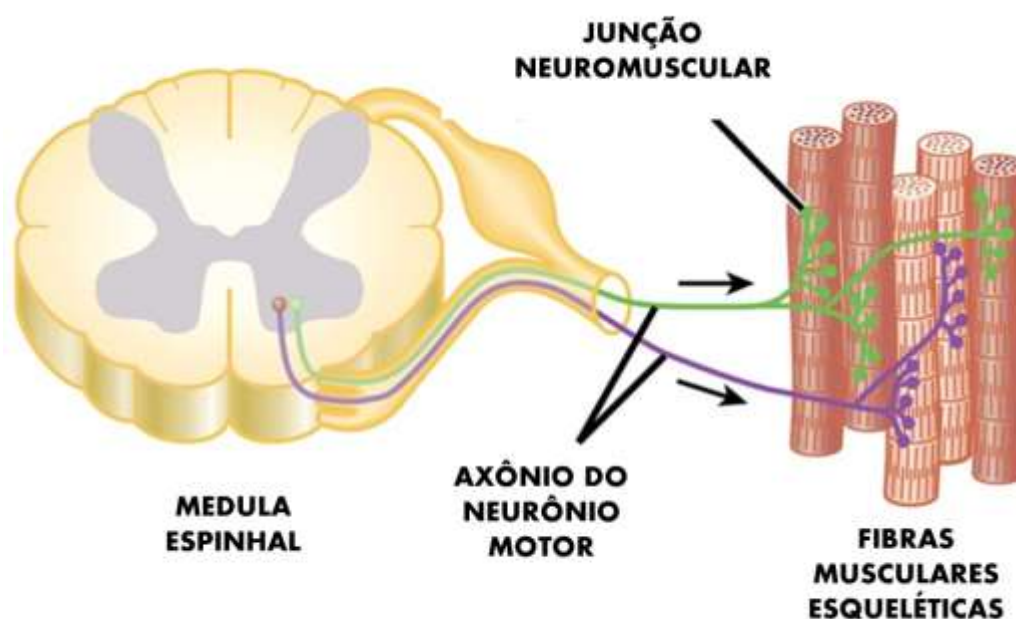
Aos 12 meses de idade, o cérebro do BACHD apresenta atrofia com redução de 20% no peso em comparação com os camundongos do tipo selvagem (GRAY et al., 2008).



**Figura 1: Representação esquemática do modelo BACHD.** Gene humano modificado de 240 kb inserido no Cromossomo Artificial Bacteriano (BAC) com o comprimento completo de 170 kb de Htt humana no locus genômico, acrescido de 20 kb na região flanqueadora 5' e 50 kb na região 3'. O BAC foi manipulado para substituir a Htt endógena no exon 1 pela mHtt, contendo sequência CAA /CAG - 97 que codifica repetições de Poli-Q. Dois sítios loxP foram posicionados para flanquear o exon 1 – mHtt, de modo que a expressão da mHtt pode ser desligado por recombinases do tipo Cre (Modificado a partir de GRAY *et al*, 2008).

#### 1.4. A unidade motora: dos motoneurônios às fibras musculares

A estrutura que faz interligação entre circuitos motores superiores e a execução dos movimentos através dos músculos, é a unidade motora (UM), portanto, a via final do sistema motor (ENOKA, 2000; POWERS, 2000). A UM tem origem no corno ventral da medula espinhal, sendo formada por um motoneurônio, seu prolongamento e terminações axonais, bem como as fibras musculares esqueléticas inervadas por esses elementos (**Figura 2**). O contato entre o terminal nervoso pré-sináptico e a fibra muscular pós-sináptica caracteriza a placa motora ou junção neuromuscular (JNM) (DAUBER, 1995).



**Figura 2: Componentes da Unidade motora.** Corpo e axônio dos motoneurônios (representação verde e roxa) localizados no corno anterior da medula espinhal; Junção neuromuscular (dilatações verdes e roxas) ou terminação nervosas axonais; Fibras musculares esqueléticas (<http://www.psyllassportperformance.com>).

Os motoneurônios são células que recebem aferências de neurônios corticais e que são responsáveis pela inervação das fibras musculares esqueléticas (BEAR *et al.*, 2002).

Classicamente, são classificados em motoneurônios alfa, que inervam as fibras extrafusais e motoneurônios gamma, que inervam a fibra intrafusais (ECCLES & SHERRINGTON, 1930; LUNDY-EKMAN, 2004). Os motoneurônios alfa podem possuir corpo celular pequeno ou grande, e de acordo com Brook & Kaiser, (1970) e MANUEL & ZITNICKI, (2011) podem inervar fibras musculares de contração rápida ou lentas. Da mesma forma, os motoneurônios gama, inervam fibras musculares intrafusais que são relacionadas à propriocepção (MANUEL & ZITNICKI, 2011).

Outro parâmetro para classificar motoneurônios e sua unidade motora foi estabelecido por Burke *et al.*, (1971) e diz respeito a resistência à fadiga. Desta forma são conhecidos motoneurônios S (*slow*) que inervam fibras mais lentas, motoneurônios FF (*fast contracting fatigable motor units*) que são mais susceptíveis à fadiga e os tipos FR (*fatigue resistant*) resistentes à fadiga.

Cada motoneurônio emite um prolongamento chamado axônio que se ramifica em numerosos terminais à medida que se aproxima da fibra muscular, estes terminais juntamente com a membrana pós sináptica são chamados de JNMs e fazem parte do sistema nervoso periférico sendo um modelo experimental que proporciona uma excelente integração entre o sistema nervoso e as células musculares, fornecendo assim subsídios para o estudo das funções sinápticas (revisado por SANES & LICHTMAN, 2001). A JNM de mamíferos é um dos modelos de sinapses mais bem estudados e melhor compreendidos, pois possui dimensões amplas, simplicidade estrutural e melhor acessibilidade quando comparada as outras sinapses localizadas no SNC (KUMMER *et al.*, 2006).

Caracterizada como uma sinapse química, a JNM está anatomicamente e funcionalmente apta para transmitir um sinal do terminal nervoso para a fibra muscular (ENGEL, 2003). Em mamíferos, na região de contato sináptico, o potencial de ação do nervo leva à liberação de um neurotransmissor químico, a acetilcolina (ACh), que atua nos receptores nicotínicos na membrana pós-sináptica e promove uma transmissão sináptica efetiva levando a contração muscular (WILLMANN & FUHRER, 2002).

A sinapse neuromuscular de camundongos possui aspecto circunscrito e formato "arborizado" e é composta por três regiões distintas: o terminal neuronal pré-sináptico,

contendo muitas vesículas sinápticas e mitocôndrias; a fenda sináptica e a membrana pós-sináptica da célula muscular, apresentando diversas dobras juncionais, nas cristas das quais se concentram aglomerados de receptores nicotínicos para a ACh.

Em relação a musculatura esquelética, o músculo estriado esquelético (M.E.E) é responsável pela geração e execução dos movimentos planejados no córtex motor primário e se ligam os ossos através de tendões para coordenar tais movimentos (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; KUANG, GILLESPIE, RUDNICKI, 2008; KERNELL, 2006).

O potencial de ação gerado no motoneurônio alcança a região pré-sináptica da JNM onde ativa canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem. Esses canais quando ativados permitem o influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior do terminal nervoso (LEVITAN & KACZMAREK, 1997). O aumento da concentração intracelular deste íon será responsável pela exocitose de vesículas contendo acetilcolina (ACh) na fenda sináptica. A ACh poderá se difundir para áreas adjacentes sendo degradada pela acetilcolinesterase ou se ligar a receptores para esse neurotransmissor, denominados receptores nicotínicos, presentes na membrana pós-sináptica (MARBAN *et al.*, 1998). A ligação do neurotransmissor ao seu receptor causa aumento da condutância do canal o que permite o influxo de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) a favor do seu gradiente eletroquímico. Como esse canal não é seletivo apenas ao íon  $\text{Na}^+$ , ocorrerá também efluxo de íons potássio ( $\text{K}^+$ ). Desta maneira, o influxo de íons  $\text{Na}^+$  será maior que o efluxo de íons  $\text{K}^+$  devido ao gradiente eletroquímico do  $\text{Na}^+$  ser maior do que o de  $\text{K}^+$ . Em seguida, ocorre a despolarização da membrana pós-sináptica, sendo que se esta despolarização da placa motora alcançar o potencial limiar, potenciais de ação serão originados e se propagarão para toda fibra muscular (HILLE, 1992). O sarcolema das fibras musculares esqueléticas possui invaginações perpendiculares ao eixo longitudinal da fibra chamadas de sistema tubular transverso, responsável pela despolarização que percorre o sarcolema e propague-se para o centro da fibra (MOSS & HOFMANN, 1992).

Após a despolarização do sarcolema, ocorre liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques localizados na cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (LEONG & MACLENNAN, 1998; DULHUNTY, 2002). O  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se aos sítios de baixa afinidade presentes na molécula de troponina C, causando modificação conformacional de sua estrutura alterando a posição do complexo troponina-tropomiosina, permitindo que ocorram interações cíclicas da cadeia pesada da miosina com os filamentos finos de actina,

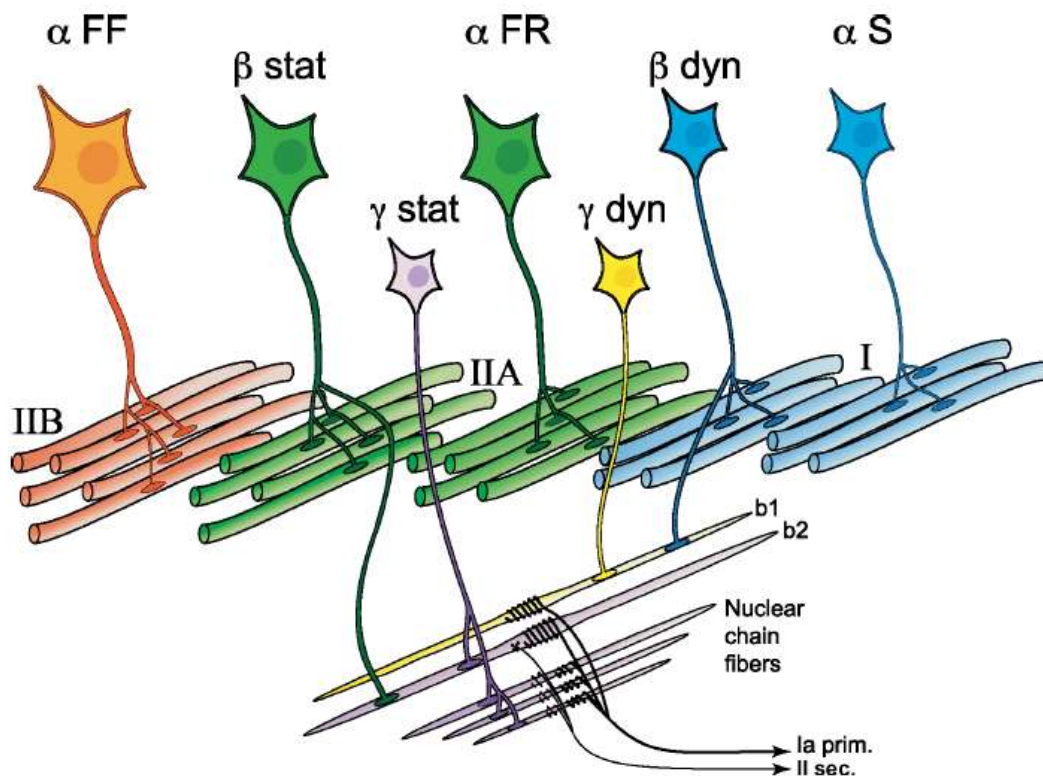
resultando em produção de força e/ou encurtamento dos sarcômeros, gerando a contração muscular (RÜEGG, 1988).

Além disso, existem músculos que possuem fibras de contração lenta, músculos com contração rápida e os de fibras mistas (ESSEN *et al.*, 1975). Essa dinamicidade das fibras musculares é que permite que o mesmo músculo possa ser utilizado na realização de diferentes tarefas (SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011; revisado por LUNA, DAIKOKU, ONO, 2015).

Após a descrição pioneira de Brook e Kaiser em 1970, atualmente as fibras musculares são classificadas de acordo com a expressão de quatro isoformas da cadeia pesada de miosina (*MyHC- Myosin heavy chain*) e se diferem umas das outras com base nas propriedades elétricas, de contratilidade e do metabolismo. Elas são classificadas em fibras de contração lenta a rápida de acordo com expressão do gene da *MyHC* sendo que fibras de contração lenta expressam a *MyHC* tipo I enquanto as fibras de contração rápida expressam a *MyHC* IIA, *MyHC* IIX e *MyHC* IIB (ESSEN *et al.*, 1975; CHAKKALAKAL *et al.*, 2010).

Entretanto, estudos recentes tem utilizado uma nova classificação para os tipos de fibras agrupando-as da seguinte forma: i) fibras de contração lenta oxidativa (tipo I), ii) de contração rápida oxidativa glicolítica (IIA) e fibras de contração rápida glicolíticas (IIB). (BAR & PETTE, 1988; DENARDI *et al.*, 1993; revisado por SCHIAFFINO *et al.*, 2011; revisado por LUNA, DAIKOKU, ONO, 2015). Esta classificação leva em consideração que existem fibras de contração lenta com resistência à fadiga e metabolismo oxidativo e possuem baixa atividade de ATPase. Por outro lado, existem as fibras de contração rápida e que são recrutadas em movimentos de explosão, por esta maneira tendo um perfil mais glicolítico (revisado por SCHIAFFINO *et al.*, 2011; revisado por LUNA, DAIKOKU, ONO, 2015).

Foi também descrito que músculos de fibras rápidas e lentas podem se diferir também pelo padrão de inervação do motoneurônio, sendo as fibras musculares de contração lenta inervadas por motoneurônios pequenos (motoneurônios alfa do tipo S) com JNMs pequenas, enquanto as fibras de contração rápida são inervadas por motoneurônios maiores (alfa FF e FR) com JNMs maiores (**FIGURA 3**) (REID *et al.*, 1999; revisado por SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011; para revisão ver MANUEL & ZITNICKI, 2011).



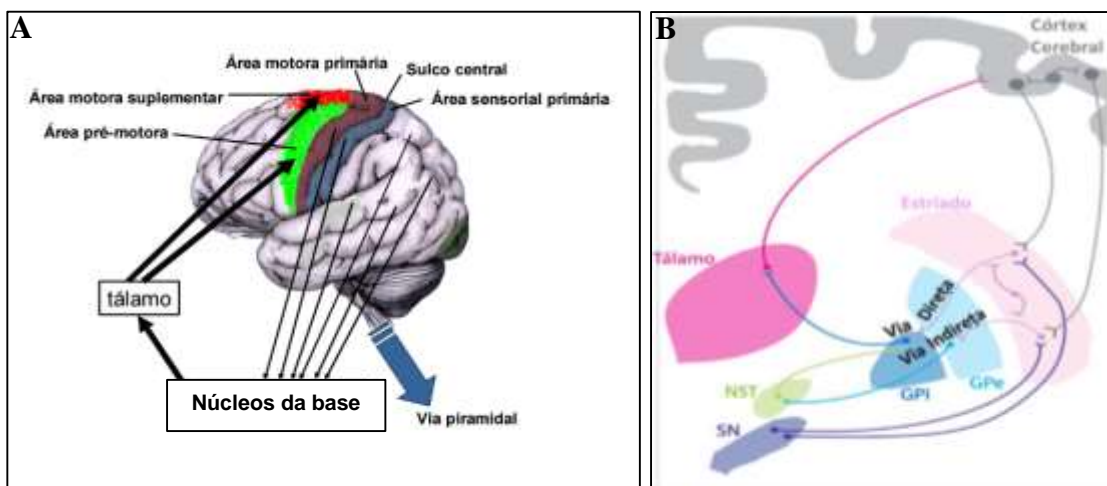
**Figura 3: Representação esquemática dos diferentes tipos de motoneurônios.** A figura representa sete motoneurônios que inervam fibras extrafusais e intrafusais. Os do tipo alfa- FF são os maiores (em termos de tamanho e diâmetro) e inervam um grande número de fibras rápidas do Tipo IIB. Os motoneurônios alfa-FR são um pouco menores e inervam fibras do tipo IIA. Motoneurônios alfa do tipo S são os menores e inervam fibras mais lentas do tipo I. Motoneurônios beta inervam tanto fibras extrafusais como intrafusais podendo inervar fibras do tipo IIA ou IIB. Motoneurônios gamma inervam fibras intrafusais (Adaptado de MANUEL & ZITNICKI, 2011).

### 1.5. A unidade motora e a Doença de Huntington

Apesar de a DH apresentar origem no SNC, é possível fazer um paralelo entre as alterações ocorridas nos centros superiores do movimento com as alterações em estruturas periféricas como JNMs e músculo. Esta correlação é válida, uma vez que existe relação direta entre as estruturas afetadas na DH (neurônios espinhosos médios GABAérgicos estriatais), o córtex cerebral e componentes periféricos. Os núcleos da base estão estreitamente ligados ao córtex cerebral com o qual interagem funcionalmente através de alças de retroalimentação, recebendo projeções (aferências) provenientes de várias regiões corticais (SAKAI *et al.*, 2000; AKKAI *et al.*, 2007). As informações transitam através dos núcleos da base e depois são sempre transmitidas ao tálamo que as reenvia de volta ao córtex cerebral fechando este ciclo (MACHADO, 2005) (**Figura 4 A**).



Sabe-se que neurônios espinhosos médios GABAérgicos, presentes no corpo estriado e que são os principais afetados na DH, projetam-se para o globo pálido externo formando a chamada via indireta. Tais alterações são as responsáveis pelo início dos movimentos involuntários do tipo coreia nas fases iniciais da doença (CROSSMAN, 1987; CROSSMAN *et al.*, 1988). Após esta fase e à medida que a doença progride, outros neurônios como os neurônios espinhosos médios que se projetam para o globo pálido interno e formam a via direta e os neurônios piramidais corticais, começam a ser afetados e os prejuízos causados na via direta tem sido associados à bradicinesia e rigidez presentes nos estágios terminais da doença (BERARDELLI *et al.*, 1999) (**Figura 4B**).

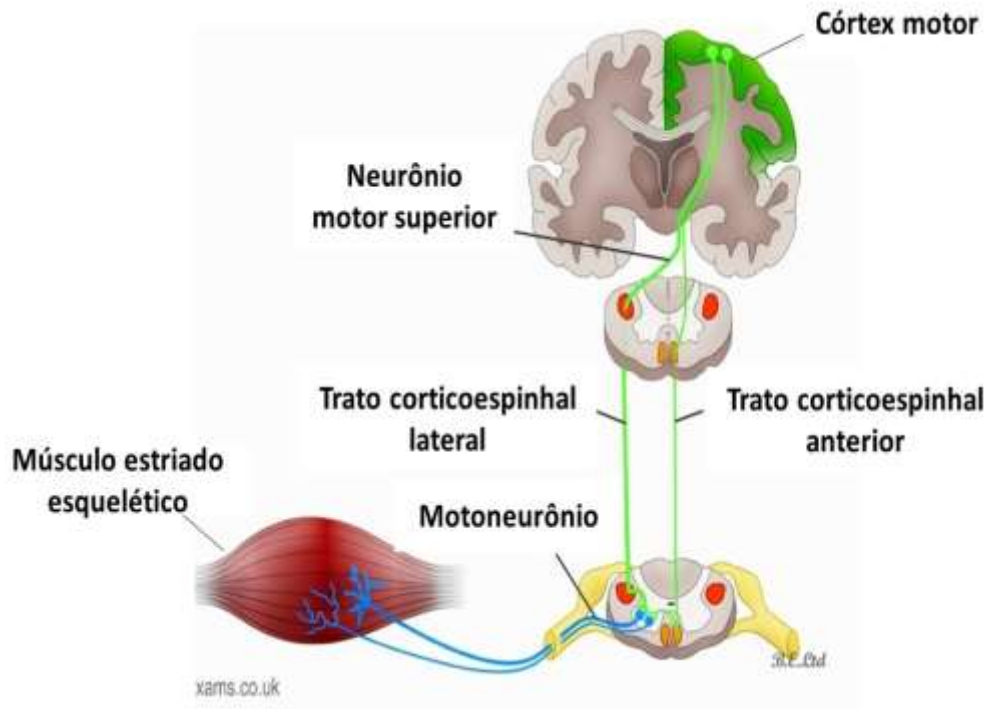


**Figura 4: Estruturas modificadoras do movimento.** A: Interações entre núcleos da base, tálamo e áreas motoras reguladoras do movimento no CórTEX cerebral (adaptado de <http://mp.fmrp.usp.br/>). B: Ilustração das principais projeções neuronais acometidas na DH. A linha tracejada rosa indica os neurônios espinhosos médios GABAérgicos estriatais, já a linha tracejada cinza faz referência aos neurônios piramidais corticais que em conjunto são as projeções neuronais mais afetadas na DH. A morte desses neurônios tem sido relacionada aos sintomas motores da doença. GPI, globo pálido interno; GPe, globo pálido externo; NST, núcleo subtalâmico; SN, substância nigra (Adaptado de Han *et al.*, 2010).

Uma vez que existem conexões das estruturas afetadas e o córtex cerebral, é possível fazer um novo paralelo entre as conexões entre córtex e medula espinhal. Sabe-se que o controle do sistema motor é feito pelo córtex cerebral, que envia impulsos nervosos através do chamado trato córtico-espinhal, que se comunica com interneurônios e chegam aos motoneurônios responsáveis pela inervação dos M.E.E (LEMON & GRIFFITHS, 2005). O trato córtico-espinhal tem origem em diversas regiões do córtex cerebral sendo que a região denominada córtex motor primário é responsável por enviar aproximadamente 31% dos axônios que formam o trato córtico-espinhal (MACHADO, 2005). As fibras deste trato seguem através da coroa radiada e quando chegam na decussação das pirâmides, parte das fibras continua ventralmente, para formar o trato córtico-espinhal anterior, que na região posterior cruza na comissura branca da medula para então fazer sinapse com os motoneurônios contralaterais. O restante das fibras cruza na decussação das pirâmides para dar origem ao trato córtico-espinhal lateral que faz sinapse com os motoneurônios ipsilaterais e por fim terminando em motoneurônios que controlam tanto a musculatura axial como a distal e são as principais responsáveis pela motricidade voluntária no homem (**Figura 5**) (MACHADO, 2005; WOLPERT, GHAHRAMANI, FLANAGAN, 2001, LEMON & GRIFFITHS, 2005). Em resumo, percebe-se que existem interações corticais com componentes da UM fechando o circuito que compõe o sistema motor. Além disso, estudos como o de Donoghue *et al.*, (1992) e Sanes & Schiebr, (2001), através de marcação retrograda confirmam que existem regiões no córtex que possuem conexão com vários músculos bem como cada musculo tem seu ponto de conexão no córtex. Desta forma mesmo que a DH tenha origem em centros superiores do controle motor é possível que a extensão dos danos se propague através de outras regiões que fazem parte do sistema motor como um todo.

Mediante ao exposto, por estar relacionada a processos como a contração muscular, conservação do tônus muscular e coordenação motora, a manutenção das estruturas que compõem a UM é de fundamental importância para o movimento. Desta forma, compreender como se processam as diversas alterações nesta estrutura, mais especificamente nos elementos pré e pós-sinápticos, no tecido muscular e também nos motoneurônios da medula espinhal durante o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a DH, é um tema relevante. Além disso, e não menos importante, evidências recentes apontam que embora a patologia da DH tenha origem no SNC, mudanças ocorridas na periferia e que afetam músculos estriados esqueléticos podem ocorrer de forma independente da progressão da disfunção cerebral e parecem

estar relacionadas com a expressão de mHtt mutante nos tecidos periféricos (VAN DER BURG, BJÖRKQVIST, BRUNDIN, 2009). Estas evidências reforçam ainda mais a necessidade de se estudar estruturas que se encontram fora do SNC.



**Figura 5:** Representação esquemática das interações entre córtex motor e a unidade motora (adaptado de <http://www.clinicalexams.co.uk/corticospinal-tracts-lesions>).

## **2. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar possíveis alterações morfofuncionais nas unidades motoras de camundongos transgênicos para Htt (BACHD) em diferentes músculos na idade de 12 meses.

### **2.1. Objetivos Específicos**

- 1)** Realizar testes comportamentais motores nos animais WT e BACHD na idade de 12 meses;
- 2)** Caracterizar nos planos óptico e ultraestrutural, motoneurônios localizados nos segmentos cervical e lombar de medulas espinhais de camundongos BACHD e WT na idade de 12 meses;
- 3)** Avaliar, nos planos óptico e ultraestrutural, possíveis alterações axonais em camundongos BACHD e WT na idade de 12 meses;
- 4)** Caracterizar através de microscopia óptica de fluorescência possíveis alterações pré e pós- sinápticas nas junções neuromusculares dos músculos ETM e TA em camundongos BACHD e WT na idade de 12 meses;
- 5)** Avaliar, nos planos óptico e ultraestrutural possíveis alterações morfológicas nas fibras musculares de ETM e TA de camundongos BACHD e WT na idade de 12 meses;

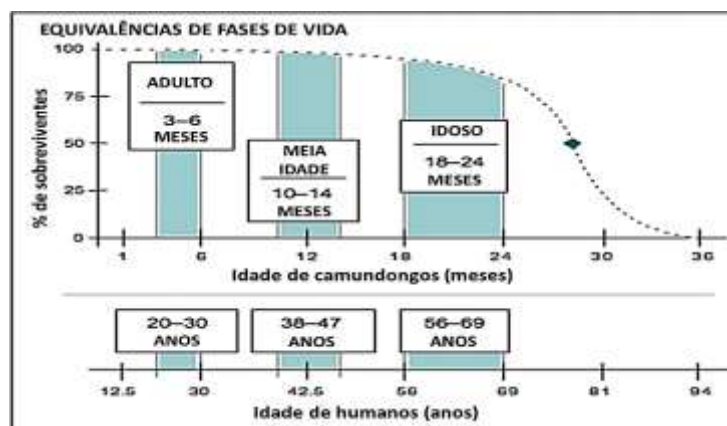
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Modelo animal-Camundongos BACHD

Camundongos transgênicos FVB/NJ (wild type) e FVB/N-Tg (HTT\* Q 97) IXwy/J (BACHD) foram gerados por Gray *et al.*, (2008), introduzindo 170 kb da Htt humana em 240 kb RP11-866L6 BAC (Bacterial Artificial Chromosome). O locus da proteína Htt foi alterado através da inserção de um exon com 97 repetições mistas CAA-CAG no gene da proteína Htt humana. Os animais foram adquiridos através do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA) e utilizados para estabelecer nova colônia de onde foram obtidos camundongos WT e BACHDs na idade de 12 meses.

Nossos experimentos foram realizados em animais WT e BACHD com 12 meses, pois estudos anteriores usando este modelo, demonstraram sinais neurodegenerativos pronunciados no córtex cerebral e déficits no comportamento motor em camundongos desta idade. (GRAY *et al.*, 2008; Para revisão ver YANG & GRAY, 2011). Além disso, de acordo com o quadro comparativo de idades entre seres humanos e camundongos, esta idade corresponde à meia idade em seres humanos, sendo a idade em que os sintomas da DH começam a se manifestar na maioria dos indivíduos afetados (**Figura 6**).

Os animais foram mantidos em um local com temperatura controlada (23 ° C), em ciclo 12h luz / 12h escuro, tendo alimentos e água fornecidos *ad libitum*. Os cuidados com os animais estavam de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), sob aprovação do protocolo # 036/2013.



**Figura 6: Quadro comparativo das fases de vida entre seres humanos e camundongos.** Note que a idade de 12 meses em camundongos equivale ao início da meia idade em seres humanos. (Adaptado de Flurkey, Currer, Harrison, 2007).

## 3.2. Genotipagem dos animais

### 3.2.1. Extração do DNA das amostras

Amostras de tecidos de camundongos WT e BACHD tiveram o DNA extraído a partir da adição de 500µL de solução de extração que constituía de: H<sub>2</sub>O, SDS 10%, Tris-EDTA, NaCl, Proteinase K e foram deixadas *overnight* em banho-maria a 55 °C. Após a centrifugação a 16.000g por 10 minutos em temperatura ambiente o sobrenadante foi transferido para novos *ependorfs* contendo 500µL de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas (10x) e submetidas a uma nova etapa de centrifugação a 16.000g por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi então descartado e os tubos foram deixados invertidos e abertos para secagem por pelo menos 1 hora à temperatura ambiente. Após a secagem, 200µL de solução TE 0,5X (Tris HCl 1M, EDTA 0,5M, H<sub>2</sub>O) foi adicionado aos *ependorfs* e deixado no banho-maria a 37°C por no mínimo 1 hora. As amostras de DNA foram armazenadas a 4°C.

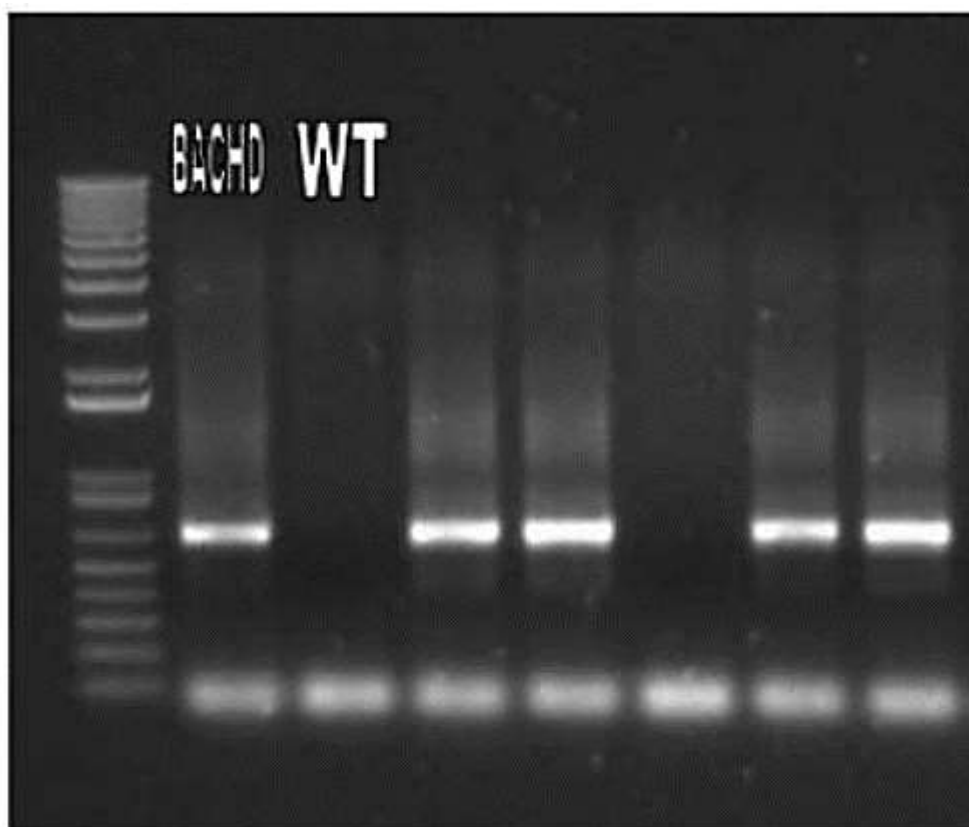
### 3.2.2. Etapa de amplificação do DNA

Utilizando a técnica de Multiplex PCR, no qual um mix de iniciadores é utilizado em cada reação, permitindo a identificação das linhagens numa mesma reação de PCR, os genes da Htt e do controle actina foram amplificados. As sequências dos iniciadores e o tamanho dos amplicons gerados estão representados na tabela 1, e um exemplo da identificação das bandas é mostrado na figura 7. As reações foram realizadas utilizando 0,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2,00 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTPs; 1,0 µM de cada iniciador (tabela 1), 500ng de DNA genômico, juntamente com o tampão fornecido pelo fabricante diluído para 1X, num volume final de 12µL de reação. A amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 35 ciclos formados por uma etapa de desnaturação a 94°C por 45 segundos, uma etapa de anelamento a 60°C por 45 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 45 segundos. A ciclagem termina com uma etapa de extensão final a 72°C por 2 min. Após a amplificação, 12µL da amostra mais 3µL de tampão de amostra 5X foi aplicada em gel de agarose a 2% contendo Sybr Safe (100mL de TAE 0,5X, 2g agarose, 10µL Syber Safe). O gel foi acondicionado a uma cuba de eletroforese horizontal com solução tampão de corrida Tris-Acetato-EDTA (TAE 0,5X) e submetido a uma corrente de 100 volts por 30

minutos aproximadamente. As imagens referentes ao gel, foram realizadas utilizando o transiluminador.

**Tabela 1:** *Iniciadores utilizados no PCR convencional*

Nome	Sequência	Amplicon (pb)
Actina (Forward)	TGG AAT CGT GTG GCA TCC ATC A	122
Actina (Reverse)	AAT GCC TGG GTA CAT GGT GGT A	
Htt (Forward)	CCG CTC AGG TTC TGC TTT TA	650
Htt (Reverse)	TGG TCG GTG CAG CGG CTC CTC	



**Figura 7:** Imagem representativa do gel de genotipagem de camundongos BACHD. As bandas representam a amplificação do gene da Htt. Os animais WT foram identificados pelas canaletas que não apresentaram bandas, pois indicam a ausência da Htt transgênica humana (Dória, 2013).

### 3.3. Análises morfológicas e morfométricas

Animais WT e BACHD foram anestesiados com cetamina / xilazina (0,1 ml / 20g), em conformidade com as diretrizes do protocolo CEUA / UFMG. Os três primeiros segmentos cervicais da medula espinhal (C1-C3), os cinco lombares (L1-L5) e os músculos ETM e TA foram dissecados e fixados em glutaraldeído a 4% diluído em solução salina tamponada com fosfato (0,2 M) durante 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram desidratados em uma série ascendente de álcoois (70%, 80%, 90%, 95% 2X). As amostras foram incluídas em resina glicolmetacrilato (Leica) e seccionadas em um micrótomo (Reichert Jung), obtendo-se secções na espessura de 5 µm. Secções de amostras dos músculos e segmentos cervicais e lombares da medula espinhal foram corados com azul de toluidina (EMS) para medições de área de secção transversa (AST) de fibras individuais, além de número e diâmetro de motoneurônios. Os motoneurônio dos segmentos cervicais e lombares também foram marcados com anticorpo anti- *Choline Acetyltransferase* (anti-ChAT) anti-goat (AB144P -Millipore Corporation ;1: 100- veja protocolo a seguir), para determinar o número e diâmetro de Ferret de motoneurônios com este marcador específico para este tipo celular. Somente motoneurônios apresentando núcleos e nucléolos evidentes foram contados e medidos. As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio (Leica DM2500) acoplado a uma câmera CCD (Leica DFC345FX). Músculos e secções dos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal foram fotografados com objetivas de 10X e 63X, respectivamente.

As amostras contendo raízes ventrais cervicais foram processadas seguindo o protocolo de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (veja a seguir). Secções transversais semi-finas (300 nm) foram obtidas e coradas com azul de toluidina. As imagens de raízes ventrais cervicais de animais WT e BACHD foram adquiridas utilizando objetiva de 20x em um microscópio Zeiss Axio Lab.A1. A AST das raízes ventrais e o número total de axônios foram mensurados através do programa Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). Para quantificar a mielinização axonal, utilizou-se o parâmetro G-ratio, que foi calculado medindo o diâmetro interno axonal e dividindo-o pelo diâmetro externo seguindo a fórmula:  $G = d / D$ , onde G representa o G-ratio, d é o diâmetro interno e D o diâmetro externo (CHAU *et al.*, 2000). O tamanho adotado para classificar grandes fibras mielinizadas foi  $> 4,5 \mu\text{m}$ , de acordo com os critérios de avaliação descritos por Kong & Xu, (1999).



### 3.4. Imunofluorescência para determinação das isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC)

As *MyHC* do músculo ETM e TA foram determinadas de acordo com protocolo descrito por Valdez *et al.*, (2012). Os camundongos foram sacrificados e os músculos foram retirados cirurgicamente de animais WT e BACHD. Foram então orientados em fôrmas específicas contendo meio de congelamento OCT (Easy Path), congelados utilizando isopentano (Sigma-Aldrich) resfriado em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. A região do ventre muscular foi cortada em um criostato (Leica CM3050S) e as secções transversais com 10µm de espessura foram coletadas em lâminas revestidas com gelatina. As lâminas contendo as secções musculares passaram pelo processo de bloqueio com BSA a 3%, soro de cabra a 5% e 0,1% de Triton X-1000 por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas a 4°C, *overnight*, com os seguintes anticorpos primários: tipo I (NCL-Novocastra, Leica 1:250); tipo IIA (SC-71, Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB 1:100), tipo IIX (BF-35 DSHB 1:100, o qual reconhece todos os tipos de fibras musculares exceto as IIX) e tipo IIB (BF-F3, DSHB 1:100) todos diluídas em solução de bloqueio contendo 3% de BSA e 5% de soro de cabra. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpos secundários: Alexa 488 goat anti-mouse IgG1 (reconhece os anticorpos dos tipos I, IIA e IIX) e Alexa 488 goat anti-mouse IgM (reconhece os anticorpos do tipo IIB). Finalmente, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e montadas usando o meio de montagem ProLong® Gold (Thermo Scientific).

As imagens foram adquiridas usando objetiva de ar (10x, N.A: 0,25) acoplada a um microscópio de fluorescência (Leica DM2500) e visualizadas no computador. A luz de excitação foi proveniente de uma lâmpada de 100W Hg e um filtro para FITC foi usado para coletar a luz emitida. Foram capturadas de 3 a 4 imagens por secção transversal. Cada tipo de fibra foi apresentado como porcentagem do total do número de fibras contadas. As imagens foram analisadas através dos programas Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA) e Microsoft Excel® e convertidos em representações gráficas através do programa GraphPad Prisma 6.0 (San Diego, CA, USA).

### 3.5. Imunofluorescência em segmentos cervicais e lombares da medula espinhal

Para avaliar a expressão de caspase-3 em segmentos cervicais e lombares da medula espinhal de animais WT e BACHD, estes segmentos foram dissecados e imediatamente imersos em formalina neutra tamponada (NBF) durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Secções de 5 µm foram obtidas utilizando um micrótomo (modelo HM335E; Microm, Inc., Minneapolis, MN). A ligação inespecífica do anticorpo foi bloqueada através da incubação das amostras em solução de BSA a 2% com 0,1% de Tween-20 durante 1 hora utilizando câmara úmida. As secções foram incubadas com anticorpo primário (polyclonal rabbit anti-caspase-3, 1:100; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) diluído em solução de bloqueio *overnight* a 4 ° C em câmara úmida. As secções foram então lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit a 1: 1000; Invitrogen, Eugene, OR) durante 1 hora. Subsequentemente, as secções foram lavadas 3 vezes com PBS, e na última lavagem, marcados com DAPI para permitir a identificação do núcleo das células (1: 1000; Invitrogen, Eugene, OR). As lâminas marcadas foram fotografadas usando o microscópio NIKON ECLIPSE Ti (objetiva de 100X, N.A: 1,49). Todas as imagens digitais foram analisadas quantitativamente utilizando o *software* Image J. (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA) e convertidos em representações gráficas através do programa GraphPad Prisma 6.0 (San Diego, CA, USA).

Para marcação específica de motoneurônios com anticorpo anti-ChAT, o corno ventral dos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal foram removidos e fixados com PFA a 4% durante 48 horas. Posteriormente, estes segmentos foram mantidos em sacarose 30% durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram orientadas em moldes de congelamento cobertas com meio de congelamento OCT (Easy trajeto) e foram congeladas em isopentano fresco (Sigma-Aldrich) arrefecido em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 ° C. Os segmentos cervicais e lombares da medula espinhal foram cortados em criostato (Leica CM3050 S) e as secções transversais (30 µm) foram recolhidas em lâminas revestidas com gelatina. As lâminas contendo secções dos segmentos cervicais e lombares foram bloqueadas por 60 minutos à temperatura ambiente

com BSA a 3%, soro de burro a 5% e 0,1% de Triton X-100. Em seguida, as secções foram então incubadas *overnight* a 4 ° C com o seguinte anticorpo primário diluído em BSA a 3%, 5% de soro de burro: ChAT anti-goat, Millipore Corporation (1: 100).

As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo secundário Alexa 488 donkey anti-goat IgG1 (1:800). As lâminas foram lavadas novamente 3 vezes com PBS 1x e montadas utilizando o meio de montagem ProLong®Gold (Thermo Scientific Invitrogen™). As imagens foram adquiridas usando objetiva de imersão em óleo de 63x (N.A: 1,4) acoplada a um microscópio confocal de escaneamento a laser (Zeiss LSM 510 Meta, Zeiss GmbH, Jena, Alemanha). Laser de argônio (488 nm) foi usado para a excitação dos fluoróforos que se ligaram aos motoneurônios marcados com anti-ChAT. A série Z das secções ópticas foi coletada em intervalos de 2.0µm. Todas as imagens digitais foram analisadas quantitativamente utilizando o *software* Image J. (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA) e convertidos em representações gráficas através do programa *GraphPad* Prisma 6.0 (San Diego, CA, USA).

### **3.6. Análises de JNMs por microscopia confocal**

Os animais foram anestesiados com cetamina / xilazina (0,1 mL / 20 g) e em seguida foi realizada a perfusão transcardíaca do ventrículo esquerdo com solução resfriada de 4% de paraformaldeído em 0,1 M de solução (PBS; pH 7,4). Os músculos ETM e TA foram dissecados e passaram pela etapa de bloqueio em 3% de BSA + 5% soro de cabra + 0,5% de Triton X-100 durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado anticorpo primário anti-sinaptotagmina (Anti-sinaptotagmina, anti-mouse, IgG2A, DSHB, 1: 250) em solução de bloqueio, e incubadas *overnight* a 4 ° C. Os músculos foram lavados 3 vezes com PBS 1x e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente com Alexa 555- $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BTX) 1: 1000 (Molecular Probes, Eugene, OR) em conjunto com um anticorpo secundário (Alexa 488 anti-goat IgG2a; 1;1000; Invitrogen). Os músculos foram então lavados novamente 3 vezes com PBS 1x e as lâminas contendo todo o tecido foram montadas utilizando meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Eching, Alemanha). As imagens de JNMs marcadas com anti-sinaptotagmina e  $\alpha$ -BTX foram adquiridas utilizando objetiva de imersão em óleo de 63x (NA: 1,4) ligada a um microscópio confocal de escaneamento a

laser (Zeiss LSM 510 Meta, Zeiss GmbH, Jena, Alemanha). Lasers de Argon (488 nm) e de hélio-neon (HeNe, 543 nm) foram utilizados para a excitação de fluoróforos de terminais marcados com anti-sinaptotagmina e aglomerados de receptores de acetilcolina (nAChR) marcados com  $\alpha$ -BTX, respectivamente. As secções em série Z foram coletadas em intervalos 2.0 $\mu$ m, e os músculos inteiros (ETM e TA) foram digitalizados. As terminações nervosas foram identificadas considerando a sua colocalização com os conjuntos de nAChR. As imagens foram convertidas em escala de 8 bits e cada elemento sináptico foi avaliado individualmente. Foi utilizado o método de análise de partículas para obter o índice de fragmentação das JNMs, baseando-se na quantidade de pixels apresentados em cada imagem. Resumidamente, as imagens foram convertidas em um padrão de imagem binária e passaram pelo processo de “*skeletonize*” contido no programa image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). Em seguida, para descrever a conectividade para cada pixel na imagem, um histograma foi gerado usando o plugin BinaryConnectivityClass de Image J (protocolo completo em Pratt *et al.*, 2013). Foi analisado o grau de fragmentação em elementos pré e pós-sinápticos, comparando as amostras de músculo de camundongos WT e BACHD. Os parâmetros adotados para a fragmentação foram definidos de acordo com os critérios de avaliação descritos por Valdez *et al.*, (2010), em que estabelece o padrão de fragmentação quando observa-se cinco ou mais ilhas, tanto nos terminais pré-sinápticos quanto nas regiões pós-sinápticas.

### **3.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão e análises ultraestruturais**

Para a análise ultraestrutural dos motoneurônios dos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal e das fibras musculares de ETM e TA foi utilizado o protocolo previamente estabelecido em nosso laboratório por Rodrigues *et al.*, (2013). Em resumo, os animais foram anestesiados com cetamina / xilazina (0,1 mL / 20 g) e submetidos a perfusão transcardíaca no ventrículo esquerdo com solução fixativa resfriada de Karnovsky modificado (4% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em tampão de cacodilato 0,1 M a 4 ° C). As amostras foram mantidas nesta solução durante pelo menos 24 horas a 4°C. Em seguida os segmentos medulares e os músculos de interesse foram retirados dos animais WT e BACHD.

Após a fixação, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato (0,1 M), seccionadas em vários fragmentos, pós-fixadas em ósmio reduzido (1% de tetróxido de ósmio

contendo 1,6% de ferrocianeto de potássio). Passaram então para a fase de contrastação em bloco com acetato de uranila (UA, 2% em água deionizada), Em seguida, as amostras foram lavadas com água deionizada por 10 minutos em temperatura ambiente e as amostras foram desidratadas em uma série ascendente de etanol (35, 50, 70, 85, 95 e 100%) e acetona absoluta à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a 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 das amostras foram infiltrados e incluídos 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 dos tecidos, foi realizada a microtomia com navalha de vidro (cortes semi-finos de 300 nm) para seleção das áreas de interesse, as quais apresentavam grande potencial para conter motoneurônios nos casos dos segmentos cervicais e lombares e fibras musculares no caso dos músculos. Em seguida, foi realizada a ultramicrotomia 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 para a coleta das secções foram utilizadas telas de cobre sem grades, porém cobertas por películas de formvar. Por fim, as telas coletadas contendo secções de 50 nm foram contrastadas com citrato de chumbo (solução de Reynolds) para posterior visualização. Os cortes foram visualizados através de microscópio eletrônico Tecnai- G2-Spirit FEI / Quanta (120 kV Philips) localizado no Centro de Microscopia da UFMG. O mesmo protocolo foi utilizado para obtenção de cortes semi-finos de raízes ventrais dos segmentos cervicais da medula espinhal. Imagens dos cortes semi-finos abrangendo raízes ventrais inteiras foram adquiridos utilizando ZEISS Axio Lab.A1 (objetiva de 20X, N.A: 0,45) e analisados qualitativa e quantitativamente, como descrito anteriormente. Foram analisados um total de 3222 axônios em animais WT e 1.937 em BACHD.

Para a quantificação dos grânulos de lipofuscina, foram usadas 30 micrografias eletrônicas de transmissão da medula espinhal cervical para cada genótipo. A contagem dos grânulos foi realizada utilizando o *software* Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). Os dados são apresentados como grânulos / área, utilizando o GraphPad Prism 6.

### 3.8. Testes comportamentais motores

#### Tempo para queda (*Wire-hang*)

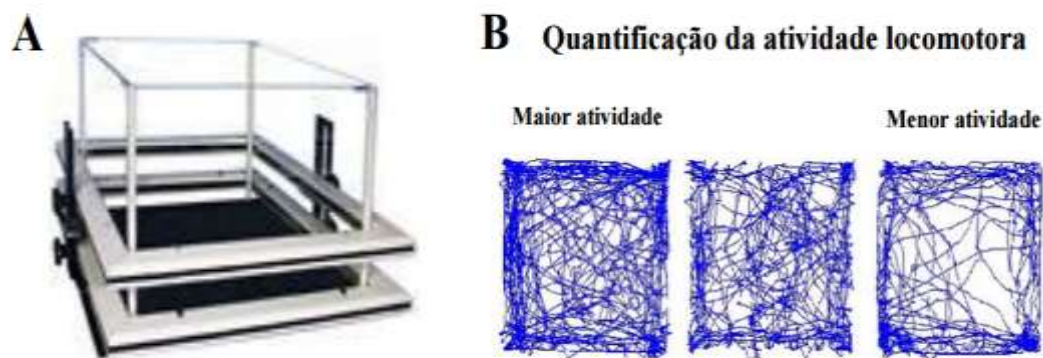
O teste de tempo para queda (*wire hang*) é uma medida de avaliação da força muscular em roedores e os experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo descrito por Sango *et al.*, (1996) e Prado *et al.*, (2006). Os animais foram habituados à sala de experimentação e manipulados pelo experimentador pelo menos duas horas antes do teste. O aparato utilizado consistia em uma grade metálica com espaçamento de 1 cm entre as barras de 0,8 mm de diâmetro (**Figura 8**). O teste foi conduzido em única sessão, na qual o animal foi individualmente colocado sobre a grade até realizar o movimento de preensão. A grade foi então invertida e mantida a 20 cm acima de um acolchoado de espuma. Importante ressaltar que esta altura é suficiente para que o animal se mantenha preso à grade, no entanto é incapaz de feri-lo no caso de queda. Foi mensurada a latência, ou tempo até que o animal se desprendesse e caísse da grade invertida durante 60s de observação e utilizada a média de 3 observações por animal.



**Figura 8:** Aparato de teste *wire hang*. Aparato metálico com espaçamento de 1 cm entre as barras de 0,8 mm de diâmetro utilizado para medir força em roedores (<http://www.waisman.wisc.edu/rmc-bts-tests.htm>).

### Campo aberto (*open field*)

A atividade locomotora espontânea foi avaliada por meio de um sistema automático de campo aberto (LE 8811 IR Monitores de Atividade Motora PANLAB / HARVARD APPARATUS), com dimensões da caixa acrílica de 450x450x200mm (largura x profundidade x altura) (PEREIRA *et al.*, 2014), como mostrado na figura 9A. Os animais WT e BACHD foram habituados na sala de teste comportamental por, no mínimo, 60 min. As atividades detectadas no plano horizontal (distância percorrida) (**Figura 9B**) e vertical (*rearing*) foram medidas durante 60 min. A medida da atividade total foi calculada usando o programa ACTITRACK e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 6*.



**Figura 9: O teste de campo aberto:** Representação do LE 8811 - IR Actímetro, aparato de campo aberto. A: Equipamento PANLAB/HARVARD- Actímetro infravermelho (IR) permite o estudo da atividade locomotora espontânea em roedores. O software proporciona a distância total percorrida, bem como a percentagem de tempo / distância dentro de diferentes partes da arena. B: Representação gráfica da atividade locomotora detectada e gerada pelo equipamento (adaptado de <http://bpc.facilities.northwestern.edu/behavioral-assays>).

### Teste de força de agarre (*Gripe Force*)

O teste de força de agarre foi realizado de acordo com Fowler *et al.*, (2002). Foi utilizado um transdutor de força conectado a um pequeno suporte metálico que pôde ser agarrado pelo camundongo (**Figura 10**). O transdutor de força foi acoplado a um computador que registrou a força de agarre máxima exercida pelo camundongo. Os animais foram habituados a sala de testes e manipulados por apenas um examinador.

Durante o teste, o experimentador manuseia os animais delicadamente pela cauda para permitir aderência do animal com as patas dianteiras ao aparelho mantendo o corpo do animal em paralelo à superfície.

Depois de se manter durante dois segundos nesta posição, o experimentador aumenta continuamente a força até que os animais percam a aderência. O pico de força máxima é registrado automaticamente no momento em que os animais perdem a aderência e é expresso em gramas / força (g / f). O teste foi realizado três vezes para cada animal em um período máximo de 60 segundos. Os valores médios de três ensaios foram calculados para cada animal e utilizada para posterior análise.



**Figura 10: Teste de força de agarre.** Aparelho utilizado para medir objetivamente a força de agarre determinando o pico de força máxima desenvolvida por roedores. A medição é realizada usando um transdutor de força e um dispositivo eletrônico oferecendo uma taxa de amostragem de 1000 Hz. Isto assegura que a força máxima é perfeitamente capturada ([http://www.bioseb.com/bioseb/anglais/default/item\\_id=48.php](http://www.bioseb.com/bioseb/anglais/default/item_id=48.php)).



### **3.9. Análise estatística**

Todos os dados foram analisados utilizando Microsoft Excel e plotados através do programa GraphPad Prism 6. A significância estatística foi avaliada utilizando o teste t de Student não-pareado e os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão (média  $\pm$  SD) ou (mediana), como descrito no texto. Quando os dados não apresentavam distribuição normal, foi aplicado o teste de Man-Whitney, como descrito no texto. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

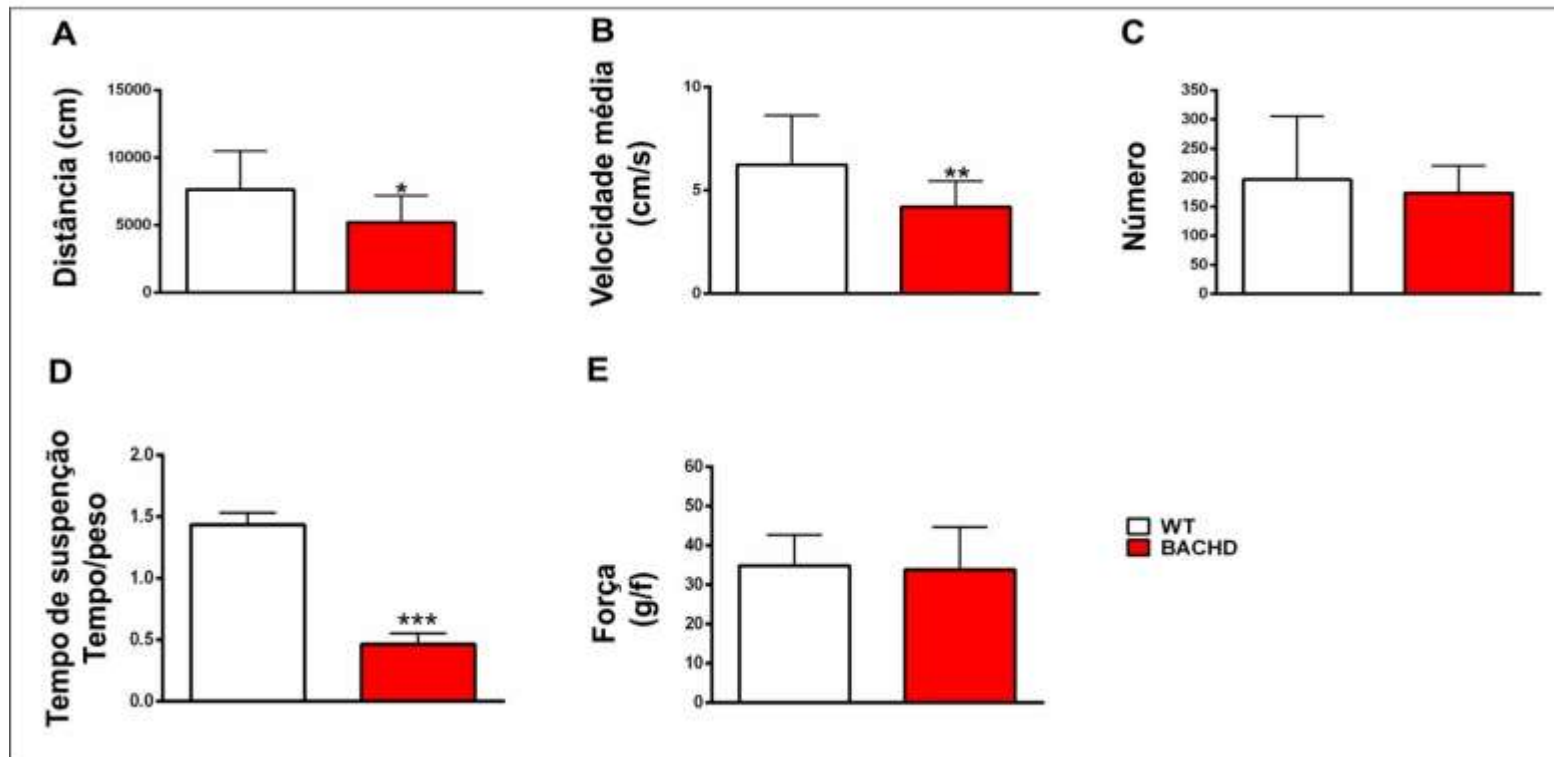
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Animais BACHD de 12 meses apresentam alterações comportamentais

Dados da literatura discorrem sobre os sintomas motores observados na DH tais como os clássicos movimentos involuntários dos membros e face, instabilidade postural de tronco e pescoço, alterações da marcha e de tônus muscular, culminando na grande incapacidade de realizar movimentos voluntários (HADDAD & CUMMINGS, 1997).

A fim de determinar se camundongos BACHD possuem alguma alteração no comportamento motor em relação aos animais controles, utilizamos os seguintes testes: tempo para queda (*wire hang*), teste de força de agarre (*grip force*) e o campo aberto (*open Field*). Nossos resultados mostram que no teste de campo aberto, em geral os animais BACHD possuem comportamento exploratório diminuído com hipoatividade uma vez que a distância média percorrida foi significativamente menor neste genótipo quando comparados aos camundongos WT (BACHD:  $5216,0 \pm 1987$  cm/s Vs WT:  $7647,0 \pm 2865$  cm/s (média  $\pm$  SD)  $t_{26} = 2,6$ ; \* $p = 0,01$ ; *student t- test* não pareado) (**Figura 11A**). Além disso, os animais BACHD apresentaram índices menores no que se refere à velocidade média percorrida em relação aos controles (BACHD:  $4,2 \pm 1,2$  cm/s Vs. WT:  $6,2 \pm 2,3$  cm/s (média  $\pm$  SD);  $t_{26} = 2,9$ ; \*\*\* $p = 0,006$ ; *student t- test* não pareado) (**Figura 11B**). No entanto, na tarefa de exploração vertical do ambiente (*rearing*) não observamos diferenças significativas entre os dois genótipos, embora o desempenho de exploração de camundongos BACHD tenha sido reduzido (BACHD:  $173,3 \pm 47,1$  cms Vs. WT:  $196,8 \pm 108,6$  cms (média  $\pm$  SD);  $t_{24} = 0,75$ ;  $p = 0,5$ ; *student t- test* não pareado) (**Figura 11C**). Também não observamos diferenças significativas no teste de força de agarre (*grip force*) (teste para comparar a força máxima) (BACHD:  $33,8 \pm 10,8$  N/cm<sup>2</sup>, Vs. WT:  $34,8 \pm 7,8$  N/cm<sup>2</sup> (média  $\pm$  SD);  $t_{26} = 0,26$ ;  $p = 0,39$ ; *student t- test* não pareado) (**Figura 11E**). Entretanto, no teste tempo para queda (*wire hang*), os animais BACHD apresentaram mais dificuldades para manter o seu próprio peso, enquanto a maioria dos camundongos WT mantiveram-se firmemente aderidos ao aparato experimental, demonstrando força para manter seu próprio peso durante toda a duração do teste (60 s) (BACHD:  $0,4 \pm 0,3$  s Vs. WT:  $1,4 \pm 0,3$  s (média  $\pm$  SD);  $t_{27} = 7,2$ ; \*\*\* $p = 0,0001$ ; *student t- test* não pareado) (**Figura 11D**). Importante ressaltar que, para este teste, o tempo de permanência no aparato foi corrigido pelo peso do animal. Em suma, os resultados obtidos mostram que

os camundongos BACHD apresentam alterações motoras importantes de força e locomoção/exploração.



**Figura 11: Animais BACHD com 12 meses de idade apresentaram alterações no comportamento motor.** A: Quantificação gráfica da distância total percorrida por camundongos WT e BACHD, mostrando hipoatividade nos animais transgênicos (\* $p=0.01$ ). B: Quantificação gráfica da velocidade média percorrida por ambos os genótipos com diminuição nos animais BACHD (\*\* $p=0.006$ ). C: Gráfico mostrando a avaliação da atividade exploratória (*rearing*) de animais WT e BACHD. Não houve diferença entre os genótipos ( $p=0.5$ ). D: Quantificação gráfica da avaliação do tempo total que os animais permaneceram segurando e sustentando seu próprio peso no aparato do teste durante 60 segundos (\*\* $p=0.0001$ ). E: Quantificação da força máxima no teste de força de agarre exercida pelos animais WT e BACHD quando se aplica uma força constante e oposta ( $p=0.39$ ). Os resultados expressam a média  $\pm$  SD. Foram utilizados nestes testes 11 animais individuais para WT e 17 para BACHD.

## 4.2. Atrofia e perda de motoneurônios dos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal de camundongos BACHD de 12 meses

Uma vez que observamos alterações significativas no comportamento motor e sabendo que a UM é a via final do sistema motor, nosso próximo conjunto de experimentos foi desenhado para avaliar possíveis alterações no componente inicial das UMs dos músculos ETM e TA. Desta forma, buscamos avaliar o número, o tamanho e o aspecto morfológico dos motoneurônios dos segmentos cervicais (C1-C3) e lombares (L1-L5) da medula espinhal de animais BACHD e WT. A **figura 12A-D**, mostra imagens representativas dos segmentos cervical (A-B) e lombar (C-D) da medula espinhal de animais WT e BACHD corados com violeta de cresil. Observe em B células menores indicando atrofia (setas pretas) e em D células com vacúolos (setas vermelhas).

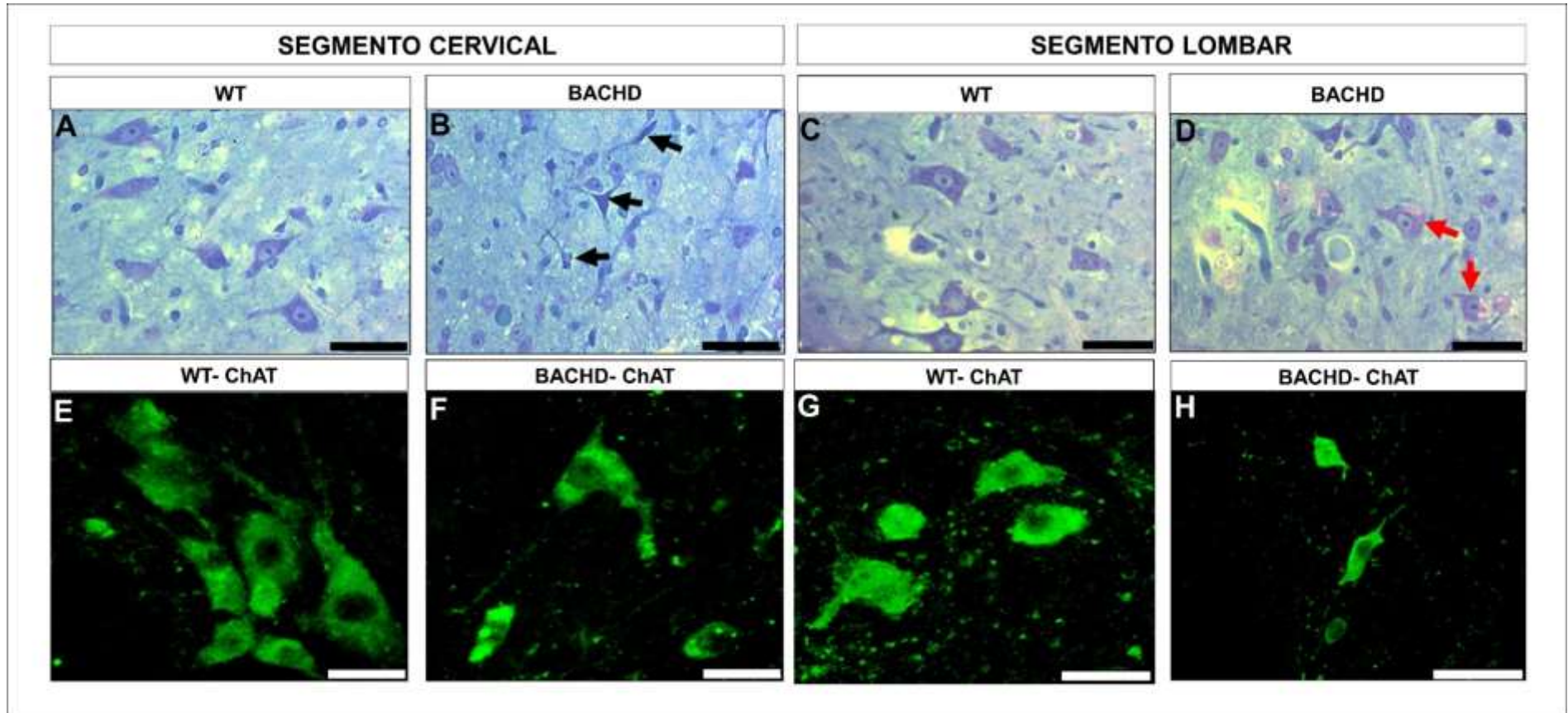
Análise quantitativa de vários cortes de medula espinhal corados com violeta de cresil indicou uma redução no número total de neurônios nos camundongos BACHD comparado com os WT: **Para o segmento cervical:** [BACHD:  $128.7 \pm 11.7$  células Vs. WT:  $177.0 \pm 26.5$  células (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 2.9$ ; \* $p=0.04$ ;  $n=3$  animais individuais por genótipo; *student t-test* não pareado] (**Figura 13A**); **Para o segmento lombar:** [BACHD:  $75.3 \pm 12.6$  células Vs. WT:  $100.3 \pm 3.21$  células (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 3.3$ ; \* $p=0.02$ ;  $n=3$  animais individuais por genótipo; *student t-test* não pareado] (**Figura 13A**).

Na **figura 12E-H** são apresentadas imagens representativas de motoneurônios cervicais (E-F) e lombares (G-H) marcados com anticorpo específico para a ChAT. Observamos na **figura 12E e G** motoneurônios típicos (WT) ao passo que na **figura 12F e H** observamos motoneurônios atípicos. A quantificação do número de motoneurônios especificamente marcados com anti-ChAT demonstraram redução significativa no número de motoneurônios quando comparados aos WTs em ambos os segmentos; **Para o segmento cervical:**(BACHD:  $270 \pm 22.6$  Vs. WT:  $342.3 \pm 29$  (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 3.4$ ; \* $p=0.02$ ;  $n=3$  animais individuais por genótipo; *student t-test* não pareado] (**Figura 13B**).

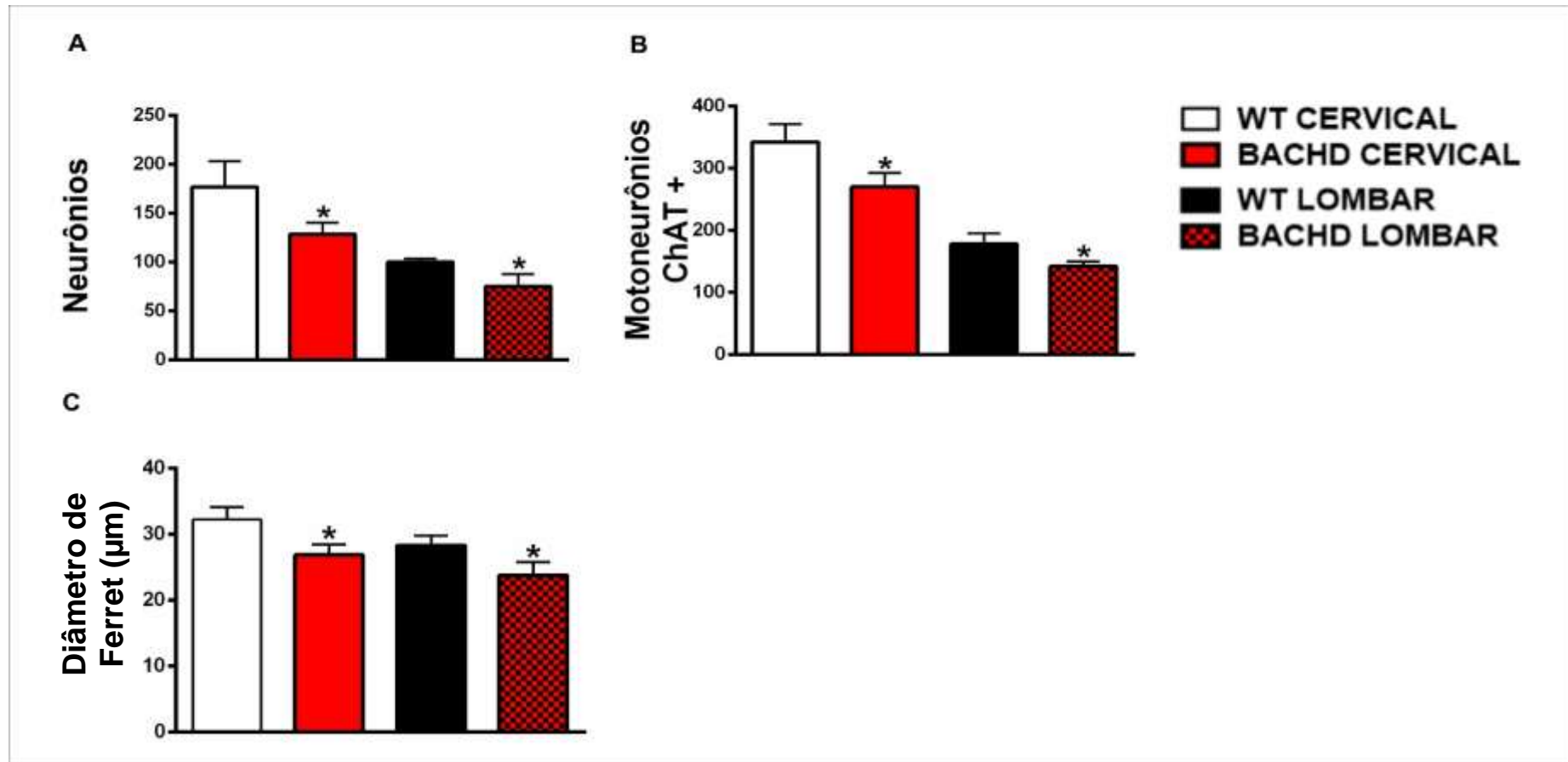
**Para o segmento lombar:** [(BACHD:  $142.0 \pm 8.0$  for Vs. WT:  $178.0 \pm 17.6$  (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 3.30$ ; \* $p=0.02$ ;  $n=3$  animais individuais por genótipo; *student t-test* não pareado] (**Figura 13B**).

Identificamos também atrofia dos motoneurônios nestes segmentos de de medula dos camundongos BACHD, pois apresentaram diâmetro menor em comparação aos motoneurônios de animais controles: **Para o segmento cervical:** [BACHD:  $26.4 \pm 1.4$   $\mu\text{m}$  vs WT:  $32.8 \pm 2.8$   $\mu\text{m}$  (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 3.5$ ;  $*p=0.02$ ;  $n=3$  animais individuais por genótipo; *student t- test* não pareado] (**Figura 13C**).

Para o segmento lombar: [(BACHD:  $23.7 \pm 2.0$   $\mu\text{m}$  Vs. WT:  $28.3 \pm 1.4$   $\mu\text{m}$  (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 3.1$ ;  $p=0.03$ ;  $n=3$  animais individuais por genótipo; *student t- test* não pareado] (**Figura 13C**).



**Figura 12: Atrofia e perda de motoneurônios nos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal de camundongos BACHD de 12 meses.** A-B: Imagens representativas de motoneurônios do segmento cervical de animais WT (A) e BACHD (B) corados com violeta de cresil. Em B há presença de células possivelmente atróficas e com vacúolos (setas pretas). C-D: Imagens representativas de motoneurônios do segmento lombar WT (C) e BACHD (D) corados com violeta de cresil. Em D encontramos neurônios com vacúolos (setas vermelhas) E-H: Imagens representativas de motoneurônios cervicais e lombares imunomarcados com anti- CHAT em animais WT (E-G) e BACHD (F-H) onde notamos motoneurônios atípicos com aspecto atrófico. Barra de escala: 50  $\mu$ m.



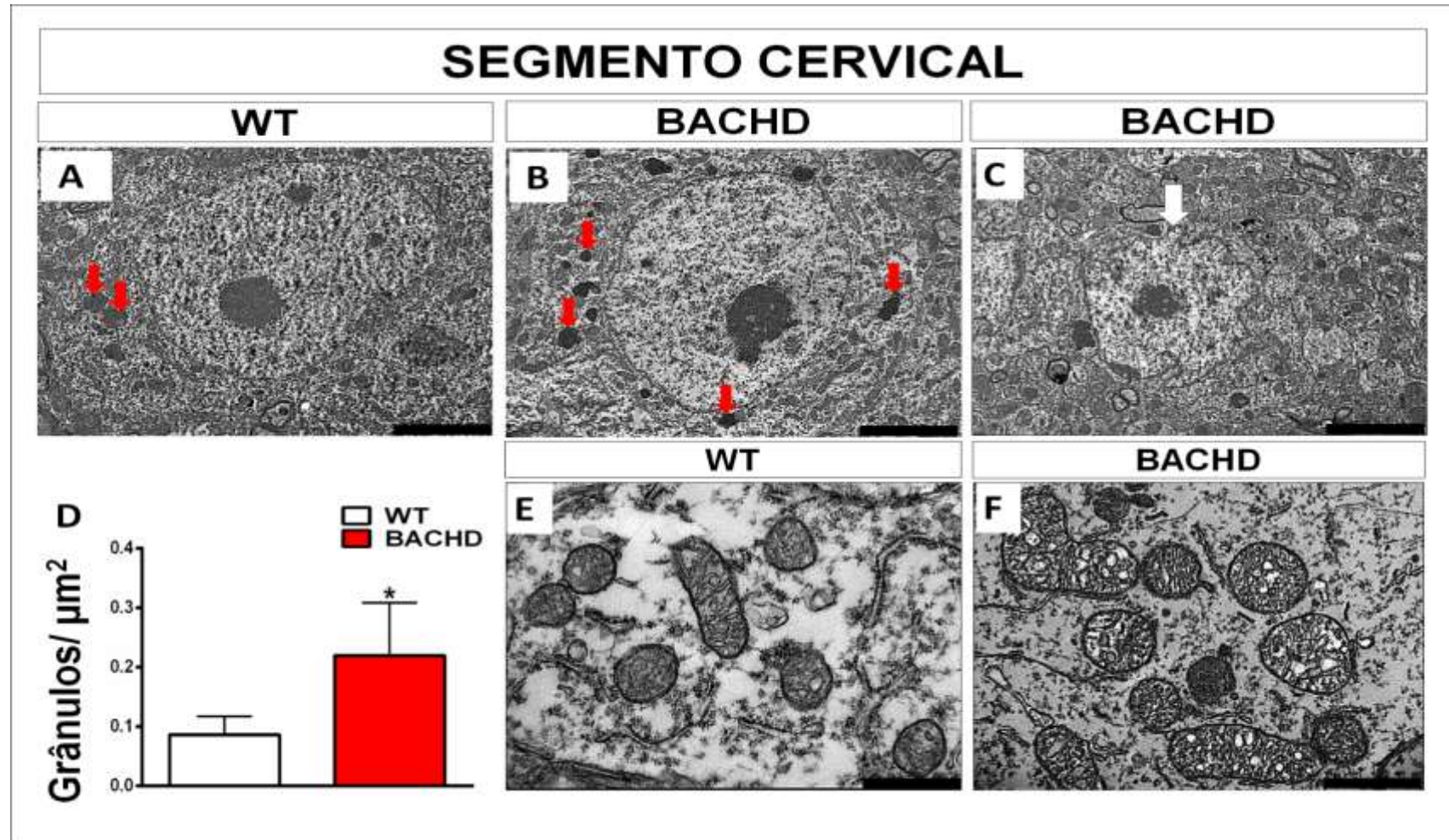
**Figura 13: Quantificações gráficas da atrofia e perda de motoneurônios nos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal de camundongos BACHD de 12 meses.** A: Quantificação gráfica do número total de neurônios nos segmentos cervicais e lombares em ambos os genótipos (~2.000 neurônios analisadas por genótipo e segmento; *student t-test* não pareado; \* $p < 0.05$ ;  $n = 3$  animais por genótipo). B: Representação gráfica da quantificação do número de motoneurônios ChAT-positivos em ambos os segmentos da medula espinhal de WT e BACHD (~ 100 motoneurônios analisados por genótipo e segmento; *student t-test* não pareado; \* $p < 0.05$ ;  $n = 3$  animais por genótipo). C: Representação gráfica da análise do diâmetro dos motoneurônios cervicais e lombares (*student t-test* não pareado; \* $p < 0.05$ ;  $n = 3$  animais por genótipo).



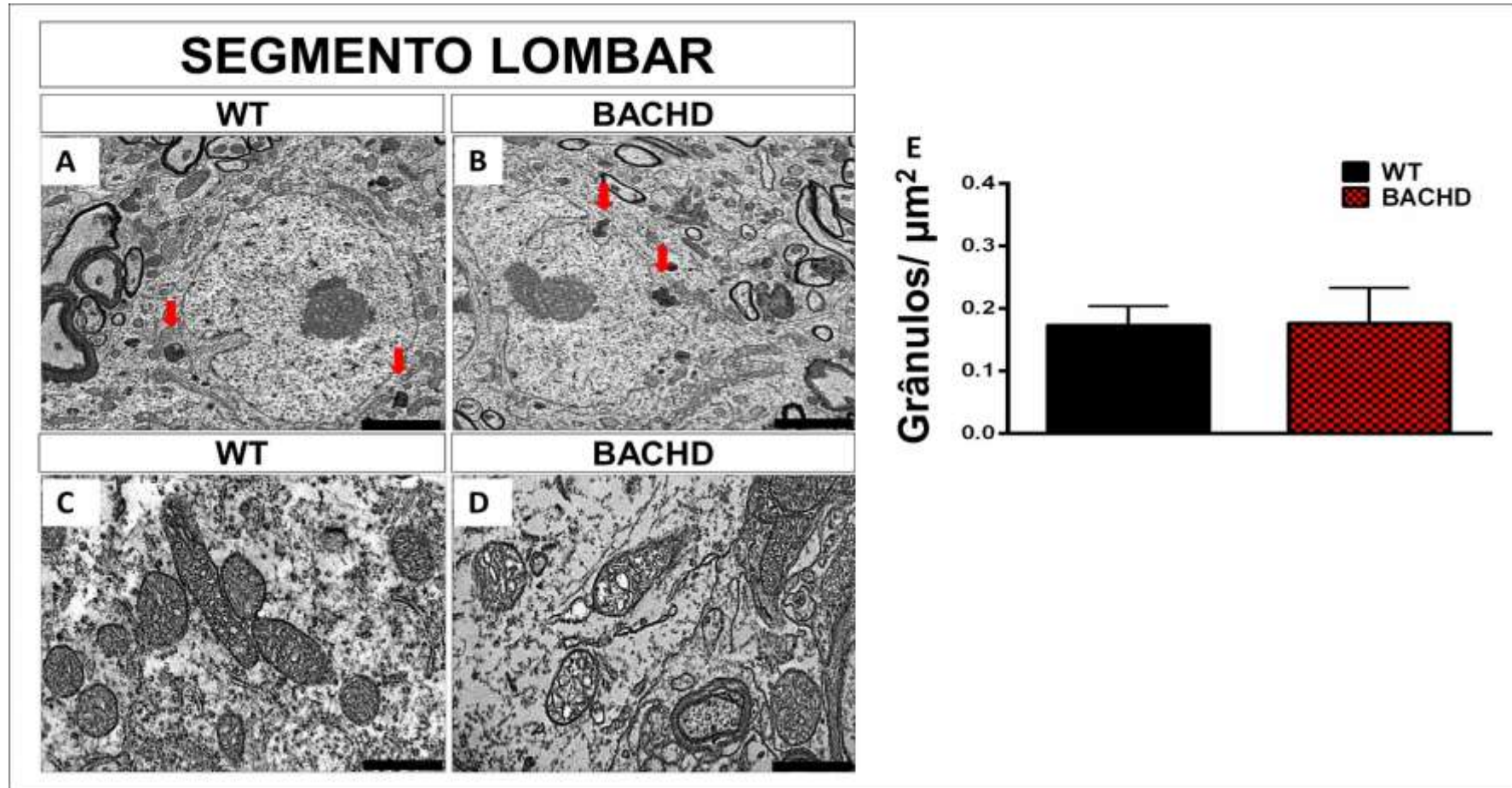
### 4.3. Alterações ultraestruturais nos segmentos cervical e lombar da medula espinhal de animais BACHD de 12 meses

Nosso próximo passo foi então investigar possíveis alterações dos motoneurônios no plano ultraestrutural. A análise qualitativa das micrografias eletrônicas de transmissão mostrou motoneurônios típicos em animais WT em ambos os segmentos (**Figuras 14A e 15A**), enquanto que motoneurônios de animais BACHD exibiram aspecto morfológico atípico (**Figura 14C seta branca e 15B**) e presença significativamente maior de grânulos de lipofuscina no segmento cervical [BACHD:  $0.2 \pm 0.1$  grânulos/área Vs. WT:  $0.1 \pm 0.03$  grânulos/área (média  $\pm$  SD);  $t_4=2.5$ ; \* $p=0.03$ ;  $n=3$  animais individuais por genótipo; *student t- test* não pareado] (**Figura 14D**). No segmento lombar, também identificamos a presença de grânulos de lipofuscina em muitos motoneurônios de animais BACHD e WT (**Figura 15A-B** setas vermelhas em WT e BACHD), e a análise quantitativa do número destes grânulos não foi estatisticamente diferente entre os genótipos ( $0.2 \pm 0.5$  grânulos/área para BACHD Vs. WT:  $0.2 \pm 0.03$  grânulos/área (média  $\pm$  SD);  $t_4=0.08$ ;  $p=0.5$ ;  $n=3$  animais individuais por genótipo. Nós analisamos 30 motoneurônios por genótipo (**Figura 15E**).

Além disso, nós identificamos alterações mitocondriais expressivas em motoneurônios de animais BACHD de ambos os segmentos, com destruição de cristas mitocondriais e presença de vacúolos (**Figuras 14F e 15D**), enquanto que nos animais WT, estas estruturas estavam preservadas (**Figuras 14E e 15C**).



**Figura 14: Alterações ultraestruturais em motoneurônios do segmento cervical da medula espinhal de animais BACHD de 12 meses:** A-B: Eletromicrografias de transmissão mostrando motoneurônios com grânulos de lipofuscina (setas vermelhas) em WT e BACHD, respectivamente. Em C núcleo atrófico de motoneurônio (seta branca) Barra de escala: 5 $\mu$ m. E: Imagens representativas de mitocôndrias de WT com mitocôndrias normais e preservadas. F: Mitocôndrias vacuoladas em BACHD. Barra de escala: 500 nm. D: Quantificação do número de grânulos de lipofuscina (grânulos/área) em motoneurônios de animais WT e BACHD (Analisamos 30 motoneurônios por genótipo; *student's t-test* não pareado; \*  $p < 0.05$ ;  $n = 3$  animais por genótipo).



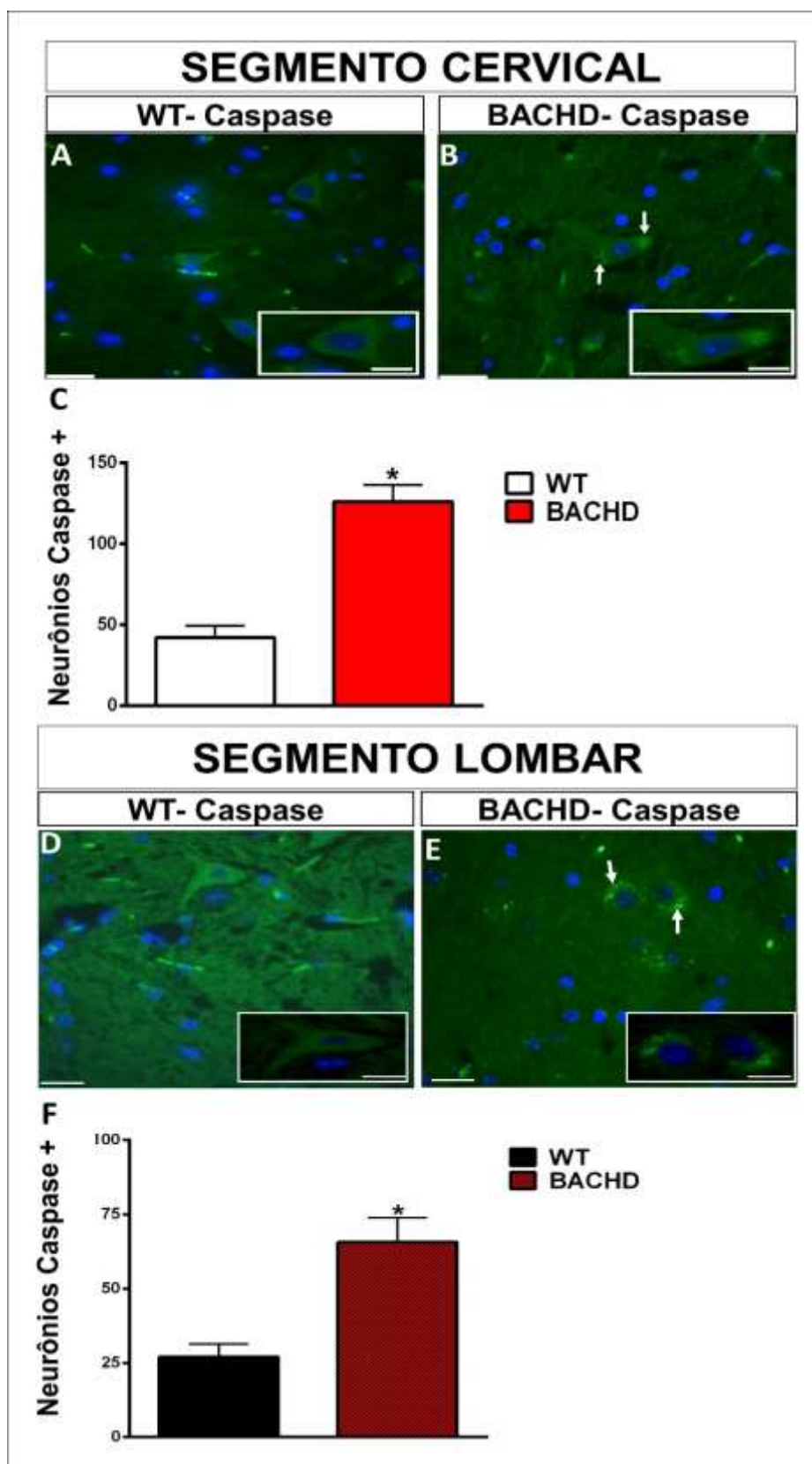
**Figura 15: Alterações ultraestruturais em motoneurônios do segmento lombar da medula espinal de animais BACHD de 12 meses:** A-B: Eletromicrografias de transmissão mostrando motoneurônios com grânulos de lipofuscina (setas vermelhas) em WT e BACHD, respectivamente. Barra de escala: 5 $\mu\text{m}$ . C: Imagens representativas de mitocôndrias de WT com mitocôndrias preservadas. D: Mitocôndrias vacuoladas em BACHD. Barra de escala: 500 nm. E: Quantificação do número de grânulos de lipofuscina (grânulos/área) em motoneurônios de animais WT e BACHD (Analisamos 30 motoneurônios por genótipo; *student's t-test* não pareado;  $p > 0.05$ ;  $n = 3$  animais por genótipo). Os resultados expressam a média  $\pm$  SD de  $n = 3$  animais individuais por genótipo.

#### 4.4. A redução no número de motoneurônios em animais BACHD pode estar ocorrendo via ativação da cascata apoptótica

A partir das observações anteriores de redução no número, atrofia e alterações ultraestruturais nos motoneurônios dos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal de animais BACHD, nosso próximo passo foi investigar se a redução no número de motoneurônios nos segmentos analisados poderia estar relacionada à ativação da cascata apoptótica. Para isso, foi realizada a imunomarcação dos dois segmentos medulares de animais BACHD e WT com anticorpos específicos para identificação de morte celular (anti-caspase-3).

A **figura 16A-E** mostra imagens representativas dos segmentos cervicais e lombares de medulas espinhais de animais controles marcados com anti-caspase-3. Note a ausência de marcação no detalhe na **figura 16A e D**. Entretanto esta mesma marcação nos motoneurônios de animais BACHD mostrou marcação mais acentuada (**Figuras 16B e E**; note a marcação no detalhe destas figuras- setas brancas).

Observamos através da análise quantitativa que mais motoneurônios foram marcados positivamente com anti-caspase-3 em ambos os segmentos para o BACHD quando comparados aos motoneurônios marcados nos animais WT. Para o segmento cervical [BACHD:  $126 \pm 10.6$  células Vs. WT:  $42 \pm 13.1$  células (média  $\pm$  SD);  $t_4=8.6$ ;  $**p=0.001$ ;  $n=3$  animais individuais por genótipo; *student's t-test* não pareado] (**Figura 16C**). Para o segmento lombar: [BACHD:  $65.7 \pm 8.3$  células Vs. WT:  $27.0 \pm 4.3$  células (média  $\pm$  SD);  $t_4=7.1$ ;  $p=0,002$ ; animais individuais por genótipo; *student's t-test* não pareado) (**Figura 16F**). Estes resultados podem indicar que a ativação da cascata apoptótica pode estar relacionada com as alterações de carácter degenerativo vistas em motoneurônios de animais BACHD. Além disso, o conjunto de análises que realizamos, indicam que ambos os segmentos sofrem alterações nos motoneurônios de animais BACHD e aparentemente não há comprometimento maior de um segmento em detrimento do outro neste componente da UM dos músculos analisados.



**Figura16: A morte dos motoneurônios nos segmentos cervicais lombares pode ocorrer via apoptose:** Imagens representativas de neurônios cervicais e lombares imunomarcados com anti-Caspase-3 em WT (A e D) e BACHD (B e E-setas brancas). O núcleo foi marcado com DAPI. Destaque: motoneurônios positivos para caspase-3 em animais BACHD em B e E e para WT em A e D. Barra de escala: 50  $\mu$ m. C e F: Quantificação gráfica dos motoneurônios Caspase-3 positivos no segmento cervical e lombar, respectivamente. (Analisamos ~150 motoneurônios por genótipo; *student's t-test* não pareado; \*  $p < 0.05$ ;  $n = 3$  animais por genótipo). Os resultados expressam a média  $\pm$  SD de  $n = 3$  animais individuais por genótipo.

#### 4.5. Em animais BACHD de 12 meses existem alterações que vão desde as raízes ventrais até as JNMs

Como observamos alterações nos motoneurônios da medula espinhal (segmentos lombar e cervical) o foco dos próximos experimentos foi investigar se estas mudanças poderiam levar a danos axonais e nas JNMs de camundongos BACHD.

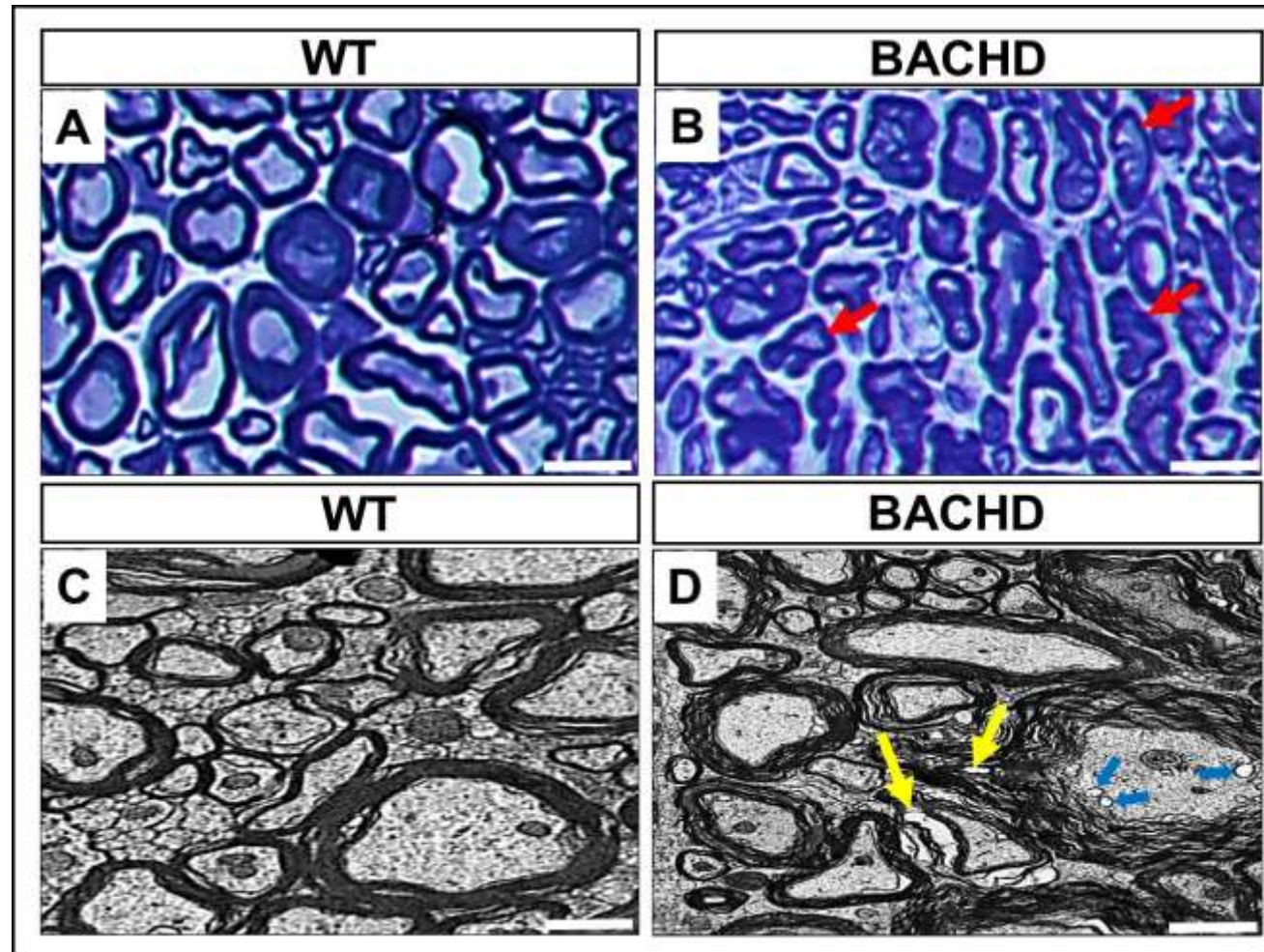
##### 4.5.1. Alterações em fibras nervosas mielínicas de animais BACHD

Inicialmente investigamos se as raízes espinhais ventrais de camundongos BACHD sofreram algum dano quando comparadas as dos camundongos WT. Desta forma, foram obtidas secções transversais semi-finas das raízes ventrais cervicais que foram coradas com azul de toluidina (ver métodos). A análise qualitativa de axônios de BACHD mostrou alterações morfológicas severas (**Figura 17B** setas vermelhas).

A análise ultraestrutural das raízes cervicais confirmou as observações histológicas e mostrou que as fibras nervosas mielínicas de camundongos BACHD apresentavam várias características degenerativas, tais como a ruptura estrutural da bainha de mielina com separações lamelares (**Figura 17D**, setas amarelas) e vacúolos dentro do axoplasma (**Figura 17D**, setas azuis). Já as raízes nervosas espinhais de animais WT não apresentaram alterações (**Figura 17C**).

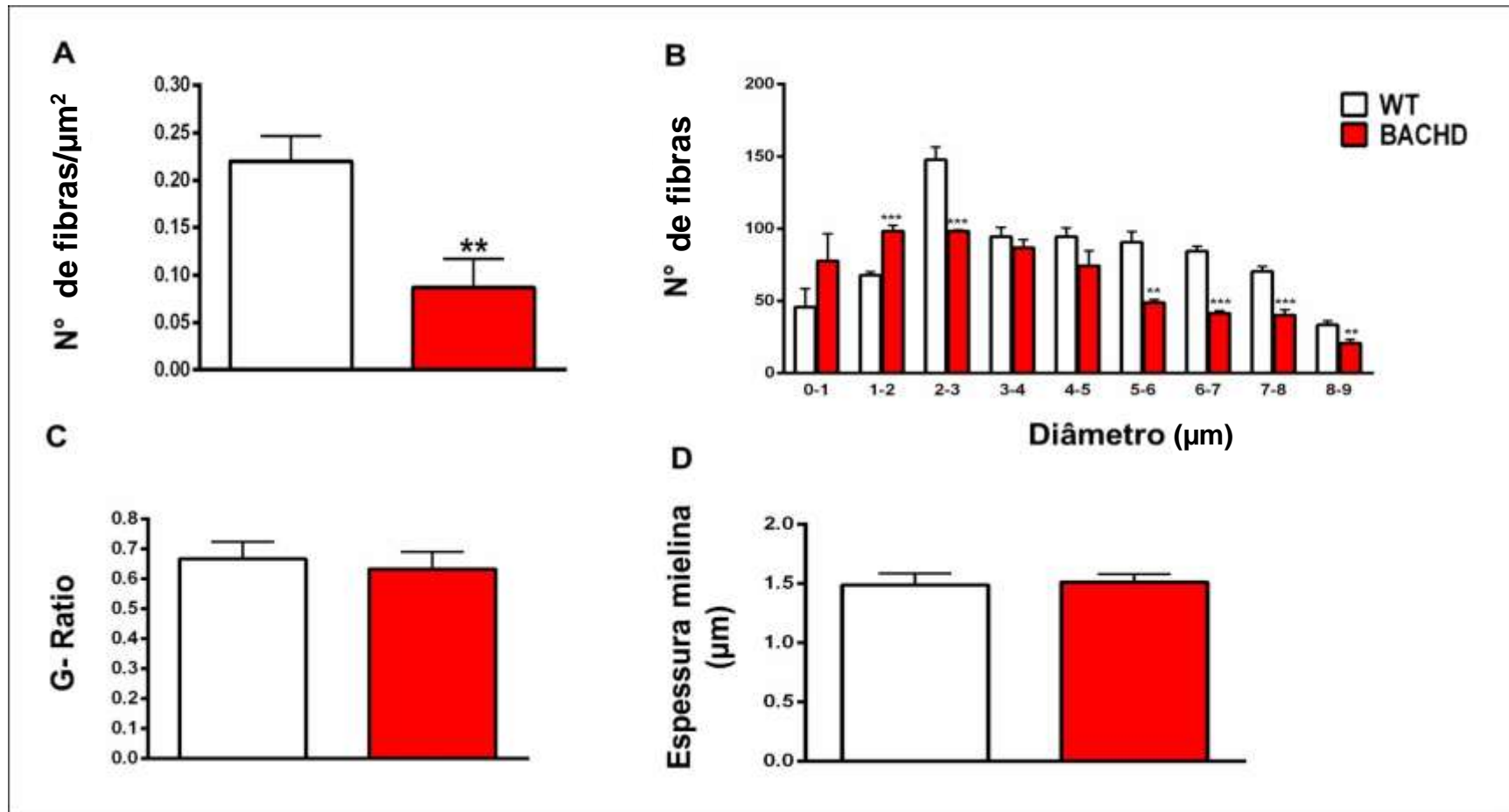
A análise quantitativa demonstrou uma redução no número de fibras nervosas mielínicas por área em camundongos BACHD [BACHD:  $0,08 \pm 0,03$  fibras nervosas mielínicas /  $\mu\text{m}^2$  vs. WT:  $0,2 \pm 0,02$  fibras nervosas mielínicas /  $\mu\text{m}^2$  (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 5,7$ ; \*\*  $p = 0,004$ ; *student's t-test* não pareado] (**Figura 18A**). O histograma na figura 16D mostra uma redução no número de grandes fibras mielinizadas ( $> 4,5 \mu\text{m}$ ) em BACHD [Intervalo entre 5-6  $\mu\text{m}$  - BACHD:  $48,7 \pm 3,8 \mu\text{m}$  Vs. WT:  $90,7 \pm 12,7 \mu\text{m}$  (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 5,5$ ; \*\*  $p = 0,005$ ; *student's t-test* não pareado; Intervalo entre 6-7  $\mu\text{m}$  - BACHD:  $41,3 \pm 3,0 \mu\text{m}$  Vs. WT:  $84,3 \pm 6,1 \mu\text{m}$  (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 10,1$ ; \*\*\* $p = 0,0004$ ; *student's t-test* não pareado; Intervalo entre 7-8  $\mu\text{m}$  - BACHD:  $40,0 \pm 6,5 \mu\text{m}$  Vs. WT:  $70,3 \pm 6,0 \mu\text{m}$  (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 6,0$ ; \*\*  $p = 0,004$ ; *student's t-test* não pareado e intervalo entre 8-9  $\mu\text{m}$  - BACHD:  $20,7 \pm 4,1 \mu\text{m}$  Vs. WT:  $33,3 \pm 5,0 \mu\text{m}$  (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 3,3$ ; \*  $p = 0,02$ ; *student's t-test* não pareado,  $n = 3$  animais individuais por genótipo (**Figura 18B**)]. No entanto, a razão G (relação entre o diâmetro interno e externo

axonal) não foi significativamente diferente do controle [BACHD:  $0.6 \pm 0.1$  Vs. WT:  $0.7 \pm 0.1$  (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 0.7$ ;  $p = 0.5$ ; *student's t-test* não pareado] (**Figura 18C**). A espessura bainha mielina também não mostrou diferenças significativas [BACHD:  $1.5 \pm 0,1 \mu\text{m}$  Vs. WT:  $1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$  (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 0.4$ ;  $P = 0.7$ ; *student's t-test* não pareado; Foram analisadas qualitativamente 30 imagens para cada animal em um n= 3 animais individuais por genótipo] (**Figura 18D**).



**Figura 17: Alterações nas fibras nervosas mielínicas em BACHD.** A-B: Imagens representativas de fibras nervosas mielínicas de WT e BACHD, respectivamente coradas com azul de toluidina. Note em A fibras nervosas mielínicas típicas com estrutura e forma preservadas enquanto que em B evidenciamos a presença de fibras nervosas mielínicas atípicas em degeneração com anormalidades morfológicas (setas vermelhas). Barra de escala: 40 $\mu$ m. C-D: Micrografias eletrônicas das fibras nervosas mielínicas de animais WT e BACHD. Note em D fibras nervosas mielínicas com sinais de degeneração como separação lamelar (setas amarelas) e vacuolização no axoplasma (setas azuis). Analisamos 90 micrografias eletrônicas por genótipo. Barra de escala: 2  $\mu$ m.





**Figura 18: Quantificações gráficas das alterações das fibras nervosas mielínicas em animais BACHD.** A: Quantificação do número de fibras nervosas mielínicas por área nervosa. B: Número de grandes fibras nervosas mielínicas (> 4,5 $\mu\text{m}$ ). C: Representação gráfica de G-ratio. D: Quantificação gráfica da espessura da mielina. Foram analisadas 9 seções semi-finas por genótipo e um total de 3,222 fibras nervosas mielínicas para WT e 1,937 em BACHD (\*  $p < 0,05$ , *student's t-test* não pareado,  $n = 3$  animais individuais por genótipo).

#### 4.5.2. As JNMs de músculos ETM e TA estão alteradas em animais BACHD de 12 meses

Os próximos experimentos investigaram se existiam alterações nas JNMs de camundongos BACHD. Desta forma, os músculos ETM e TA dos dois genótipos (BACHD e WT) tiveram seus elementos pré e pós-sinápticos marcados com sinaptotagmina e  $\alpha$ -btx, respectivamente (ver métodos).

As **figuras 19A-B e 19G-H** são as imagens representativas de terminais nervosos pré-sinápticos de musculo ETM e TA de WT e BACHD respectivamente marcados com anticorpo contra a proteína de vesícula sináptica sinaptotagmina. As **figuras 19A'B'** (ETM) e **19G'H'** (TA) mostram os aglomerados de receptores de acetilcolina pós-sinápticos (AChRs) marcados com  $\alpha$ -btx para ambos os genótipos. As **figuras 19C-E (ETM) e 19I-K (TA)**, mostram representações gráficas do método de análise de partículas para quantificar a fragmentação dos elementos das JNMs do musculo ETM. As **figuras 19D-F (ETM) e 19J-L (ETM)** evidenciam a continuidade ou descontinuidade das JNMs dos dois músculos.

A partir das análises quantitativas realizadas, nós observamos alguns indícios de processos degenerativos em JNMs de ambos os músculos (ETM e TA) de animais BACHD, como por exemplo: i) perda de colocalização dos elementos pré e pós-sinápticos nos animais BACHD. **Para ETM:** [BACHD:  $87.3 \pm 2.0$  % for Vs.  $98.4 \pm 1.6$  % para WT (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 8.0$ ;  $**p=0.001$ ; *student's t-test* não pareado] (**Figuras 19B'' e 20A** para quantificação). **Para TA:** ( $72.5 \pm 4.0$  % for BACHD Vs. WT:  $94.0 \pm 5.1$  % (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 5.7$ ;  $p=***0.002$ ; *student's t-test* não pareado) (**Figuras 19H'' e 20A** para quantificação);

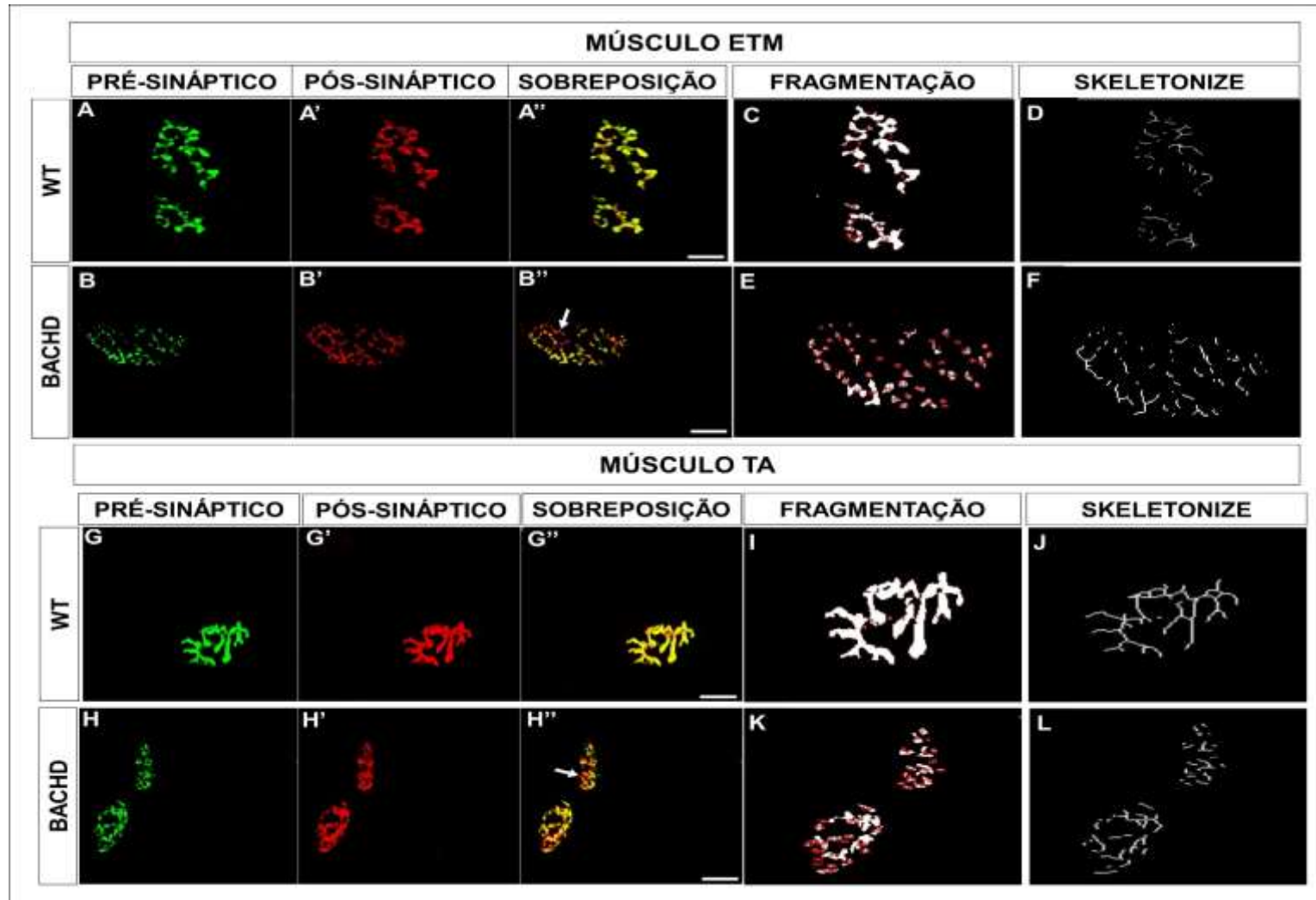
ii) nestas JNMs, nós analisamos o grau de desnervação, confirmando que muitas das JNMs avaliadas anteriormente apresentavam-se parcialmente desnervadas nos dois músculos, o que corrobora os dados de perda de colocalização. **Para ETM:** [BACHD:  $20.0 \pm 4.0$  % Vs. WT:  $2.7 \pm 2.3$  % (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 6.5$ ;  $**p = 0.002$ ; *student's t-test* não pareado] (**Figuras 19 B'' e 20B** para quantificação). **Para TA:** (BACHD:  $23.3 \pm 2.1$  % Vs. WT:  $5.7 \pm 2.1$  % (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 10.4$ ;  $***p = 0.0005$ ; *student's t-test* não pareado) (**Figuras 19H'' e 20B** para quantificação). Note locais com presença de nAChRs, sem a presença de aposição pré-sináptica (setas em **19B'' e 19H''**);

iii) Diminuição da área do terminal pré-sináptico de JNMs de animais BACHD comparada à área do terminal pré-sináptico de animais controles. **Para ETM:** [Área pré-sináptica: BACHD:  $923 \mu\text{m}^2$  Vs. WT:  $1655 \mu\text{m}^2$  (mediana);  $***p=0.0001$ , *Mann Whitney test* (**Figura**

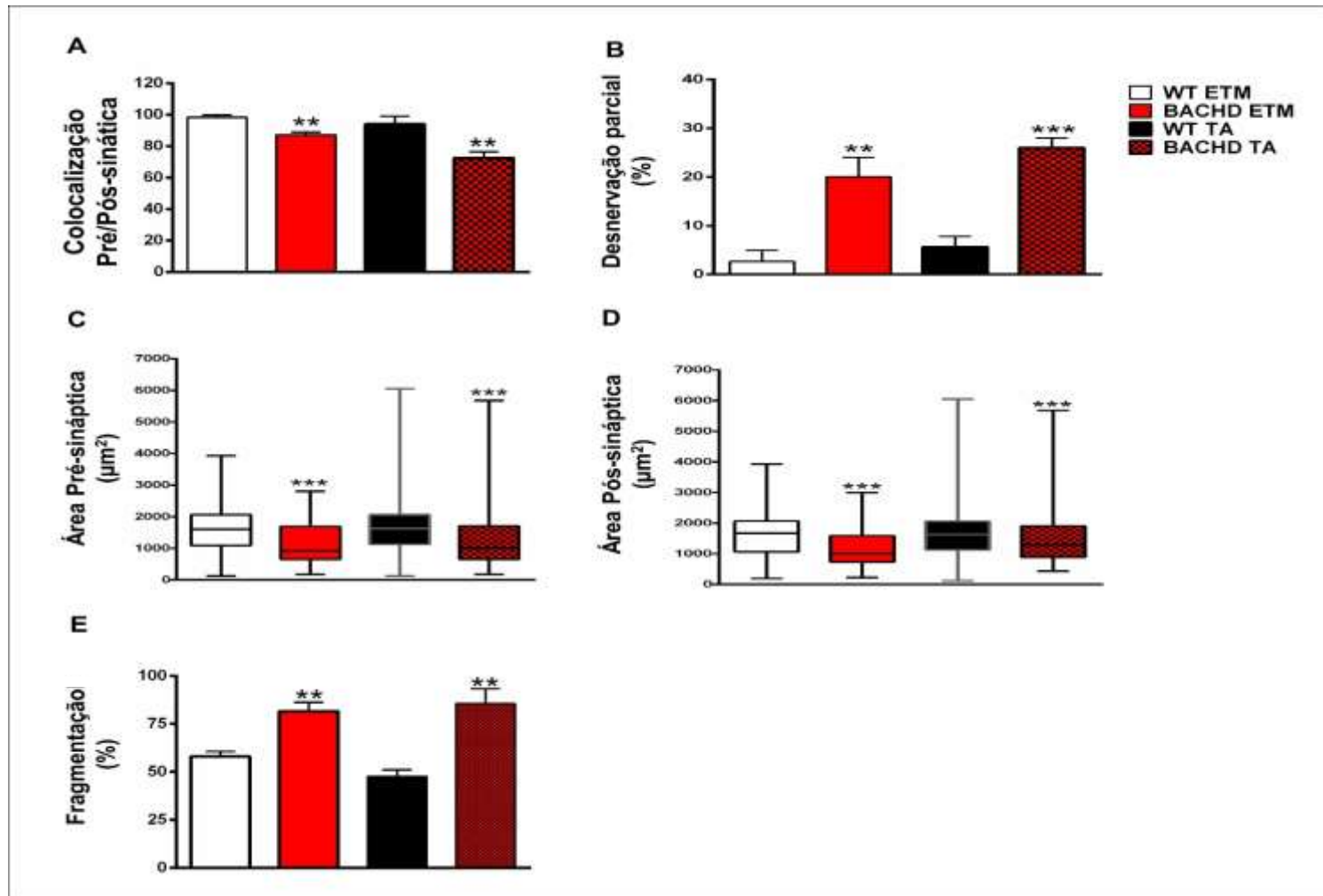
**20C**); Área pós-sináptica- BACHD:  $1011 \mu\text{m}^2$  Vs. WT,  $1669 \mu\text{m}^2$  (mediana);  $***p=0.0005$ ; *Mann Whitney test* (**Figura 20D**). **Para TA**: [Área pré-sináptica: BACHD:  $1005 \mu\text{m}^2$  Vs. WT:  $11628 \mu\text{m}^2$  (mediana);  $***p=0.0001$  *Mann Whitney test* (**Figura 20C**). Entretanto não observamos diferenças significativas na área dos terminais pós-sinápticos (BACHD:  $1464 \mu\text{m}^2$  Vs. WT:  $1761 \mu\text{m}^2$  (mediana); *Mann Whitney test*) (**Figura 20D**);

iiii) Fragmentação pronunciada de JNMs nos animais BACHD e menor fragmentação nos animais controles. **Para ETM**: [BACHD:  $81.7 \pm 4.7 \%$  Vs. WT:  $58.0 \pm 2.6 \%$  (média  $\pm$  SD);  $t_4=7.6$ ;  $**p=0.001$ ; *student's t-test* não pareado (**Figura 20E**)].

**Para TA**: (BACHD:  $85.6 \pm 7.6 \%$  Vs. WT:  $47.6 \pm 3.5 \%$  para (média  $\pm$  SD);  $t_4=7.8$ ;  $**p=0.001$ ; *student's t-test* não pareado) (**Figura 20E**). Nós analisamos 75 JNMs de cada musculo em cada genótipo em um  $n=3$  animais individuais por genótipo.



**Figura 19: Fragmentação e desnervação em JNMs de BACHD.** A--H'': Imagens representativas de JNMs de músculo ETM (A-B'') e TA (G-H'') em camundongos WT e BACHD. A e B, G e H: terminais pré-sinápticos marcados com anticorpo anti-sinaptotagmina e Alexa-488 (verde). A' e B', G' e H': Receptores pós-sinápticos para acetilcolina marcados com Alexa-555  $\alpha$ -btx (vermelho). A'' e B'', G'' e H'': Imagens sobrepostas mostrando desnervação parcial (setas brancas). C e E, I e K: Representação gráfica de método de análise de partículas (números vermelhos) das JNMs em ETM (C e E) e TA (I e K). D e F, J e L: Representação de *skeletonize* de fragmentação em JNMs de WT e BACHD dos músculos ETM e TA, respectivamente. Barra de escala: 10  $\mu$ m.



**Figura 20: Quantificações gráficas das alterações nas JNMs de ETM e TA.** A: Gráficos que mostram o grau de colocalização das JNMs de ambos os músculos e genótipos [\*\* p = 0.001; *student's t-test* não pareado, n = 3 animais individuais por genótipo). B: Representação gráfica da desnervação parcial em animais BACHD de ETM e TA [\*\* p = 0,002; *student's t-test* não pareado, n = 3 animais individuais por genótipo). C: Quantificação gráfica da área pré-sináptica [\*\*\* p = 0.0001 *Mann Whitney test*] e D da área pós-sináptica [\*\*\* p = 0.0005 *Mann Whitney test*]. E: Análise da fragmentação das JNMs de ambos os músculos [\*\* p = 0.001; *student's t-test* não pareado, n = 3 animais individuais por genótipo]. Os resultados representam a média ± SD ou mediana (para Mann Whitney) de 75 JNMs por genótipo (\* p < 0.05, n = 3 animais individuais por genótipo).

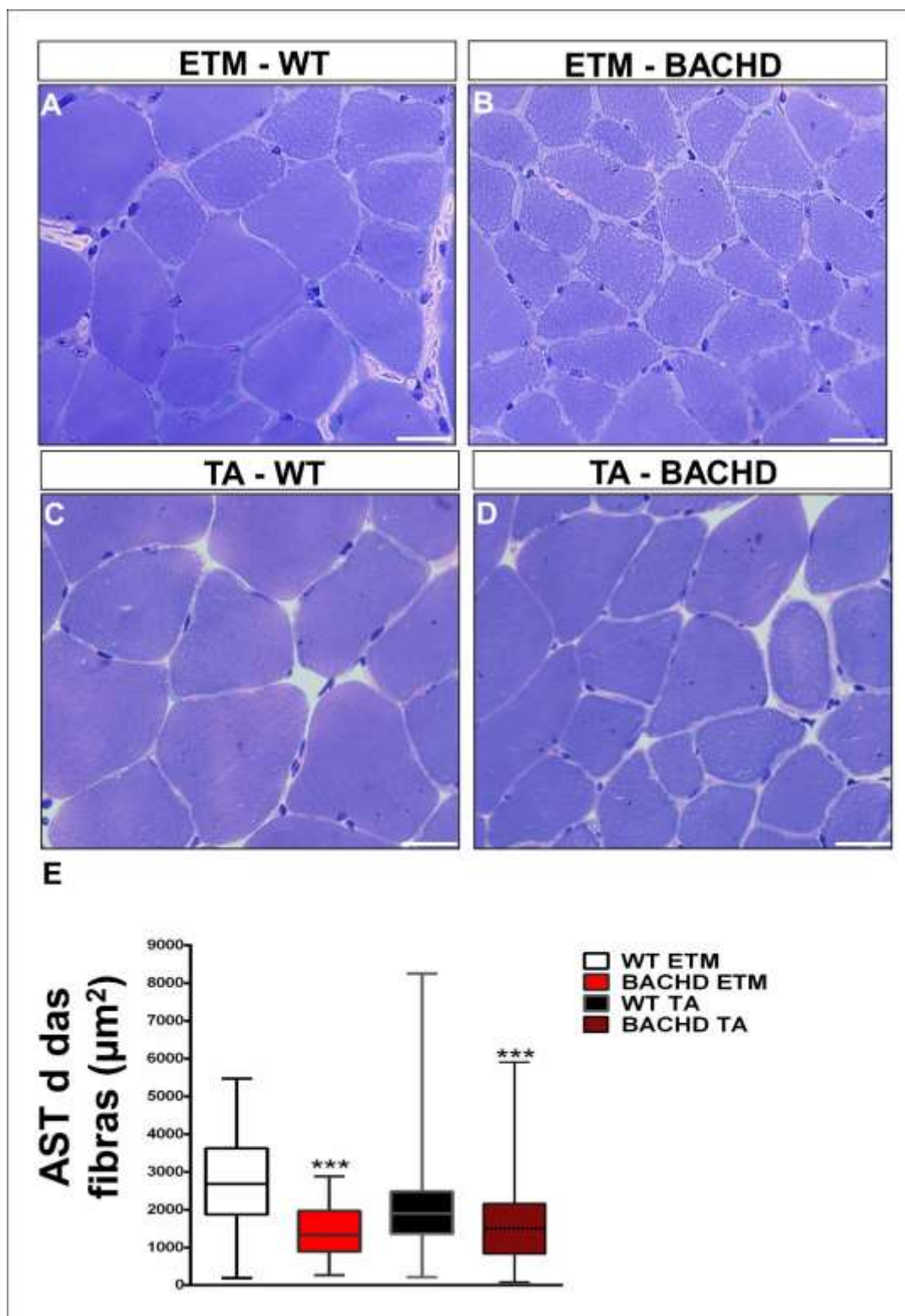
#### 4.6. Os animais BACHD de 12 meses apresentam atrofia das fibras musculares de ETM e TA

Nosso próximo conjunto de experimentos foi voltado para investigar se as alterações vistas em componentes da unidade motora como motoneurônios, axônios e JNMs podem estar associadas a mudanças nas fibras musculares que são inervadas por eles.

Inicialmente, os músculos ETM e TA foram processados para histologia de rotina e secções transversais do músculo foram obtidas e coradas com azul de toluidina (ver métodos).

A **figura 21A e C** mostra imagens representativas de fibras musculares de ambos os músculos de animais WT de 12 meses de idade. De modo semelhante, a **figura 21B e D** mostra imagens representativas de fibras musculares de músculo ETM e TA de animais BACHD.

Nossos resultados indicam que pode estar ocorrendo processo atrófico das fibras musculares de ambos os músculos de animais BACHD, uma vez que a análise quantitativa demonstrou que a AST das fibras musculares dos músculos em análise é menor nos animais BACHD quando comparada aos WT: **Para ETM:** (BACHD:  $1333 \mu\text{m}^2$  Vs. WT:  $2772 \mu\text{m}^2$  (Mediana); \*\*\* $p=0.0001$ ; Analisamos ~3000 fibras por genótipo;  $n=3$  animais individuais por genótipo; *Mann-Whitney test*) (**Figura 21E**); **Para TA:** (BACHD:  $1507 \mu\text{m}^2$  Vs. WT:  $1898 \mu\text{m}^2$  (mediana); \*\*\* $p<0.0001$ ; Analisamos ~5000 fibras por genótipo;  $n=3$  animais individuais por genótipo; *Mann-Whitney test*) (**Figura 21E**).



**Figura 21: Diminuição da AST das fibras musculares de músculo ETM e TA de camundongos BACHD.** A-C: Imagens representativas de fibras musculares esqueléticas de ETM e TA de animais WT. C-D: Imagens representativas das fibras musculares esqueléticas de músculo ETM e TA de animais BACHD. Barra de escala: 50 $\mu\text{m}$ . E: Representação gráfica com os valores médios de AST do músculo ETM e TA para WT e BACHD. Esses resultados representam a mediana de mais de 3.000 fibras musculares por genótipo (\*\*\*)  $p < 0.0001$ , *Man-Whitney test*,  $n = 3$  animais individuais por genótipo).

#### 4.7. A atrofia vista nos músculos ETM e TA é acompanhada por alterações na expressão da *MyHC* de animais BACHD

Estudos revelam que a atrofia muscular pode ser acompanhada por mudanças na expressão da *MyHC* (BROWN & HASSER, 1996; CARVALHO *et al.*, 2003; RICE *et al.*, 2005). Desta forma, comparamos a expressão de *MyHC* de músculos ETM e TA de camundongos WT e BACHD. Para isso, realizamos imunomarcação para tipos de fibras musculares através de anticorpos monoclonais específicos para diferentes isoforma da *MyHC*.

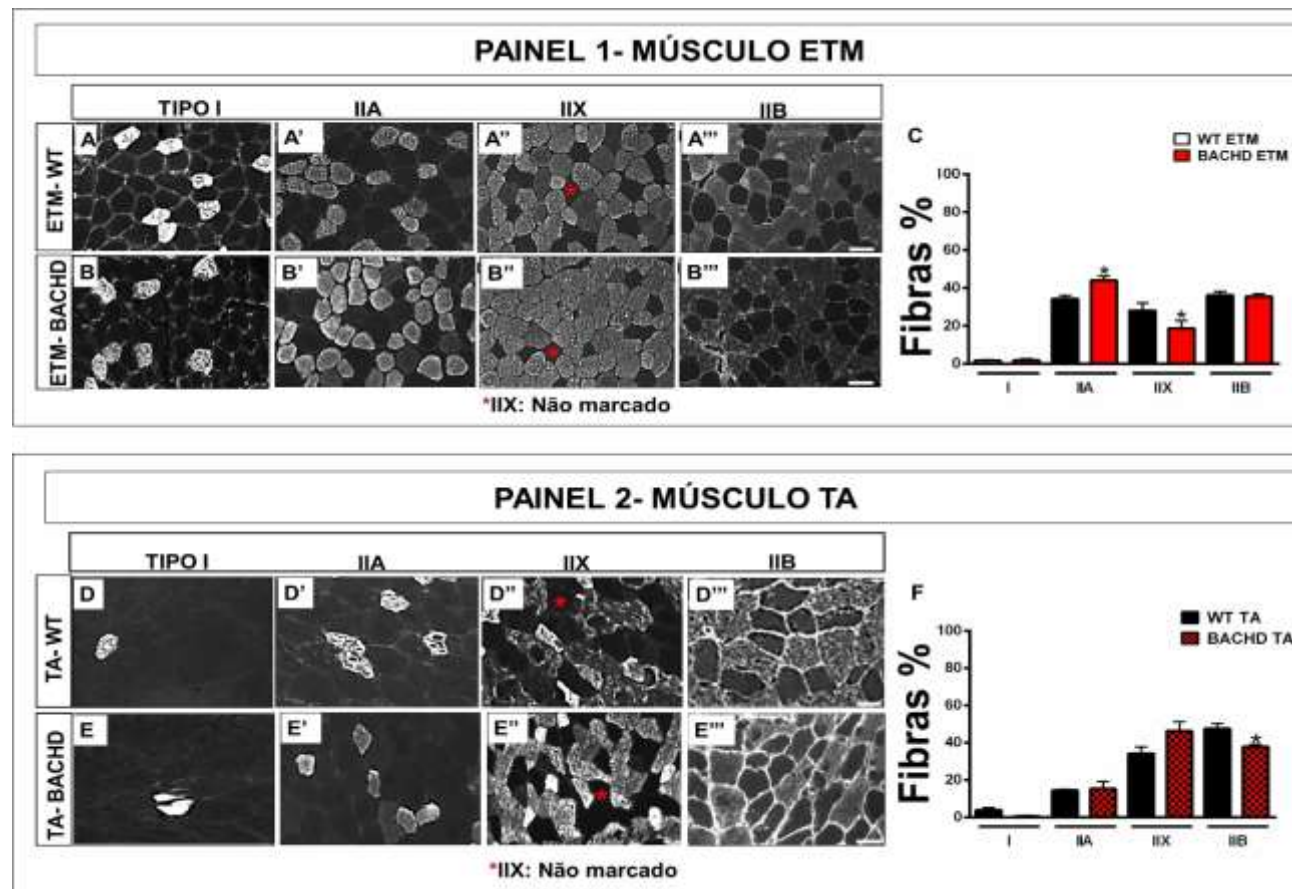
A **figura 22** mostra dois painéis, um para ETM (**painel 1**) e outro para TA (**painel 2**). No **painel 1** temos imagens representativas de secções transversas de musculo ETM. Neste painel, temos representadas de A à A''', isoformas do tipo I (**Figura 22A**), tipo IIA (**Figura 22A'**), tipo IIX (**Figura 22A''**) e tipo IIB (**Figura 22A'''**) em fibras musculares de animais WT. No mesmo painel, de B à B''' contém as mesmas marcações, porém para as fibras musculares dos animais BACHD (**Figura 22B' -B'''**). Asmesmas marcações foram feitas para o músculo TA e as imagens estão representadas no painel 2, onde de D à D''', temos marcação para isoformas do tipo I (**Figura 22B**), tipo IIA (**Figura 22B'**), tipo IIX (**Figura 22B''**) e tipo IIB (**Figura 22B'''**) em fibras musculares de animais WT. No mesmo painel, de E à E''' contém as mesmas marcações, porém para as fibras musculares dos animais BACHD (**Figura 22E -E'''**).

A análise quantitativa de várias fibras dos músculos citados para ambos os genótipos mostrou que, em animais BACHD, houve alteração no padrão de expressão nos dois músculos analisados. Para o músculo ETM, verificamos que a porcentagem de fibras do tipo IIA estava aumentada em camundongos BACHD [BACHD:  $44.0 \pm 4.0$  % Vs. WT:  $34.2 \pm 1.7$  % (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 3.8$ ; \* $p = 0.01$ ; Cada tipo de fibra foi contado em uma secção muscular em um  $n=3$  animais individuais por genótipo; *student t-test* não pareado (**Figura 22C- painel 1**)].

Verificamos também que animais BACHD apresentam menos fibras do tipo IIX marcadas no músculo ETM quando comparado ao WT (**Figura 22B''**). A quantificação mostra que houve redução na porcentagem desta isoforma nos animais BACHD para este músculo [BACHD:  $18.7 \pm 4.0$  % Vs. WT:  $28.0 \pm 4.1$  % (média  $\pm$  SD);  $t_4 = 2.8$ ; \* $p = 0.04$ ; Cada tipo de fibra foi contado em uma secção muscular em um  $n=3$  animais individuais por genótipo;  $n=3$  animais individuais por genótipo; *student t-test* não pareado (**Figura 22C- painel 1**)].



Para o músculo TA, observamos que o número de fibras do tipo IIB quando comparado ao controle está reduzido nos animais BACHD (BACHD:  $37.9 \pm 2.1$  % Vs. WT:  $47.5 \pm 4.7$  % (média $\pm$  SD);  $t_4 = 3.2$ ; \* $p = 0.03$ , *student t-test* não pareado) (**Figura 22F- painel 2**). Além disso, observamos tendência ao aumento de fibras do tipo IIX. Estes resultados indicam que está ocorrendo mudança no padrão de expressão da *MyHC* e que esta modificação pode estar relacionada à atrofia vista anteriormente nestes músculos.



**Figura 22: Mudança no padrão de expressão de *MyHC* associado à atrofia dos músculos ETM e TA em animais BACHD.** PAINEL 1: A-A''': Imagens representativas de fibras musculares de ETM de animais WT. Observe que em camundongos BACHD houve menos marcação de fibras do tipo IIX e mais marcação para fibras do tipo IIA em comparação com WT (B'' e B'). Barra de escala: 50µm. C: Análise quantitativa da porcentagem de isoformas nas fibras musculares mostrando diminuição da expressão da isoforma IIX e aumento da isoforma IIA nas fibras musculares de ETM de animais BACHD comparação com WT. Os resultados representam a média ± SD (*student t-test* não pareado; \* p <0,05, n = 3 animais individuais por genótipo. PAINEL 2: D-D''': Imagens representativas de fibras musculares de TA de animais WT. Observe que em camundongos BACHD houve menos marcação de fibras do tipo IIB e tendência a maior marcação para fibras do tipo IIX em comparação com WT (E'' e E'). Barra de escala: 50µm. F: Análise quantitativa da porcentagem de isoformas nas fibras musculares mostrando diminuição da expressão da isoforma IIB nas fibras musculares de TA de animais BACHD comparação com WT. Os resultados representam a média ± SD (*student t-test* não pareado; \* p <0.05, n = 3 animais individuais por genótipo.

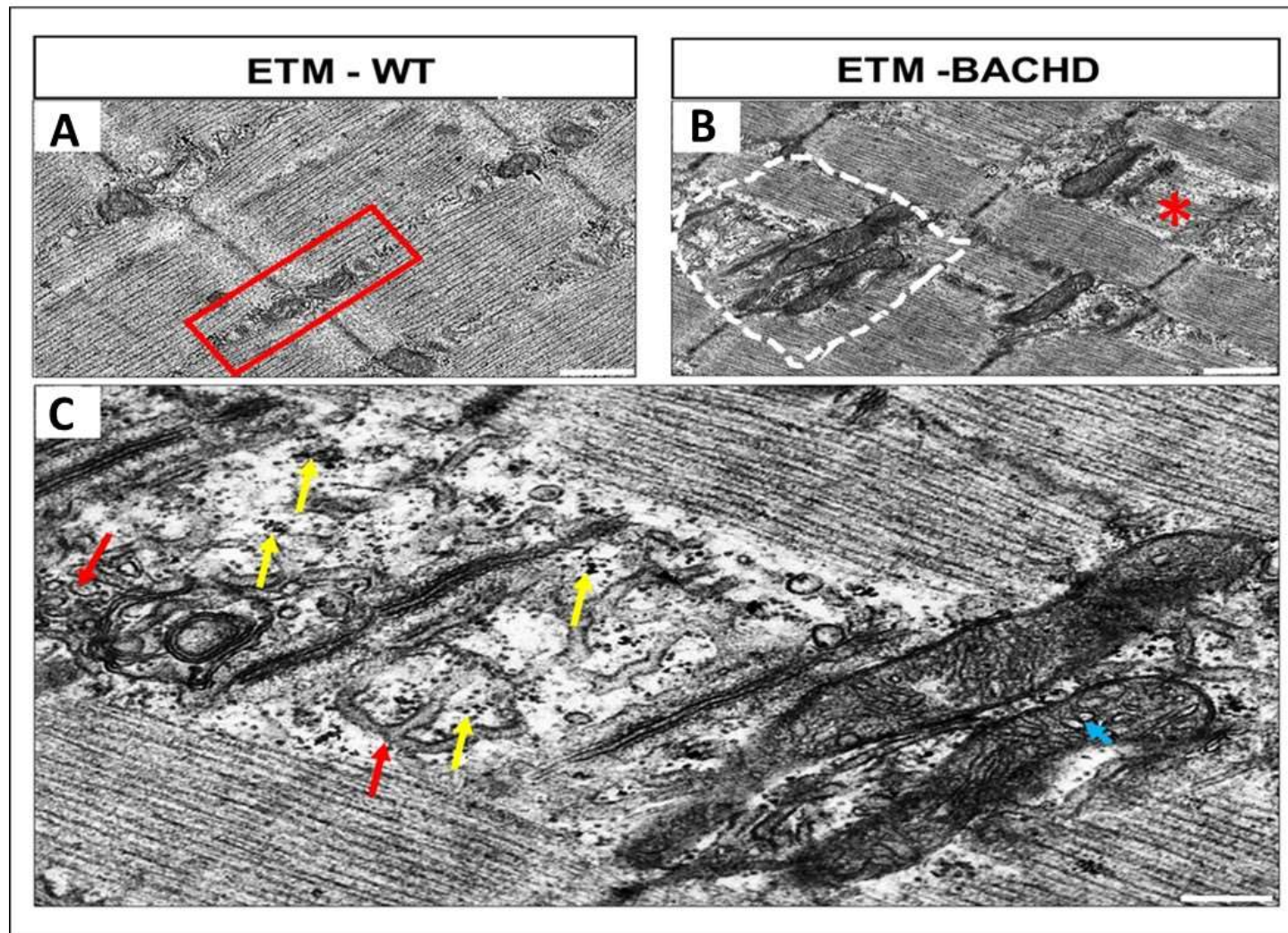
#### 4.8. Alterações morfológicas ultraestruturais de músculos ETM e TA de camundongos BACHD de 12 meses

Diante da atrofia observada em ambos os músculos ETM e TA, investigamos se haveria alterações ultraestruturais nos músculos ETM e TA de camundongos BACHD. Análise qualitativa das micrografias eletrônicas de transmissão revelou nos camundongos WT estruturas típicas tais como mitocôndrias, sarcômeros e suas tríades, bem como miofibrilas em perfeito estado (retângulo vermelho **figura 23A** para ETM) e (retângulo amarelo **figura 24A para TA**).

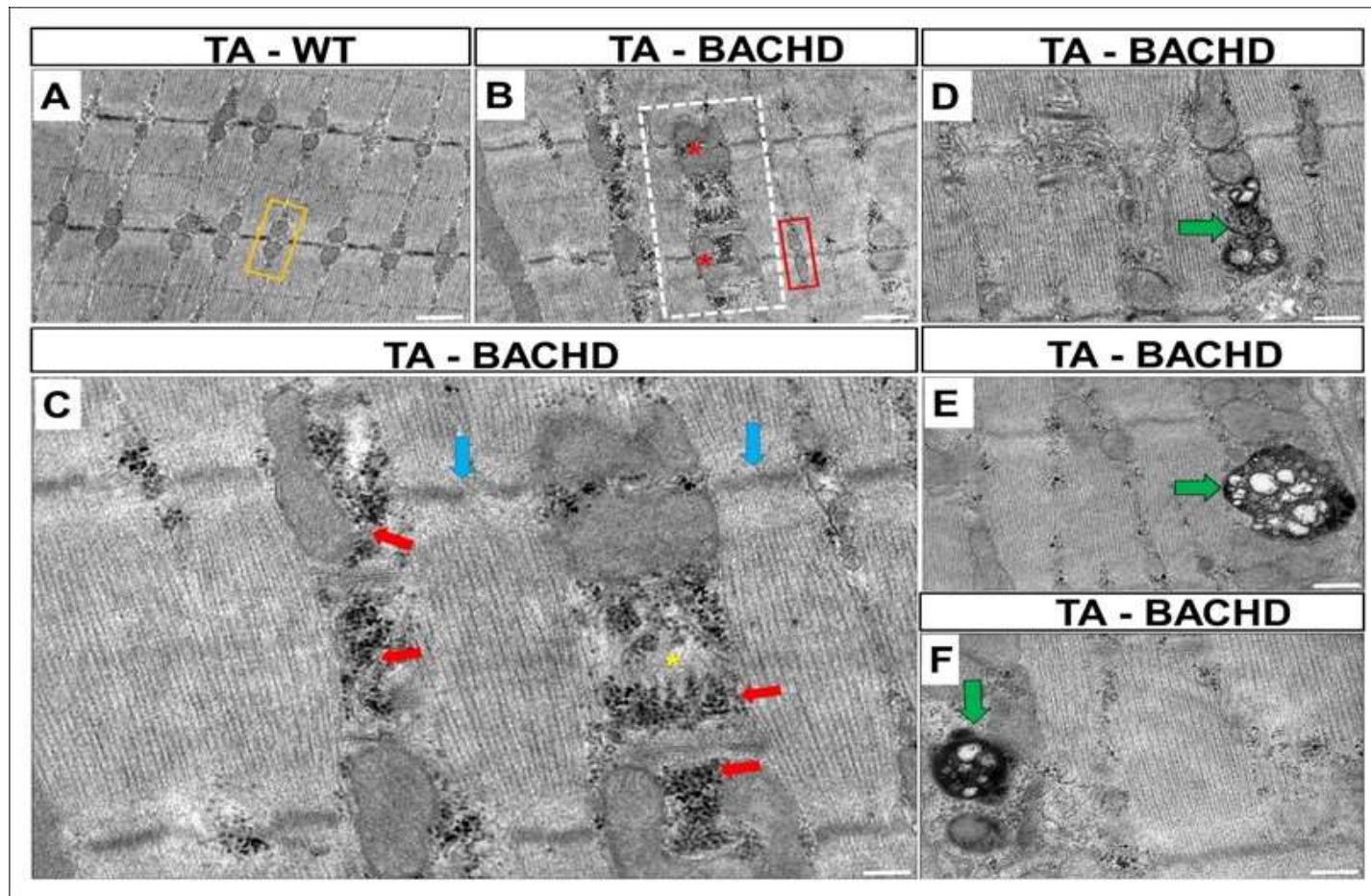
Entretanto para os animais BACHD observamos no músculo ETM: retículo sarcoplasmático (RS) significativamente dilatado, invadindo espaços (área demarcada em 24B) anteriormente ocupados por miofibrilas (**Figura 23B**, setas vermelhas, ii) mitocôndrias contendo vacúolos anormais dentro da matriz mitocondrial (**Figura 23G**, seta azul); iii) aumento dos depósitos inter-miofibrilares de glicogênio (**Figura 23C**, setas amarelas) e iv) áreas com diminuição dramática de miofibrilas (**Figura 23B**, asterisco).

Para o músculo TA de animais BACHD observamos áreas com sarcômeros desestruturados (**Figura 24B**- área pontilhada), com mitocôndrias aparentemente maiores quando comparadas ao tamanho de mitocôndrias no mesmo plano de corte (**Figura 24B** retângulo vermelho). A **figura 24C**, mostra ampliação da área delimitada em **24B**, e nela podemos observar quantidades atípicas de glicogênio inter-miofibrilar (setas vermelhas). Além disso, identificamos RS invadindo a região de miofibrilas, bem como perda do alinhamento dos sarcômeros (setas azuis). O conjunto das alterações vistas no musculo ETM e TA de camundongos BACHD, indicam que eles podem estar passando por um processo degenerativo, assim como os outros componentes de suas UMs.

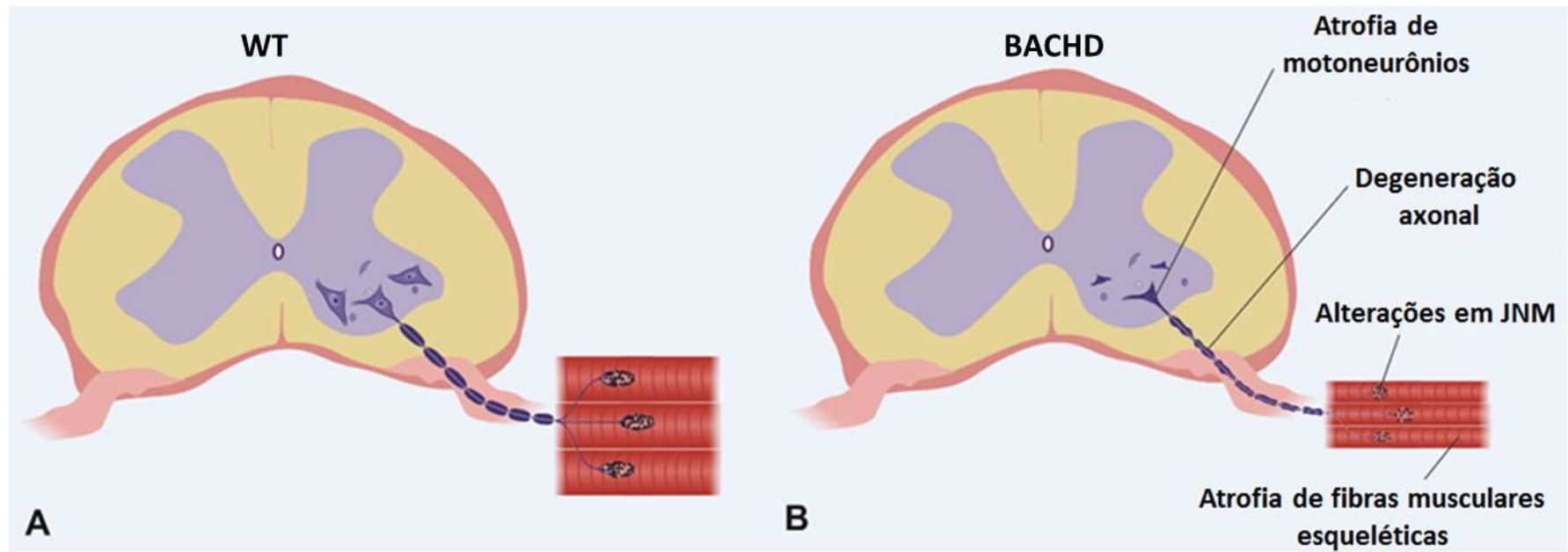
A **figura 25**, mostra uma representação esquemática de todas as alterações que vimos para os dois músculos analisados. Em A é esquematizada a UM de animais WT e em B a UM de animais BACHD com todos os danos apontados por nós neste trabalho de tese.



**Figura 23: A ultraestrutura de músculo ETM mostra alterações morfológicas nos animais BACHD.** A-B: Micrografias eletrônicas de transmissão representativas de fibras musculares de ETM de animais WT e BACHD. A: Observe tríade normal em WT (caixa vermelha). B: Observe redução no número de miofilamentos no sarcômero (asterisco) em BACHD. C: Imagem ampliada da área pontilhada em B mostrando o alargamento e invasão do RS. Observe também a presença de vacúolos dentro do espaço interno de mitocôndrias (seta azul), deposição anormal de glicogênio no espaço inter-miofibrilar (setas amarelas) e RS atípicos (setas vermelhas). Barra de escala: 500 nm. Analisamos 90 imagens para WT e 90 imagens para BACHD de 3 animais individuais por genótipo).



**Figura 24: Alterações morfológicas na ultraestrutura de músculo TA de animais BACHD.** A-B: Micrografias eletrônicas representativas de fibras musculares de TA de animais WT e BACHD. A: Observe tríade normal em WT (caixa amarela). B: Observe mitocôndrias alongadas (asteriscos vermelhos) e normais (caixa vermelha) em BACHD. C: Imagem ampliada da área pontilhada em B mostrando acentuado acúmulo de glicogênio nos espaços inter-miofibrilares (setas vermelhas), alargamento RS (asterisco amarelo) e descontinuidade da linha Z (setas azuis) em animais BACHD. D-F: Observe intensas alterações mitocondriais (setas verdes). Barra de escala: 500 nm. Analisamos 90 imagens para WT e 90 imagens para BACHD de 3 animais individuais por genótipo).



**Figura 25: Desenho esquemático ilustrando as alterações na UM de camundongos BACHD.** A UM de animais WT com todos seus componentes preservados. B: A UM de animais BACHD indicando alterações em todos seus componentes (VALADÃO *et al*, 2016- aceito para publicação).

## 5. DISCUSSÃO

A maioria das investigações científicas sobre a DH tem como foco o processo patológico cerebral, principalmente investigando mecanismos de neurodegeneração em estruturas cerebrais e correlacionando alterações nestas regiões com os sintomas neurológicos decorrentes.

Embora esteja bem consolidado que a DH tenha origem a partir da degeneração de estruturas cerebrais como os neurônios do corpo estriado e da região dos núcleos da base, composta pelo núcleo caudado e putâmen (ROSS & TABRIZI, 2011; DODDS *et al.*, 2014), não podemos excluir dois pontos fundamentais e que nos fazem olhar para os mecanismos desta doença de forma global e interligada. O primeiro é o fato de que tanto a Htt normal quanto a forma mutada são expressas em vários órgãos e tecidos humanos estando presentes em diversos compartimentos no interior das diferentes células (ZUCCATO, VALENZA, CATTANEO, 2010; VAN DER BURG, BJÖRKQVIST, BRUNDIN, 2009). Além disso, a Htt encontra-se associada a uma variedade de organelas como o núcleo, complexo de golgi, retículo endoplasmático, vesículas endossomais e mitocôndrias. Em axônios e sinapses, ela interage com microtúbulos e estruturas vesiculares (revisado por ZUCCATO, VALENZA, CATTANEO, 2010; revisado por EHRNHOFER, SUTTON, HAYDEN, 2011; SCHULTE & LITTLETON, 2011; MICHALEK, SALNIKOV, BECHINGER, 2013).

O segundo ponto é que mesmo a DH tendo origem em neurônios cerebrais específicos, estes fazem conexões que culminam em interligações com o córtex motor e consequente comunicação com os motoneurônios da medula espinhal através de tratos como o córtico-espinhal (SAKAI *et al.*, 2000; AKKAI *et al.*, 2007; LEMON & GRIFFITHS, 2005).

Desta forma, mesmo que a origem da degeneração se inicie em estruturas motoras superiores, não podemos excluir a investigação dos circuitos motores inferiores para sabermos se os mesmos sofrem algum tipo de alteração nesta doença.

Primeiramente, avaliamos a função motora de camundongos BACHD e WT para confirmar as alterações no comportamento motor nesse modelo animal. Assim, realizamos testes de comportamento motor como o campo aberto, teste de tempo de queda e força de agarre.

O teste de campo aberto revelou hipoatividade significativa, como redução da locomoção, distância total percorrida e velocidade média nos animais BACHD quando comparados aos WTs (**Figura 11**). Estes dados estão de acordo com o estudo de Mellaned *et*

*al.*, (2009), no qual demonstraram que aos sete meses de idade, camundongos BACHD apresentavam hipoatividade locomotora. Os mesmos resultados, também na idade de sete meses, foram previamente observados por Gray *et al.*, (2008) nestes animais.

No teste de tempo de queda (*wire hang*), observamos que os camundongos BACHD apresentaram pior desempenho em relação aos WTs, semelhantemente aos dados de Heng *et al.*, (2007) e Brooks (2012) em camundongos *Hdh* CAG<sup>(150)</sup> aos 12 meses de idade. Até onde sabemos, o teste de tempo de queda não foi realizado anteriormente em animais BACHD.

Um fato digno de nota é que o BACHD apresenta um notável ganho de peso com a idade, enquanto que os pacientes com DH apresentam acentuada perda de peso (AZIZ *et al.*, 2008; DJOUSSÉ *et al.*, 2002; KIRKWOOD *et al.*, 2001; VAN DER BURG, BJÖRKQVIST, BRUNDIN, 2009). Entretanto, é descrito que o peso e a composição corporal de modelos de camundongos transgênicos para DH possuem grande variabilidade (ZUCCATO *et al.*, 2010). Os animais que expressam a mHtt integral no genoma, como os animais BACHD, tipicamente mostram um aumento no peso corporal, devido ao aumento de acúmulo de tecido adiposo (GRAY *et al.*, 2008). Foi sugerido que esse aumento no peso corporal pode levar a um pior desempenho nos testes de comportamento motor (KUDWA *et al.*, 2013, MCFADYEN *et al.*, 2003). Portanto, normalizamos o peso dos animais pelo tempo em que permaneciam no aparato do teste, porém mesmo após esta normalização, observamos que os camundongos BACHD apresentaram pior desempenho na tarefa quando comparados aos animais WTs, indicando que estes camundongos possuem déficits motores relacionados a este teste.

Em relação ao teste de força de agarre (*grip force*), não identificamos diferenças significativas na resistência máxima entre BACHD e camundongos controles (**Figura 11**). Menalled *et al.*, (2009) observaram que camundongos contendo apenas um fragmento da mHtt (R6 / 2), na idade de 4 a 100 semanas de idade, apresentaram déficits neste teste motor. Entretanto, observaram que os animais que expressam o comprimento total de mHtt, incluindo o BACHD, não mostraram diferenças significativas neste teste, o que confirma os nossos resultados. Contudo, futuros estudos seriam importantes para explorar esta diferença entre os dois modelos. Recentemente, Mantovani *et al.*, (2016) mostraram que os animais BACHD gerados em outra linhagem como C57BL / 6J de 12 meses não apresentaram déficits no *grip force*.

Uma vez confirmado que o nosso modelo experimental apresentava déficit motor, nosso próximo objetivo foi avaliar os impactos da mHtt nos motoneurônios dos segmentos



cervicais e lombares da medula espinhal de camundongos BACHD em comparação com os animais controles. Através da marcação específica de motoneurônios com anti- ChAT, identificamos redução no tamanho e número destas células nos animais BACHD de ambos os segmentos (**Figuras 12 e 13**). Estudos anteriores que investigaram alterações em músculos e JNMs em modelo R6/2 apontaram que estas mudanças poderiam ser resultantes de algum defeito nos motoneurônios, entretanto esta hipótese não foi testada por esses autores (MIELCAREK *et al.*, 2015; RIBCHESTER *et al.*, 2004). Esta questão foi abordada por nós neste trabalho, no qual demonstramos redução de 20% no diâmetro de motoneurônios cervicais e 22% de diminuição no número destas células quando comparados aos animais WTs. Para o segmento lombar da medula espinhal observamos redução de 17% no diâmetro e de 21% no número de motoneurônios. Estes resultados mostram semelhança quando comparamos os segmentos cervicais e lombares da medula espinhal de animais BACHD de 12 meses, o que pode indicar que não há diferença no grau de acometimento entre estes dois segmentos da medula espinhal no que se refere a alterações de tamanho e número dos motoneurônios.

Para confirmar a morte dos motoneurônios nos segmentos medulares estudados, utilizamos o marcador de morte celular por apoptose anti-caspase-3. Observamos marcação mais acentuada em motoneurônios de camundongos BACHD em comparação aos de animais WT em ambos os segmentos da medula espinhal (**Figura 16**) indicando que uma possível via de morte destes motoneurônios pode ser a ativação da cascata apoptótica. Apesar de ainda não estar completamente elucidado que a morte neuronal vista na DH seja em decorrência de um processo puramente apoptótico, linhas de evidências apontam que a ativação de determinadas vias podem levar à morte neuronal (HICKEY & CHESSELET, 2003). De fato, estudos como o de Gervais *et al.*, (2002), demonstram que uma das vias de morte neuronal ocorre pela interação da mHtt com moléculas específicas que irão ativar caspases-8 que levará a alterações mitocondriais com consequente ativação de caspases-3, culminando na morte celular por apoptose. Além disso, outra evidencia é que caspases-8 encontram-se em níveis aumentados em cérebros de pacientes com DH (SANCHEZ *et al.*, 1999). Outros trabalhos também sugeriram que a mHtt pode ser um substrato para a caspase-3, levando a um aumento na taxa de clivagem da Htt, causando estresse adicional à célula e consequentemente a morte celular por apoptose (WELLINGTON *et al.*, 2002). Do mesmo modo, Toulmond *et al.*, (2004) mostraram que a inibição da atividade da caspase-3 pelo seu inibidor reversível (M-826) resulta em uma redução significativa na morte neuronal em modelos de ratos para HD.

Posteriormente, nós também avaliamos possíveis alterações no plano ultraestrutural em motoneurônios cervicais e lombares. A análise qualitativa de micrografias eletrônicas de transmissão de motoneurônios de ambos os segmentos de animais BACHD evidenciou mitocôndrias com alterações como destruição de cristas mitocondriais e vacúolos (**Figuras 14 e 15**). As mitocôndrias são organelas vitais que geram energia para todos os processos celulares e regulam a função celular, assim, qualquer comprometimento nessas estruturas pode levar à geração de espécies reativas de oxigênio que podem induzir a morte celular por necrose ou apoptose (BENARD *et al.*, 2007). Além disso, tem sido demonstrado que a disfunção mitocondrial desempenha um papel importante na patogênese da DH (BROWNE & BEAL, 2004; REDDY, MAO, MANCZAK, 2009). Em nosso estudo, observamos ruptura de cristas e presença vacúolos em mitocôndrias dos motoneurônios dos segmentos analisados (**Figuras 14 e 15**). Além disso, observamos grânulos de lipofuscina em ambos os genótipos para os dois segmentos, entretanto diferentemente do que observamos no segmento cervical, a análise quantitativa destes grânulos não foi significativamente diferente no segmento lombar (**Figura 15**). É bem descrito que o acúmulo de grânulos de lipofuscina é um processo normal e dependente da idade (SAMORAJSKI *et al.*, 1965). Entretanto, estudos apontam seu acúmulo em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (CATALDO *et al.*, 1994; MCHOLM, AGUILAR, NORRIS, 1984). Além disso, já foi reportado que o estresse oxidativo causado pelo dano mitocondrial em cérebros de pacientes com DH culmina no aumento de grânulos de lipofuscina (BROWN, 1999). Estudos clássicos utilizando microscopia eletrônica de transmissão para avaliar danos em cérebros de pacientes com HD já apontavam para alterações morfológicas das mitocondriais com cristas escassas, contendo ocasionalmente estruturas fibrilares cristalinas dentro da matriz e aumento de grânulos de lipofuscina em maior quantidade em cérebros afetados pela DH em relação ao controle (GOEBEL *et al.*, 1978; TELLEZ-NAGEL *et al.*, 1974). Além disso, existe relação comprovada da mHtt com componentes mitocondriais levando a alterações na sua estrutura (BOSSY-WETZEL, PETRILLI, KNOTT, 2008; SHIRENDEB *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2011). Além destes aspectos morfológicos outros marcadores indicam alterações mitocondriais em modelos de camundongos para a DH como alterações na atividade da cadeia transportadora de elétrons, prejuízos na fosforilação oxidativa (MILAKOVIC & JOHNSON, 2005), estresse oxidativo (TABRIZI *et al.*, 1999), defeitos no tamponamento do cálcio pela mitocôndria (LIM *et al.*, 2008; OLIVEIRA & WALLACE, 2006), anormalidades no tráfego mitocondrial (LI *et al.*, 2010) e desregulação de fatores chaves para biogênese mitocondrial (CUI *et al.*, 2006). Uma vez que estudos enfatizam que as disfunções mitocondriais e

desbalanços energéticos são importantes para os processos fisiopatológicos em doenças neurodegenerativas, em especial a DH, nós sugerimos que as alterações mitocondriais nos motoneurônios podem estar relacionadas a atrofia destas células e morte por apoptose nos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal de animais BACHD.

A título de comparação, entre os dois segmentos analisados por este conjunto de técnicas, não observamos grandes diferenças nos padrões analisados, excetuando-se o aumento de grânulos de lipofuscina no segmento cervical. Estes dados podem indicar que não existem diferenças no acometimento dos motoneurônios dos segmentos cervicais e lombares da medula espinhal no que se refere ao aspecto morfológico, sendo necessários estudos mais aprofundados para se averiguar outros parâmetros.

A partir das observações de que a Htt mutante também estava presente de forma sistêmica nos órgãos e tecidos periféricos, começaram a surgir publicações utilizando modelos animais para DH com foco nos nervos e JNMs mostrando que, de fato, estas estruturas apresentam prejuízos nestes animais (RIBCHESTER *et al.*, 2004; ROZAS *et al.*, 2011; ZIELONKA *et al.*, 2014; KHEDRAKI *et al.*, 2016; DE ARAGÃO *et al.*, 2016).

Neste trabalho, analisamos as raízes ventrais do segmento cervical da medula espinhal de animais BACHD comparados aos WT. A análise ultraestrutural mostrou alterações como separação lamelar e vacúolos na bainha de mielina e axoplasma de camundongos BACHD (**Figura 17**). Além disso, observamos um intenso processo de degeneração axonal com diminuição de diâmetro e número por área destas estruturas. Observou-se também que as fibras mielinizadas mais afetadas em animais BACHD eram as que possuíam maior calibre (**Figura 18**). Trabalhos anteriores demonstraram alterações semelhantes na ultraestrutura afetando preferencialmente as fibras de grande calibre no nervo ciático dos animais R6 / 2 (WADE *et al.*, 2008). Sobue *et al.*, (1981), também encontraram maior incidência de danos nas fibras de grande calibre em relação às de menor calibre nas raízes cervicais ventrais de pacientes com ELA. Estes dados sugerem que as grandes fibras mielinizadas, que são correspondentes às fibras de  $\alpha$ -motoneurônios, são seletivamente afetadas e que as pequenas fibras mielinizadas, correspondentes às fibras dos  $\gamma$ -motoneurônios, são preservadas até certo ponto (BISCOE *et al.*, 1982; SOBUE *et al.*, 1981).

Nós também observamos que não houve alterações na espessura da bainha de mielina e nem na análise de G-ratio que são parâmetros que servem para avaliar a mielinização (**Figura 18**). Estes dados sugerem que nas raízes ventrais do segmento cervical de animais BACHD estão ocorrendo eventos de caráter degenerativos e que o processo de mielinização não sofre alterações.

Além das raízes ventrais, nós também observamos alterações em JNMs dos músculos ETM e TA de animais BACHD em relação ao WT. Nestes músculos identificamos diminuição da área do elemento pré-sináptico e pós-sinápticos (**Figuras 19**). Estas alterações nas áreas pré e pós-sinápticas podem refletir na diferença de colocalizações entre estes dois elementos e na desnervação parcial observada em ambos os músculos. Além disso, identificamos fragmentação das JNMs de animais BACHD em relação aos controles nos músculos ETM e TA (**Figura 19 e 20**). Muitos estudos morfológicos sobre JNMs em doenças neurodegenerativas (SARANTSEVA *et al.*, 2011, VALDEZ *et al.*, 2012, XIA *et al.*, 2012) ou em processos degenerativos relacionados à idade (BALICE-GORDON, 1997; COURTNEY & STEINBACH, 1981; GUTMANN, HANZLIKOVA, VYSOKOCIL, 1971; VALDEZ *et al.*, 2010) correlacionam alterações semelhantes ao processo de desnervação axonal. Por exemplo, em camundongos R6 / 2, observaram-se mudanças nas JNMs, como desnervação, redução na área de terminais pré-sinápticos, aumento da sensibilidade à acetilcolina e redução na sensibilidade à  $\mu$ -conotoxina (RIBCHESTER *et al.*, 2004). Portanto, tem sido sugerido que mHtt pode alterar componentes sinápticos e então interferir com sua estrutura afetando a neurotransmissão (SMITH *et al.*, 2005). Os resultados aqui apresentados estão de acordo com este ponto de vista, de que mHtt em ratos BACHD pode levar a degeneração sináptica.

Em relação à comparação entre as JNMs dos dois músculos, esta indica que mesmo tendo diminuição de área pré-sináptica, as JNMs de TA possuem maior índice de desnervação, menor colocalização entre os elementos pré e pós-sinápticos e apresentam maior porcentagem de fragmentação quando comparamos os mesmos índices para JNMs de músculo ETM. Esta comparação é útil na medida em que se tratam de JNMs de dois grupos musculares diferentes que estão sendo afetadas de formas distintas em modelos murinos para DH de mesma idade. Esses dados comparativos, portanto, sugerem que as JNMs de um músculo dos membros (TA) são mais acometidas e se encontram mais alteradas em relação a músculo do pescoço (ETM) em camundongos BACHD.

Como vimos alterações em motoneurônios, raízes ventrais e JNMs, partimos para a análise das fibras musculares esqueléticas dos músculos ETM e TA para averiguar possíveis alterações em camundongos BACHD. Primeiramente, observamos diminuição da AST das fibras musculares de ambos os músculos nos animais transgênicos em relação aos WTs (**Figura 21**). Estes dados vão ao encontro do trabalho de Mielcarek *et al.*, (2015) onde observaram diminuição da massa muscular de TA em animais R6/2. Além disso, é bem descrito que a atrofia muscular é uma característica comum da DH (FARRER, 1985;

FARRER & MEANEY, 1985; RIBCHESTER *et al.*, 2004; TREJO *et al.*, 2004). Outro ponto a ser considerado é o efeito deletério da mHtt em fibras musculares de camundongos R6/2 (SATHASIVAM *et al.*, 1999; MOFFITT *et al.*, 2009; ORTH *et al.*, 2003, sendo que, de acordo com Van Der Burg, Björkqvist, Brundin, (2009), o M.E.E. é um dos locais com maior acúmulo de Htt fora do SNC. Em relação aos dois músculos em análise, a atrofia vista no músculo TA foi maior do que para o músculo ETM. No entanto, cabe ressaltar que o músculo ETM possui grande variabilidade no tamanho das fibras por se tratar de um músculo com características mistas de contratilidade, sendo constituído por fibras rápidas e lentas. Já o músculo TA é um músculo de contração rápida tendo normalmente cerca de 70,9% das fibras de padrão rápido do tipo IIB (BLOEMBERG & QUADRILATERO, 2012). Essa maior atrofia visualizada no músculo TA em camundongos BACHD pode estar correlacionada ao maior comprometimento das JNMs desse músculo observado por nós nesse estudo.

Em relação às alterações no padrão de expressão da *MyHC* dos músculos ETM e TA de BACHD, houve diminuição de fibras do tipo IIX e aumento das isoformas do tipo IIA para o músculo ETM (**Figura 22**). Já para o músculo TA, observamos redução no padrão de expressão das fibras do tipo IIB e tendência ao aumento de fibras IIX (**Figura 22**). Como as fibras do tipo IIB são fibras de maior porcentagem neste músculo, esta mudança pode estar associada à atrofia relatada, uma vez que fibras do tipo IIB são maiores do que fibras do tipo IIX (BLOEMBERG & QUADRILATERO, 2012). Além disso, estudos realizados em dois grupos musculares distintos como gastrocnêmio e diafragma, demonstrou que em músculos que sofrem deservação existe alteração no padrão de expressão das isoformas mais rápidas como é o caso de fibras do tipo IIB e IIX, corroborando nossos dados de deservação parcial de JNMs e alteração no padrão da *MyHC*. Os dados da literatura também mostram que os motoneurônios e suas JNMs diferem drasticamente em tamanhos e que motoneurônios maiores, com as maiores JNMs inervam fibras musculares rápidas (BURKE, 1971; MANTILLA *et al.*, 2007). Portanto, a hipótese de que a redução de fibras musculares do tipo IIX em ETM e IIB em TA de animais BACHD também pode estar associada a mudanças nos motoneurônios e JNMs descritas aqui, como a diminuição na área de elementos pré-sinápticos (Figuras 18 e 20) e diminuição do tamanho dos motoneurônios em BACHD (**Figuras 12 e 13**). De fato, trabalhos anteriores sugeriram que mHtt pode ter um efeito direto ou indireto na mudança de perfis de tipo de fibras no modelo murino R6 / 2 e também em seres humanos (STRAND *et al.*, 2005).

Após cuidadosa análise qualitativa observamos que ambos os músculos apresentavam alterações em sua ultraestrutura (**Figuras 23 e 24**). A análise de fibras musculares de ETM de

BACHD mostrou aumento do RS, invadindo a região de miofibrilas. Também observamos a presença de vacúolos dentro das mitocôndrias. Além disso, observamos a presença de maior quantidade de glicogênio inter-miofibrilar (**Figura 23**). No músculo TA, observamos maior acúmulo de glicogênio nos espaços inter-miofibrilar e danos mitocondriais mais severos do que os observados em músculos ETM. Além disso, identificamos que nos animais transgênicos a linha Z não seguia um padrão retilíneo como observamos nos animais controles (**Figura 24**). De fato, estudos realizados no músculo TA de coelhos, também demonstrou desalinhamento da linha Z e alterações mitocondriais (ASHLEY *et al.*, 2007). Em relação ao acúmulo de glicogênio observado nos espaços inter-miofibrilares dos dois músculos, sabe-se que este acúmulo é um evento normal e que é dependente da demanda energética do músculo (MARCHAND *et al.*, 2002). Entretanto, também já foi reportado na literatura por Nielsen *et al.*, (2009) e Ørtenblad *et al.*, (2011), que alterações no RS podem causar deposição anormal de glicogênio nestes espaços inter-miofibrilares, o que vai de encontro às nossas observações de alargamento do RS e acumulação deste grânulo. De fato, existem evidências na literatura de que regulação no feedback dos depósitos e armazenamento de glicogênio estão associados à função normal do RS através de um complexo proteico denominado RS-glicogênio (WANSON & DROCHMANS, 1972; ENTMAN *et al.*, 1980; XU & BECKER, 1998). Assim, mesmo que o músculo TA seja um músculo mais rápido e possuir maiores demandas de glicogênio, não podemos excluir o fato de que a elevada deposição no espaço inter-miofibrilar possa ser consequência dos danos observados na fibra muscular como um todo, principalmente com alterações tão pronunciadas nos RS e mitocôndrias.

Todas estas alterações ultraestruturas relatadas aqui sugerem um processo patológico contínuo durante a atrofia muscular. Além disso, os defeitos mitocondriais relatados em nosso trabalho podem ser fatores chave para o processo degenerativo observado em modelos animais e pacientes com DH.

Juntos, estes resultados mostram que no modelo murino para DH, BACHD, existem alterações em todos os componentes das UMs de músculos ETM e TA (**Figura 25**). No entanto, vimos alterações mais severas apenas nas JNMs e musculatura esquelética do músculo TA. Desta forma podemos especular que o dano segue uma ordem ascendente (músculo para motoneurônio) nos animais BACHD de 12 meses de idade. Estes achados são importantes na medida em que evidências encontradas na literatura apontam que, embora a patologia da DH tenha origem no SNC, alterações ocorridas na periferia e que afetam músculos estriados esqueléticos podem ocorrer de forma independente da progressão da disfunção cerebral (VAN DER BURG, BJÖRKQVIST, BRUNDIN, 2009).

Entretanto, novos estudos em idades diferentes podem ser uteis para traçar uma linha temporal e avaliar em que período de vida começam os sinais degenerativos na UM destes animais transgênicos para DH.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho de tese, mostramos que dois diferentes músculos (ETM e TA), são afetados de formas diferentes no que diz respeito à JNMs e musculatura esquelética. Estes dados podem indicar que dependendo da função e composição do musculo, o processo degenerativo pode sofrer alterações.

Nós identificamos que as alterações vistas nos motoneurônios de ambos os segmentos podem indicar que apesar de a doença ser causada devido à morte neuronal no cérebro, os motoneurônios também estão sendo afetados, abrindo espaço para novos estudos a fim de elucidar se é devido aos mesmos mecanismos de morte encontrados nos neurônios estriatais ou se por outro(s) fator(es). Se estas questões puderem ser respondidas, nosso trabalho terá trazido contribuições de suma importância para o advento de novas terapias para o tratamento da DH.

Em conjunto os dados apresentados nesta tese, reforçam que o caminho trilhado para investigar alterações fora do SNC na DH é promissor e merece esforços para que sejam elucidados mecanismos que estejam levando a estes danos.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, O. R.; JANKOVIC, J. Symptomatic treatment of Huntington disease. **Neurotherapeutics**, v. 5, n. 2, p. 181-197, 2008.

AKKAL, D.; DUM, R. P.; STRICK, P. L. Supplementary motor area and presupplementary motor area: targets of basal ganglia and cerebellar output. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 40, p. 10659-10673, 2007.

ANDERSON, T. J.; MACASKILL, M. R. Eye movements in patients with neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n.2, p. 74-85, 2013.

ANDREW, S. E.; GOLDBERG, Y. P.; KREMER, B.; TELENUS, H.;THEILMANN, J., ADAM, S.; ... & GRAHAM, R. K. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length. **Nature genetics**, v. 4, 1993.

ASHLEY, Z.; SALMONS, S.; BONCOMPAGNI, S.; PROTASI, F.; RUSSOLD, M.; LANMULLER, H.; ... & JARVIS, J. C. Effects of chronic electrical stimulation on long-term denervated muscles of the rabbit hind limb. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 28, n. 4-5, p. 203-217, 2007.

AZIZ, N.A.; VAN DER BURG, J.M.; LANDWEHRMEYER, G.B.; BRUNDIN, P.; STIJNEN, T.; EHDI STUDY GROUP.; ROOS, R,A. Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number. **Neurology**, v. 71, p. 1506-1513,2008.

BALICE-GORDON, R.J. Age-related changes in neuromuscular innervation. **Muscle & Nerve Supplement**,v. 5, p. S83–S87,1997.

BÄR, A.; PETTE, D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. **FEBS letters**, v. 235, n. 1-2, p. 153-155, 1988.

BATES, G.P. History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history. **Nat Rev Genet.**, v. 6, p. 766 – 73, 2005.

BAUER, P. O.; NUKINA, N. The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. **Journal of neurochemistry**, v.110, n. 6, p.1737-1765, 2009.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. **Artmed Editora**, 2016.

BENARD, G.; BELLANCE, N.; JAMES, D.; PARRONE, P.; FERNANDEZ, H.; LETELLIER, T.; ROSSIGNOL, R. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. **Journal of cell science**, v. 120, p. 838-848, 2007.

BERARDELLI, A.; NOTH, J.; THOMPSON, P. D.; BOLLEN, E. L.; CURRA, A.; DEUSCHL, G.; ... & ROOS, R. A. Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease. **Movement disorders**, v. 14, n. 3, p. 398-403, 1999.

BLOEMBERG, D.; QUADRILATERO, J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. **PloS one**, v. 7, n. 4, p; e35273, 2012.

BISCOE, T.J.; NICKELS, S.M.; STIRLING, C.A. Numbers and sizes of nerve fibres in mouse spinal roots. **Experimental Physiology**, v. 67, p. 473-494, 1982.

BOSSY-WETZEL, E.; PETRILLI, A.; KNOTT, A. B. Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. **Trends in neurosciences**, v. 31, n. 12, p. 609-616, 2008.

BROOKS, S.; HIGGS, G.; JONES, L.; DUNNETT, S.B. Longitudinal analysis of the behavioural phenotype in Hdh (CAG) 150 Huntington's disease knock-in mice. **Brain research bulletin**, v. 88, p. 182-188, 2012.

BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind?. **Archives of neurology**, v. 23, n. 4, p. 369-379, 1970.

BROWN, M.; HASSER, E. M. Complexity of age-related change in skeletal muscle. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 51, n. 2, p. B117-B123, 1996.

BROWN, G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1411, p. 351-369, 1999.

BROWNE, S.E.; BEAL, M.F. The energetics of Huntington's disease. **Neurochemical research**, v. 29, p. 531-546, 2004.

BROWNE, S. E.; BEAL, M. F. Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 11-12, p. 2061-2073, 2006.

BROŽOVÁ, H.; ŠTOCHL, J.; KLEMPÍŘ, KUCHARÍK, M.; RŮŽIČKA, E.; ROTH, J. A sensitivity comparison of clinical tests for postural instability in patients with Huntington's disease. **Gait & posture**, v. 34, p. 245-247, 2011.

BURKE, R.E.; LEVINE, D.N.; ZAJAC, F.E.D.; Tsairis, P.; Engel, W.K. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. **Science**, v. 174, p. 709-712, 1971.

CAPECCHI M. R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. **Nat Rev Genet.**, v. 6, n. 6, p. 507–12, 2005

CARTER R. J.; LIONE L. A.; HUMBY T.; MANGIARINI L.; MAHAL A.; BATES G. P.; DUNNETT S. B.; MORTON A. J. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. **J Neurosci.**, v. 19, n. 8, p. 3248–57, 1999.

CARVALHO, R. F.; CICOGNA, A. C.; CAMPOS, G. E. R.; DE ASSIS, J. M. F.; PADOVANI, C. R.; OKOSHI, M. P.; PAI-SILVA, M. D. (). Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. **International journal of experimental pathology**, v. 84, n. 4, p. 201-206, 2003.

CATALDO, A.M.; HAMILTON, D.J.; NIXON, R.A. Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease. **Brain research**, v. 640, p. 68-80, 1994.

CHAKKALAKAL, J. V.; NISHIMUNE, H.; RUAS, J. L.; SPIEGELMAN, B. M.; SANES, J. R. Retrograde influence of muscle fibers on their innervation revealed by a novel marker for slow motoneurons. **Development**, v. 137, n. 20, p. 3489-3499, 2010.

CHARGE, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 209-238, 2004.

CHAU, W.K.; SO, K.F.; TAY, D.; DOCKERY, P. A morphometric study of optic axons regenerated in a sciatic nerve graft of adult rats. **Restorative neurology and neuroscience**, v. 16, p.105-116, 2000.

COURTNEY, J.; STEINBACH, J.H. Age changes in neuromuscular junction morphology and acetylcholine receptor distribution on rat skeletal muscle fibres. **J Physiol.**, v. 320, p. 435–447, 1981.

COYLE, J. T.; SCHWARCZ, R. Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea, p. 244-246, 1976.

CROSSMAN, A. Primate models of dyskinesia: the experimental approach to the study of basal ganglia-related involuntary movement disorders. **Neuroscience**, v. 21, n.1, p. 1-40, 1987.

CROSSMAN, A. R.; MITCHELL, I. J.; SAMBROOK, M. A.; JACKSON, A. Chorea and myoclonus in the monkey induced by gamma-aminobutyric acid antagonism in the lentiform complex. **Brain**, v. 111, n. 5, p. 1211-1233, 1988.

CUI, L.; JEONG, H.; BOROVECKI, F.; PARKHURST, C. N.; TANESE, N.; KRAINIC, D. Transcriptional repression of PGC-1 $\alpha$  by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. **Cell**, v. 127, n. 1, p. 59-69, 2006.

DAUBER, J. R. Estimating the number of motor units in a muscle. **J. Clin. Neurophysiol.** v. 12, p. 585-594, 1995.

DE ARAGÃO, B. C.; RODRIGUES, H. A.; VALADÃO, P. A. C.; CAMARGO, W.; NAVES, L. A.; RIBEIRO, F. M.; GUATIMOSIM, C. Changes in structure and function of diaphragm neuromuscular junctions from BACHD mouse model for Huntington's disease. **Neurochemistry international**, v. 93, p. 64-72, 2016.

DENARDI, C., AUSONI, S., MORETTI, P., GORZA, L., VELLECA, M., BUCKINGHAM, M., & SCHIAFFINO, S. Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. **The Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 4, p. 823-835, 1993.

DEWHURST, K.; OLIVER, J.E; MCKNIGHT, L. Huntington's Disease. *British Journal of Psychiatry*, v. 116, p. 255–258, 1970.

DIFIGLIA, M.; SAPP, E.; CHASE, K. O.; DAVIES, S. W.; BATES, G. P.; VONSATTEL, J. P.; ARONIN, N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. **Science**, v. 277, n. 5334, p. 1990-1993, 1997.

DJOUSSE, L. M. D. D., KNOWLTON, B., CUPPLES, L. A., MARDER, K., SHOULSON, I., & MYERS, R. H. Weight loss in early stage of Huntington's disease. **Neurology**, v. 59, n. 9, p. 1325-1330, 2002.

DODDS, L.; CHEN, J.; BERGGREN, K.; FOX, J. Characterization of striatal neuronal loss and atrophy in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **PLOS Currents Huntington Disease**, 2014.

DONOGHUE, J. P.; LEIBOVIC, S.; SANES, J. N. Organization of the forelimb area in squirrel monkey motor cortex: representation of digit, wrist, and elbow muscles. **Experimental Brain Research**, v. 89, n. 1, p. 1-19, 1992.

DÓRIA, J.G. Efeito neuroprotetor dos moduladores alostéricos positivos do receptor metabotrópico de glutamato 5 na Doença de Huntington. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

DULHUNTY, A.F.; HAARMANN, C.S.; GREEN, D.; LAVER, D.R. *et al.* Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. **Prog. Bio. Mol. Biol.** v. 79, p. 45-75, 2002.

ECCLES, J. C.; SHERRINGTON, C. S. Numbers and contraction-values of individual motor-units examined in some muscles of the limb. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character**, v.106, n. 745, p. 326-357, 1930.

EHRNHOEFER, D. E.; SUTTON, L.; HAYDEN, M. R. Small changes, big impact: posttranslational modifications and function of huntingtin in Huntington disease. **The Neuroscientist**, p. 1073858410390378, 2011.

ENGEL, A. G.; OHNO, K.; SINE, S. M. Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 5, p. 339-352, 2003.

ENOKA, R. Bases Neuromecânicas da Cinesilogia. 2ª ed. **Manole**, São Paulo. 2000.

ENTMAN, M. L., KESLENSKY, S. S., CHU, A., & VAN WINKLE, W. B. The sarcoplasmic reticulum-glycogenolytic complex in mammalian fast twitch skeletal muscle. Proposed in vitro counterpart of the contraction-activated glycogenolytic pool. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 13, p. 6245-6252, 1980).

ESSEN, B.; JANSSON, E.; HENRIKSSON, J.; TAYLOR, A. W.; SALTIN, B. Metabolic characteristics of fibre types in human skeletal muscle. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 95, n. 2, p. 153-165, 1975.

FARRER, L.A. Diabetes mellitus in Huntington disease. **Clin Genet.**, v. 27, p. 62–67, 1985.

FARRER, L.A.; MEANEY, F.J. An anthropometric assessment of Huntington's disease patients and families. **Am J Phys Anthropol.**, v. 67, p. 185–94, 1985.

FERRANTE, R.J.; GUTEKUNST C.A.; PERSICHETTI, F.; MCNEIL, S.M.; KOWALL, N.W.; GUSELLA, J.F.; MACDONALD, M.E.; BEAL, M.F.; HERSCH, S.M. () Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum. **J Neurosci**, v. 17, p. 3052–3063, 1997.

FOWLER, S.C.; ZARCONE, T.J.; CHEN, R.; TAYLOR, M.D.; WRIGHT, D.E. Low grip strength, impaired tongue force and hyperactivity induced by overexpression of neurotrophin-3 in mouse skeletal muscle. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 20, p. 303–308, 2002.

FLURKEY, K.; CURRER, J. M.; HARRISON, D. E. Mouse models in aging research. 2007.

FUSCO, F. R.; CHEN, Q.; LAMOREAUX, W. J.; FIGUEREDO-CARDENAS, G.; JIAO, Y.; COFFMAN, J. A.; ... & REINER, A. (). Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. **The Journal of neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 1189-1202, 1999.

GERVAIS, F. G.; SINGARAJA, R.; XANTHOUDAKIS, S.; GUTEKUNST, C. A.; LEAVITT, B. R.; METZLER, M.; ... & RASPER, D. M. Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hip1. **Nature cell biology**, v. 4, n. 2, p. 95-105, 2002.

GIL, J. M.; REGO, A. C. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2803-2820, 2008.

GIL-MOHAPEL, J. M.; REGO, A. C. Doença de Huntington: Uma revisão dos aspectos fisiopatológicos. **Rev Ncienc**, v. 19, n. 4, p. 724-734, 2011.

GOEBEL, H.H.; HEIPERTZ, R.; SCHOLZ, W.; IQBAL, K.; TELLEZ-NAGEL, I. Juvenile Huntington chorea: clinical, ultrastructural, and biochemical studies. **Neurology**, v. 28, p. 23–31, 1978.

GRAY, M.; SHIRASAKI, D. I.; CEPEDA, C.; ANDRÉ, V.M.; WILBURN, B.; LU, X. H.; LI, X. J. (). 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, p. 6182-6195, 2008.

GUTMANN, E.; HANZLIKOVA, V.; VYSOKOCIL, F. (). Age changes in cross striated muscle of the rat. **J Physiol.**, v. 216, p. 331–343, 1971.

GUSELLA, J. F.; WEXLER, N. S.; CONNEALLY, P. M.; NAYLOR, S. L.; ANDERSON, M. A.; TANZI, R. E.; ... & YOUNG, A. B. A Polymorphic DNA Marker Genetically Linked to Huntington's Disease. **Landmarks in Medical Genetics: Classic Papers with Commentaries**, v. 306, n. 51, p. 153, 2004.

HADDAD, M. S.; CUMMINGS, J. L. Huntington's disease. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 20, n. 4, p. 791-807, 1997.

HAN, I.; YOU, Y.; KORDOWER, J. H.; BRADY, S. T.; & MORFINI, G. A. Differential vulnerability of neurons in Huntington's disease: the role of cell type-specific features. **Journal of neurochemistry**, v. 113, n. 5, p. 1073-1091, 2010.

HARJES, P.; WANKE, E.E. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. **Cell press**, v. 28, p. 425-433, 2003.

HEEMSKERK, A. W.; ROOS, R. A. Dysphagia in Huntington's disease: a review. **Dysphagia**, v. 26, n. 1, p. 62-66, 2011.

HEINTZ N. BAC to the future: the use of bac transgenic mice for neuroscience research. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n.12, p.861–70, 2001.



HENG, M.Y.; TALLAKSEN-GREENE, S.J.; DETLOFF, P.J.; ALBIN, R.L. Longitudinal evaluation of the Hdh (CAG) 150 knock-in murine model of Huntington's disease. **The Journal of neuroscience**, v. 27, p. 8989-8998, 2007.

HICKEY, M.A.; CHESSELET, M.F. Apoptosis in Huntington's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 27, p. 255–265, 2003.

HICKEY, M. A.; GALLANT, K.; GROSS, G. G.; LEVINE, M. S.; CHESSELET, M. F. Early behavioral deficits in R6/2 mice suitable for use in preclinical drug testing. **Neurobiol Dis**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2005.

HILLE, B. Ionic Channels in Excitable Cells, 2nd edn. **Sinauer**, Sunderland, MA, USA, 1992.

HO, L.W.; CARMICHAEL, J.; SWART, J.; WYTTENBACH, A.; RANKIN, J.; & RUBINSZTEIN, D.C. The molecular biology of Huntington's disease. **Psychol. Med.**, v. 31, p. 3–14, 2001.

HOLMES, A.; YANG, R.J; MURPHY, D.L.; CRAWLEY, J.N. Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, p. 914–923, 2002.

HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell**, v. 72, p. 971 – 83, 1993.

IMARISIO, S.; CARMICHAEL, J.; KOROLCHUK, V.; CHEN, C. W.; SAIKI, S.; ROSE, C.; ... & RUBINSZTEIN, D. C. Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. **Biochemical Journal**, v. 412, n. 2, p. 191-209, 2008.

KAZANTSEV, A.; PREISINGER, E.; DRANOVSKY, A.; GOLDGABER, D.; HOUSMAN, D. Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 11404-11409, 1999.

KERNELL, D. The motoneurone and its muscle fibres, 2006.

KHEDRAKI, A.; REED, E. J.; RICH, M. M.; & VOSS, A. A. Increased Probability of Release in Huntington's Disease Neuromuscular Junctions. **The FASEB Journal**, v.30, n. (1 Supplement), p. 992-2, 2016.

KIRKWOOD, S.C.; SU, J.L.; CONNEALLY, P.; FOROUD, T. Progression of symptoms in the early and middle stages of Huntington disease. **Archives of Neurology**, v. 58, p. 273-278, 2001.

KONG, J.; XU, Z. Peripheral axotomy slows motoneuron degeneration in a transgenic mouse line expressing mutant SOD1 G93A. **Journal of Comparative Neurology**, v. 412, p. 373-380, 1999.

KROBITSCH, S.; KAZANTSEV, A. G. Huntington's disease: From molecular basis to therapeutic advances. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 43, n. 1, p. 20-24, 2011.

KUANG, S.; GILLESPIE, M. A.; RUDNICKI, M. A. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. **Cell stem cell**, v. 2, n. 1, p. 22-312008.

KUDWA, A.E.; MENALLED, L.B.; OAKESHOTT, S.; MURPHY, C.; MUSHLIN, R.; FITZPATRICK, J.; HOWLAND, D. Increased Body Weight of the BAC HD Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease Accounts for Some but Not All of the Observed HD-like Motor Deficits. **PLoS currents**, v. 5, p. 10-1371, 2013.

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.

LANDLES, C.; BATES, G. P. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. **EMBO reports**, v. 5, n. 10, p. 958-963, 2004.

LEMON, R.N.; GRIFFITHS, J. Comparing the function of the corticospinal system in different species: organizational differences for motor specialization? **Muscle Nerve**, v. 32, p. 261-279, 2005.

LEONG, P.; MACLENNAN, D. H. The cytoplasmic loops between domains II and III and domains III and IV in the skeletal muscle dihydropyridine receptor bind to a contiguous site in the skeletal muscle ryanodine receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 45, p. 29958-29964, 1998.

LEVITAN, I. B.; KACZMAREK, L. K. Signaling in the brain. **Oxford University Press**, p. 1-22, 1997.

LI, J. Y.; POPOVIC N.; BRUNDIN P. The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington's disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. **NeuroRx**, v. 2, n. 3, p. 447-64, 2005.

LI, Z.; JO, J.; JIA, J.M.; LO, S.C.; WHITCOMB, D.J.; JIAO, S.; CHO, K.; SHENG, M. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. **Cell.**, v. 141, p. 859-871, 2010.

LI, S. H.; LI, X. J. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. **TRENDS in Genetics**, v. 20, n. 3, p. 146-154, 2004.

LI, S.H.; SCHILLING, G.; YOUNG, W.; MARGOLIS, R.L.; STINE, O.C.; WAGSTER, M.V.; HEDREE, N.J.C. Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. **Neuron**, v. 11, p. 985-993, 1993.

LIM, D.; FEDRIZZI, L.; TARTARI, M.; ZUCCATO, C.; CATTANEO, E.; BRINI, M.; & CARAFOLI, E. Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 9, p. 5780-5789, 2008.

LIN, C. H.; TALLAKSEN-GREENE, S.; CHIEN, W. M.; CEARLEY, J. A.; JACKSON, W. S.; CROUSE, A. B.; REN, S.; LI, X. J.; ALBIN, R. L.; DETLOFF, P. J. Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. **Hum Mol Genet.** v. 10, n. 2, p. 137-44, 2001.

LIONE, L. A.; CARTER, R. J.; HUNT, M. J.; BATES, G. P.; MORTON, A. J.; DUNNETT, S. B. Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation. **J Neurosci.**, v. 19, n. 23, p.10428–37, 1999.

LUNA, V. M.; DAIKOKU, E.; ONO, F. (). "Slow" skeletal muscles across vertebrate species. **Cell & bioscience**, v. 5, n. 1, p. 1, 2015.

LUNDY-EKMAN, L. Neurociência. "**fundamento para reabilitação.**" 2004.

Machado, A. B. Neuroanatomia funcional. **Atheneu**, 2005.

MANGIARINI, L.; SATHASIVAM, K.; SELLER, M.; COZENS, B.; HARPER, A.; HETHERINGTON, C.; BATES, G.P.. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. **Cell**, v. 87, p. 493-506, 1996.

MANTILLA, C.B.; ROWLEY, K.L.; ZHAN, W.Z.; FAHIM, M.A.; SIECK, G.C.; Synaptic vesicle pools at diaphragm neuromuscular junctions vary with motoneuron soma, not axon terminal, inactivity. **Neuroscience**, v. 146, p.178-189, 2007.

MANTOVANI, S.; GORDON, R.; LI, R.; CHRISTIE, D.C.; KUMAR, V.; WOODRUFF, T.M. Motor deficits associated with Huntington's disease occur in the absence of striatal degeneration in BACHD transgenic mice. **Human molecular genetics**, p. ddw050, 2016.

MANUEL, M.; ZYTNICKI, D. Alpha, beta and gamma motoneurons: functional diversity in the motor system's final pathway. **Journal of integrative neuroscience**, v. 10, n. 03, p. 243-276, 2011.

MARBAN, E.; YAMAGISHI, T.; TOMASELLI, G. F. Structure and function of voltage-gated sodium channels. **The Journal of Physiology**, v. 508, n. 3, p. 647-657, 1998.

MARCHAND, I.; CHORNEYKO, K.; TARNOPOLSKY, M.; HAMILTON, S.; SHEARER, J.; POTVIN, J.; GRAHAM, T.E. Quantification of subcellular glycogen in resting human muscle: granule size, number, and location. **J Appl Physiol.**, v. 93, p. 1598-1607, 2002.

MARSH, J. L.; THOMPSON, L. M. *Drosophila* in the study of neurodegenerative disease. **Neuron**, v. 52, n.1, p. 169-178, 2006.

MARSH, J. L.; PALLOS, J.; THOMPSON, L. M. Fly models of Huntington's disease. **Human molecular genetics**, v. 12, n. (suppl 2), p. R187-R193, 2003.

MCFADYEN, M.P.; KUSEK, G.; BOLIVAR, V.J.; FLAHERTY, L. Differences among eight inbred strains of mice in motor ability and motor learning on a rotarod. **Genes, Brain and Behavior**, v. 2, p. 214-219, 2003.

MCHOLM, G.B.; AGUILAR, M.J.; NORRIS, F.H. Lipofuscin in amyotrophic lateral sclerosis. **Archives of neurology**, v. 41, p. 1187, 1984.

MENALLED L. B.; SISON J. D.; DRAGATSIS I.; ZEITLIN S.; CHESSELET M. F. Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. **J Comp Neurol.**, v. 465, n. 1, p. 11–26, 2003.

MENALLED, L.; EL-KHODOR, B.; PATRY, M.; SUAREZ-FARINAS, M. Systematic behavioral evaluation of transgenic and knock-in mouse models of Huntington's Disease. **Neurobiology of Disease**, v. 35, p. 319-36, 2009.

MENALLED, L.; ZANJANI, H.; MACKENZIE, L.; KOPPEL, A.; CARPENTER, E.; ZEITLIN, S.; CHESSELET, M. F. Decrease in striatal enkephalin mRNA in mouse models of Huntington's disease. **Experimental neurology**, v. 162, n. 2, p. 328-342, 2000.

MICHALEK, M.; SALNIKOV, E. S.; BECHINGER, B. Structure and topology of the huntingtin 1–17 membrane anchor by a combined solution and solid-state NMR approach. **Biophysical journal**, v. 105, n. 3, p. 699-710, 2013.

MIELCAREK, M. Huntington's disease is a multi-system disorder. **Rare Diseases**, v. 3, p. e1058464, 2015.

MILAKOVIC, T.; JOHNSON, G. V. Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 30773-30782, 2005.

MOFFITT, H.; MCPHAIL, G.D.; WOODMAN, B.; HOBBS, C.; BATES, G.P. (). Formation of polyglutamine inclusions in a wide range of non-CNS tissues in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease. **PLoS One**, v. 30, p. e8025, 2009.

MORTON, A. J.; WOOD, N. I.; HASTINGS, M. H.; HURELBRINK, C.; BARKER, R. A.; MAYWOOD, E. S. Disintegration of the sleep-wake cycle and circadian timing in Huntington's disease. **J Neurosci.**, v. 25, n. 1, p. 157–63, 2005.

MOSS. R. L.; HOFMANN. P. A. Cellular and molecular basis of muscle contraction. *Fundamental of Medical.* **Cell Biology**, v. 5b, p. 185-237, 1992.

MOUSE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 520–62, 2002.

MURPHY K. P. ;CARTER R. J.; LIONE L. A.; MANGIARINI L.; MAHAL A.; BATES G. P.; DUNNETT S. B.; MORTON A. J. Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. **J Neurosci.**, v. 20, n. 13, p. 5115–23, 2000.

NIELSEN, J.; SCHRØDER, H.D, RIX, C.G.; ØRTENBLAD, N. Distinct effects of subcellular glycogen localization on tetanic relaxation time and endurance in mechanically skinned rat skeletal muscle fibres. **The Journal of physiology**, v. 587, p. 3679-3690, 2009.

OLIVEIRA, P. J.; WALLACE, K. B. Depletion of adenine nucleotide translocator protein in heart mitochondria from doxorubicin-treated rats—relevance for mitochondrial dysfunction. **Toxicology**, v. 220, n. 2, p. 160-168, 2006.

ØRTENBLAD, N.; NIELSEN, J.; SALTIN, B.; HOLMBERG, H. C. Role of glycogen availability in sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> kinetics in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 589, n.3, p. 711-725, 2011.

ORTH, M.; COOPER, J.M.; BATES, G.P.; SCHAPIRA, A.H. Inclusion formation in Huntington's disease R6/2 mouse muscle cultures. **Journal of neurochemistry**, v. 87, p. 1-6, 2003.

PARKER, J. A.; CONNOLLY, J. B.; WELLINGTON, C.; HAYDEN, M.; DAUSSET, J.; NERI, C. Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 23, p. 13318-13323, 2001.

PEREIRA, L. M.; BASTOS, C. P.; DE SOUZA, J. M.; RIBEIRO, F. M.; PEREIRA, G. S. Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor  $\alpha$ . **Neurobiology of learning and memory**, v. 114, p. 1-9, 2014.

PEREZ-DE LA CRUZ, V.; SANTAMARIA, A. Integrative hypothesis for Huntington's disease: a brief review of experimental evidence. **Physiological Research**, v. 56, n. 5, 513, 2007.

PIIRA, A.; VAN WALSEM, M. R.; MIKALSEN, G.; ØIE, L.; FRICH, J. C.; KNUTSEN, S. Effects of a Two-Year Intensive Multidisciplinary Rehabilitation Program for Patients with Huntington's Disease: a Prospective Intervention Study. **PLoS currents**, v. 6, 2014.

POWERS, S.C.; HOWLEY, E.T. Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho. 1ª ed. São Paulo: **Manole**, 2000.

PRADO, V.F.; MARTINS-SILVA C.; DE CASTRO, B.M.; LIMA, R.F.; BARROS, D.M.; AMARAL, E. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. **Neuron**, v. 51, p. 601-12, 2006.

PRATT, S.J.; SHAH, S.B.; WARD, C.W.; INACIO, M.P.; STAINS, J.P.; LOVERING, R.M. Effects of in vivo injury on the neuromuscular junction in healthy and dystrophic muscles. **The Journal of physiology**, v. 591, p. 559-570, 2013.

RAWLINS, M. D.; WEXLER, N. S.; WEXLER, A. R.; TABRIZI, S. J.; DOUGLAS, I.; EVANS, S. J.; SMEETH, L. The Prevalence of Huntington's Disease. **Neuroepidemiology**, v. 46, n. 2, p. 144-153, 2016.

REDDY, P.H.; MAO, P.; MANCZAK, M. Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease. **Brain research reviews**, v. 61, p. 33-48, 2009.

REID, B.; SLATER, C.R.; BEWICK, G.S. Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. **J Neurosci.**, v. 19, p. 2511–2521, 1999.

RIBCHESTER, R.R.; THOMSON, D.; WOOD, N.I.; HINKS, T.; GILLINGWATER, T.H.; WISHART, T.M.; COURT, F.A.; MORTON, A.J. Progressive abnormalities in skeletal muscle and neuromuscular junctions of transgenic mice expressing the Huntington's disease mutation. **Eur J Neurosci.**, v. 20, p. 3092-114, 2004.

RICE, K. M.; LINDERMAN, J. K.; KINNARD, R. S.; BLOUGH, E. R. The Fischer 344/NNiaHSd X Brown Norway/BiNia is a better model of sarcopenia than the Fischer 344/NNiaHSd: a comparative analysis of muscle mass and contractile properties in aging male rat models. **Biogerontology**, v. 6, n. 5, p. 335-343, 2005.

RIGAMONTI, D.; BAUER, J.H.; DE-FRAJA, C.; CONTI, L.; SIPIONE, S.; SCIORATI, C.; CLEMENTI, E.; HACKAM, A.; HAYDEN, M.R.; LI, Y.; COOPER, J.K.; ROSS, C.A.; GOVONI, S.; VINCENZ, C.; CATTANEO, E. Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. **J Neurosci.**, v. 20, p. 3705–3713, 2000.

RODRIGUES, H.A.; FONSECA, M.D.C.; CAMARGO, W.L.; LIMA, P.M.; MARTINELLI, P. M.; NAVES, L.A.; GUATIMOSIM, C. Reduced Expression of the Vesicular Acetylcholine Transporter and Neurotransmitter Content Affects Synaptic Vesicle Distribution and Shape in Mouse Neuromuscular Junction. **Plos one**. v. 8, p. e78342, 2013.

ROOS, R. A. Huntington's disease: a clinical review. **Orphanet J Rare Dis.**, v. 5, n. 1, p. 40, 2010.



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

ROZAS, J. L.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, L.; TOMÁS-ZAPICO, C.; LUCAS, J. J.; FERNÁNDEZ-CHACÓN, R. Increased neurotransmitter release at the neuromuscular junction in a mouse model of polyglutamine disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 1106-1113, 2011.

RÜEGG, J.C. Calcium in muscle activation, 2nd edn. **Springer**, Berlin Heidelberg New York, 1988.

SAKAI, S. T.; STEPNIEWSKA, I.; Q.I; H. X.; KAAS, J. H. Pallidal and cerebellar afferents to pre-supplementary motor area thalamocortical neurons in the owl monkey: a multiple labeling study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 417, n. 2, p. 164-180, 2000.

SAMORAJSKI, T.; ORDY, J.M.; KEEFE, J.R. The fine structure of lipofuscin age pigment in the nervous system of aged mice. **J Cell Biol.**, v. 26, p. 779-793, 1965.

SANCHEZ, I.; XU, C. J.; JUO, P.; KAKIZAKA, A.; BLENIS, J.; YUAN, J. Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. **Neuron**, 22(3), 623-633, 1999.

SANES, J. N.; SCHIEBER, M. H. Orderly somatotopy in primary motor cortex: does it exist?. **Neuroimage**, v. 13, n. 6, p. 968-974, 2001.

SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 11, p. 791-805, 2001.

SANGO, K.; MCDONALD, M.P.; CRAWLEY, J.N.; MACK, M.L.; TIFFT, C.J.; SKOP, E., PROIA, R.L. Mice lacking both subunits of lysosomal beta-hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. **Nature genetics**, v. 14, p. 348-52, 1996.

SARANTSEVA, S. V.; KISLIK, G. A.; TKACHENKO, N. A.; VASIL'EV, A. N.; SHVARTSMAN, A. L. [Morphological and functional abnormalities in neuromuscular

junctions of *Drosophila melanogaster* induced by the expression of human APP gene]. **Tsitologiia**, v. 54, n. 5, p. 421-429, 2011.

SATHASIVAM, K.; HOBBS, C.; MANGIARINI, L.; MAHAL, A.; TURMAINE, M.; DOHERTY, P.; ... & BATES, G. P. Transgenic models of Huntington's disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 354, n. 1386, p. 963-969, 1999.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiological reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447-1531, 2011.

SCHILLING G.; SHARP A. H.; LOEV S. J.; WAGSTER M. V.; LI S. H.; STINE O. C.; ROSS C. A. Expression of the Huntington's disease (IT15) protein product in HD patients. **Hum Mol Genet.**, v. 4, n. 8, p. 1365-71, 1995.

SCHULTE, J.; LITTLETON, J. T. The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. **Current trends in neurology**, v. p. 5, 65, 2011.

SHIRENDEB, U.; CALKINS, M.; MANCZAK, M.; DUFOUR, B.; MCBRIDE, J.; MAO, P.; REDDY, P. H. Mutant huntingtin's association with mitochondria protein Drp1, and impaired axonal transport of mitochondria in Huntington's disease neurons. **Hum. Mol. Genet.**, v. 21, p. 406-420, 2012.

SIPIONE, S.; CATTANEO, E. (). Modeling Huntington's disease in cells, flies, and mice. **Molecular neurobiology**, v. 23, n. 1, p. 21-51, 2001.

SKODDA, S.; SCHLEGEL, U.; HOFFMANN, R.; SAFT, C. Impaired motor speech performance in Huntington's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 4, p. 399-407, 2014.

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.

SOBUE, G.; MATSUOKA, Y.; MUKAI, E.; TAKAYANAGI, T.; SOBUE, I. Pathology of myelinated fibers in cervical and lumbar ventral spinal roots in amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of the neurological sciences**, v. 50, p. 413-421, 1981.

SONG, W.; CHEN, J.; PETRILLI, A.; LIOT, G.; KLINGLMAYR, E.; ZHOU, Y.;...& MASLIAH, E. Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. **Nature medicine**, v. 17, n. 3, p. 377-382, 2011.

STRAND, A.D.; ARAGAKI, A.K.; SHAW, D.; BIRD, T.; HOLTON, J.; TURNER, C.; OLSON, J.M. Gene expression in Huntington's disease skeletal muscle: a potential biomarker. **Human molecular genetics**, 2005.

SWERDLOW N. R.; BRAFF D. L.; TAAID N.; GEYER M. A. Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. **Arch Gen Psychiatry**, v. 51, n. 2, p. 139–541994.

TABRIZI, S. J.; CLEETER, M. W. J.; XUEREBA, J.; TAANMAN, J. W.; COOPER, J. M.; SCHAPIRA, A. H. V. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. **Annals of neurology**, v. 45, n. 1, p. 25-32, 1999.

TALLAKSEN-GREENE S. J.; CROUSE A. B.; HUNTER J. M.; DETLOFF P. J.; ALBIN R. L. Neuronal intranuclear inclusions and neuropil aggregates in HdhCAG(150) knockin mice. **Neuroscience**, v. 131, n. 4, p. 843–52, 2005.

TELLEZ-NAGEL, I.; JOHNSON, A.B.; TERRY, R.D. Studies on brain biopsies of patients with Huntington's chorea. *J Neuropathol Exp Neurol* 33: 308–332, 1974.

TOULMOND, S; TANG, K.; BUREAU, Y.; ASHDOWN, H.; DEGEN, S.; O'DONNELL, R.; TAM, J.; HAN, Y.; COLUCCI, J.; GIROUX, A.; ZHU, Y.; BOUCHER, M.; PIKOUNIS, B.; XANTHOUDAKIS, S.; ROY, S.; RIGBY, M.; ZAMBONI, R.; ROBERTSON, G.S.; GY, N.G.; NICHOLSON, D.W.; FLÜCKIGER, J.P. Neuroprotective effects of M826, a

reversible caspase-3 inhibitor, in the rat malonate model of Huntington's disease. **British journal of pharmacology**, v. 141, p. 689-697, 2004.

TREJO, A.; TARRATS, R.M.; ALONSO, M.E.; BOLL, M.C.; OCHOA, A.; VELÁSQUEZ, L. Assessment of the nutrition status of patients with Huntington's disease. **Nutrition**, v. 20, p. 192–6, 2004.

VALDEZ, G.; TAPIA, J.C.; KANG, H.; CLEMENSON, G.D.J.R.; GAGE, F.H.; LICHTMAN, J.W.; SANES, J.R. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, p. 14863-14868, 2010.

VALDEZ, G.; TAPIA, J.C.; LICHTMAN, J.W.; FOX, M.A.; SANES, J. (). Shared Resistance to Aging and ALS in Neuromuscular Junctions of Specific Muscles. **PLoS ONE**, v. 7, p. e34640, 2012.

VAN DER BURG, JORIEN, M.M.; BJÖRKQVIST, M.; BRUNDIN, P. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. **The Lancet Neurology**, v. 8, p. 765-774, 2009.

VAN DUIJN, E.; KINGMA, E. M.; VAN DER MAST, R. C. Psychopathology in verified Huntington's disease gene carriers. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 19, n. 4, p. 441-448, 2007.

VONSATTEL, J. P. G.; DIFIGLIA, M. Huntington disease. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 57, n. 5, p. 369-384, 1998.

XIA, R.; LIU, Y.; YANG, L.; GAL, J.; ZHU, H.; JIA, J. Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a Drosophila model of Fus-mediated ALS. **Mol Neurodegener.**, v. 7, p. 10, 2012.

XU, K. Y.; BECKER, L. C. Ultrastructural localization of glycolytic enzymes on sarcoplasmic reticulum vesicles. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 419-427, 1998.

WADE, A.; JACOBS, P.; MORTON, A.J. Atrophy and degeneration in sciatic nerve of presymptomatic mice carrying the Huntington's disease mutation. **Brain research**, v. p. 1188, 2008.

WALLING, H. W.; BALDASSARE, J. J.; WESTFALL, T. C. Molecular aspects of Huntington's disease. **Journal of neuroscience research**, v. 54, n. 3, p. 301-308, 1998.

WANSON, J. C., & DROCHMANS, P. (). Role of the sarcoplasmic reticulum in glycogen metabolism Binding of phosphorylase, phosphorylase kinase, and primer complexes to the sarcovesicles of rabbit skeletal muscle. **The Journal of cell biology**, v. 54, n. 2, p. 206-224, 1972.

WATASE, K.; ZOGHBI, H. Y. Modelling brain diseases in mice: the challenges of design and analysis. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 4, p. 296-307, 2003.

WELLINGTON, C.L.; ELLERBY, L.M.; GUTEKUNST, C.A.; ROGERS, D.; WARBY, S.; GRAHAM, R.K.; LOUBSER, O.; VAN RAAMSDONK, J.; SINGARAJA, R.; YANG, Y.Z.; GAFNI, J.; BREDESEN, D.; HERSCH, S.M.; LEAVITT, B.R.; ROY, S.; NICHOLSON, D.W.; HAYDEN, M.R. Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. **J Neurosci.**, v. 22, p. 7862-7872, 2002.

WHEELER V. C., AUERBACH W., WHITE J. K., SRINIDHI J., AUERBACH A., RYAN A., DUYAO M. P., VRBANAC V., WEAVER M., GUSELLA J. F., *et al.* Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. **Hum Mol Genet.**, v. 8 , n.1, p.115–22, 1999.

WILLMANN, R.; FUHRER, C. Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptors revisited. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 59, n. 8, p. 1296-1316, 2002.

WOLPERT, D. M.; GHAHRAMANI, Z.; FLANAGAN, J. R. (). Perspectives and problems in motor learning. **Trends in cognitive sciences**, v. 5, n. 11, p. 487-494, 2001.

WOODMAN, O. J. An introduction to inertial navigation. **University of Cambridge, Computer Laboratory, Tech. Rep. UCAMCL-TR-696**, v. 14, p. 15, 2007.

YAMAMOTO, A.; LUCAS, J. J.; HEN, R. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. **Cell**. v. 101, n. 1, p. 57–66, 2000.

YANG X. W., MODEL P., HEINTZ N. Homologous recombination based modification in Escherichia coli and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. **Nat Biotechnol.**, v. 15, n. 9, p. 859–65, 1997.

YANG, X.W.; GRAY, M. Mouse models for validating preclinical candidates for Huntington's disease. **In Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery**, v. 165-195. CRC Press, 2011.

ZIELONKA, D.; PIOTROWSKA, I.; MARCINKOWSKI, J.T.; MIELCAREK, M. Skeletal muscle pathology in Huntington's disease. **Front Physiol.**, v. 5, p. 1-5, 2014.

ZUCCATO, C.; VALENZA, M.; CATTANEO, E. (). Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in Huntington's disease. **Physiol Ver.**, v. 90, p. 905-81, 2010.

## **8. ANEXOS**

**8.1. ARTIGO 1:** Changes in structure and function of diaphragm neuromuscular junctions from BACHD mouse model for Huntington's disease.

**8.2. ARTIGO 2:** Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease.