### CAMILA MIRANDA LOPES

# DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO IN VITRO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DA ATAXINA-3 EXPANDIDA E AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA O CONTROLE DESSES EFEITOS

CAMPINAS UNICAMP 2010

### CAMILA MIRANDA LOPES

# DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO IN VITRO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DA ATAXINA-3 EXPANDIDA E AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA O CONTROLE DESSES EFEITOS

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Campos Pereira

Apoio FAPESP

CAMPINAS UNICAMP 2010

### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

#### BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

 Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

 Lopes, Camila Miranda

 Desenvolvimento de um modelo in vitro dos efeitos citotóxicos da

 ataxina-3 expandida e avaliação de diferentes estratégias terapêuticas

 para o controle desses efeitos / Camila Miranda Lopes. Campinas, SP

 : [s.n.], 2010.

 Orientador : Íscia Lopes-Cendes, Tiago Campos Pereira

 Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.

 Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Doença de Machado-Joseph. 2. Ubiquinona. 3. Lítio. 4.

 Ataxia. I. Lopes-Cendes, Íscia. II. Pereira, Tiago Campos. III.

 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

 IV. Título.

Título em inglês : Development of an in vitro model of expanded ataxin-3 cytotoxic effects and evaluation of different therapeutic strategies to control of these effects

Keywords: • Machado-Joseph disease

- Ubiquinone
- Lithium
- Ataxia

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica Área de concentração: Neurociências

Banca examinadora:

Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson Prof. Dr. Roger Frigerio Castilho

Data da defesa: 08-02-2010

## Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Camila Miranda Lopes

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Iscia Teresinha Lopes Cendes

Membros:	
Professor(a) Doutor(a) Iscia Teresinha Lopes Ce	endes 7766
Professor(a) Doutor(a) Roger Frigério Castilho	logs
Professor(a) Doutor(a) Maria Luisa Paço-Larson	USPE

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 08/02/2010

Aos meus pais pelo amor, carinho e dedicação. São meus maiores exemplos, sempre presentes e me incentivando.

Aos meus irmãos, Luana e Gabriel, pelas alegrias, companheirismo e carinho.

Ao meu amor, Filipe, pelos momentos maravilhosos, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, com muito amor e paciência.

À Dra. Iscia pela orientação e oportunidades que me ofereceu.

Ao meu co-orientador, Tiago, pelo apoio e por todas as explicações científicas.

Ao pessoal do laboratório e especialmente o Marcondes e todos do RNAi (Dany, Fábio, Henrique, Mari, Paty, Rafael, Thiago, Vinicius) pela convivência diária, pelo suporte técnico e emocional para a elaboração deste trabalho.

À Madá que me ajudou muito em vários experimentos e estava sempre super disposta.

Ao pessoal de outros laboratórios que me cederam o espaço e suporte para realização deste trabalho. Gostaria de agradecer especialmente o Prof. Rovilson do CEMIB, Marília do Laboratório de Oncologia Molecular, Társis do Laboratório de Citogenética Humana, Gleidson do Laboratório de Genômica e Expressão, Rodrigo e Renata do Laboratório de Regeneração Nervosa.

Aos amigos do 04 pela ótima convivência e amizade ao longo desses 6 anos e, principalmente, a Carol, Talita, Gabi e Camila pela amizade maravilhosa, e que contribuíram muito, pelo menos com palavras e carinho, para a realização desse mestrado.

À agência financiadora Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de mestrado.

v

## Página

RI	<b>ESUMO</b> xi
Ał	STRACTxiv
1.	INTRODUÇÃO17
2.	<b>OBJETIVO</b>
3.	MATERIAL E MÉTODOS
4.	RESULTADOS
5.	<b>DISCUSSÃO</b>
6.	CONCLUSÕES71
7.	REFERÊNCIAS

ATP	5'-trifosfato de adenosina
ATX-3	ataxina-3
BCIP	5-Bromo–4-Cloro-3-Indol-fosfatase
CDK	quinase dependente de ciclina
cDNA	DNA complementar
CMV	citomegalovírus
CoQ10	coenzima Q10
CRE	elemento de resposta ao AMP cíclico
Ct	ciclo de threshold
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium (meio de Eagle modificado por
kDa	kilodaltons
DMJ	doença de Machado-Joseph
DMSO	solvente orgânico dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
FITC	fluoresceína
GABA	ácido γ-aminobutírico
Gapdh	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GFP	proteína fluorescente verde
GSK-3	glicogênio sintase quinase-3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio

proteínas de choque térmico
proteíno-quinase ativada por mitógeno
brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NitroBlue Tetrazólico
superóxido
tampão fosfato salino
reação em cadeia da polimerase
iodeto de propídio
ácido ribonucléico
RNA mensageiro
quantificação relativa
quantificação relativa máxima
quantificação relativa mínima
atrofia muscular espino-bulbar
ataxia espinocerebelar
dodecil sulfato de sódio
gel de poliacrilamida para eletroforese com dodecil sulfato de sódio
tampão salino Tris-HCl
N-óxido de trimetilamina
ultravioleta

	Página
Figura 1. Mapa dos vetores utilizados no trabalho.	31
<b>Figura 2.</b> Imagens obtidas em microscópio de fluorescência para analisar a eficiência de transfecção.	40
Figura 3. Curva padrão obtida na validação dos ensaios utilizados no PCR em tempo real.	41
Figura 4. Linha de tendência obtida na validação dos ensaios utilizados no PCR em tempo real.	42
Figura 5. Imunodetecção da proteína ataxina-3 por western blot.	43
Figura 6. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência mostrando a formação de agregados	44
Figura 7. Imunodetecção de agregados por western blot.	45
Figura 8. Viabilidade celular relativa após transfecção com diferentes concentrações de plasmídeo.	46
Figura 9. Viabilidade de células transfectadas com pcDNA3-myc-ATX3 expandida em relação à normal.	47
Figura 10. Representação da análise em citômetro de fluxo de células transfectadas com pcDNA3-myc-ATX3 expandida.	48
<b>Figura 11.</b> Viabilidade celular relativa após o tratamento com glicerol, analisada com o reagente MTT.	49

<b>Figura 12.</b> Viabilidade celular analisada por citometria de fluxo após tratamento com glicerol.	50
Figura 13. Razão monômero/agregado de ataxina-3 expandida após tratamento com glicerol.	51
<b>Figura 14.</b> Viabilidade celular relativa após o tratamento com carbonato de lítio, analisada com o reagente MTT.	52
<b>Figura 15.</b> Viabilidade celular analisada por citometria de fluxo após tratamento com carbonato de lítio.	53
Figura 16. Razão monômero/agregado de ataxina-3 expandida após tratamento com carbonato de lítio.	54
<b>Figura 17.</b> Viabilidade celular relativa após o tratamento com coenzima Q10, analisada com o reagente MTT.	55
<b>Figura 18.</b> Viabilidade celular analisada por citometria de fluxo após tratamento com coenzima Q10.	56
<b>Figura 19.</b> Razão monômero/agregado de ataxina-3 expandida após tratamento com coenzima Q10.	57
<b>Figura 20.</b> Viabilidade de células transfectadas com pcDNA3-myc-ATX3 normal após o tratamento com as drogas.	58
<b>Figura 21.</b> Porcentagem de células em apoptose analisada por citometria de fluxo após os tratamentos.	59

# RESUMO

A ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3), também conhecida como doença de Machado-Joseph (DMJ), pertence ao grupo das doenças neurodegenerativas por expansão de poliglutamina e é o tipo de ataxia de herança autossômica dominante mais comum em muitos países. Os efeitos clínicos são variados, incluindo a coordenação motora anormal e morte precoce.

O gene *MJD1*, responsável pela doença, codifica a proteína ataxina-3, uma ubiquitina protease do sistema ubiquitina-proteossomo. Esta proteína quando mutada contém uma expansão consecutiva de 51-86 glutaminas, em contraste com a ataxina-3 normal que apresenta 14-44 glutaminas. Os mecanismos envolvidos na doença estão principalmente relacionados ao mal enovelamento e consequente agregação da proteína mutada, disfunção neuronal e morte celular por apoptose nos neurônios afetados.

A investigação de estratégias que interfiram diretamente nos efeitos citotóxicos da doença representa, portanto, um importante enfoque terapêutico. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo *in vitro* dos efeitos citotóxicos da ataxina-3 mutada a fim de avaliar diferentes estratégias terapêuticas para o controle desses efeitos.

O modelo *in vitro* para a DMJ foi estabelecido com sucesso utilizando a sequência completa do cDNA da ataxina-3 expandida codificando 84 glutaminas. A análise fenotípica das culturas celulares mostrou que nosso modelo apresenta os principais efeitos fenotípicos e citotóxicos da doença, como a formação de agregados protéicos e indução de morte celular. Nós investigamos três estratégias terapêuticas com a finalidade de diminuir a morte celular no modelo *in vitro*. A primeira, utilizando uma chaperona química (glicerol) teve o intuito de estabilizar a conformação nativa da proteína, auxiliando no enovelamento correto da mesma. Os sais de lítio provavelmente atuam modulando a expressão gênica e poderiam reverter os efeitos citotóxicos causados pela ataxina-3 expandida que levam à disfunção neuronal e à morte celular. A terceira estratégia focou na atenuação da disfunção mitocondrial através de um cofator mitocondrial e antioxidante poderoso, a coenzima Q10. O glicerol, lítio e coenzima Q10 aumentaram a viabilidade das células expressando a ataxina-3 expandida em 16%, 17% e 11%, respectivamente. O aumento de viabilidade resultou da diminuição da população celular em apoptose.

Atualmente não existem tratamentos eficazes contra a DMJ, daí a importância

de se estudar compostos capazes de reduzirem os efeitos citotóxicos da doença. Esse trabalho estabeleceu um modelo *in vitro* para a DMJ, bem caracterizado, fácil de ser manipulado no laboratório e de análise fenotípica direta que poderá ser mais explorado futuramente quanto à investigação de novos alvos terapêuticos e à compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patologia da doença. Nossos resultados indicam que o glicerol, o lítio e a coenzima Q10 são bons candidatos para prevenir a morte celular causada pela ataxina-3 expandida e, portanto, estudos adicionais utilizando esses 3 compostos devem ser considerados.

# ABSTRACT

Spinocerebellar ataxia-3 (SCA3), also known as Machado-Joseph disease (MJD), belongs to a group of neurodegenerative disorders caused by expansion of a polyglutamine stretch, called polyglutamine diseases. MJD is the most frequent inherited autosomal dominant ataxia in many countries. Clinical manifestations are varied, including abnormal motor coordination and early death.

The protein encoded by *MJD1*, ataxin-3, is an ubiquitin protease that belongs to the ubiquitin-proteasome system. The responsible for MJD is a trinucleotide repeat expansion (CAG), which leads to an elongated polyglutamine tract in the encoded ataxin-3 protein, varying from 51 to 86 glutamines. On the other hand, normal alleles range between 14 and 44. The mechanisms underlying the disease are mainly related to protein misfolding and aggregation, neuronal dysfunction followed by cell death within the affected neurons.

Investigation of strategies that interfere directly with disease cytotoxic effects represents an important therapeutic approach. The objective of this study was to develop an *in vitro* model that presented the main expanded ataxin-3 cytotoxic effects in order to evaluate different therapeutic strategies to control these effects.

The *in vitro* model for MJD was successfully established using the complete ataxin-3 cDNA coding 84 glutamines. We confirmed that the model presented the main phenotypic and cytotoxic effects of the disease, such as protein aggregates and induction of cell death. We investigated three therapeutic strategies aiming cell death reduction in our *in vitro* model. The first, using a chemical chaperone (glycerol), was designed to stabilize the native protein and help protein folding. Lithium probably acts by modulating gene expression, and it was used in order to reverse the cytotoxic effects resulted from the disease, such as neuronal dysfunction and cell death. The third strategy focused on attenuation of mitochondrial dysfunction via a mitochondrial cofactor and powerful antioxidant, coenzyme Q10. Glycerol, lithium and coenzyme Q10 increased the viability of cells expressing expanded ataxin-3 in 16%, 17% and 11%, respectively. This augmentation resulted from a decrease in cell population undergoing apoptosis.

Currently, there are no effective treatments against MJD, hence the importance of studying compounds capable of reducing disease cytotoxic effects. This work established an *in vitro* model for MJD, well characterized, and easy to be manipulated and analyzed. This model can be further explored for therapeutic investigations and for better understanding of molecular mechanisms involved in disease pathology. Our results indicate that glycerol, lithium and coenzyme Q10 are good candidates for preventing cell death caused by expanded ataxin-3 and, therefore, further studies with these 3 compounds should be considered.

# 1. INTRODUÇÃO

#### Doenças por poliglutamina

Expansões de tripletos de DNA têm sido identificadas como causas de inúmeras doenças genéticas neurológicas. Uma família importante são as doenças genéticas neurodegenerativas causadas pela expansão do trinucleotídeo CAG, a qual resulta em repetições expandidas do aminoácido glutamina nas proteínas afetadas e são denominadas, portanto, doenças por poliglutamina. São conhecidos nove genes distintos relacionados a essas doenças, são elas: doença de Huntington, atrofia muscular espino-bulbar (SBMA), atrofia dentatorubral palidoluisiana e as ataxias espinocerebelares (SCA) dos tipos 1, 2, 3, 6, 7 e 17. Características importantes dessas doenças são a ocorrência de agregados intracelulares e morte neuronal em áreas do sistema nervoso específicas para cada uma das doenças quando o número de repetições de glutamina ultrapassa certo limiar (1).

A ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3), também conhecida como doença de Machado Joseph (DMJ), é o tipo de ataxia de herança autossômica dominante mais comum no Brasil e em vários outros países. Apresenta prevalência em torno de 1:100.000 e corresponde a mais da metade das ataxias com herança autossômica dominante no Brasil (2;3). A DMJ foi primeiramente descrita em uma família de imigrantes portugueses em 1972 (4). Nos anos seguintes a doença foi relatada em outros países e populações diferentes daquelas de origem portuguesa (5).

#### Características clínicas da doença de Machado-Joseph

A DMJ é caracterizada por grande variabilidade fenotípica, com sinais e sintomas relacionados ao envolvimento de múltiplas populações neuronais (6). As principais manifestações clínicas são: perda de coordenação motora (ataxia), anormalidades da movimentação ocular, neuropatia periférica, disfunção piramidal e extra-piramidal (em geral espasticidade e distonia) (5;7). Classicamente considera-se que as funções cognitivas estejam preservadas, no entanto na literatura há casos descritos de demência, manifestações psiquiátricas, alterações das funções executivas e emocionais (8-10).

A doença tem um curso lento e progressivo. O início da sintomatologia ocorre na maioria dos casos na idade adulta, mas a doença pode se manifestar em crianças e idosos. A idade de início da doença correlaciona-se inversamente com o número de repetições CAG (11). O tamanho da expansão de CAG também influencia o fenótipo da doença, de maneira que repetições maiores estão associadas a piores manifestações piramidais e distonia (12).

#### Genética da doença de Machado-Joseph

O gene *MJD1*, responsável pela doença, está localizado no cromossomo 14q32.1 e codifica a proteína ataxina-3 (13). Até o momento, a mutação presente em todos os pacientes com DMJ é uma expansão de repetição do trinucleotídeo CAG localizado no  $10^{\circ}$  exon do *MJD1*, que leva ao alongamento do trato de poliglutamina na proteína ataxina-3. A doença se desenvolve quando um alelo possui mais de 51 repetições, podendo chegar até 86 (6). Os alelos normais apresentam um número variável de repetições de poliglutamina, estando geralmente entre 14 e 44 (14). Existem ainda os alelos intermediários (45 a 51 repetições) que apresentam penetrância reduzida (14;15).

A mutação responsável pela desordem é instável, assim o número de repetições no alelo expandido pode variar durante a transmissão parental. De modo geral, há uma tendência para o aumento desse número nas gerações sucessivas. Essa instabilidade é responsável pelo fenômeno de antecipação, assim gerações sucessivas iniciam a doença em idades mais jovens e com fenótipos mais graves (13).

Casos de homozigose para a expansão de poliglutamina são raros, no entanto os casos relatados apresentaram fenótipos mais graves do que aqueles que contêm apenas um alelo mutante (16). Este fato sugere que há um efeito de dose na DMJ.

#### Estrutura gênica e função da proteína

A ataxina-3 contém um domínio globular denominado *Josephin* na porção Nterminal, ao qual foi recentemente atribuído uma atividade de ubiquitina protease (17;18), dois ou três domínios de interação a ubiquitina (dependendo da variante de *splicing*), que são capazes de ligar a ubiquitina (19;20), seguido pela extensão de poliglutamina e domínio variável C-terminal. A proteína ataxina-3 possui 42 kDa e está presente tanto no núcleo quanto no citoplasma (21).

Foi demonstrado em *Drosophila* a capacidade da ataxina-3 normal em suprimir a neurodegeneração *in vivo* causada pelas doenças por poliglutamina, essa ação supressora depende de atividades da proteína associadas à ubiquitina e à função do proteossomo (22). Diversas evidências sugerem que a ataxina-3 seja capaz de se ligar e clivar cadeias específicas de ubiquitina (17;18;23-26). Sua atividade estaria aumentando a eficiência da degradação de proteínas ubiquitinadas pelo proteossomo, provavelmente a ataxina-3 facilita o transporte de proteínas anormais para serem degradadas pela maquinaria da célula (27). Quando sua atividade enzimática é inativada, a proteína deixa de suprimir a neurodegeneração e se torna tóxica (22).

Tem sido sugerido ainda um possível papel da ataxina-3 na regulação gênica, pois esta proteína contém um sinal de localização nuclear putativo (28), além da capacidade de interagir com histona, co-ativadores transcripcionais e apresentar atividade transcripcional repressora (29;30).

#### Neuropatologia da doença de Machado-Joseph

Embora a expressão da ataxina-3 expandida seja ubiqua, o aspecto degenerativo da doença foi descrito apenas em regiões específicas do sistema nervoso, as principais lesões estão localizadas no sistema espinocerebelar e núcleo denteado cerebelar (31;32). Observa-se perda neuronal nos gânglios da base, substância negra, núcleo rubro, núcleo denteado, núcleos pontinos, núcleos dos nervos cranianos e estruturas da medula espinhal (coluna de Clarke, colunas intermediolaterais e cornos anteriores, 5;6;33).

Inclusões intracelulares são marcadores fenotípicos importantes da doença, elas estão presentes tanto no núcleo quanto no citoplasma de neurônios (34;35). As inclusões encontram-se não apenas nas regiões afetadas pela doença, mas também naquelas não afetadas como: córtex cerebral, tálamo, estriato, corpo lateral geniculado, oliva inferior e gânglios da raiz dorsal e simpáticos (31;36).

#### Mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da DMJ

O mal enovelamento das proteínas ataxina-3 expandida e a formação de agregados foram inicialmente identificados como possíveis fatores chave na causa das doenças por poliglutamina a partir da observação de diferentes tipos de agregados intraneuronais em pacientes afetados pela doença (35;37;38). Um mecanismo possível no qual a proteína mutada forma agregados seria a perda da estabilidade natural por causa do trato de poliglutamina expandido, levando a formação e acúmulo de espécies parcialmente enoveladas e predispostas para agregação, o que resulta por fim em fibrilização (39). Diversos mecanismos celulares, como a atuação de chaperonas

moleculares, sistema ubiquitina-proteossomo e autofagossomo/lisossomo, agem na defesa celular contra a ataxina-3 mutada (40;41). No entanto, quando a concentração dessas proteínas excede a capacidade celular de auxiliar no enovelamento e degradação, as mesmas podem formar agregados insolúveis que são sequestrados em inclusões (42). Além da ataxina-3, essas inclusões são formadas pelo proteossomo, chaperonas moleculares e fatores de transcrição ou co-ativadores (40).

Embora a ocorrência dos agregados seja um componente morfológico bastante reconhecido na DMJ, sua associação com a neurodegeneração e seu papel preciso na patogênese da doença ainda não estão claros. Tem sido questionado se as inclusões estão diretamente relacionadas com a citotoxicidade. Evidências recentes relataram que as inclusões não são tóxicas, no entanto demonstraram que a proteína malenovelada é tóxica (43;44). A baixa correlação entre neurônios que apresentam inclusões e neurônios realmente degenerando indicam que as inclusões não são necessárias ou suficientes para provocar dano neuronal (6;32;45;46). Embora ainda não esteja certo o papel das inclusões na patogênese das doenças por poliglutamina, é indiscutível que as mesmas são marcadores fenotípicos importantes da doença.

A sequência precisa dos eventos envolvidos na patogênese da doença ainda não está estabelecida, provavelmente diversos mecanismos levam à disfunção neuronal e morte celular. A formação de oligômeros tóxicos a partir da proteína mutada possivelmente está relacionada à patogênese, além de interações anormais proteínaproteína que prejudicam várias funções celulares como a expressão gênica, localização subcelular, tráfico axonal, homeostase protéica e degradação protéica (42). O processo parece estar inicialmente relacionado a uma clivagem proteolítica que libera fragmentos tóxicos contendo a expansão de poliglutamina (47).

Chaperonas moleculares e o proteossomo são atraídos para os agregados de poliglutamina por reconhecerem o mal-enovelamento dessas proteínas (48;49). Enquanto as chaperonas se associam livremente e se movimentam para dentro e fora dos agregados (50), o proteossomo permanece no local na tentativa de degradar as proteínas agregadas (51). A redistribuição do proteossomo para os agregados pode limitar sua disponibilidade na célula levando à diminuição na atividade de degradação protéica e acúmulo de diversas proteínas danificadas ou mal-enoveladas (51;52), podendo, dessa maneira, ocorrer a ativação da resposta celular ao estresse e indução da apoptose.

O dano celular causado por um aumento do estresse oxidativo também parece ter um papel importante na progressão da DMJ. Ataxina-3 expandida influencia a atividade enzimática de componentes que reduzem  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  e promove danos ao DNA mitocondrial levando a disfunção mitocondrial (53). Agregados protéicos podem, ainda, bloquear fisicamente o transporte de proteínas influenciando a função das mesmas (42). Por exemplo, fragmentos da ataxina-3 mutada resultaram no bloqueio axonal em *Drosophila* (54).

Interações da ataxina-3 expandida com fatores de transcrição e co-ativadores específicos podem alterar a expressão gênica, tais interações podem envolver o sequestro de proteínas alvo pelos monômeros de ataxina-3 ou pelos agregados. Já foram relatadas interações anormais com a proteína de ligação a TATA e a proteína de ligação a CRE (42). A desregulação transcripcional foi verificada em animais transgênicos para DMJ, nestes houve uma redução da expressão de RNAm de proteínas envolvidas com neurotransmissão glutamatérgica, sinalização/mobilização de cálcio intracelular ou vias de MAP quinase, subunidades do receptor GABA<sub>A/B</sub>, proteínas de choque térmico (Hsp) e fatores de transcrição que regulam a sobrevivência e diferenciação neuronal. Também foram observados o aumento da expressão de Bax, ciclina D1 e CDK5-p39, que podem mediar a morte celular (55). Um estudo *in vitro* mostrou que a ataxina-3 expandida causa neurodegeneração em neurônios cultivados do cerebelo, corpo estriado e substância negra através do aumento da expressão do RNAm pro-apoptótico Bax e redução da expressão do RNAm anti-apoptótico Bcl-x<sub>L</sub> (56).

#### Estratégias terapêuticas

A investigação de alvos terapêuticos para a DMJ é de extrema importância, pois não existem tratamentos específicos contra a doença, estão disponíveis apenas medicamentos que amenizam alguns sintomas (57). As estratégias terapêuticas podem ser divididas em duas categorias principais: (i) a reversão dos defeitos celulares induzidos pela ataxina-3 expandida ou (ii) a atuação direta na proteína manipulando a expressão, processamento ou conformação da mesma (58). Neste trabalho nós realizamos três abordagens terapêuticas. A primeira, utilizando uma chaperona química (glicerol) teve o intuito de estabilizar a conformação nativa da proteína, auxiliando no enovelamento correto da mesma. A segunda foi direcionada à reversão

dos efeitos citotóxicos derivados da doença, como a disfunção neuronal e morte celular, utilizando o lítio. A terceira focou na atenuação da disfunção mitocondrial através de um cofator mitocondrial e antioxidante poderoso, a coenzima Q10.

#### **Chaperonas**

Organismos desde arqueobactérias até eucariotos desenvolveram uma classe de proteínas altamente conservadas, chamadas de chaperonas moleculares, que previnem interações inapropriadas dentro e entre polipeptídeos, aumentam a eficiência do enovelamento protéico e promovem o re-enovelamento de proteínas que tiveram sua conformação alterada por estresse celular (40). Em condições de estresse, por exemplo o aumento da temperatura, ocorre a ativação de um programa celular conhecido como resposta ao choque térmico, que aumenta a síntese de proteínas Hsp, importantes para o restabelecimento das proteínas danificadas pelo estresse (59). Quando as chaperonas moleculares não são capazes de reparar as proteínas mal-enoveladas, elas direcionam essas proteínas para serem degradadas pelo sistema ubiquitina-proteossomo ou pelos lisossomos.

A co-localização de componentes da maquinaria do controle de qualidade de proteínas com os agregados refletem o sequestro e perda de função desses componentes, bem como a falha no re-enovelamento ou degradação da ataxina-3 expandida (40).

Diversos trabalhos mostram que a super-expressão das chaperonas moleculares diminui a citotoxicidade causada pelas poliglutaminas expandidas. O aumento de expressão da Hsp70 suprimiu completamente os defeitos nos olhos de *Drosophila* causados pela ataxina-3 expandida (60) e atenuou a neurodegeneração em um camundongo modelo para SCA1 (48). A redução da citotoxicidade também foi vista em modelos celulares para DMJ e doença de Huntington (61;62)

Os efeitos positivos das chaperonas moleculares provavelmente estão envolvidos com o seu papel no enovelamento das proteínas com poliglutamina expandida e no direcionamento para o sistema ubiquitina-proteossomo. Um outro possível mecanismo de ação visto para Hsp27 seria através da redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio, já que as proteínas com poliglutamina expandida induzem a produção desses compostos (63).

Foi descrita uma classe de compostos de baixo peso molecular com

23

características químicas e funcionais próximas as chaperonas moleculares. Esses compostos, como o glicerol, solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO), N-óxido de trimetilamina (TMAO), trealose e *Congo Red*, aumentam a estabilidade de proteínas em sua conformação nativa e são chamados de chaperonas químicas devido à influência sobre o enovelamento protéico (64). Modelos celulares contendo o gene truncado para DMJ, doença de Huntington ou SBMA apresentaram redução da citotoxicidade após o tratamento com chaperonas químicas (65-69).

Alguns trabalhos mostraram o efeito positivo do *Congo Red* na redução dos efeitos citotóxicos causados pela doença de Huntington. Inicialmente, o estudo foi feito em modelos celulares e posteriormente expandido para modelos animais, com melhora na coordenação motora e aumento da sobrevida média (68;70). Esses trabalhos reforçam a importância dos modelos *in vitro* já que os resultados obtidos em modelos celulares puderam ser reproduzidos em modelos animais.

Os resultados dos modelos experimentais indicam o potencial das chaperonas químicas na prevenção dos efeitos citotóxicos induzidos pelas proteínas com trato de poliglutamina expandido. O aumento da expressão ou da atividade das chaperonas representam importantes estratégias terapêuticas para as doenças por poliglutamina.

#### Lítio

O lítio possui ação neuroprotetora documentada, no entanto seu mecanismo de ação ainda não está totalmente estabelecido. A ação do lítio parece estar relacionada com a modulação da expressão de diversos genes, como *p53*, *Bax*, *Bcl-2* e *GSK-3* (71;72). A super-expressão da glicogênio sintase quinase-3 (*GSK-3*) potencializa a apoptose em células de neuroblastoma, enquanto inibidores de *GSK-3*, como o lítio, protegem as células contra apoptose (73;74). O lítio também está envolvido em outros processos celulares, como a via de sinalização da proteína quinase C e a inibição da produção de inositol (75;76).

Foi relatada a diminuição na formação de agregados e morte celular em um modelo *in vitro* para a doença de Huntington após o tratamento com lítio (72). O efeito protetor do lítio foi mediado pela inibição de *GSK-3* e subsequentes alterações na transcrição gênica. *GSK-3* é uma proteína principalmente com atividade de sinalização pro-apoptótica, está envolvida em diversas funções celulares devido à sua habilidade

de fosforilar proteínas chave que modulam processos como ciclo celular, transcrição gênica, integridade do citoesqueleto e apoptose (73;77).

A proteção conferida pelo lítio contra a citotoxicidade induzida pela doença de Huntington apresentou-se efetiva em experimentos com camundongos transgênicos (78), *Drosophila* (79) e *Caenorhabditis elegans* (80). E ainda, uma dieta suplementada com lítio para modelos animais da SCA1 também apresentou efeitos positivos, resultando no melhoramento da coordenação motora, aprendizagem e memória dos animais (81). A análise neuropatológica desses animais mostrou que neurônios no hipocampo CA3 foram parcialmente resgatados de mudanças degenerativas e não houve variação significativa da magnitude e distribuição dos agregados intranucleares.

#### Coenzima Q10

Como descrito anteriormente, evidências apontam para o envolvimento da disfunção mitocondrial e estresse oxidativo na patogênese das doenças por poliglutamina. Estudos *post-mortem* em cérebros de pacientes com doença de Huntington, bem como estudos bioquímicos e de imagens, reforçam o papel da disfunção mitocondrial na patogênese da doença. Há uma diminuição da atividade dos complexos mitocondriais II, III e IV da cadeia respiratória no núcleo caudato e putamem desses pacientes (82-84). Tem sido demonstrado ainda um aumento nos níveis de compostos provenientes de danos oxidativos como: 8-hidroxideoxiguanosina malondialdeído, 3-nitrotirosina e hemoxigenase nas áreas em degeneração no cérebro dos pacientes e aumento da produção de radicais livres em alguns modelos animais (84-87). Além disso, mitocôndrias isoladas desses pacientes apresentam homeostase anormal de cálcio (88) e razão aumentada de lactato/piruvato, um indicador de metabolismo energético anormal (89).

Em um estudo com camundongos transgênicos para doença de Huntington foi verificado um aumento na sobrevivência dos animais e atraso no início dos sintomas de deficiência motora após o tratamento com coenzima Q10 (90). Coenzima Q10, também chamada de ubiquinona, é a forma predominante de coenzima Q em humanos, está presente em todos os órgãos e em concentrações maiores no cérebro, coração, rim e fígado (91-94). É sintetizada endogenamente e aproximadamente 3-5 mg é consumida na dieta por dia (95).

Coenzima Q10 participa na transferência de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria produzindo ATP (96-98). É aceptor de elétrons para os complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons e coenzima para o complexo III (99). Quando coenzima Q10 está reduzida, é um antioxidante poderoso que previne danos oxidativos por radicais livres, incluindo oxidação de lipídeos na membrana mitocondrial (96;100). Coenzima Q10 também age como antioxidante através da ativação e aumento de expressão de proteínas de desacoplamento mitocondrial, tal efeito é anti-apoptótico e reduz a geração de radicais livres (98;101). A análise do perfil de expressão gênica mostrou que a coenzima Q10 influencia a expressão de centenas de genes. Foi relatada a diminuição da atividade de marcadores inflamatórios em experimentos com culturas celulares sugerindo que a coenzima Q10 pode ter um efeito anti-inflamatório através da modificação da expressão gênica (102).

Foi demonstrada uma diminuição do nível de coenzima Q10 no soro de pacientes com doença de Huntington não tratados quando comparados com pacientes tratados e controles (103). Níveis da coenzima Q10 mitocondrial correlacionam-se com atividades dos complexos I e II/III (104). Visto o importante papel da coenzima Q10 na atenuação da disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, a sua utilização para o tratamento de doenças neurodegenerativas tem sido amplamente estudado, por exemplo nas doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica (revisão, 105). Especificamente para doença de Huntington, que mais se assemelha a DMJ, diversos estudos em animais modelos mostraram efeitos positivos da coenzima Q10 na progressão da doença (90;96;106-109).

#### Linhagem celular PC12

A linhagem celular de feocromocitoma adrenal (PC12) foi originalmente isolada de um tumor de medula adrenal de rato em 1976 por Greene e colaboradores (110). As células PC12 sintetizam e armazenam os neurotransmissores dopamina e norepinefrina, mas não epinefrina. Esses neurotransmissores são liberados através da despolarização em uma via dependente de cálcio (111). Assim, células PC12 apresentam características de células cromafinas noradrenérgicas da adrenal e de neurônios simpático, sendo bons modelos para estudos neurobiológicos e neuroquímicos (110). A popularidade das células de PC12 é decorrente, principalmente, de sua versatilidade para manipulação farmacológica, facilidade de cultivo e amplo conhecimento de proliferação e diferenciação (112). Neste estudo foi utilizada a linhagem PC12 pois, além das características mencionadas, outros autores já estabeleceram modelos da DMJ a partir dessa linhagem (113, 114, 115).

# 2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um modelo *in vitro* dos efeitos citotóxicos da ataxina-3 expandida a fim de avaliar diferentes estratégias terapêuticas para o controle desses efeitos.

### **Objetivos específicos**

- Construir e validar um modelo *in vitro* para a formação de agregados e morte celular após a transfecção com o vetor contendo a ataxina-3 expandida.
- Avaliar os efeitos citotóxicos do modelo após o tratamento com glicerol, carbonato de lítio e coenzima Q10.

# **3.** MATERIAL E MÉTODOS

#### Cultura celular

Os experimentos foram realizados em cultura de células originadas de feocromocitoma de rato (PC12). As células foram mantidas em ambiente umidificado controlado, com 5% de CO<sub>2</sub> e  $37^{\circ}$ C. Essas células são aderentes e foram cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM, Gibco, Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal equino, 5% de soro fetal bovino, 1,5g/L de glicose, 2mM de glutamina e 100µg/mL de penicilina-estreptomicina.

#### Vetor

Os vetores utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pelo Dr. Henry Paulson (Michigan University). As clonagens foram realizadas com uma versão normal da ataxina-3 humana contendo 28 glutaminas ou com uma versão expandida contendo 84 glutaminas. Os mapas dos plasmídeos estão representados na figura 1. Um dos plasmídeos utilizados, pEGFP-C1 (Clontech), possui a sequência codificante para a proteína GFP fusionada a extremidade N terminal da ataxina-3 (116). O outro, pcDNA3 (Invitrogen), possui parte do epítopo myc que foi introduzido à extremidade C terminal da ataxina-3 (35;117).



**Figura 1.** Mapa dos vetores utilizados nesse trabalho. a) pEGFP-C1 (Clontech); b) pcDNA3 (Invitrogen). Ambos foram clonados com a versão normal da ataxina-3 (28 glutaminas) ou com a versão expandida (84 glutaminas).

#### Transfecção das células

A transfecção transiente das células, com uma das versões de plasmídeos descritas, foi realizada com o reagente lipofectamine 2000 (Invitrogen). No dia anterior à transfecção, eram distribuídas 350000 células por poço em placas de 6 poços (cada um com 10cm<sup>2</sup> de diâmetro) em 2ml de meio de cultura completo. A transfecção foi feita seguindo as recomendações do fabricante. Para cada poço, foram misturados 10µl de lipofectamine 2000 (1mg/ml) e 490µl de OptiMEM (Invitrogen) e incubados por 5 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, foi acrescentada 500µl de uma solução contendo o plasmídeo na concentração desejada diluído em OptiMEM, seguindo uma incubação de 20 min. O meio de cultura das placas foi retirado e as células lavadas com tampão fosfato salino (PBS). A mistura completa de lipofectamine, plasmídeo e OptiMEM foi gotejada na placa e acrescentado 1ml de OptiMEM. As placas foram colocadas na estufa a 37°C e após 5h o meio de cultura foi trocado.

#### Tratamentos

Foram realizados três tratamentos das células transfectadas com os plasmídeos: glicerol, carbonato de lítio e coenzima Q10. Após 5h da transfecção, o meio de cultura foi substituído por 2ml de meio de cultura completo acrescido da droga na concentração determinada. Foram testadas três concentrações distintas para cada uma das drogas, com base na literatura. O glicerol (Sigma Aldrich) foi utilizado nas concentrações 0,5%; 1% e 2% (69); carbonato de lítio (Acros) a 2,5mM, 5mM e 7,5mM (72) e coenzima Q10 (Solgar) a  $10\mu M$ ,  $30\mu M$  e  $90\mu M$  (118;119).

Três tipos de análises foram realizadas 48h após a transfecção: expressão da ataxina-3, identificação de agregados protéicos e avaliação da taxa de citotoxicidade e viabilidade celular.

#### Análises moleculares e fenotípicas

#### PCR em tempo real

A expressão da ataxina-3 foi avaliada através de PCR em tempo real. Para tanto o RNA total das amostras foi extraído com o reagente TRIzol (Invitrogen). As células foram lavadas com PBS, raspadas do fundo da placa e ressuspendidas em 500µl de TRIzol, seguindo o protocolo do fabricante. A qualidade dos RNAs obtidos foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com SYBR Safe (Invitrogen). A determinação da concentração e pureza do material foi obtida através do aparelho Nanovue (GE Healthcare).

A síntese de cDNA necessária para os experimentos de PCR em tempo real foi realizada utilizando a enzima SuperScriptIII<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen). Dois microgramas de RNA total foram incubados com 250ng de óligos randômicos (Invitrogen), 1 $\mu$ L de dNTP mix (10mM) e água para um volume final de 14 $\mu$ L, a 65°C por 5 min., seguindo 2 min. de incubação em gelo. A seguir foram adicionadas à reação: 4 $\mu$ L de 5x First-Strand Buffer, 1 $\mu$ L de DTT (0,1M) e 200U da enzima Superscript III RT, sendo a amostra incubada a 25°C por 5 min., 50°C por 60 min. e 70°C por 15 min.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR system), utilizando o sistema TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystems) que é constituído por um par de iniciadores e uma sonda marcada com fluoróforo. Foi utilizado um ensaio já otimizado e validado (Assays-on-Demand<sup>SM</sup> - Applied Biosystems) para o gene da ataxina-3 humano (Hs01026447\_m1), com o fluoróforo FAM. O gene escolhido como controle endógeno das reações de PCR quantitativo foi o *Gapdh* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), sendo este ensaio marcado com VIC e também já otimizado (4352338E-0608007; Applied Biosystems).

Para a quantificação relativa do gene ataxina-3, as reações foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2X, 0,625µL da solução de iniciadores e sonda, 1,125µL de água e 4,0µL de cDNA (20ng). Para o controle negativo foi adicionado 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 min., 95°C por 10 min. e 40 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C por 1 min.

A quantificação relativa (RQ) da expressão foi calculada pelo método de Ct comparativo ( $\Delta\Delta$ Ct), o qual é determinado pela equação (120):

### $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

O clico de *threshold* (Ct), do inglês: *threshold cycle*, é o ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção – *threshold* - o qual é definido arbitrariamente. A média dos Cts de cada amostra é calculada, tanto para o gene alvo, como para o controle endógeno e, então, é determinado o valor de  $\Delta$ Ct (Ct alvo – Ct

endógeno). O  $\Delta\Delta$ Ct é calculado, subtraindo-se o  $\Delta$ Ct do calibrador pelo  $\Delta$ Ct da amostra. O calibrador é a amostra escolhida pelo usuário como referência, que terá o valor de RQ igual a 1, neste caso foi escolhida a amostra controle não transfectada com plasmídeo como calibrador. O valor de RQ expressa quantas vezes a amostra em questão está mais expressa em relação ao calibrador. Os cálculos de RQ, para a análise da expressão, são realizados pelo aplicativo 7500 System SDS Software (Applied Biosystems).

Anteriormente aos experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, é necessário fazer a validação do sistema gene de interesse/controle endógeno, a fim de verificar se as eficiências de amplificação de ambos os genes são semelhantes e próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse. A validação consiste na amplificação, em triplicata, de ambos os genes a partir de 7 concentrações diferentes de cDNA (diluições seriadas de 5 vezes) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, constrói-se uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct. Nessa curva, são obtidos os valores da inclinação da curva (*slope*) e da confiabilidade das réplicas (R2). A eficiência de um sistema é calculada através da fórmula:

$$E = 10^{(-1/slope)} - 1$$

O valor da eficiência deve ser  $1 \pm 0,1$ , ou seja, próximo a 100% e deve ser semelhante entre o controle endógeno e o gene alvo. O valor de R2 indica o quanto as réplicas estão parecidas, este valor deve ser maior que 0,95, o que indica maior de 95% de confiabilidade.

Após o cálculo das eficiências de amplificação de cada um dos genes, constróise um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a construção do gráfico, são utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obtém-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta e valor de inclinação. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiverem mais próximos à linha de tendência são considerados validados.

#### Western blot

A extração de proteínas também foi feita utilizando o reagente TRYzol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (121) a 120V por 1h e 30 min. e transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond C (GE Healthcares), previamente umedecida em tampão de transferência (39mM glicina, 48mM Tris base, 0,037% SDS e 20% de etanol), usando o aparelho de eletroblot Multiphor II (GE Healthcares) a 3500V por 2h. Em seguida, a membrana foi incubada, sob agitação, em solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó magro por 2h a temperatura ambiente e lavada três vezes com TBS 1X. Seguiu-se a incubação com o anticorpo primário contra a proteína ataxina-3 (diluído 1:1000) por 16h sob agitação a 4ºC. O anticorpo primário utilizado foi gentilmente cedido pelo Dr. Henry Paulson (Michigan University) (35). Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com TBS 1X e incubada por 1h com o anticorpo secundário (diluído 1:20000) anti-IgG de coelho produzido em cabra e conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Aldrich). As bandas foram detectadas pela incubação da membrana com tampão de revelação acrescido de BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-fosfatase) e NBT (NitroBlue Tetrazólico, Sigma Aldrich).

Western blot foi realizado em cultura de células transfectadas com pcDNAmyc-ATX3 normal ou expandida a fim de detectar as bandas referentes aos monômeros de proteína ataxina-3 e aos agregados. Os agregados são insolúveis em gel SDS-PAGE e por isso permanecem na porção superior do *stacking gel*.

Western blot também foi realizado em cultura de células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 expandida tratadas ou não com glicerol (1%), carbonato de lítio (5mM) e coenzima Q10 (30µM). Para a densitometria das bandas obtidas foi utilizado o programa ImageJ (122), com o objetivo de estabelecer a razão entre monômeros e agregados de ataxina-3 após os diferentes tratamentos. Foram feitos dois experimentos independentes, cada um em triplicata.

#### Microscopia de fluorescência

O plasmídeo pEGFP-ATX3 permite a análise da proteína ataxina-3 em microscopia de fluorescência já que a proteína está fundida a GFP, que fluoresce em verde utilizando-se os filtros para fluoresceína (FITC, 488nm). Para as análises em microscopia de fluorescência as células foram plaqueadas sobre lamínulas estéreis colocadas no fundo do poço das placas. Após 48h da transfecção, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com PBS. As células então foram fixadas, durante 10 min. a temperatura ambiente, com uma solução de paraformoldeído 4% em PBS, seguindo 3 lavagens de 5 min. com PBS. Foi adicionada 1ml da solução de Hoechst 33258 a 0,8µg/ml (Sigma Aldrich), seguindo uma incubação de 20 min e 3 lavagens de 5 min. com PBS. Por fim, as lamínulas foram viradas sob lâminas contendo uma gota de Vectashield (Vector Laboratories) e analisadas no microscópio de fluorescência (Olympus BX51). Hoechst 33258 identifica o núcleo celular ligando-se às moléculas de DNA, sendo visualizado sob luz UV.

Como as células que receberam o plasmídeo pEGFP-ATX3 e expressam a ataxina-3 fluorescem em verde e o núcleo de todas as células fica marcado em azul, foi possível calcular a eficiência de transfecção utilizando esse sistema. Para um mesmo campo do microscópio foi tirado uma foto utilizando o filtro para FITC e outra com luz UV. Posteriormente, essas imagens foram sobrepostas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS4, sendo possível contar o número total de células (em azul) e o número de células que receberam o plasmídeo e expressam a proteína ataxina3-GFP (dupla marcação verde e azul). Assim, foi possível estimar a eficiência da transfecção.

A partir de análises em microscopia de fluorescência também foram identificados os agregados protéicos de ataxina-3 expandida, que aparecem com coloração mais intensa. Utilizando o mesmo procedimento de marcação do núcleo das células com Hoechst 33258 foi possível calcular o número de células que apresentavam agregados e a localização dos mesmos, podendo estar no núcleo, citoplasma ou ambos.

#### Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através de testes com o reagente MTT, brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (Sigma Aldrich). Para cada poço, 48h após a transfecção o meio de cultura foi retirado e adicionado 1 ml de
solução de MTT diluído em DMEM (0,3mg/ml). A cultura permaneceu na estufa a 37°C por 4h. Após essa incubação é formado um produto roxo insolúvel em água, formazam, que é solubilizado em álcool e a absorbância lida a 570nm (Hitachi U-2001 Sepctrophotometer). A redução do MTT para formazam ocorre através da ação de enzimas redutases das mitocôndrias. Sendo assim, apenas células viáveis são capazes de produzir formazam e a quantidade produzida pode ser correlacionada ao número de células viáveis na cultura. Os resultados foram plotados em gráficos de barra normalizando as absorbâncias obtidas com a do controle, sendo obtida a viabilidade celular relativa. Pelo menos três réplicas para cada uma das condições foram realizadas.

Inicialmente foi analisado se o método de transfecção, o reagente lipofectamine, alterava a viabilidade celular quando comparado às células controles não tratadas. Neste mesmo experimento foram avaliados os efeitos citotóxicos da transfecção de diferentes concentrações do plasmídeo pcDNA3-myc-ATX3 normal ou expandida. As células foram transfectadas com quatro concentrações distintas do plasmídeo (0,5; 1; 2 e 4µg) e os dados obtidos plotados em relação às células não transfectadas. Após a determinação de uma concentração ideal de plasmídeo que diminuísse a viabilidade celular, foram realizados mais três experimentos, cada um em triplicata, transfectando as células com pcDNA3-myc-ATX3 normal ou expandido. Este maior número de experimentos foi importante para confirmar o efeito da ataxina-3 expandida comparado apenas ao efeito da ataxina-3 normal.

O mesmo procedimento foi aplicado para a análise da viabilidade celular relativa após os diferentes tratamentos propostos com as drogas. Esses experimentos foram realizados em triplicatas.

As taxas de viabilidade celular obtidas nos testes com o reagente MTT foram confirmadas por outra técnica, utilizando o kit ApoTarget (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Nesta metodologia as células são incubadas com anexina V conjugada à fluoresceína (FITC) e iodeto de propídio (PI) vermelho fluorescente, em seguida a fluorescência é medida em citômetro de fluxo. A metodologia permite identificar a porcentagem de três populações distintas de células: (1) células viáveis (não marcadas), (2) células em apoptose (marcadas com anexina V), (3) células em necrose ou apoptose tardia (marcadas com anexina V e PI).

Neste experimento foram avaliadas as células transfectadas com pcDNA3-myc-

ATX3 expandida tratadas ou não com uma única concentração de cada droga: glicerol (1%), carbonato de lítio (5mM) e coenzima Q10 (30µM). Quatro réplicas foram realizadas para cada condição. O citômetro de fluxo utilizado foi o FACSCalibur (BD Biosciences) e foram coletados 10000 eventos para análise. Os resultados foram plotados em gráficos mostrando a porcentagem de células viáveis (não marcadas) permitindo a comparação com os resultados obtidos com o reagente MTT. Visto que a ataxina-3 expandida induz a apoptose, a porcentagem de células em apoptose antes e após os tratamentos também foi avaliada.

Para averiguar se as drogas não estimulavam a proliferação celular, foi avaliada ainda a taxa de viabilidade relativa de células transfectadas com pcDNA3-myc-ATX3 normal tratadas com cada uma das drogas: glicerol (1%), carbonato de lítio (5 mM) e coenzima Q10 ( $30\mu$ M). Da maneira já descrita, essa análise foi feita utilizando testes com o reagente MTT, em triplicata.

## Análises estatísticas

Para verificar a existência de diferenças entre os tratamentos realizados, foi empregado o teste estatístico Kruskal-Wallis. Quando valores variavam significativamente, era aplicado o teste de Student-Newman-Keuls a fim de que fossem ajustados os valores de p para os grupos específicos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para p maior do que 0,05. Os testes estatísticos foram realizados no programa BioEstat 5.0 (123).

# 4. RESULTADOS

#### Estabelecimento do modelo in vitro para DMJ

A primeira etapa deste trabalho foi desenvolver um modelo *in vitro*, que além de expressar a ataxina-3 expandida, apresentasse as principais características fenotípicas e citotóxicas da DMJ, como a formação de agregados protéicos e indução de morte celular. Para confirmar a viabilidade e eficiência do modelo diversos parâmetros foram avaliados, tais como a taxa de transfecção das células, a expressão da ataxina-3, a identificação de agregados e a taxa de viabilidade celular.

A padronização da metodologia de transfecção das células foi feita através da análise em microscopia de fluorescência. Como um dos vetores utilizados, pEGFP-C1, continha a proteína GFP fundida a ataxina-3, as células que receberam o plasmídeo e expressavam a proteína tinham coloração verde sob incidência de luz fluorescente. A fim de avaliar a taxa de eficiência da transfecção, o núcleo das células foram marcados com Hoechst 33258, dessa forma foi possível obter o número total de células e o número de células contendo o plasmídeo. A figura 2 ilustra como essa análise foi realizada. Obteve-se, em média, 60% de células transfecção.



**Figura 2.** Imagens obtidas em microscópio de fluorescência para analisar a eficiência de transfecção. a) Núcleos marcados com Hoechst 33258, em azul; b) Proteína ataxina-3 fusionada a GFP, em verde; c) Sobreposição das imagens a e b, tiradas no mesmo campo do microscópio, com auxílio do programa Adobe Photoshop CS4, o que permite a contagem do número de células que receberam o plasmídeo e expressam a proteína (dupla marcação verde e azul) em relação às que não receberam (azul). Aumento 100x.

Além da análise por microscopia de fluorescência, a confirmação da expressão da ataxina-3 foi realizada por PCR em tempo real e a imunodetecção da proteína por western blot.

Como mencionado anteriormente, antes de realizar um experimento de expressão gênica utilizando PCR em tempo real, a validação do sistema gene de interesse/controle endógeno deve ser feita. Com os dados da cinética de amplificação das amostras e utilizando o programa 7500 System SDS Software, construiu-se uma curva padrão para cada gene. Os valores das inclinações (*slope*) das curvas e as eficiências foram -3,384 e 97,5% para ataxina-3 e -3,324 e 99,9% para *Gapdh*. A confiabilidade desses resultados medida pelo parâmetro R2 foi de 99,3% para ataxina-3 e de 99,8% para *Gapdh*. A figura 3 mostra as curvas obtidas para os dois genes.



**Figura 3.** Gráfico gerado pelo programa 7500 System SDS Software mostrando a curva padrão obtida para o gene ataxina-3 (em roxo) e a curva obtida para o controle endógeno *Gapdh* (em verde). Os pontos sobre as curvas representam as réplicas.

Para determinar a amplitude de concentrações para as quais o sistema está validado, construiu-se um gráfico do logaritmo das concentrações de cDNA utilizadas (eixo X) pela diferença das médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno obtidas para cada concentração (eixo Y). Com isso, obteve-se uma reta com

inclinação igual a 0,0237, mostrando que os  $\Delta$ Cts das amostras não estão variando entre as diferentes concentrações testadas. A inclinação menor do que 0,1 indica que o sistema está validado. Na figura 4 estão mostradas a curva de eficiência para o sistema *ataxina-3/Gapdh* e a equação da reta correspondente à linha de tendência.



**Figura 4**. Linha de tendência obtida após a construção do gráfico do logaritmo das concentrações (eixo x) pela diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse (eixo y). Notar ao lado a equação de reta da linha de tendência, a qual possui inclinação menor do que 0,1, indicando que o sistema está validado.

Após a validação do sistema, o PCR em tempo real foi realizado para confirmar o aumento de expressão da ataxina-3 no modelo *in vitro*. Os ensaios de PCR em tempo real mostraram que 48h após a transfecção a expressão da ataxina-3 aumentou 15000 vezes em relação ao controle não transfectado. Não houve diferença significativa da expressão entre a ataxina-3 normal e expandida.

A proteína ataxina-3 normal foi detectada por western blot com 49kDa e a expandida com 56kDa, sendo essa diferença de tamanho esperada devido à variação no número de glutaminas (figura 5). O tamanho observado refere-se não apenas a ataxina-3, propriamente dita, mas também a uma pequena porção do plasmídeo e epítopo myc que são juntamente traduzidos.



ATX-3 normal ATX-3 expandida

**Figura 5.** Imunodetecção da proteína ataxina-3 por western blot após transfecção com pcDNA-myc-ATX3 normal ou expandida. Ataxina-3 normal apresenta 49kDa, enquanto a expandida apresenta 56kDa.

Embora não esteja estabelecido o papel dos agregados protéicos na patologia da DMJ, esses foram analisados devido à sua importância fenotípica. Os agregados foram identificados através de microscopia de fluorescência como mostra a figura 6. Novamente, o núcleo das células foi marcado com Hoechst 33258, o que permitiu avaliar o número de células com agregados bem como a localização celular dos mesmos. Haviam células com agregados apenas no núcleo, apenas no citoplasma ou ambos, e normalmente mais de um por célula. Em média, 20% das células apresentaram pelo menos um agregado após a transfecção com pEGFP-ATX3 expandida. Como esperado, as células transfectadas com pEGFP-ATX3 normal não apresentaram agregados.



**Figura 6.** Imagens obtidas em microscópio de fluorescência mostrando a formação de agregados (seta) após a transfecção com pEGFP-ATX3 expandida. a) Núcleo marcado com Hoechst 33258, em azul; b) Proteína ataxina-3 expandida fusionada a GFP, em verde. Um exemplo de agregado está apontado pela seta; c) Sobreposição das imagens utilizando o programa Adobe Photoshop CS4 que permite localizar os agregados, estão mostrados exemplos de células com agregados presentes no núcleo e citoplasma ou restritos ao citoplasma. Aumento 400x.

Os agregados protéicos também foram confirmados por western blot. O extrato protéico de células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 expandida apresenta no *stacking gel* uma banda referente aos agregados. Os agregados protéicos formam fibrilas amilóides que são resistentes à solubilização em detergente após fervura (40). Dessa forma, os agregados são insolúveis em gel SDS-PAGE e ficam retidos na parte superior do *stacking gel*, o que não acontece para a ataxina-3 normal (figura 7). No caso da ataxina-3 expandida, além das bandas referentes ao agregado e ao monômero (56kDa), também ocorre uma banda referente à formação de oligômeros (200kDa).



ATX-3 normal ATX-3 expandida

**Figura 7.** Imunodetecção de agregados através de western blot. a) Extrato protéico de células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 normal e imunodetecção do monômero de ataxina-3 com 49kDa; b) Transfecção com pcDNA-myc-ATX3 expandida e imunodetecção do monômero com 56kDa, de oligômeros com 200kDa e de agregados no *stacking gel*, insolúvel em gel SDS-PAGE.

O modelo só estaria completo se a ataxina-3 expandida introduzida nas células tivesse um efeito citotóxico, para tanto foi realizada uma curva de concentrações do plasmídeo com o intuito de estabelecer concentrações que diminuíssem a viabilidade celular. Foram analisadas quatro concentrações do plasmídeo, variando de 0,5 a 4µg, tanto para ataxina-3 normal quanto para a expandida. A viabilidade celular foi avaliada através de testes com o reagente MTT, em triplicata, comparando com o controle não transfectado. As quatro concentrações avaliadas para pcDNA-myc-ATX3 normal não alteraram de forma significativa a viabilidade celular (Figura 8). Da mesma forma, as duas concentrações mais baixas de pcDNA-myc-ATX3 expandida não alteraram esse parâmetro de forma significativa, entretanto as concentrações mais altas testadas (2 e 4µg) reduziram a viabilidade celular, estatisticamente significativo.

A taxa de viabilidade celular relativa após a transfecção de 2µg de pcDNA-

myc-ATX3 expandida foi 0,79, enquanto a concentração maior, 4µg, reduziu ainda mais a viabilidade e atingiu 0,6. Assim, ficou confirmada a redução da viabilidade celular relativa em torno de 21% e 40% para transfecções com 2 e 4µg de plasmídeos, respectivamente. Os experimentos seguintes foram realizados com 2µg de plasmídeo pois essa concentração já foi suficiente para reduzir a viabilidade celular, a níveis significativos estatisticamente. Embora a introdução de 4µg de plasmídeo também tenha resultado na redução da viabilidade celular estatisticamente significativa, essa redução é bem mais drástica, o que poderia estar distanciando da patologia da doença que reduz de forma lenta o número de neurônios. A concentração utilizada na literatura é bem variada, desde 1 a 4µg de plasmídeo (124-128).

O efeito do agente de transfecção utilizado, lipofectamine, também foi avaliado. A viabilidade de células tratadas com lipofectamine foi comparada com o controle não tratado e não houve alteração significativa desse parâmetro (figura 6).



**Figura 8.** Gráfico mostrando a viabilidade de células tratadas apenas com o reagente de transfecção (lipofectamine) e de células transfectadas com diferentes concentrações de pcDNA3-myc-ATX3 normal ou expandida em relação ao controle não transfectado. Avaliação feita através de testes com o reagente MTT. O experimento foi realizado em triplicata e aplicado o teste estatístico Kruskal-Wallis, \* p < 0,05.

Após o estabelecimento de um protocolo eficiente de transfecção e determinação da concentração de plasmídeo suficiente para reduzir a viabilidade celular, foi realizado um maior número de experimentos comparando apenas o efeito da ataxina-3 expandida em relação à ataxina-3 normal. Esses experimentos foram importantes para estabelecer de forma mais precisa o quanto a ataxina-3 expandida é citotóxica nesse modelo, eliminando o efeito de outras variáveis presentes na manipulação das células e transfecção que também podem ser citotóxicas. Observou-se que, em média, a ataxina-3 expandida é responsável por reduzir em 15% a viabilidade celular, sendo este resultado estatisticamente significativo e referente a três experimentos independentes, cada um em triplicata (figura 9).



**Figura 9.** Gráfico mostrando a viabilidade de células transfectadas com  $2\mu g$  de pcDNA3-myc-ATX3 expandida em relação à normal. Através de testes com o reagente MTT verificou-se que a ataxina-3 expandida reduziu a viabilidade celular relativa para 0,85. Dados de 3 experimentos independentes, cada um em triplicata, foi aplicado o teste estatístico Kruskal-Wallis, \* P < 0,01.

Como a ataxina-3 expandida induz apoptose, foi avaliada a porcentagem de células em apoptose após a transfecção com pcDNA3-myc-ATX3 expandida. Esse parâmetro foi obtido através da marcação das células com anexina V e PI e posterior quantificação do número de células por citômetro de fluxo. Obtendo a média de quatro experimentos, 24% das células estavam marcadas com anexina V, ou seja, estavam em apoptose e 5,1% estavam marcadas com anexina V e PI, ou seja, estavam em necrose

ou apoptose tardia (Figura 10). Por fim, 70,4% das células não estavam marcadas, porcentagem representando as células viáveis.



**Figura 10**. Representação gráfica da análise em citômetro de fluxo de células marcadas com anexina V e PI 48h após a transfecção com pcDNA3-myc-ATX3 expandida. A tabela indica a porcentagem média de células referente a 4 experimentos. Quadrante inferior esquerdo: células não marcadas (viáveis); quadrante inferior direito: células marcadas com anexina V (apoptose); quadrante superior esquerdo: células marcadas com PI (necrose); quadrante superior direito: células marcadas com anexina V e PI (apoptose tardia ou necrose).

### Tratamento com as drogas

Após o estabelecimento do modelo *in vitro* para DMJ foram iniciados os tratamentos com as três drogas tendo por finalidade o aumento da viabilidade celular. Verificou-se, ainda, a razão entre monômero e agregado da ataxina-3 expandida após os tratamentos.

### Glicerol

A primeira abordagem terapêutica foi a utilização de uma chaperona química, o glicerol. O tratamento com três concentrações de glicerol foi primeiramente analisado através de testes com o reagente MTT, nestes a viabilidade celular das amostras tratadas eram comparadas com a do controle não tratado e sendo ambos transfectados com pcDNA-myc-ATX3 expandida. A figura 11 mostra o resultado desse

experimento, realizado em triplicata. O tratamento com a concentração mais baixa de glicerol, 0,5%, aumentou a viabilidade celular em 12%, no entanto este resultado não foi estatisticamente significativo através do teste Kruskal-Wallis. Já o tratamento com 1% de glicerol, aumentou 16% a viabilidade em relação ao controle não tratado, estatisticamente significativo. A concentração mais alta, 2%, não alterou significativamente a viabilidade celular, inclusive houve uma redução de 6% o que pode ter ocorrido devido a uma concentração muito alta e tóxica do glicerol.



**Figura 11.** Viabilidade celular relativa após o tratamento com glicerol (0,5; 1 ou 2%) de células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 expandida. Resultados obtidos através de testes com o reagente MTT. O experimento foi realizado em triplicata e aplicado o teste estatístico Kruskal-Wallis, \* p < 0,05.

Para confirmar o resultado de aumento de viabilidade celular, as células foram marcadas com anexina V e PI e a fluorescência medida em citômetro de fluxo. Como descrito anteriormente, 70,4% dessas células eram viáveis após a transfecção com pcDNA-myc-ATX3 expandida. O tratamento com 1% de glicerol aumentou a viabilidade celular para 77%, no entanto este resultado não foi estatisticamente significativo (figura 12).



b)



**Figura 12.** Viabilidade celular analisada por citometria de fluxo após marcação com anexina V e PI de células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 expandida tratadas ou não com glicerol 1%. a) Gráfico mostrando a porcentagem média de células viáveis após o tratamento com glicerol 1%, experimento em quadruplicata; b) Representação gráfica obtida por citometria de fluxo e tabela indicando a porcentagem média de células em cada quadrante.

Em seguida, foi avaliada a razão entre monômero e agregado de ataxina-3 expandida após o tratamento por western blot. A densitometria das bandas foi feita utilizando o programa ImageJ. Não houve alteração estatisticamente significativa dessa razão após o tratamento com 1% de glicerol (Figura 13).



**Figura 13.** Análise da razão entre monômero e agregado de ataxina-3 expandida por western blot após o tratamento com 1% de glicerol. a) Western blot representativo mostrando as bandas referentes aos monômeros e agregados, 1- ataxina-3 expandida; 2- ataxina-3 expandida + glicerol 1%; b) Resultado da razão entre monômeros e agregados de dois experimentos independentes, cada um em triplicata, a densitometria das bandas foi obtida através do programa ImageJ. Não houve alteração significativa da razão após o tratamento.

51

# Lítio

As mesmas análises foram feitas utilizando o carbonato de lítio como tratamento. Os ensaios com o reagente MTT mostraram que a concentração mais baixa de lítio, 2,5mM, não alterou a viabilidade celular relativa (figura 14). Já as concentrações mais altas, 5mM e 7,5mM, aumentaram significativamente em 17% e 21%, respectivamente.



**Figura 14.** Viabilidade celular relativa após o tratamento com carbonato de lítio (2,5; 5 e 7,5mM) de células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 expandida. Resultados obtidos através de testes com o reagente MTT. O experimento foi realizado em triplicata e aplicado o teste estatístico Kruskal-Wallis, \* p < 0,05.

O aumento da viabilidade celular também foi confirmado por citometria de fluxo após o tratamento com 5mM de carbonato de lítio. Os resultados mostraram um aumento de 12% da viabilidade celular, estatisticamente significativo, sendo este resultado próximo ao obtido nos experimentos utilizando o reagente MTT (figura 15).



**Figura 15.** Viabilidade celular analisada por citometria de fluxo após marcação com anexina V e PI de células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 expandida tratadas ou não com 5mM de carbonato de lítio. a) Gráfico mostrando a porcentagem média de células viáveis após o tratamento com 5mM de carbonato de lítio. Experimento em quadruplicata e aplicado o teste estatístico Kruskal-Wallis, \*p < 0,05; b) Representação gráfica obtida por citometria de fluxo e tabela indicando a porcentagem média de células em cada quadrante.

10<sup>13</sup>

102

Anexina Y FITC

10

10

10<sup>4</sup>

A razão entre monômero e agregado de ataxina-3 expandida foi analisada após o tratamento com 5mM de lítio e também não houve alteração estatisticamente significativa dessa razão (Figura 16).



a)

**Figura 16.** Análise da razão entre monômero e agregado de ataxina-3 expandida por western blot após o tratamento com 5mM de carbonato de lítio. a) Western blot representativo mostrando as bandas referentes aos monômeros e agregados, 1- ataxina-3 expandida; 2- ataxina-3 expandida + carbonato de lítio 5mM; b) Resultado da razão entre monômeros e agregados de dois experimentos independentes, cada um em triplicata, a densitometria das bandas foi obtida através do programa ImageJ. Não houve alteração significativa da razão após o tratamento.

# Coenzima Q10

Por último, os mesmos parâmetros foram avaliados para a coenzima Q10. Os testes com o reagente MTT demonstraram um aumento de 14% da viabilidade celular relativa com a concentração mais baixa de coenzima Q10, 10µM, estatisticamente significativo (figura 17). A concentração de 30µM aumentou em 11% a viabilidade, entretanto esse aumento não se mostrou estatisticamente significativo através do teste Kruskal-Wallis. Por fim, para a concentração mais alta testada, 90µM, não houve alteração significativa.



**Figura 17.** Viabilidade celular relativa após o tratamento com coenzima Q10 (10, 30 e 90 $\mu$ M) de células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 expandida. Resultados obtidos através de testes com o reagente MTT. O experimento foi realizado em triplicata e aplicado o teste estatístico Kruskal-Wallis, \* p < 0,05.

Os experimentos de viabilidade celular através da análise por citometria de fluxo mostraram um aumento de 14% na viabilidade, estatisticamente significativo, após o tratamento com  $30\mu$ M de coenzima Q10 (figura 18). Embora este resultado tenha sido próximo ao da análise com MTT, neste caso foi estatisticamente significativo.







**Figura 18.** Viabilidade celular analisada por citometria de fluxo após marcação com anexina V e PI de células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 expandida tratadas ou não com 30 $\mu$ M de coenzima Q10. a) Gráfico mostrando a porcentagem média de células viáveis após o tratamento com 30 $\mu$ M de coenzima Q10. Experimento em quadruplicata e aplicado o teste estatístico Kruskal-Wallis, \*p < 0,05; b) Representação gráfica obtida por citometria de fluxo e tabela indicando a porcentagem média de células em cada quadrante.

Para o tratamento com 30µM de coenzima Q10 também não houve alteração significativa da razão entre monômero e agregado de ataxina-3 expandida (figura 19).



**Figura 19.** Análise da razão entre monômero e agregado de ataxina-3 expandida por western blot após o tratamento com  $30\mu$ M de coenzima Q10. a) Western blot representativo mostrando as bandas referentes aos monômeros e agregados, 1- ataxina-3 expandida; 2- ataxina-3 expandida + coenzima Q10  $30\mu$ M; b) Resultado da razão entre monômeros e agregados de dois experimentos independentes, cada um em triplicata, a densitometria das bandas foi obtida através do programa ImageJ. Não houve alteração significativa da razão após o tratamento.

# Avaliação de proliferação e apoptose

Para averiguar se o aumento de viabilidade celular observado após o tratamento com as drogas não ocorreu devido a um estímulo da proliferação celular pelas drogas, realizou-se os tratamentos de células transfectadas com pcDNA3-myc-ATX3 normal. A viabilidade celular foi analisada a partir de testes com o reagente MTT e não houve variação significativa após os tratamentos (figura 20).



**Figura 20.** Viabilidade celular relativa após o tratamento com as drogas citadas de células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 normal. Resultados obtidos através de testes com o reagente MTT. O experimento foi realizado em triplicata e não houve alteração significativa da viabilidade celular.

Os resultados dos experimentos de citometria de fluxo foram apresentados em gráficos em termos de viabilidade celular, o que permite comparar aos resultados obtidos a partir de testes com o reagente MTT, pois este teste informa o número de células viáveis na amostra não diferenciando o tipo de morte celular. Já a marcação com anexina V e PI distingue a amostra em três populações celulares: células viáveis, células em apoptose e células em necrose. Quando os dados são plotados no gráfico em termos de porcentagem de células em apoptose, observa-se que os tratamentos agiram na redução dessa população celular (figura 21). A redução da apoptose é importante pois é este o tipo de morte celular observada na DMJ.



**Figura 21.** Porcentagem de células em apoptose analisada por citometria de fluxo após marcação com anexina V e PI de células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 expandida e tratadas com as drogas mencionadas. Experimento em quadruplicata e aplicado o teste estatístico Kruskal-Wallis, \* p < 0,05.

# 5. DISCUSSÃO

#### Modelo *in vitro* para DMJ

Neste trabalho foi desenvolvido um modelo *in vitro* para DMJ. Nas condições apresentadas, a transfecção transiente da ataxina-3 expandida foi capaz de exibir os principais efeitos fenotípicos e citotóxicos descritos para DMJ, como a formação de agregados e a indução de morte celular. A cultura celular estudada, PC12, já foi utilizada por outros autores, que também relataram a ocorrência de agregados e de morte celular (113;114;115).

Um parâmetro importante testado para demonstrar a eficiência do modelo estabelecido foi a expressão gênica. Verificou-se um aumento de 15000 vezes na expressão da ataxina-3 após a transfecção com o plasmídeo que possui um promotor forte de expressão em mamíferos, citomegalovírus (CMV). Essa super-expressão provavelmente permitiu a antecipação dos efeitos citotóxicos causados pela ataxina-3 expandida. Esses efeitos já puderam ser analisados 48h após a transfecção. Assim, os resultados podem ser obtidos em prazo de tempo menor.

A análise da proteína ataxina-3 nas células transfectadas através de microscopia de fluorescência mostrou que tanto a ataxina-3 normal quanto a expandida estão presentes no núcleo e no citoplasma das células. Essa distribuição da ataxina-3 já foi demonstrada em modelos *in vitro* (28;129) e em cérebro de pacientes (130). Os agregados de ataxina-3 expandida foram identificados tanto no núcleo quanto no citoplasma e não estavam presentes em células transfectadas com pEGFP-ATX3 normal. Inicialmente, acreditava-se que os agregados estavam presentes apenas no núcleo, mas têm sido relatado a ocorrência de agregados no citoplasma em cérebro de pacientes (34) e em modelo *in vitro* para DMJ (129).

A ocorrência dos agregados representa um importante marcador fenotípico da doença, corroborando para a credibilidade do modelo. Os agregados foram confirmados por duas metodologias, microscopia de fluorescência e western blot. No entanto, o estudo não focou na avaliação mais detalhada dos agregados pois este não era nosso interesse e além disso há grande contradição na literatura do papel dos agregados na patogênese da DMJ. Yoshizawa e colaboradores (113) estudaram a susceptibilidade de oito linhagens celulares para a formação de agregados e indução de morte celular após a transfecção com ataxina-3 expandida truncada. Além desse trabalho mostrar que as linhagens celulares respondem diferentemente à super-

expressão da ataxina-3 expandida, não houve correlação entre a frequência de morte celular e de agregados.

Nosso trabalho mostrou que a expressão da ataxina-3 expandida reduziu em torno de 15% a viabilidade celular quando comparada à ataxina-3 normal, resultado estatisticamente significativo e obtido a partir de testes com o reagente MTT. Essa redução foi dependente da concentração de plasmídeo utilizada no experimento. Concentrações mais baixas não alteraram a viabilidade celular e a concentração mais alta de plasmídeo utilizada (4µg) reduziu ainda mais a viabilidade, em 40%. A marcação com anexina V das células transfectadas com 2µg de pcDNA-myc-ATX3 expandida mostrou que 24% dessas células estão em apoptose. Sendo a apoptose o tipo de morte celular induzido pela ataxina-3 expandida (131), esse resultado aumenta a confiabilidade no modelo desenvolvido pois a ataxina-3 expandida está induzindo a apoptose. A porcentagem de células em apoptose (24%) é maior do que a redução relativa da viabilidade celular obtida com o reagente MTT (15%), provavelmente essa diferença se refere à taxa basal de células que morrem por causas além da ataxina-3 expandida. A taxa de morte celular induzida pela ataxina-3 expandida é comparável a outros trabalhos da literatura (69;130).

O modelo *in vitro* desenvolvido é importante para o estudo de novas estratégias terapêuticas, principalmente, por ser um modelo simples e rápido de ser manipulado e analisado. As características fenotípicas da doença são reproduzidas após um período curto de tempo, e ainda o modelo *in vitro* permite a realização de um maior número de réplicas. Além desse modelo permitir o estudo de novas estratégias terapêuticas, o mesmo também pode ser utilizado para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da doença.

O desenvolvimento de modelos que reproduzam os efeitos citotóxicos da DMJ *in vitro* também é importante devido à deficiência de modelos *in vivo* para a doença. Embora existam alguns modelos *in vivo*, eles reproduzem apenas em parte as características fenotípicas além de apresentarem neurodegeneração em regiões diferentes daquelas de pacientes (131-134).

# Tratamento com as drogas

Atualmente não existem tratamentos eficazes contra a DMJ, daí a importância de se estudar compostos capazes de reduzirem os efeitos citotóxicos da doença. A

investigação de estratégias que resultam na diminuição da morte celular no modelo *in vitro* desenvolvido representa, portanto, um importante enfoque terapêutico.

# Glicerol

A primeira estratégia terapêutica avaliada se baseou na classe de compostos conhecidos como chaperonas químicas, estes aumentam a estabilidade de proteínas no seu estado nativo e auxiliam no enovelamento protéico. O tratamento com glicerol aumentou a viabilidade celular em 16%, sendo este dose-dependente, quando analisado através de testes com o reagente MTT. Este aumento foi estatisticamente significativo. No experimento utilizando o citômetro de fluxo o aumento da viabilidade celular foi de 7% e não alcançou significância estatística. Embora não tenha ocorrido um aumento de viabilidade significativo verificado por métodos independentes acreditamos que esse resultado pode ter ainda relevância biológica.

Alterações no controle de qualidade de proteínas estão associadas com outras doenças neurodegenerativas além das doenças por poliglutamina, como a doença de Alzheimer e doença de Parkinson (135). Proteínas mal-enoveladas podem resultar na formação de precipitados tóxicos de proteína, inativação funcional de proteínas e causar morte celular, sendo as chaperonas a primeira linha de defesa contra o mal-enovelamento (135).

Proteossomos são abundantes em neurônios, onde o controle preciso de degradação protéica é necessário para manter o neurônio funcional. Alterações no sistema proteossomo estão associadas a um aumento de expressão de Hsp, que são chaperonas moleculares atuando no reconhecimento de proteínas mal-enoveladas, auxiliando na conformação ou direcionando até a via ubiquitina-proteossomo para degradação (136;137).

A super-expressão de chaperonas moleculares reduz a citotoxicidade causada pela proteína expandida em diversos modelos, como expressão da ataxina-3 expandida em *Drosophila* (60) e modelo celular para doença de Huntington (63). O mecanismo molecular envolvido nessa redução de citotoxicidade ainda não está estabelecido, embora existam alguns indícios. Um estudo recente mostrou que a super-expressão de Hsp70 e Hsp40 aumenta a solubilidade de proteínas com trato de poliglutamina expandido, além de aumentar a degradação através do 26S do proteossomo (138).

63

Provavelmente, as chaperonas moleculares se ligam a proteínas mal-enoveladas e induzem a mudança conformacional (139).

Visto a importância funcional das chaperonas moleculares, a utilização de chaperonas químicas tem sido explorada na prevenção da citotoxicidade causada pelas proteínas com poliglutamina expandida. O efeito positivo do glicerol já foi relatado para dois modelos de doenças por poliglutamina. O primeiro mostrou uma redução da morte de bactérias que expressavam o gene truncado para doença de Huntington (140). O segundo trabalho, obteve uma diminuição de 5% da morte celular em um modelo *in vitro* que expressava a ataxina-3 expandida truncada (69). No entanto, tem sido demonstrada a importância do contexto das proteínas na patogênese das doenças por poliglutamina, regiões diferentes da expansão de glutamina podem complicar o enovelamento errôneo e subsequente formação de fibrila, além de determinar vias moleculares e progressão patogênica (141-143). Sendo assim relevante o desenvolvimento de um modelo que expresse a ataxina-3 completa para o estudo de estratégias terapêuticas.

A ação de uma outra chaperona química, trealose, também apresentou efeitos positivos em modelos *in vitro* para doença de Huntington (66). Não houve aumento da expressão de Hsps após o tratamento com a droga mostrando que a trealose não induziu vias de estresse celular e, provavelmente, reduziu a citotoxicidade por se ligar diretamente a proteínas com o trato de poliglutamina expandido.

Nossos experimentos não resultaram alteração da razão em monômero/agregado após o tratamento com glicerol. Enquanto alguns trabalhos relatam que a redução da citotoxicidade nas doenças por poliglutamina pelas chaperonas estão associadas à redução de agregados (66;69), outros trabalhos, com resultados semelhantes ao nosso, demonstram que os mecanismos de ação das chaperonas independem dos agregados. Zhou e colaboradores mostraram para um modelo celular da doença de Huntington que diversas chaperonas moleculares reduzem a citotoxicidade causada pela proteína expandida, no entanto apenas uma (Hsp40) é capaz de reduzir agregados (144). O mecanismo de ação dessas chaperonas está relacionado à inibição da atividade das capazes 3 e 9, sendo esta inibição independente dos agregados.

Embora seja controverso o papel dos agregados na patologia da DMJ, a citotoxicidade induzida pelas proteínas monoméricas mal-enoveladas é mais aceita

64

(145). O aumento da viabilidade celular após o tratamento com glicerol e sua provável ação na estabilização das proteínas em sua conformação nativa, corrobora com o fato de que o mal enovelamento das proteínas mutadas desencadeiam, pelo menos em parte, processos que levam à morte celular. Assim, o aumento de atividades que são desencadeadas por chaperonas moleculares através da introdução de chaperonas químicas tem grande potencial terapêutico para DMJ.

A aplicação clínica das chaperonas químicas traz vantagens em relação à modulação da expressão de chaperonas moleculares pois podem ser administradas facilmente e a liberação dessas drogas no sistema nervoso é segura (69). Além disso, uma das chaperonas químicas, DMSO, já foi utilizada em pacientes com amiloidose que apresentaram melhoras clínicas (146;147).

Ainda que o aumento da viabilidade celular pelo glicerol tenha sido parcial, este continua sendo um bom candidato terapêutico e novos estudos deveriam ser realizados. O modelo desenvolvido super-expressa a ataxina-3 expandida a níveis bem maiores do que em pacientes com DMJ, de forma que o efeito parcial do glicerol demonstrado nesse trabalho já possa ser suficiente na redução de morte celular induzida pela ataxina-3 expandida em pacientes.

# Lítio

O efeito protetor do lítio também foi dose-dependente, sendo que houve um aumento estatisticamente significativo de 17% e 21% da viabilidade celular relativa nas concentrações 5mM e 7,5mM, respectivamente, quando analisados com o reagente MTT. A concentração mais baixa testada, 2,5mM, não teve alteração significativa. A faixa de concentração de lítio que exerce funções neuroprotetoras para as diversas doenças já estudadas é muito estreita, o que pode explicar esse efeito dose-dependente (76;148). O aumento da viabilidade pela ação do lítio foi confirmado através da outra metodologia aplicada. Os experimentos analisados em citômetro de fluxo mostraram um aumento estatisticamente significativo de 12% de células viáveis após o tratamento com 5mM de lítio.

Em um modelo celular para a doença de Huntington, o tratamento com lítio resultou na diminuição de 40% da morte celular e 40% de agregados (72). No entanto, esse modelo utilizou o gene truncado para huntingtina, sendo que a ausência do contexto da proteína pode modificar aspectos patológicos. A diferença na eficiência da

proteção exercida pelo lítio obtida nesse trabalho e no nosso é provavelmente resultado da diferença entre as doenças de Huntington e DMJ. Embora as doenças por poliglutamina tenham características semelhantes, os mecanismos exatos não estão estabelecidos já que o contexto das proteínas envolvidas em cada uma das doenças é completamente diferente.

Carmichael e colaboradores (72) demonstraram que o lítio age através da inibição do gene GSK-3, mas não está associado a outros genes como o Bcl-2 e p53 ou com a resposta ao choque térmico. Ao final de sua cascata de sinalização, GSK-3 ativa genes indutores da apoptose, de maneira que a inibição do GSK-3 pelo lítio estaria diminuindo a expressão desses genes indutores de apoptose.

Outro trabalhou mostrou que o tratamento com lítio em animais modelos para SCA1 diminuiu a regeneração hipocampal, mas não alterou os agregados (81). O lítio pode apresentar alvos moleculares além do *GSK-3*, que alteram a expressão gênica e poderiam ser responsáveis pelos efeitos neuroprotetores obtidos. Um outro mecanismo de ação do lítio seria o aumento da atividade de ligação ao DNA de fatores de transcrição, como é o caso do AP-1 (149). Como a alteração da expressão gênica é característica das doenças por poliglutamina, o lítio pode estar exercendo seu efeito neuroprotetor através do favorecimento da expressão de genes que são alterados na doença. O tratamento com lítio também pode prevenir a redução no tamanho de dendritos de neurônios hipocampais (150) ou ainda atuar na neurotransmissão e neurodegeneração (151-153).

Após o tratamento com lítio não houve alteração da razão entre monômeros e agregados no nosso modelo, resultados comparáveis aos de Watase (81). A redução da morte celular induzida pela ataxina-3 expandida demonstrada neste trabalho reforça o potencial terapêutico do lítio nas doenças por poliglutamina, sendo que resultados positivos já foram demonstrados para doença de Huntington e SCA1. A esses resultados soma-se a vantagem de usar uma droga já estabelecida e usada em humanos por mais de 50 anos, o potencial terapêutico e tóxico do lítio é conhecido, sendo usado principalmente para o transtorno afetivo bipolar (154). Dentre os efeitos colaterais da droga estão o tremor e falta de coordenação, principalmente quando a dose não é bem monitorada (155). Visto o risco desses efeitos colaterais para tratar doenças que apresentam disfunção cerebelar, Watase e colaboradores (81) avaliaram eventos de

tremor em camundongos durante o tratamento com lítio e não encontraram aumento desses eventos.

# Coenzima Q10

Existem evidências do envolvimento da disfunção mitocondrial e anormalidades bioenergéticas na patogênese de doenças neurodegenerativas (156). Sendo assim, compostos que melhoram a bioenergética celular e mitocondrial são candidatos para o tratamento dessas doenças. Neste trabalho foi avaliada a coenzima Q10, um cofator da cadeia transportadora de elétrons e importante antioxidante (157), na redução dos efeitos citotóxicos do modelo *in vitro* para DMJ.

Através de análises com o reagente MTT, verificou-se um aumento, estatisticamente significativo, de 14% da viabilidade celular relativa após o tratamento com 10µM da coenzima Q10. O tratamento com uma concentração maior, 30µM levou a um aumento de 11%, que não alcançou significância estatística. Já a concentração mais alta testada, 90µM, não mostrou efeito significativo na viabilidade celular. Valores próximos foram obtidos nos experimentos analisados em citômetro de fluxo. Nesses experimentos o tratamento com 30µM de coenzima Q10 aumentou em 13% a viabilidade celular, o que foi estatisticamente significativo.

O efeito da coenzima Q10 tem sido estudado em diversos modelos *in vitro* de toxicidade neuronal com resultados que corroboram para o efeito neuroprotetor desse composto. Em modelos neuronais para o estresse oxidativo, o pré-tratamento com coenzima Q10 preserva o potencial da membrana mitocondrial e reduz a geração de espécies reativas de oxigênio (158). As deficiências nas atividades dos complexos I e IV são melhoradas pela ação da coenzima Q10 em fibroblastos de pacientes com doença de Parkinson (159). Em cultura de neurônios provenientes de camundongos transgênicos para doença de Huntington houve diminuição da morte celular após o tratamento com coenzima Q10 (160).

A ação da coenzima Q10 na proteção contra danos oxidativos também já foi relatada na literatura para diversas doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (161), doença de Alzheimer (162;163) e doença de Huntington (90;164). Um mecanismo possível da coenzima Q10 prevenir a apoptose seria a inibição da despolarização mitocondrial através do bloqueio da permeabilidade de transição da mitocôndria (119;160). Além do importante papel da coenzima Q10 atenuando a

disfunção mitocondrial presente em doenças neurodegenerativas, a sua utilização em diversos testes clínicos reforça o seu potencial para o tratamento da DMJ.

O tratamento com a coenzima Q10 de pacientes com doença de Huntington foi capaz de reduzir os níveis de lactato no córtex cerebral e gânglio basal, a interrupção do tratamento resultou na alteração para os níveis iniciais de lactato mostrando que o efeito verificado foi devido à coenzima Q10 (89). Visto que pacientes com doença de Huntington apresentam um aumento no nível de lactato, a coenzima Q10 pode agir, pelo menos em parte, na normalização dos níveis de lactato. Esses resultados demonstraram efeitos metabólicos no tecido cerebral provenientes da coenzima Q10 e sugeriram um efeito sobre o metabolismo mitocondrial. Um teste clínico com a coenzima Q10 demonstrou a tolerância e segurança dessa droga quando administrada em pacientes com doença de Huntington (165). Não houve melhora significativa de características motoras e funcionais após 6 meses de tratamento, entretanto esse estudo foi pequeno e não tinha poder para detectar tais efeitos. Outro estudo clínico para a mesma doença avaliou o tratamento com coenzima Q10 unicamente ou em conjunto com remacemide, receptor antagonista NMDA, durante 30 meses (166). Esse estudo comprovou a tolerância e segurança da droga e houve uma tendência a reduzir o declínio funcional e cognitivo. No entanto, os resultados obtidos não foram estatisticamente significativos, o que pode ter ocorrido devido à falta de poder do estudo na análise das variáveis propostas, à baixa dosagem da droga ou à necessidade de avaliar os resultados com prazos maiores já que as diferenças entre o grupo tratado e controle foram verificadas apenas 11 meses após o início do tratamento. Diversos testes clínicos com resultados positivos foram realizados para outras doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, esclerose amiotrófica lateral e ataxia de Friedreich (revisão, 105).

Além de ser um composto natural, bem tolerado e com poucos efeitos colaterais, a coenzima Q10 é capaz de atravessar a barreira encefálica, demonstrado em estudos animais (96;107). A administração oral de coenzima Q10 em camundongos modelos para doença de Huntington aumentou o nível de coenzima Q10 no cérebro desses animais (107). Assim, os resultados obtidos nesse trabalho juntamente com as evidências da literatura apontam para o potencial desse composto no tratamento da DMJ.

Novamente não houve alteração na razão entre monômeros e agregados da

ataxina-3 em nossos experimentos após o tratamento com a coenzima Q10. Os trabalhos na literatura com modelos para a doença de Huntington não avaliaram tal parâmetro.

## **Considerações finais**

Para confirmar a especificidade do tratamento com as drogas, os experimentos foram repetidos em culturas de células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 normal. O tratamento com as drogas não alterou a viabilidade dessas células. Isso mostra que o aumento de viabilidade observado nas células transfectadas com pcDNA-myc-ATX3 expandida não foi resultado de um aumento de proliferação estimulada pelas drogas. Os tratamentos agiram reduzindo a morte celular induzida pela ataxina-3 expandida. Um experimento seguinte de citometria de fluxo permitiu avaliar separadamente a porcentagem de células que estão vivas, em apoptose ou em necrose e mostrou que o tratamento com as drogas reduziu a porcentagem de células em apoptose. Os mecanismos de ação dessas drogas resultaram ao final na redução da apoptose, apresentando portanto potencial para redução do processo de neurodegeneração. Embora a redução de células em apoptose pareça discreto, em torno de 10%, esse efeito provavelmente terá repercussão importante na progressão da doença, que é caracterizada por neurodegeneração lenta. E como descrito anteriormente, no cérebro de pacientes a ataxina-3 é menos expressa do que no modelo desenvolvido, que está super-expressando a proteína.

Cada uma das drogas avaliadas nesse trabalho possui mecanismos de ação diferentes. Embora não esteja completamente elucidado a atuação exata de cada droga, o glicerol provavelmente auxilia no enovelamento correto da ataxina-3 expandida, o lítio na expressão gênica e a coenzima Q10 na disfunção mitocondrial. Sendo assim, a redução da morte celular após o tratamento com essas drogas obtida neste trabalho corrobora com dados da literatura de que o mal-enovelamento da ataxina-3 expandida, a alteração na expressão gênica e a disfunção mitocondrial estão envolvidos no processo patológico. De fato, diversos mecanismos complexos estariam contribuindo, em parte, para a patogênese da DMJ.

As três estratégias terapêuticas estudadas neste trabalho foram capazes de reduzir a apoptose induzida pela ataxina-3 expandida e, portanto, estudos adicionais

devem ser considerados, bem como estudos de outras drogas que exerçam mecanismos semelhantes.

# 6. CONCLUSÕES

- Reprodução dos efeitos citotóxicos e fenotípicos da DMJ no modelo *in vitro* desenvolvido, como a indução de morte celular e formação de agregados protéicos.
- Glicerol aumentou em 16% a viabilidade de células expressando a ataxina-3 expandida quando avaliado com o reagente MTT e 7% por citometria de fluxo.
- Lítio aumentou em 17% a viabilidade de células expressando a ataxina-3 expandida quando avaliado com o reagente MTT e 12% por citometria de fluxo.
- Coenzima Q10 aumentou em 11% a viabilidade de células expressando a ataxina-3 expandida quando avaliado com o reagente MTT e 14% por citometria de fluxo.
- Não houve alteração da razão monômero/agregado de ataxina-3 expandida após os tratamentos com as drogas.
- As drogas não estimularam a proliferação celular e reduziram, em torno de 10%, a porcentagem de células em apoptose que expressavam ataxina-3 expandida.
- Os tratamentos com glicerol, lítio e coenzima Q10 foram eficientes na prevenção da morte celular induzida pela ataxina-3 expandida.
## 7. REFERÊNCIAS

- (1) Truant R, Raymond LA, Xia J, Pinchev D, Burtnik A, Atwal RS. Canadian Association of Neurosciences Review: polyglutamine expansion neurodegenerative diseases. Can J Neurol Sci 2006 Aug;33(3):278-91.
- (2) Lopes-Cendes I, Teive HG, Calcagnotto ME, da Costa JC, Cardoso F, Viana E, et al. Frequency of the different mutations causing spinocerebellar ataxia (SCA1, SCA2, MJD/SCA3 and DRPLA) in a large group of Brazilian patients. Arq Neuropsiquiatr 1997 Sep;55(3B):519-29.
- (3) Silveira I, Lopes-Cendes I, Kish S, Maciel P, Gaspar C, Coutinho P, et al. Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy, and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. Neurology 1996 Jan;46(1):214-8.
- (4) Nakano KK, Dawson DM, Spence A. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. Neurology 1972 Jan;22(1):49-55.
- (5) Rosenberg RN. Machado-Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration. Mov Disord 1992;7(3):193-203.
- (6) Durr A, Stevanin G, Cancel G, Duyckaerts C, Abbas N, Didierjean O, et al. Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. Ann Neurol 1996 Apr;39(4):490-9.
- (7) Lopes-Cendes I, Silveira I, Maciel P, Gaspar C, Radvany J, Chitayat D, et al. Limits of clinical assessment in the accurate diagnosis of Machado-Joseph disease. Arch Neurol 1996 Nov;53(11):1168-74.
- (8) Ikeda K, Kubota S, Isashiki Y, Eiraku N, Osame M, Nakagawa M. Machado-Joseph disease with retinal degeneration and dementia. Acta Neurol Scand 2001 Dec;104(6):402-5.
- (9) Ishikawa A, Yamada M, Makino K, Aida I, Idezuka J, Ikeuchi T, et al. Dementia and delirium in 4 patients with Machado-Joseph disease. Arch Neurol 2002 Nov;59(11):1804-8.
- (10) Zawacki TM, Grace J, Friedman JH, Sudarsky L. Executive and emotional dysfunction in Machado-Joseph disease. Mov Disord 2002 Sep;17(5):1004-10.
- (11) Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, et al. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. Am J Hum Genet 1995 Jul;57(1):54-61.
- (12) Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R. Neurologic findings in Machado-Joseph disease: relation with disease duration, subtypes, and (CAG)n. Arch Neurol 2001 Jun;58(6):899-904.

- (13) Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, et al. CAG expansion in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. Nat Genet 1994 Nov;8(3):221-8.
- (14) Padiath QS, Srivastava AK, Roy S, Jain S, Brahmachari SK. Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005 Feb 5;133B(1):124-6.
- (15) Gu W, Ma H, Wang K, Jin M, Zhou Y, Liu X, et al. The Shortest Expanded Allele of the MJD1 Gene in a Chinese MJD Kindred with Autonomic Dysfunction. European Neurology 2004;52(2):107-11.
- (16) Carvalho DR, La Rocque-Ferreira A, Rizzo IM, Imamura EU, Speck-Martins CE. Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. Pediatr Neurol 2008 Apr;38(4):296-9.
- (17) Burnett B, Li F, Pittman RN. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. Hum Mol Genet 2003 Dec 1;12(23):3195-205.
- (18) Scheel H, Tomiuk S, Hofmann K. Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. Hum Mol Genet 2003 Nov 1;12(21):2845-52.
- (19) Chai Y, Berke SS, Cohen RE, Paulson HL. Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. J Biol Chem 2004 Jan 30;279(5):3605-11.
- (20) Donaldson KM, Li W, Ching KA, Batalov S, Tsai CC, Joazeiro CA. Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. Proc Natl Acad Sci U S A 2003 Jul 22;100(15):8892-7.
- (21) Zoghbi HY, Orr HT. Glutamine repeats and neurodegeneration. Annu Rev Neurosci 2000;23:217-47.
- (22) Warrick JM, Morabito LM, Bilen J, Gordesky-Gold B, Faust LZ, Paulson HL, et al. Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in Drosophila by a ubiquitin-associated mechanism. Mol Cell 2005 Apr 1;18(1):37-48.
- (23) Berke SJ, Chai Y, Marrs GL, Wen H, Paulson HL. Defining the role of ubiquitin-interacting motifs in the polyglutamine disease protein, ataxin-3. J Biol Chem 2005 Sep 9;280(36):32026-34.
- (24) Doss-Pepe EW, Stenroos ES, Johnson WG, Madura K. Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. Mol Cell Biol 2003 Sep;23(18):6469-83.

- (25) Mao Y, Senic-Matuglia F, Di Fiore PP, Polo S, Hodsdon ME, De CP. Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. Proc Natl Acad Sci U S A 2005 Sep 6;102(36):12700-5.
- (26) Nicastro G, Menon RP, Masino L, Knowles PP, McDonald NQ, Pastore A. The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. Proc Natl Acad Sci U S A 2005 Jul 26;102(30):10493-8.
- (27) Burnett BG, Pittman RN. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. Proc Natl Acad Sci U S A 2005 Mar 22;102(12):4330-5.
- (28) Tait D, Riccio M, Sittler A, Scherzinger E, Santi S, Ognibene A, et al. Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix. Hum Mol Genet 1998 Jun;7(6):991-7.
- (29) Evert BO, Araujo J, Vieira-Saecker AM, de Vos RA, Harendza S, Klockgether T, et al. Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation. J Neurosci 2006 Nov 1;26(44):11474-86.
- (30) Li F, Macfarlan T, Pittman RN, Chakravarti D. Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. J Biol Chem 2002 Nov 22;277(47):45004-12.
- (31) Yamada M, Tan CF, Inenaga C, Tsuji S, Takahashi H. Sharing of polyglutamine localization by the neuronal nucleus and cytoplasm in CAG-repeat diseases. Neuropathol Appl Neurobiol 2004 Dec;30(6):665-75.
- (32) Iwabuchi K, Tsuchiya K, Uchihara T, Yagishita S. Autosomal dominant spinocerebellar degenerations. Clinical, pathological, and genetic correlations. Rev Neurol (Paris) 1999 Apr;155(4):255-70.
- (33) Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C, Shore P. Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. Neurology 1976 Aug;26(8):703-14.
- (34) Hayashi M, Kobayashi K, Furuta H. Immunohistochemical study of neuronal intranuclear and cytoplasmic inclusions in Machado-Joseph disease. Psychiatry Clin Neurosci 2003 Apr;57(2):205-13.
- (35) Paulson HL, Perez MK, Trottier Y, Trojanowski JQ, Subramony SH, Das SS, et al. Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. Neuron 1997 Aug;19(2):333-44.
- (36) Yamada M, Hayashi S, Tsuji S, Takahashi H. Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease. Acta Neuropathol 2001 Feb;101(2):140-4.

- (37) DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. Science 1997 Sep 26;277(5334):1990-3.
- (38) Holmberg M, Duyckaerts C, Durr A, Cancel G, Gourfinkel-An I, Damier P, et al. Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. Hum Mol Genet 1998 May;7(5):913-8.
- (39) Duenas AM, Goold R, Giunti P. Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. Brain 2006 Jun;129(Pt 6):1357-70.
- (40) Muchowski PJ, Wacker JL. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. Nat Rev Neurosci 2005 Jan;6(1):11-22.
- (41) Gatchel JR, Zoghbi HY. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. Nat Rev Genet 2005 Oct;6(10):743-55.
- (42) Paulson HL. Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. Semin Neurol 2007 Apr;27(2):133-42.
- (43) Yang W, Dunlap JR, Andrews RB, Wetzel R. Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. Hum Mol Genet 2002 Nov 1;11(23):2905-17.
- (44) Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. Nature 2004 Oct 14;431(7010):805-10.
- (45) Rub U, De Vos RA, Brunt ER, Sebesteny T, Schols L, Auburger G, et al. Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3): thalamic neurodegeneration occurs independently from thalamic ataxin-3 immunopositive neuronal intranuclear inclusions. Brain Pathol 2006 Jul;16(3):218-27.
- (46) Slow EJ, Graham RK, Osmand AP, Devon RS, Lu G, Deng Y, et al. Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. Proc Natl Acad Sci U S A 2005 Aug 9;102(32):11402-7.
- (47) Wellington CL, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, Singaraja R, et al. Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. J Biol Chem 1998 Apr 10;273(15):9158-67.
- (48) Cummings CJ, Mancini MA, Antalffy B, DeFranco DB, Orr HT, Zoghbi HY. Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. Nat Genet 1998 Jun;19(2):148-54.

- (49) Chai Y, Koppenhafer SL, Shoesmith SJ, Perez MK, Paulson HL. Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro. Hum Mol Genet 1999 Apr;8(4):673-82.
- (50) Kim S, Nollen EA, Kitagawa K, Bindokas VP, Morimoto RI. Polyglutamine protein aggregates are dynamic. Nat Cell Biol 2002 Oct;4(10):826-31.
- (51) Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. Science 2001 May 25;292(5521):1552-5.
- (52) Jana NR, Tanaka M, Wang G, Nukina N. Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. Hum Mol Genet 2000 Aug 12;9(13):2009-18.
- (53) Yu YC, Kuo CL, Cheng WL, Liu CS, Hsieh M. Decreased antioxidant enzyme activity and increased mitochondrial DNA damage in cellular models of Machado-Joseph disease. J Neurosci Res 2009 Jun;87(8):1884-91.
- (54) Gunawardena S, Goldstein LS. Polyglutamine diseases and transport problems: deadly traffic jams on neuronal highways. Arch Neurol 2005 Jan;62(1):46-51.
- (55) Chou AH, Yeh TH, Ouyang P, Chen YL, Chen SY, Wang HL. Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation. Neurobiol Dis 2008 Jul;31(1):89-101.
- (56) Chou AH, Yeh TH, Kuo YL, Kao YC, Jou MJ, Hsu CY, et al. Polyglutamine-expanded ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-xL. Neurobiol Dis 2006 Feb;21(2):333-45.
- (57) Riess O, Rub U, Pastore A, Bauer P, Schols L. SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. Cerebellum 2008;7(2):125-37.
- (58) Shao J, Diamond MI. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. Hum Mol Genet 2007 Oct 15;16 Spec No. 2:R115-R123.
- (59) Lindquist S. The heat-shock response. Annu Rev Biochem 1986;55:1151-91.
- (60) Warrick JM, Chan HY, Gray-Board, Chai Y, Paulson HL, Bonini NM. Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in Drosophila by the molecular chaperone HSP70. Nat Genet 1999 Dec;23(4):425-8.
- (61) Hsieh M, Tsai HF, Chang WH. HSP27 and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. Cerebellum 2005;4(1):31-6.

- (62) Novoselova TV, Margulis BA, Novoselov SS, Sapozhnikov AM, van der SJ, Cheetham ME, et al. Treatment with extracellular HSP70/HSC70 protein can reduce polyglutamine toxicity and aggregation. J Neurochem 2005 Aug;94(3):597-606.
- (63) Wyttenbach A, Sauvageot O, Carmichael J, az-Latoud C, Arrigo AP, Rubinsztein DC. Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. Hum Mol Genet 2002 May 1;11(9):1137-51.
- (64) Tatzelt J, Prusiner SB, Welch WJ. Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. EMBO J 1996 Dec 2;15(23):6363-73.
- (65) Furusho K, Yoshizawa T, Shoji S. Ectoine alters subcellular localization of inclusions and reduces apoptotic cell death induced by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. Neurobiol Dis 2005 Oct;20(1):170-8.
- (66) Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, et al. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. Nat Med 2004 Feb;10(2):148-54.
- (67) Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tanaka F, et al. Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutaminemediated motor neuron disease. Proc Natl Acad Sci U S A 2005 Nov 15;102(46):16801-6.
- (68) Sanchez I, Mahlke C, Yuan J. Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. Nature 2003 Jan 23;421(6921):373-9.
- (69) Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F, Shoji S, Kanazawa I. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. Neurobiol Dis 2002 Jul;10(2):88-99.
- (70) Heiser V, Scherzinger E, Boeddrich A, Nordhoff E, Lurz R, Schugardt N, et al. Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 2000 Jun 6;97(12):6739-44.
- (71) Chen RW, Chuang DM. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. J Biol Chem 1999 Mar 5;274(10):6039-42.
- (72) Carmichael J, Sugars KL, Bao YP, Rubinsztein DC. Glycogen synthase kinase-3beta inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. J Biol Chem 2002 Sep 13;277(37):33791-8.

- (73) Bijur GN, De SP, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. J Biol Chem 2000 Mar 17;275(11):7583-90.
- (74) Li X, Bijur GN, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. Bipolar Disord 2002 Apr;4(2):137-44.
- (75) Chen G, Masana MI, Manji HK. Lithium regulates PKC-mediated intracellular cross-talk and gene expression in the CNS in vivo. Bipolar Disord 2000 Sep;2(3 Pt 2):217-36.
- (76) Pilcher HR. Drug research: the ups and downs of lithium. Nature 2003 Sep 11;425(6954):118-20.
- (77) Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. Biochem J 2001 Oct 1;359(Pt 1):1-16.
- (78) Wood NI, Morton AJ. Chronic lithium chloride treatment has variable effects on motor behavior and survival of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. Brain Res Bull 2003 Aug;61(4):375-383.
- (79) Berger Z, Ttofi EK, Michel CH, Pasco MY, Tenant S, Rubinsztein DC, et al. Lithium rescues toxicity of aggregate-prone proteins in Drosophila by perturbing Wnt pathway. Hum Mol Genet 2005 Oct;14(20):3003–3011.
- (80) Voisine C, Varma H, Walker N, Bates EA, Stockwell BR, Hart AC. Identification of potential therapeutic drugs for huntington's disease using Caenorhabditis elegans. PLoS One 2007;2(6):e504.
- (81) Watase K, Gatchel JR, Sun Y, Emamian E, Atkinson R, Richman R, et al. Lithium therapy improves neurological function and hippocampal dendritic arborization in a spinocerebellar ataxia type 1 mouse model. PLoS Med 2007 May;4(5):e182.
- (82) Mann VM, Cooper JM, Javoy-Agid F, Agid Y, Jenner P, Schapira AH. Mitochondrial function and parental sex effect in Huntington's disease. Lancet 1990 Sep 22;336(8717):749.
- (83) Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. Ann Neurol 1996 Mar;39(3):385-9.
- (84) Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, et al. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. Ann Neurol 1997 May;41(5):646-53.
- (85) Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF. Oxidative stress in Huntington's disease. Brain Pathol 1999 Jan;9(1):147-63.

- (86) Bogdanov MB, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, Beal MF. Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of Huntington's disease. J Neurochem 2001 Dec;79(6):1246-9.
- (87) Perez-Severiano F, Santamaria A, Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Rios C, Segovia J. Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. Neurochem Res 2004 Apr;29(4):729-33.
- (88) Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, et al. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. Nat Neurosci 2002 Aug;5(8):731-6.
- (89) Koroshetz WJ, Jenkins BG, Rosen BR, Beal MF. Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10. Ann Neurol 1997 Feb;41(2):160-5.
- (90) Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante KL, Jenkins BG, Hersch SM, et al. Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. J Neurosci 2002 Mar 1;22(5):1592-9.
- (91) Ogawa O, Zhu X, Perry G, Smith MA. Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in neurodegenerative disease. Sci Aging Knowledge Environ 2002 Oct 16;2002(41):e16.
- (92) Strijks E, Kremer HP, Horstink MW. Q10 therapy in patients with idiopathic Parkinson's disease. Mol Aspects Med 1997;18 Suppl:S237-S240.
- (93) Beal MF. Coenzyme Q10 administration and its potential for treatment of neurodegenerative diseases. Biofactors 1999;9(2-4):261-6.
- (94) Bonakdar RA, Guarneri E. Coenzyme Q10. Am Fam Physician 2005 Sep 15;72(6):1065-70.
- (95) Coenzyme Q10. Med Lett Drugs Ther 2006 Feb 27;48(1229):19-20.
- (96) Matthews RT, Yang L, Browne S, Baik M, Beal MF. Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. Proc Natl Acad Sci U S A 1998 Jul 21;95(15):8892-7.
- (97) Chaturvedi RK, Beal MF. Mitochondrial approaches for neuroprotection. Ann N Y Acad Sci 2008 Dec;1147:395-412.
- (98) Beal MF. Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. Ann Neurol 2003;53 Suppl 3:S39-S47.
- (99) Shults CW, Haas R. Clinical trials of coenzyme Q10 in neurological disorders. Biofactors 2005;25(1-4):117-26.

- (100) Geromel V, Rotig A, Munnich A, Rustin P. Coenzyme Q10 depletion is comparatively less detrimental to human cultured skin fibroblasts than respiratory chain complex deficiencies. Free Radic Res 2002 Apr;36(4):375-9.
- (101) Beal MF. Therapeutic effects of coenzyme Q10 in neurodegenerative diseases. Methods Enzymol 2004;382:473–87.
- (102) Schmelzer C, Lindner I, Rimbach G, Niklowitz P, Menke T, Doring F. Functions of coenzyme Q10 in inflammation and gene expression. Biofactors 2008;32(1-4):179-83.
- (103) Andrich J, Saft C, Gerlach M, Schneider B, Arz A, Kuhn W, et al. Coenzyme Q10 serum levels in Huntington's disease. J Neural Transm Suppl 2004;(68):111-6.
- (104) Shults CW, Haas RH, Passov D, Beal MF. Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. Ann Neurol 1997 Aug;42(2):261-4.
- (105) Spindler M, Beal MF, Henchcliffe C. Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease. Neuropsychiatr Dis Treat 2009;5:597-610.
- (106) Beal MF. Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease. Curr Opin Neurol 1994 Dec;7(6):542-7.
- (107) Smith KM, Matson S, Matson WR, Cormier K, Del Signore SJ, Hagerty SW, et al. Dose ranging and efficacy study of high-dose coenzyme Q10 formulations in Huntington's disease mice. Biochim Biophys Acta 2006 Jun;1762(6):616-26.
- (108) Stack EC, Smith KM, Ryu H, Cormier K, Chen M, Hagerty SW, et al. Combination therapy using minocycline and coenzyme Q10 in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. Biochim Biophys Acta 2006 Mar;1762(3):373-80.
- (109) Yang L, Calingasan NY, Wille EJ, Cormier K, Smith K, Ferrante RJ, et al. Combination therapy with coenzyme Q10 and creatine produces additive neuroprotective effects in models of Parkinson's and Huntington's diseases. J Neurochem 2009 Jun;109(5):1427-39.
- (110) Greene LA, Tischler AS. Establishment of a nor-adrenergic clonal line of rat adrenal phaeochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1976;73:2424–2428.
- (111) Greene LA, Rein G. Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive phaeochromocytoma cells. Brain Res 1977;129:247–263.

- (112) Westerink RH, Ewing AG. The PC12 cell as model for neurosecretion. Acta Physiol (Oxf). 2008 Feb;192(2):273-85.
- (113) Yoshizawa T, Yoshida H, Shoji S. Differential susceptibility of cultured cell lines to aggregate formation and cell death produced by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. Brain Res Bull 2001 Oct-Nov 1; 56(3-4):349-52.
- (114) Jeub M, Herbst M, Spauschus A, Fleischer H, Klockgether T, Wuellner U, et al. Potassium channel dysfunction and depolarized resting membrane potential in a cell model of SCA3. Exp Neurol 2006 Sep;201(1):182-92.
- (115) Yoshizawa T, Yamagishi Y, Koseki N, Goto J, Yoshida H, Shibasaki F, et al. Cell cycle arrest enhances the in vitro cellular toxicity of the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. Hum Mol Genet 2000 Jan 1;9(1):69-78.
- (116) Chai Y, Shao J, Miller VM, Williams A, Paulson HL. Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2002 Jul 9;99(14):9310-5.
- (117) Chai Y, Koppenhafer SL, Bonini NM, Paulson HL. Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. J Neurosci 1999 Dec 1;19(23):10338-47.
- (118) Gonzalez R, Ferrin G, Hidalgo AB, Ranchal I, Lopez-Cillero P, Santos-Gonzalez M, et al. N-acetylcysteine, coenzyme Q10 and superoxide dismutase mimetic prevent mitochondrial cell dysfunction and cell death induced by d-galactosamine in primary culture of human hepatocytes. Chem Biol Interact 2009 Sep 14;181(1):95-106.
- (119) Papucci L, Schiavone N, Witort E, Donnini M, Lapucci A, Tempestini A, et al. Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. J Biol Chem 2003 Jul 25;278(30):28220-8.
- (120) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001 Dec;25(4):402-8.
- (121) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual.
  2[3], 18.52. 1989. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- (122) Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. Biophotonics International 2004;11(7):36-42.

- (123) Ayres M, Ayres Jr M Ayres DL, Santos AS. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém, Sociedade Civil Mamirauá, Brasília 2007, 364pp.
- (124) Goti D, Katzen SM, Mez J, Kurtis N, Kiluk J, Ben-Hai L, et al. A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. J Neurosci 2004 Nov 10;24(45):10266-79.
- (125) Miller VM, Haibin X, Marrs GL, Gouvin CM, Lee G, Davidson BL, et al. Allele-specific silencing of dominant disease genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 10;100(12):7195-200.
- (126) Miller VM, Nelson RF, Gouvion CM, Williams A, Rodriguez-Lebron E, Harper SQ, et al. CHIP Suppresses Polyglutamine Aggregation and Toxicity In Vitro and In Vivo. J Neurosci. 2005 Oct 5;25(40):9152-61.
- (127) Haacke A, Hartl FU, Breuer P. Calpain Inhibition Is Sufficient to Suppress Aggregation of Polyglutamine-expanded Ataxin-3. J Biol Chem. 2007 Jun 29;282(26):18851-6.
- (128) Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F, Shoji S, Kanazawa I. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. Neurobiol Dis 2002 Jul;10(2):88-99.
- (129) Evert BO, Wullner U, Schulz JB, Weller M, Groscurth P, Trottier Y, et al. High level expression of expanded full-length ataxin-3 in vitro causes cell death and formation of intranuclear inclusions in neuronal cells. Hum Mol Genet 1999 Jul;8(7):1169-76.
- (130) Yamada M, Tsuji S, Takahashi H. Pathology of CAG repeat diseases. Neuropathology 2000 Dec;20(4):319-25.
- (131) Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A. Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. Nat Genet 1996 Jun;13(2):196-202.
- (132) Cemal CK, Carroll CJ, Lawrence L, Lowrie MB, Ruddle P, Al-Mahdawi S, et al. YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. Hum Mol Genet 2002 May 1;11(9):1075-94.
- (133) Goti D, Katzen SM, Mez J, Kurtis N, Kiluk J, Ben-Haiem L, et al. A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. J Neurosci 2004 Nov 10;24(45):10266-79.

- (134) Alves S, Regulier E, Nascimento-Ferreira I, Hassig R, Dufour N, Koeppen A, et al. Striatal and nigral pathology in a lentiviral rat model of Machado-Joseph disease. Hum Mol Genet 2008 Jul 15;17(14):2071-83.
- (135) Gao X, Hu H. Quality control of the proteins associated with neurodegenerative diseases. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2008 Jul;40(7):612-8.
- (136) Bush KT, Goldberg AL, Nigam SK. Proteasome inhibition leads to a heatshock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. J Biol Chem 1997 Apr 4;272(14):9086-92.
- (137) Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 1998 Jan;18(1):30-8.
- (138) Bailey CK, Andriola IF, Kampinga HH, Merry DE. Molecular chaperones enhance the degradation of expanded polyglutamine repeat androgen receptor in a cellular model of spinal and bulbar muscular atrophy. Hum Mol Genet 2002 Mar 1;11(5):515-23.
- (139) Ross CA, Poirier MA, Wanker EE, Amzel M. Polyglutamine fibrillogenesis: the pathway unfolds. Proc Natl Acad Sci U S A 2003 Jan 7;100(1):1-3.
- (140) Nagao Y, Ishiguro H, Nukina N. DMSO and glycerol reduce bacterial death induced by expression of truncated N-terminal huntingtin with expanded polyglutamine tracts. Biochim Biophys Acta 2000 Oct 18;1502(2):247-56.
- (141) Ellisdon AM, Thomas B, Bottomley SP. The two-stage pathway of ataxin-3 fibrillogenesis involves a polyglutamine-independent step. J Biol Chem 2006 Jun 23;281(25):16888-96.
- (142) Slow EJ, Graham RK, Osmand AP, Devon RS, Lu G, Deng Y, et al. Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. Proc Natl Acad Sci U S A 2005 Aug 9;102(32):11402-7.
- (143) Graham RK, Deng Y, Slow EJ, Haigh B, Bissada N, Lu G, et al. Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. Cell 2006 Jun 16;125(6):1179-91.
- (144) Zhou H, Li SH, Li XJ. Chaperone suppression of cellular toxicity of huntingtin is independent of polyglutamine aggregation. J Biol Chem 2001 Dec 21;276(51):48417-24.
- (145) Paul S. Polyglutamine-mediated neurodegeneration: use of chaperones as prevention strategy. Biochemistry (Mosc ) 2007 Apr;72(4):359-66.

- (146) Iwasaki T, Hamano T, Aizawa T, Kobayashi K, Kakishita E. A case of pulmonary amyloidosis associated with multiple myeloma successfully treated with dimethyl sulfoxide. Acta Haematol 1994; 91(2):91–4.
- (147) Shibuya T, Murakawa M, Tsuda Y, Harada M. Successful treatment of primary amyloidosis with dimethylsulfoxide and cytoreductive chemotherapy. Intern Med 1992 Apr; 31(4):544–8.
- (148) Phiel CJ, Klein PS. Molecular targets of lithium action. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001;41:789-813.
- (149) Yuan P, Chen G, Manji HK. Lithium activates the c-Jun NH2-terminal kinases in vitro and in the CNS in vivo. J Neurochem 1999 Dec;73(6):2299-309.
- (150) Wood GE, Young LT, Reagan LP, Chen B, McEwen BS. Stress-induced structural remodeling in hippocampus: prevention by lithium treatment. Proc Natl Acad Sci U S A 2004 Mar 16;101(11):3973-8.
- (151) Dixon JF, Hokin LE. Lithium acutely inhibits and chronically up-regulates and stabilizes glutamate uptake by presynaptic nerve endings in mouse cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 1998 Jul 7;95(14):8363-8.
- (152) Son H, Yu IT, Hwang SJ, Kim JS, Lee SH, Lee YS, et al. Lithium enhances long-term potentiation independently of hippocampal neurogenesis in the rat dentate gyrus. J Neurochem 2003 May;85(4):872-81.
- (153) Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK. Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. J Neurochem 2000 Oct;75(4):1729-34.
- (154) Manji HK, Moore GJ, Chen G. Lithium at 50: have the neuroprotective effects of this unique cation been overlooked? Biol Psychiatry 1999 Oct 1;46(7):929-40.
- (155) Freeman MP, Freeman SA. Lithium: clinical considerations in internal medicine. Am J Med 2006 Jun;119(6):478-81.
- (156) Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature 2006 Oct 19;443(7113):787-95.
- (157) Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. Biochim Biophys Acta 1995 May 24;1271(1):195-204.
- (158) Somayajulu M, McCarthy S, Hung M, Sikorska M, Borowy-Borowski H, Pandey S. Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress; neuroprotection by Coenzyme Q10. Neurobiol Dis 2005 Apr;18(3):618-27.

- (159) Winkler-Stuck K, Wiedemann FR, Wallesch CW, Kunz WS. Effect of coenzyme Q10 on the mitochondrial function of skin fibroblasts from Parkinson patients. J Neurol Sci 2004 May 15;220(1-2):41-8.
- (160) Zeron MM, Fernandes HB, Krebs C, Shehadeh J, Wellington CL, Leavitt BR, et al. Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. Mol Cell Neurosci 2004 Mar;25(3):469-79.
- (161) Somayajulu-Nitu M, Sandhu JK, Cohen J, Sikorska M, Sridhar TS, Matei A, et al. Paraquat induces oxidative stress, neuronal loss in substantia nigra region and parkinsonism in adult rats: neuroprotection and amelioration of symptoms by water-soluble formulation of coenzyme Q10. BMC Neurosci 2009;10:88.
- (162) Kipiani K, Dumont M, Yu F. Coenzyme Q10 decreases amyloid pathology and improves behavior in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. 2009.
   Ref Type: Personal Communication
- (163) Yang X, Yang Y, Li G, Wang J, Yang ES. Coenzyme Q10 attenuates betaamyloid pathology in the aged transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutation. J Mol Neurosci 2008 Feb;34(2):165-71.
- (164) Beal MF. Coenzyme Q10 as a possible treatment for neurodegenerative diseases. Free Radic Res 2002 Apr;36(4):455-60.
- (165) Feigin A, Kieburtz K, Como P, Hickey C, Claude K, Abwender D, et al. Assessment of coenzyme Q10 tolerability in Huntington's disease. Mov Disord 1996 May;11(3):321-3.
- (166) A randomized, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 and remacemide in Huntington's disease. Neurology 2001 Aug 14;57(3):397-404.