



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudo da potencial toxicidade do processo de silenciamento da ataxina 3 mutante humana mediado por shRNA lentiviral

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Luís Fernando Morgado Pereira Almeida (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Maria Amália da Silva Jurado (Universidade de Coimbra).

José Miguel Antunes Codêso

2015

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Luís Almeida agradeço desde logo a possibilidade de puder embarcar nesta aventura que se chama tese de mestrado, assim como todos os ensinamentos, conselhos e incentivo.

À Professora Doutora Maria Amália Jurado agradeço toda a disponibilidade e todo o entusiasmo pela ciência que tão afincadamente soube transmitir.

Ao Doutor Clévio Nóbrega agradeço toda a disponibilidade, paciência e incentivo no desenrolar desta aventura.

A todos aqueles que partilharam comigo o laboratório – Vanessa, Ana Cristina, Isabel, Sara, Mariana, Vítor, Janete, Joana, Patrícia, Dina, Guetta, Teresa, Liliana, Catarina e Rui – agradeço todo o apoio e todos aqueles momentos de boa disposição. Um agradecimento deveras especial à Vanessa pelos ensinamentos e conselhos.

A todos os meus amigos de sempre – Denis, Sara, Carlos, Paulo, Luís Miguel, Pedro, Cláudia, Ana Cristina, Roberto, Chico, Mariana, Sofia, David, Quelita e Tânia – agradeço todo o apoio nesta jornada, assim como todos aqueles episódios de algazarra e folia que bem nos caracteriza e que certamente irão perdurar.

E finalmente para aos meus pais deixo aqui um reconhecimento pleno por tudo e mais alguma coisa, de ontem, de hoje e doravante. Reconhecimento este que se estende meritoriamente aos meus avós e tio-avô.

E por fim aqui deixo uma frase que muito me diz:

“Não temos nas nossas mãos as soluções para todos os problemas do mundo, mas diante de todos os problemas do mundo temos as nossas mãos”

Friedrich von Schiller (1759-1805)

Índice

Resumo	VII
Abstract	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Machado-Joseph	3
1.2 Mecanismo de RNAi endógeno e mediado por shRNAs	5
1.3 Toxicidade associada ao mecanismo de RNAi mediado por shRNAs.....	10
1.3.1 Indução da resposta imunitária inata.....	10
1.3.2 Efeitos off-target.....	11
1.3.3 Saturação da maquinaria de RNAi endógena	12
1.4 Objectivos do projecto	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Animais	17
2.2 Lentivírus	17
2.3 Procedimento cirúrgico	18
2.4 Amostras para imunohistoquímica/histoquímica.....	19
2.5 Imunohistoquímica/histoquímica	20
2.5.1 Imunohistoquímica.....	20
2.5.2 Histoquímica	22
2.6 Amostras para <i>western blot</i>	22
2.6.1 Concentração proteica	23
2.7 <i>Western blot</i>	23

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1 Resultados preliminares	27
3.2 Avaliação da integridade neuronal	29
3.3 Avaliação da resposta microglial	37
3.4 Avaliação da resposta astrocítica	41
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	47
Referências Bibliográficas	53

Resumo

Previamente, o nosso laboratório demonstrou a eficácia terapêutica do silenciamento génico da ataxina 3 mutante humana mediado por shRNA, usando lentivírus, no estriado e cerebelo de modelos animais da doença de Machado-Joseph (MJD). Tendo em conta as evidências crescentes de que o processo de silenciamento génico mediado por shRNAs pode conduzir a efeitos citotóxicos, decidiu-se averiguar a segurança da estratégia terapêutica anteriormente testada. Procedeu-se assim a uma avaliação da potencial toxicidade do shRNA lentiviral usado para o silenciamento da ataxina 3 mutante humana (shmutatx3), no estriado de murganhos.

Com esse propósito foram analisados três aspectos: a integridade neuronal (através da análise imunohistoquímica da expressão de dois marcadores neuronais, DARPP-32 e NeuN, e da análise histoquímica com violeta de cresil), a resposta microglial (através da análise imunohistoquímica da expressão de um marcador microglial, iba-1) e a resposta astrocítica (através da análise imunohistoquímica e da análise por *western blot* da expressão de um marcador astrocítico, GFAP) no estriado de murganhos *wild-type* adultos em quatro *time points* após a injeção dos lentivírus: 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas e 5 meses.

O shmutatx3 parece apresentar toxicidade numa fase inicial, uma vez que os resultados referentes à avaliação da integridade neuronal indicam que a neurodegeneração às 2 semanas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 (lentivírus que codificam o shmutatx3) é significativamente superior à que se verifica na injeção do LV-eGFP (lentivírus sem efeito terapêutico). Apesar da aparente toxicidade inicial, o shmutatx3 não é tóxico a longo prazo, uma vez que há uma recuperação funcional da zona lesada no estriado entre as 4 semanas e os 5 meses na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3, que é quase completa aos 5 meses. Esse aspecto revela que existe uma adaptação neuronal à transcrição constitutiva do shmutatx3. Alguma da diferença em termos de neurodegeneração observada entre as injeções do LV-nlsLacZ-shmutatx3 e do LV-eGFP pode estar relacionada com o facto destes terem genes-repórter diferentes.

Os resultados da avaliação da resposta microglial e da resposta astrocítica sugerem que a aparente toxicidade do shmutatx3 numa fase inicial, mas não a longo prazo, poderá derivar da prevalência alongada de uma microglia M1 e de um fenótipo pró-inflamatório dos astrócitos activados (fenótipos de defesa que podem ter um efeito neurotóxico se forem persistentes), que dá lugar à prevalência de uma microglia M2 e de um fenótipo anti-inflamatório dos astrócitos activados (fenótipos de

reparação que têm um efeito neuroprotector e promotor do *sprouting* neuronal e da neurogênese) entre as 2 e as 4 semanas.

Palavras-chave: shRNA, lentivírus, doença de Machado-Joseph (MJD), toxicidade, neurodegeneração, microglia, astrócitos

Abstract

Data from our laboratory has previously demonstrated the therapeutic efficacy of shRNA-mediated gene silencing of human mutant ataxin 3, using lentiviral vectors, in cerebellum and striatum of Machado-Joseph disease (MJD) animal models. Given the growing evidence that shRNAs-mediated gene silencing process can lead to cytotoxic effects, we decided to investigate the safety of our previously tested therapeutic strategy. Thus, in this study, we have evaluated the potential shRNA toxicity used for silencing human mutant ataxin 3 (shmutatx3), in the mouse striatum.

For this purpose we analyzed three aspects: neuronal integrity (by immunohistochemical analysis of two neuronal markers, NeuN and DARPP-32, and histochemical analysis using cresyl violet), microglial response (by immunohistochemical analysis of a microglial marker, iba-1) and astrocytic response (by immunohistochemical analysis and western blot analysis of an astrocytic marker, GFAP) in the striatum of adult wild-type mice at four time points after injection of lentiviral vectors: 2 weeks, 4 weeks, 8 weeks and 5 months.

The shmutatx3 seem to be toxic at an early-stage, since the results of neuronal integrity evaluation indicate that the neurodegeneration at 2 weeks in LV-nlsLacZ-shmutatx3 (lentiviruses encoding shmutatx3) injection is significantly higher than that found in LV-eGFP (lentiviruses without therapeutic effect) injection. Despite the apparent initial toxicity, shmutatx3 is non-toxic at long term, since there is a functional recovery of the injured area in the striatum between 4 weeks and 5 months in LV-nlsLacZ-shmutatx3 injection, which is almost complete after 5 months. This aspect reveals that there is a neuronal adaptation to the constitutive transcription of shmutatx3. Some of the difference in the neurodegeneration observed between LV-nlsLacZ-shmutatx3 and LV-eGFP injections may be related to the fact that these lentivirus have different reporter genes.

The results of microglial response and astrocytic response suggest that the apparent toxicity of shmutatx3 at an early-stage, but not at long term, may derive from the elongated prevalence of a microglia M1 and a pro-inflammatory phenotype of activated astrocytes (defense phenotypes that may have a neurotoxic effect if they are persistent), which gives rise to the prevalence of a microglial M2 and an anti-inflammatory phenotype of activated astrocytes (repair phenotypes that have a neuroprotective effect and promoting neuronal sprouting and neurogenesis) between 2 and 4 weeks.

Keywords: shRNA, lentivirus, Machado-Joseph disease (MJD), toxicity, neurodegeneration, microglia, astrocytes

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Doença de Machado-Joseph

A doença de Machado-Joseph (MJD¹), também denominada de ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3²), é uma doença neurodegenerativa fatal, geralmente de início na idade adulta, que faz parte do grupo das doenças de poliglutaminas. Foi inicialmente descrita em descendentes de Portugueses nos Estados Unidos, em particular das ilhas dos Açores, onde a MJD é mais prevalente (1:140 na ilha das Flores). É considerada a ataxia autossómica dominante mais comum no mundo [Sudarsky, L. e Coutinho, P. (1995)].

A principal manifestação clínica da MJD é a ataxia cerebelar progressiva (descoordenação motora). Outros sinais da doença incluem a oftalmoplegia externa (paralisia dos músculos da região exterior do globo ocular), disartria (dificuldade em articular a linguagem), retracção das pálpebras (doentes apresentam olhos salientes), rigidez muscular, distonia (contrações musculares involuntárias), atrofia muscular periférica [Sudarsky, L. e Coutinho, P. (1995); Taroni, F. e DiDonato, S. (2004); Takiyama, Y. et al. (1994); Rosenberg, R.N. (1992)] e por vezes parkinsonismo [Subramony, S.H. et al. (2002); Gwinn-Hardy, K. et al. (2001); Lu, C.S. et al. (2004)]. O processo neurodegenerativo envolve zonas neuronais particulares como o estriado, o cerebelo (principalmente os núcleos pontinos e o núcleo dentado), a *substantia nigra* e os núcleos dos nervos cranianos motores [Sudarsky, L. e Coutinho, P. (1995); Durr, A. et al. (1996); Wullner U. et al. (2005); Alves S. et al. (2008b)].

A MJD é causada pela expansão de trinucleótidos CAG consecutivos na região codificante do gene *MJD1*³ localizado no cromossoma 14q32.1 [Kawaguchi, Y. et al. (1994)] - o número de repetições é de cerca de 10-51 em indivíduos normais e de 55-86 em indivíduos com MJD [Cummings, C.J. e Zoghbi, H.Y. (2000); Maciel, P. et al. (2001)]. O gene *MJD1* codifica a ataxina 3, uma proteína cuja função bioquímica está associada à proteólise mediada por ubiquitina [Doss-Pepe, E.W. et al. (2003); Chai, Y. et al. (2004); Burnett, B., Li, F. e Pittman, R.N. (2003); Donaldson, K.M. et al. (2003)]. Outros estudos indicam ainda que a ataxina 3 interage com proteínas reparadoras do DNA⁴ [Wang, G. et al. (2000)] e com histonas, actuando como co-repressor da

¹ MJD - Machado-Joseph disease

² SCA3 - Spinocerebellar ataxia type 3

³ MJD1 - Machado-Joseph disease gene 1

⁴ DNA - deoxyribonucleic acid

transcrição [Li, F. et al. (2002)]. A mutação resulta numa expansão do tracto de poliglutaminas no terminal carboxílico da ataxina 3. A proteína adquire assim propriedades citotóxicas, iniciando uma cascata de mecanismos moleculares que culminam na ocorrência de neurodegeneração em áreas específicas do cérebro. Um dos mecanismos melhor documentados envolve a formação e acumulação de agregados proteicos insolúveis, predominantemente intranucleares [Schmidt, T. et al. (1998); Trottier, Y. et al. (1998); Cancel, G. et al. (1995)]. Quer a ataxina 3 mutante quer a ataxina 3 *wild-type* e ubiquitina são componentes dos agregados em neurónios de doentes com MJD [Paulson, H.L. et al. (1997)], assim como outras proteínas que incluem proteínas *heat-shock* e factores de transcrição [Hayashi, M., Kobayashi, K. e Furuta, H. (2003); Perez, M.K. et al. (1998); Yamada, M. et al. (2001); Uchihara, T. et al. (2001)].

Actualmente não existe nenhum tratamento capaz de alterar a progressão da MJD, que culmina assim em morte prematura. Diversas estratégias terapêuticas podem ser perspectivadas [Nóbrega, C. e Pereira de Almeida, L. (2012)], sendo uma das soluções mais directas o *knockdown* da expressão do gene mutante usando a tecnologia de interferência por RNA⁵ (RNAi⁶) [Fire, A. et al. (1998); Kim, D.H. e Rossi, J.J. (2007)]. O nosso laboratório procedeu assim ao silenciamento génico da ataxina 3 mutante humana através de shRNA⁷ lentiviral, tendo-se verificado uma diminuição acentuada da severidade dos efeitos neurodegenerativos no estriado e no cerebelo de modelos animais da doença [Alves, S. et al. (2008a); Nóbrega, C. et al (2013)]. A tecnologia de RNAi baseada em shRNAs foi também usada com êxito em modelos animais de outras doenças de poliglutaminas: doença de Huntington (HD⁸) [Harper, S.Q. et al. (2005); Rodriguez-Lebron, E. et al. (2005)], esclerose amiotrófica lateral (ALS⁹) [Raoul, C. et al. (2005); Miller, T.M. et al. (2005)] e ataxia espinocerebelar do tipo 1 (SCA1) [Xia, H. et al. (2004)].

Um aspecto importante associado ao silenciamento génico passa pela discriminação entre a proteína *wild-type* e a proteína mutante. Em determinadas doenças de poliglutaminas o silenciamento parcial da proteína *wild-type* pode ser tolerado, como é o caso da estratégia aplicada a um modelo animal da HD, no qual o silenciamento da huntingtina mutante e da huntingtina *wild-type* conduziu a benefícios terapêuticos, designadamente a uma melhoria comportamental dos animais em estudo [Boudreau, R.L. et al. (2009)]. Contudo, foi demonstrado num modelo *in*

⁵ RNA - *ribonucleic acid*

⁶ RNAi - *RNA interference*

⁷ shRNA - *short-hairpin RNA*

⁸ HD - *Huntington disease*

⁹ ALS - *Amyotrophic lateral sclerosis*

vitro da MJD que a ausência da ataxina 3 *wild-type* conduz, em última instância, a uma desorganização do citoesqueleto e aumento da morte celular [Rodrigues, A.J. et al. (2010)]. Tal sugere que para algumas doenças de poliglutaminas será prudente preservar a proteína *wild-type*, enquanto se promove o silenciamento génico da proteína mutante. Tendo em conta o que foi demonstrado, o shRNA desenvolvido no nosso laboratório foi construído no sentido de silenciar de forma selectiva a ataxina 3 mutante, preservando a ataxina 3 *wild-type* [Alves, S. et al. (2008a)]. A especificidade advém do facto da estratégia de silenciamento ter como alvo um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP¹⁰) que está presente em mais de 70% dos doentes com MJD. O SNP está localizado no terminal 3' do tracto de CAG do gene da ataxina 3: na forma *wild-type* tem **G** na posição 987 enquanto que na forma mutante tem **C** nessa posição (**G**⁹⁸⁷GG → **C**⁹⁸⁷GG) [Stevanin, G. et al. (1995); Gaspar, C. et al. (1996)].

Apesar de ter sido demonstrada a eficácia terapêutica do silenciamento génico da ataxina 3 mutante humana por shRNA em modelos animais da MJD [Alves, S. et al. (2008a); Nóbrega, C. et al (2013)], a avaliação da segurança do processo *in vivo* não foi efectuada. Esta avaliação é de extrema importância, tendo em conta os possíveis efeitos citotóxicos decorrentes do próprio processo de silenciamento génico mediado por shRNAs [Rossi, J.J. (2008); Kim, D.H. e Rossi, J.J. (2007)]. Essa toxicidade parece resultar de três aspectos fundamentais: indução da resposta imunitária inata [Bridge, A.J. et al (2003); Hornung, V. et al. (2006)], efeitos *off-target* [Birmingham, A. et al. (2006); Jackson, A.L. et al. (2003); Jackson, A.L. et al. (2006)] e saturação da maquinaria de RNAi endógena [Grimm, D. et al. (2006); Yi, R. et al (2005); Castanotto, D. et al. (2007)]. Importa assim avaliar a potencial toxicidade do processo de silenciamento génico por shRNA para MJD, aplicado no nosso laboratório.

1.2. Mecanismo de RNAi endógeno e mediado por shRNAs

A descoberta do mecanismo de RNAi endógeno, também designado de mecanismo de silenciamento génico pós-transcricional, ocorreu em 1998 por Andrew Fire e Craig C. Mello ao evidenciarem, em *Caenorhabditis elegans*, a possibilidade de

¹⁰ SNP - single nucleotide polymorphism

silenciar selectivamente um gene recorrendo a dsRNAs¹¹ exógenos [Fire, A. et al. (1998)].

O mecanismo de RNAi endógeno é um processo amplamente conservado em termos evolucionários, utilizado pelas células para regular a expressão génica. Tem sido implicado em diversos aspectos do desenvolvimento animal, designadamente a diferenciação, a proliferação e a morte celular, assim como do normal funcionamento fisiológico [Carthew, R.W. e Sontheimer, E.J. (2009)]. Também parece estar envolvido no silenciamento de elementos móveis, como as transposições [Leung, R.K.M. e Whittaker, P.A. (2005)]. Pensa-se ainda que é parte integrante da maquinaria de defesa contra vírus, tendo em conta que há evidências de que diversos miRNAs¹² interceptam e inibem transcriptos virais [Lecellier, C.H. et al (2005), Otsuka, M. et al (2007)]. De forma consistente com isso, sabe-se que os vírus expressam proteínas supressoras do mecanismo de RNAi (RSS¹³) [de Vries, W. e Berkhout, B. (2008)].

O mecanismo de RNAi endógeno inicia-se com a transcrição dos genes que codificam miRNAs em longos transcriptos primários, os pri-miRNAs, que apresentam uma estrutura *stem-loop* flanqueada por regiões *single-stranded* correspondentes aos terminais 5' (com *cap* de 7-metilguanossina) e 3' (com cauda poli-A) (figura 1). A transcrição é feita geralmente pela RNA polimerase II [Davidson, B.L. e McCray Jr., P.B. (2011); Kim, D.H. e Rossi, J.J. (2007); Winter, J. et al (2009)].

Ainda no núcleo, os pri-miRNAs são de seguida clivados na extremidade oposta ao *loop* pela Drosha (RNase III¹⁴), sendo originados precursores dos miRNAs, os pré-miRNAs, que apresentam no terminal 3' um *2-nucleotide overhang*. Para que a Drosha actue é necessário que se forme um complexo enzimático com DGCR8¹⁵ (proteína que liga dsRNAs) que reconhece e estabiliza os pri-miRNAs. O complexo constituído pela Drosha e DGCR8 é conhecido como *microprocessor* [Lee, Y. et al. (2003); Gregory, R. I. et al. (2004); Davidson, B.L. e McCray Jr., P.B. (2011); Kim, D.H. e Rossi, J.J. (2007); Winter, J. et al (2009)].

¹¹ dsRNAs - *double stranded RNAs*

¹² miRNAs - *microRNAs*

¹³ RSS - *RNA silencing suppressor*

¹⁴ RNase III - *ribonuclease III*

¹⁵ DGCR8 - *DiGeorge syndrome critical region gene 8*

Os pré-miRNAs associam-se depois com a exportina5/Ran-GTP¹⁶ que os transporta para o citoplasma. Após a hidrólise da GTP são libertados e interceptados por um novo complexo formado pela Dicer, TRBP¹⁷ e PACT¹⁸. A Dicer (RNase III) reconhece o *2-nucleotide 3' overhang* dos pré-miRNAs (através do seu domínio PAZ¹⁹) e de seguida procede à clivagem do *loop*. As proteínas TRBP e PACT (proteínas que ligam dsRNAs) estabilizam os pré-miRNAs durante o processo. São assim originados *duplexes* de miRNAs com aproximadamente 22 nucleótidos (em ambas as cadeias), que apresentam nas 2 extremidades *2-nucleotide overhangs* [Ma, J., Ye, K. e Patel, D.J. (2004); Lund, E. et al (2004); Yi, R. et al (2003); Davidson, B.L. e McCray Jr., P.B. (2011); Kim, D.H. e Rossi, J.J. (2007); Winter, J. et al (2009)].

Os *duplexes* de miRNAs associam-se posteriormente com a proteína Argonauta (à semelhança da Dicer, esta proteína possui um domínio PAZ que reconhece *2-nucleotide overhangs*), sendo dessa forma incorporados no precursor do complexo RISC²⁰ (pré-RISC). Para que este complexo se torne activo (RISC) uma das cadeias dos *duplexes* tem de ser removida (a *passenger strand*), ficando a outra associada à proteína Argonauta (a *guide strand*, miRNA maduro ou simplesmente miRNA). Se existir elevada complementaridade entre as duas cadeias, a actividade de endonuclease da própria proteína Argonauta é a responsável pela remoção da *passenger strand*. Se a complementaridade for imperfeita, são RNA helicases que separam as duas cadeias e tornam o complexo activo (via mais comum, pois os *duplexes* de miRNAs apresentam frequentemente *mismatches*) [Ma, J., Ye, K. e Patel, D.J. (2004); Davidson, B.L. e McCray Jr., P.B. (2011); Kim, D.H. e Rossi, J.J. (2007); Winter, J. et al (2009)].

Por fim, os miRNAs (nos complexos RISC) reconhecem os mRNAs²¹ alvo. A especificidade do reconhecimento deriva maioritariamente da complementaridade quase total das bases 2-8 do terminal 5' dos miRNAs (região conhecida como *seed region*) com determinada região da 3'UTR²² dos mRNAs. Excepto essa região, o emparelhamento entre os miRNAs e os mRNAs alvo é geralmente parcial. Os miRNAs conduzem assim à repressão da tradução. Posteriormente, o conjunto miRNA-mRNA é transportado para compartimentos citoplasmáticos, denominados de *processing*

¹⁶ GTP - *guanosine triphosphate*

¹⁷ TRBP - *human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein*

¹⁸ PACT - *double-stranded RNA-activated protein kinase-associated activator*

¹⁹ PAZ - *Piwi/Ago/Zwille*

²⁰ RISC - *RNA-induced silencing complex*

²¹ mRNAs - *messenger RNAs*

²² 3' UTR - *3' untranslated regions*

bodies, que promovem a sua degradação [Davidson, B.L. e McCray Jr., P.B. (2011); Kim, D.H. e Rossi, J.J. (2007); Winter, J. et al (2009)].

Por sua vez, os shRNAs são RNAs que apresentam uma estrutura *stem-loop*, mimetizando e seguindo a via típica dos pré-miRNAs, que inclui o transporte pela exportina5/Ran-GTP para o citoplasma, o processamento pela Dicer e a incorporação no complexo pré-RISC, ao associarem-se à proteína Argonauta (figura 1). A *guide strand* proveniente dos shRNAs apresenta geralmente elevada complementaridade com uma determinada região do mRNA alvo, o que faz com que a degradação deste ocorra normalmente por clivagem directa no complexo RISC mediada pela proteína Argonauta. O facto de serem expressos directamente dentro das células, através de vectores virais ou plasmídeos, permite prolongar a duração do silenciamento génico em relação a outras moléculas efectoras, como os siRNAs que são sintetizados *in vitro* [Davidson, B.L. e McCray Jr., P.B. (2011); Kim, D.H. e Rossi, J.J. (2007); Rossi, J.J. (2008)].

Os vectores virais incluem lentivírus, adenovírus e AAVs²³ e são capazes de entrar nas células de uma forma mais eficiente do que os plasmídeos (que geralmente necessitam de veículos de transfecção). Os lentivírus permitem uma transcrição estável e permanente dos shRNAs, devido à integração do seu genoma no do hospedeiro. Tal possibilita também que o seu uso se expanda a todas as células, com ou sem capacidade de divisão. Contudo, a integração cromossómica pode levar à activação de oncogenes ou à inactivação de genes fundamentais à célula. Por outro lado, os adenovírus e os AAVs estão associados a uma transcrição mais transiente dos shRNAs, já que o seu genoma permanece episomal. Tendo em conta que o genoma episomal vai sendo perdido ao longo das divisões celulares, o seu uso torna-se assim limitado a células que se dividem lentamente ou que não têm capacidade de divisão. Em relação aos plasmídeos existem diversas abordagens que envolvem ou não a integração cromossómica e que permitem uma transcrição eficiente dos shRNAs. Para a entrega dos plasmídeos usam-se geralmente os veículos de transfecção utilizados para os siRNAs, como lipossomas e nanopartículas [Manjunath, N. et al (2009); Rossi, J.J. (2008)].

²³ AAVs - *adeno-associated viruses*

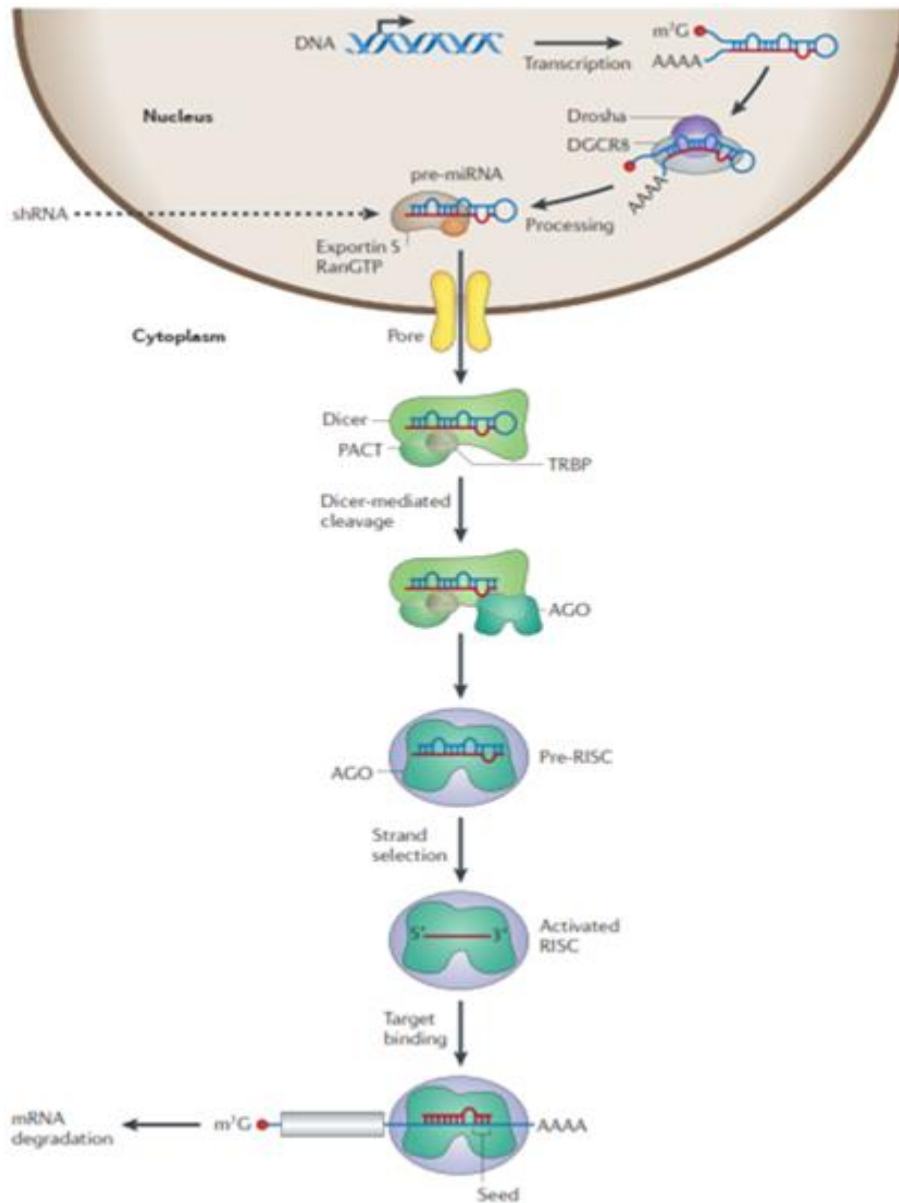


Figura 1 – Mecanismo de RNAi endógeno e mediado por shRNAs. O mecanismo de RNAi endógeno tem início com a transcrição dos genes que codificam miRNAs, geralmente pela RNA polimerase II, em longos transcritos primários, os pri-miRNAs, que apresentam uma estrutura *stem-loop*. Os pri-microRNAs são posteriormente clivados na extremidade oposta ao *loop* pela Drosha, sendo originados precursores dos miRNAs, os pré-miRNAs. Este processo de clivagem é assistido por DGCR8, que juntamente com a Drosha formam um complexo conhecido como *microprocessor*. Os pré-miRNAs, que apresentam ainda uma estrutura *stem-loop*, associam-se depois com a exportina5/Ran-GTP que os transporta para o citoplasma. Após a hidrólise da GTP são libertados e interceptados por um novo complexo formado pela Dicer, TRBP e PACT, no qual a Dicer promove a clivagem do *loop*. São assim originados *duplexes* de miRNAs com aproximadamente 22 nucleótidos (em ambas as cadeias). Os *duplexes* de microRNAs associam-se posteriormente à Argonauta dentro do complexo pré-RISC, que se torna activo após a selecção de uma das cadeias dos *duplexes* (a *guide strand*, miRNA maduro ou simplesmente miRNA). Por fim, os miRNAs reconhecem os mRNAs alvo. A especificidade do reconhecimento deriva maioritariamente da complementaridade quase total das bases 2-8 do terminal 5' dos miRNAs (região conhecida como *seed region*) com determinada região da 3'UTR dos mRNAs. Fora essa região a complementaridade é apenas parcial. Ocorre assim repressão da tradução e posterior degradação do

mRNA alvo em compartimentos citoplasmáticos, denominados de *processing bodies*. Por sua vez, os shRNAs são RNAs que apresentam uma estrutura *stem-loop*, mimetizando e seguindo a via típica dos pré-miRNAs. A *guide strand* proveniente dos shRNAs tem geralmente elevada complementaridade com uma determinada região do mRNA alvo, levando a que a degradação deste ocorra normalmente por clivagem directa mediada pela proteína Argonauta [imagem adaptada de Davidson, B.L. e McCray Jr., P.B. (2011)].

1.3. Toxicidade associada ao mecanismo de RNAi mediado por shRNAs

Actualmente, a tecnologia de RNAi é uma ferramenta amplamente usada no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e no estudo funcional dos genes [Davidson, B.L. e McCray Jr., P.B. (2011); Kim, D.H. e Rossi, J.J. (2007)]. Contudo, apesar do seu potencial ser largamente reconhecido, a sua eficácia tem sido comprometida pelo aparecimento de efeitos citotóxicos que culminam em disfunção celular e até a morte dos animais em estudo, tal como verificaram Grimm e colegas num estudo *in vivo* direccionado para o fígado [Grimm, D. et al. (2006)]. Essa toxicidade está directamente associada às moléculas efectoras de RNAi (os shRNAs e os siRNAs) e resulta de três aspectos essenciais: indução da resposta imunitária inata [Bridge, A.J. et al (2003); Hornung, V. et al. (2006)] efeitos *off-target* [Birmingham, A. et al. (2006); Jackson, A.L. et al. (2003); Jackson, A.L. et al. (2006)] e saturação da maquinaria de RNAi endógena [Grimm, D. et al. (2006); Yi, R. et al (2005); Castanotto, D. et al. (2007)].

1.3.1. Indução da resposta imunitária inata

O sistema imunitário inato constitui a primeira barreira de defesa dos mamíferos contra a invasão e proliferação de agentes patogénicos como vírus, bactérias e fungos. Inclui as barreiras fisiológicas, o sistema complemento e uma complexa gama de sensores de reconhecimento (PRRs²⁴) que reconhecem

²⁴ PRRs - *pattern-recognition receptors*

componentes estruturais dos invasores (PAMPs²⁵) [Iwasaki, A. e Medzhitov, R. (2010); Kumar, H., Kawai, T. e Akira S. (2009)].

Os PAMPs representam características relativamente invariáveis dos agentes patogénicos e incluem macromoléculas como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Os PRRs que os reconhecem podem ser classificados em três categorias de acordo com o local onde actuam: PRRs transmembranares, PRRs citosólicos e PRRs extracelulares ou segregados. À excepção dos PRRs extracelulares, a interacção entre os PRRs e os respectivos PAMPs desencadeia vias de sinalização intracelular que levam à expressão de citocinas pró-inflamatórias (ex. IFN²⁶ tipo I, IL-1 β ²⁷ e TNF- α ²⁸) [Iwasaki, A. e Medzhitov, R. (2010); Kumar, H., Kawai, T. e Akira S. (2009)].

Alguns estudos têm constatado que os shRNAs induzem a expressão de IFN tipo I, sendo a sua origem atribuída à activação de um PRR citosólico conhecido como RIG-I²⁹. A RIG-I parece reconhecer preferencialmente *guide strands* provenientes dos shRNAs com o grupo 5'-PPP desprotegido. O grupo 5'-PPP desprotegido resulta da transcrição por RNA polimerases que não executam a *cap* de 7-metilguanosina [Bridge, A.J. et al (2003); Hornung, V. et al. (2006)]. É o caso da RNA polimerase III, que é geralmente requerida na transcrição endógena dos shRNAs, uma vez que a transcrição destes está vulgarmente associada a promotores como o U6 ou o H1 que são reconhecidos pela RNA polimerase III. O reconhecimento da *guide strand* proveniente dos shRNAs parece ser feito de uma forma independente da sequência [Manjunath, N. et al (2009); Rossi, J.J. (2008)].

1.3.2. Efeitos off-target

Os shRNAs podem também induzir toxicidade ao produzirem, de forma indesejada, efeitos *off-target*. Os efeitos *off-target* são perturbações que resultam do silenciamento não intencional de genes pelos shRNAs, devido ao facto destes se comportarem como microRNAs. O mecanismo relaciona-se com o facto das bases 2-8 do terminal 5' da *guide strand* proveniente dos shRNAs se comportarem como *seed region*, interagindo de forma específica com regiões da 3'UTR de inúmeros mRNAs, o

²⁵ PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*

²⁶ IFN - *interferon*

²⁷ IL-1 β - *interleukin-1 beta*

²⁸ TNF- α - *tumor necrosis factor alpha*

²⁹ RIG-I - *retinoic acid-inducible protein 1*

que conduz ao seu silenciamento e degradação. Deste modo, os efeitos off-target são um dos maiores desafios da tecnologia de RNAi, tendo em conta o reduzido número de bases necessárias para um reconhecimento selectivo de mRNAs alvo (sendo a restante hibridização parcial). Torna-se assim importante fazer um *screening* da homologia da *guide strand* com a região 3' UTR dos mRNAs presentes no modelo *in vitro/in vivo* em estudo [Birmingham, A. et al. (2006); Jackson, A.L. et al. (2003); Jackson, A.L. et al. (2006)].

Os efeitos *off-target* podem ser ainda mais imprevisíveis se pensarmos que ambas as cadeias provenientes dos shRNAs, após o processamento pela Dicer, podem agir como *guide strand*, se não se garantir a funcionalidade da cadeia que se deseja. O *design* inicial do shRNA é assim de extrema importância, devendo ser assegurado que o terminal 5' da cadeia desejada é menos estável termodinamicamente do que o terminal 3'. Este aspecto parece ser determinante na selecção da cadeia que fica associada com a proteína Argonauta no complexo RISC [Tomari, Y. et al (2004); Hoerter, J.A.H. e Walter. N.G. (2007)].

1.3.3. Saturação da maquinaria de RNAi endógena

Níveis elevados de transcrição de shRNAs podem causar toxicidade ao desregularem, de forma indiscriminada, diversos microRNAs por saturação de componentes chave da via de RNAi endógena. Sendo os níveis de transcrição um factor determinante, a toxicidade está intimamente relacionada com o tipo de promotor usado para a transcrição, como é o caso do promotor U6 que é reconhecidamente um promotor forte, assim como com a dose administrada [Manjunath, N. (2009)].

Num estudo *in vivo* direccionado para o fígado, a elevada transcrição de shRNA (transcrição associada ao promotor U6) conduziu a disfunção hepática e à morte de animais em estudo, tendo sido a toxicidade relacionada com a diminuição significativa dos níveis de diversos microRNAs, devido à saturação da exportina5 pelo shRNA [Grimm, D. et al. (2006)]. De forma consistente com o verificado, Yi e colegas e Castanotto e colegas mostraram e que a sobre-expressão da exportina5 pode aliviar a competição com miRNAs [Yi, R. et al (2005); Castanotto, D. et al. (2007)]. Outro estudo constatou uma acumulação de shRNA (transcrição associada ao promotor U6) quer no núcleo quer no citoplasma, indiciando que tanto a exportina5 como a Dicer podiam estar saturadas [Boudreau, R.L., Monteys, A.M. e Davidson, B.L. (2008)]. An e colegas constataram que a elevada transcrição de shRNA (transcrição associada ao promotor U6) conduziu à ocorrência de toxicidade em culturas de linfócitos T humanos. A troca do promotor U6 pelo promotor H1, que é mais fraco, no modelo lentiviral usado

diminuiu significativamente a toxicidade, sugerindo a saturação de componentes chave do mecanismo de RNAi endógeno como a causa mais provável para a toxicidade verificada [An, D.S. et al (2006).].

1.4. Objectivos do projecto

Este projecto teve como objectivo central avaliar a potencial toxicidade do shRNA usado para o silenciamento génico da ataxina 3 mutante humana, cuja eficácia em diminuir a neuropatologia da MJD já foi comprovada em modelos animais da doença [Alves, S. et al. (2008a); Nóbrega, C. et al (2013)]. Com esse propósito examinou-se a integridade neuronal (através da análise imunohistoquímica da expressão de dois marcadores neuronais, DARPP-32³⁰ [Svenningsson, P. et al (2004), Yger, M. e Girault, J. (2011)] e NeuN³¹ [Kim, K.K., Adelstein, R.S. e Kawamoto, S. (2009)], e da análise histoquímica com violeta de cresil [Kádár, A. et al (2009); Garman, R.H. (2011)]), a resposta microglial (através da análise imunohistoquímica da expressão de um marcador microglial, iba-1³² [Ito, D. et al (1998)]) e a resposta astrocítica (através da análise imunohistoquímica e da análise por *western blot* da expressão de um marcador astrocítico, GFAP³³ [Eng, L.F. e Ghirnikar, R.S. e Lee, Y.L. (2000)]) no estriado de murganhos *wild-type* adultos em quatro *time points* após a injeção dos lentivírus: 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas e 5 meses.

³⁰ DARPP-32 - dopamine- and cAMP (cyclic adenosine monophosphate)-regulated phosphoprotein of 32kDa

³¹ NeuN - neuron-specific nuclear protein

³² Iba-1 - ionized calcium-binding adaptor molecule 1

³³ GFAP - glial fibrillary acidic protein

Capítulo 2

MATERIAL E MÉTODOS

2. Material e Métodos

2.1. Animais

No estudo foram utilizados murganhos *wild-type* adultos da estirpe C57BL/6, com 6 semanas de idade e um peso aproximado de 20g. Os animais foram mantidos a temperatura constante (22 ± 2 °C), com ciclos claro/escuro de 12h e com comida e água fornecidas *ad libitum*. Foi aplicada a Directiva 86/609/CEE, do Conselho da Comunidade Europeia de 24 de Novembro de 1986, que estabelece as normas mínimas relativas à protecção dos animais utilizados para fins experimentais e científicos, transposta para a ordem jurídica interna pelo Decreto-Lei 129/92 de 6 de Junho, regulamentado pela Portaria 1005/92 de 23 Outubro.

2.2. Lentivírus

Dois lentivírus derivados de HIV-1³⁴ foram usados - o LV-nlsLacZ-shmutatx3 e o LV-eGFP (figura 2) – tendo sido produzidos em células HEK 273T³⁵ através de um sistema de quatro plasmídeos, como descrito previamente [de Almeida, L.P. et al (2002)]. O primeiro é um lentivírus que codifica o shRNA³⁶ para o silenciamento da ataxina 3 mutante humana (shmutatx3), cuja eficácia em diminuir a neuropatologia da doença de Machado-Joseph (MJD³⁷) foi já anteriormente comprovada em modelos animais da doença [Alves, S. et al. (2008a); Nóbrega, C. et al (2013)]. O segundo é um lentivírus controlo sem efeito terapêutico. O gene do shmutatx3 está associado ao promotor H1. Para seguir a eficácia do processo de transdução, os lentivírus possuem genes-repórter: no caso do LV-eGFP temos o gene eGFP³⁸, que codifica uma variante da GFP otimizada geneticamente para expressão em células de mamíferos e para que seja mais brilhante [Heim, R., Cubitt, A.B. e Tsien, R.Y. (1995)], e no caso do LV-nlsLacZ-shmutatx3 temos o gene nlsLacZ³⁹, que codifica uma variante da β -galactosidase com

³⁴ HIV-1 - *human immunodeficiency virus type 1*

³⁵ HEK 273T - *human embryonic kidney 293T cell line*

³⁶ shRNA - *short-hairpin RNA (ribonucleic acid)*

³⁷ MJD - *Machado-Joseph disease*

³⁸ eGFP - *enhanced green fluorescent protein*

³⁹ nlsLacZ – *gene encoding β -galactosidase tagged with nuclear location signal*

peptídeo sinal para localização nuclear [Bonnerot, C. et al (1987)]. Ambos os genes-repórter estão associados ao promotor PGK⁴⁰.



Figura 2 – Diagrama dos lentivírus usados - LV-nlsLacZ-shmutatx3 e LV-eGFP. O LV-nlsLacZ-shmutatx3 é um lentivírus que codifica o shRNA para o silenciamento da ataxina 3 mutante humana (shmutatx3) e o LV-eGFP é um lentivírus controlo sem efeito terapêutico. O gene do shmutatx3 está associado ao promotor H1. Para seguir a eficácia do processo de transdução, os lentivírus possuem genes-repórter: no caso do LV-eGFP temos o gene eGFP e no caso do LV-nlsLacZ-shmutatx3 temos o gene nlsLacZ (no diagrama os genes aparecem designados de forma simplificada – GFP e LacZ, respectivamente). Ambos os genes-repórter estão associados ao promotor PGK. LTR - *long terminal repeat*, WPRE - *Woodchuck hepatitis virus post-transcription regulatory element*, TRE - *tetracycline response element*, SIN - *self-inactivating*, WHV - *woodchuck hepatitis virus (post-transcription regulatory element)*.

O shmutatx3 foi construído para ter como alvo específico um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP⁴¹) - $G^{987}GG \rightarrow C^{987}GG$ - que está presente em mais de 70% dos doentes com MJD [Stevanin, G. et al. (1995); Gaspar, C. et al. (1996)]. O gene do shmutatx3 tem a seguinte sequência: 5' - CTAGTTTCCAAAAAGCAGCAGC⁹⁸⁷GGGAC CTATCTCTTGAAGATAGGTCCCGCTGCTGCTGGGGATCTGTGGTCTCATACAGAAC - 3' (o sublinhado corresponde à *guide strand* em formato DNA) [Alves, S. et al. (2008a)].

2.3. Procedimento cirúrgico

Os murganhos foram anestesiados com uma mistura de quetamina (75mg/kg) e xilazina (10mg/kg), por via intraperitoneal. Uma vez imobilizados no aparelho estereotáxico, fez-se uma incisão na parte superior do crânio dos animais com um

⁴⁰ PGK - *phosphoglycerate kinase*

⁴¹ SNP - *single nucleotide polymorphism*

bisturi, de modo a expor o bregma (local anatómico onde a sutura coronal é intersectada pela sutura sagital). Através de um pequeno orifício feito com um broca eléctrica, os animais foram injectados no estriado unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 (no hemisfério direito, permanecendo o hemisfério esquerdo não injectado como controlo interno; 1µL, 400.000ng p24/mL) ou bilateralmente com LV-eGFP (no hemisfério direito; 1µL, 400.000ng p24/mL) e com PBS⁴² (no hemisfério esquerdo; 1µL, pH 7,4) (figura 3), de acordo com as seguintes coordenadas: antero-posterior +0,6mm, médio-lateral ±1,8mm e dorso-ventral -3,3mm. As injeções foram feitas com uma seringa Hamilton (agulha 34G), a fluxo constante (0,25µL/min) através de um injector automático. A agulha foi deixada no local durante 5min adicionais e depois retirada com cuidado, de modo a permitir uma difusão eficiente e a evitar refluxo. Após as injeções, as feridas cirúrgicas foram suturadas.

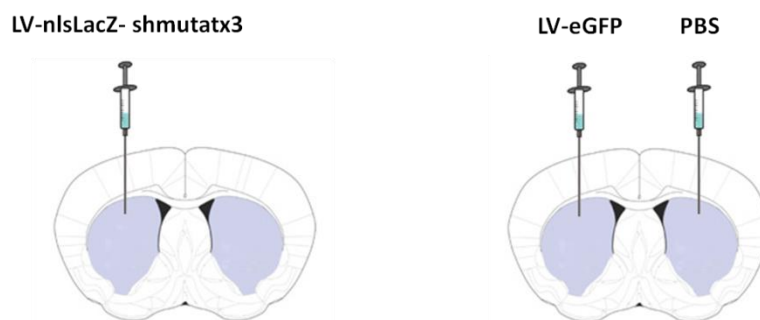


Figura 3 – Representação ilustrativa das injeções estriatais efectuadas. Os animais foram injectados no estriado unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 (no hemisfério direito, permanecendo o hemisfério esquerdo não injectado como controlo interno) ou bilateralmente com LV-eGFP (no hemisfério direito) e com PBS (no hemisfério esquerdo).

2.4. Amostras para imunohistoquímica/histoquímica

Um grupo de murganhos foi sacrificado com o intuito de obter amostras de tecido para imunohistoquímica/histoquímica. Esses sacrifícios ocorreram às 2 semanas [animais injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4, animais

⁴² PBS - phosphate buffered saline

injectados bilateralmente com LV-eGFP e com PBS – n=3], 4 semanas [animais injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3, animais injectados bilateralmente com LV-eGFP e com PBS– n=3], 8 semanas [animais injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4, animais injectados bilateralmente com LV-eGFP e com PBS – n=3] e 5 meses [animais injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4, animais injectados bilateralmente com LV-eGFP e com PBS – n=3] após as injeções.

Os animais receberam uma dose letal de mistura de quetamina (75mg/kg) e xilazina (10mg/kg), por via intraperitoneal, e de seguida foram perfundidos através do ventrículo esquerdo com cerca de 100mL de 4% PFA⁴³ em PBS (pH 7,4), a 4°C, para fixação dos tecidos. Os cérebros foram removidos, colocados em solução de perfusão durante 48h, a 4°C, e depois em solução crioprotectora de 25% sacarose em PBS durante 48h, a 4°C. Após congelamento a -80°C, secções coronais de estriado com 20µm foram obtidas usando um crióstato, recolhidas para *multiwells* de 48 poços com PBS contendo 0.12 µmol/L azida de sódio e armazenadas a 4°C, até se realizar o procedimento imunohistoquímico/histoquímico.

2.5. Imunohistoquímica/histoquímica

O procedimento imunohistoquímico/histoquímico foi realizado em séries de secções de estriado que distam 160µm entre si.

2.5.1. Imunohistoquímica

O procedimento imunohistoquímico inclui marcações para microscopia de campo claro e para microscopia de fluorescência.

Para microscopia em campo claro, 12 secções/animal em *free-floating* foram incubadas em solução de fenilhidrazina (1:1000) em PBS (pH 7,4), para inibição das peroxidases endógenas, durante 30min, a 37°C. Após 3 lavagens de 10min em PBS, procedeu-se à incubação das secções em solução de bloqueio (PBS, 0,1% Triton X-100,

⁴³ PFA - *paraformaldehyde*

10% NGS⁴⁴) durante 1h, à temperatura ambiente, em agitação moderada, e de seguida em solução de bloqueio com os anticorpos primários anti-DARPP-32⁴⁵ (1:1000, anticorpo policlonal produzido em coelho, Millipore) ou anti-NeuN⁴⁶ (1:1000, anticorpo policlonal produzido em coelho, Millipore) durante a noite, a 4°C, em agitação moderada. Após 3 lavagens, as secções foram incubadas em solução de bloqueio com os anticorpos secundários biotinilados anti-imunoglobulina de coelho (1:200, Vector Laboratories) durante 2h, à temperatura ambiente, em agitação moderada. Posteriormente procedeu-se a novas lavagens e à incubação das secções em solução de avidina conjugada com peroxidase biotinilada (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) em PBS durante 30min, à temperatura ambiente, em agitação moderada. Uma vez lavadas as secções, fez-se a revelação com uma solução de DAB⁴⁷ (Peroxidase Substrate Kit DAB, Vector Laboratories) em água Milli-Q. A DAB é um substrato da peroxidase e a sua degradação origina um composto de cor acastanhada. Por fim montaram-se as secções em lâminas gelatinadas, desidrataram-se com um gradiente de etanol, passaram-se por uma solução de xileno e cobriram-se com meio de montagem Eukitt (Sigma). Imagens das secções foram adquiridas num microscópio Zeiss PALM Laser Microdissection (Carl Zeiss MicroImaging).

Uma quantificação do volume de perda de DARPP-32 e de NeuN após as injecções foi feita através da fórmula: $\text{volume} = d(a_1+a_2+a_3 \dots)$, onde d é a distância entre as secções em série (160 μm) e $a_1, a_2, a_3 \dots$ são as áreas de perda de DARPP-32 e de NeuN em cada uma das 12 secções analisadas. As áreas de perda de DARPP-32 e de NeuN foram determinadas com recurso ao *software* Image J. O volume foi expresso em mm^3 . A análise estatística foi efectuada através do *software* GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

Para microscopia de fluorescência, 8 secções/animal em *free-floating* foram incubadas na mesma solução de bloqueio referida anteriormente e em seguida em solução de bloqueio com os anticorpos primários anti-iba-1⁴⁸ (1:1000, anticorpo policlonal produzido em coelho, Wako) ou anti-GFAP⁴⁹ (1:1000, anticorpo monoclonal produzido em murganho, Cell Signaling), nas mesmas condições. No caso dos animais injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 foi feita dupla marcação com anti- β -galactosidase (1:1000, anticorpo monoclonal produzido em murganho, Cell Signaling – com anti-iba-1; 1:1000, anticorpo policlonal produzido em coelho,

⁴⁴ NGS – normal goat serum

⁴⁵ DARPP-32 - dopamine- and cAMP (cyclic adenosine monophosphate)-regulated phosphoprotein of 32KDa

⁴⁶ NeuN - neuron-specific nuclear protein

⁴⁷ DAB - 3,3-diaminobenzidine

⁴⁸ iba-1 - ionized calcium-binding adaptor molecule 1

⁴⁹ GFAP - glial fibrillary acidic protein

Invitrogen – com anti-GFAP). Após as lavagens procedeu-se à incubação das secções em solução de bloqueio com os anticorpos secundários anti-imunoglobulina de coelho Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 594 e/ou de murganho Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 594 (1:200, Life Technologies), consoante os anticorpos primários utilizados e a presença de eGFP, nas mesmas condições, ao abrigo da luz. Após novas lavagens, as secções foram incubadas em solução de DAPI⁵⁰ (1:5000, Sigma) em PBS, para evidenciar o núcleo, durante 10min, à temperatura ambiente, em agitação moderada, ao abrigo da luz. Uma vez lavadas, montaram-se as secções em lâminas gelatinadas e cobriram-se com meio de montagem Mowiol (Sigma). Imagens das secções foram adquiridas num microscópio Zeiss PALM Laser Microdissection (Carl Zeiss MicroImaging).

2.5.2. Histoquímica

O procedimento histoquímico foi feito com violeta de cresil (microscopia de campo claro). 8 secções/animal pré-montadas em lâminas gelatinadas foram incubadas em solução de violeta de cresil, previamente aquecida a 60°C, durante 10min. De seguida passaram-se as secções em água Milli-Q, desidrataram-se com um gradiente de etanol (também para clarear), passaram-se por uma solução de xileno e cobriram-se com meio de montagem Eukitt (Sigma). Imagens das secções foram adquiridas num microscópio Zeiss PALM Laser Microdissection (Carl Zeiss MicroImaging).

2.6. Amostras para *western blot*

Um outro grupo de murganhos foi sacrificado com o intuito de obter amostras de tecido para *western blot*. Esses sacrifícios ocorreram às 2 semanas [animais injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3, animais injectados bilateralmente com LV-eGFP e com PBS – n=4], 4 semanas [animais injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3, animais injectados bilateralmente com LV-eGFP e com PBS– n=4], 8 semanas [animais injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3, animais injectados bilateralmente com LV-eGFP e com

⁵⁰ DAPI - 4,6-diamino-2-phenylindole

PBS – n=4] e 5 meses [animais injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=5, animais injectados bilateralmente com LV-eGFP e com PBS – n=4] após as injeções.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. De seguida removeram-se os cérebros, fizeram-se dois cortes coronais que incluem toda a região estriatal e dissecou-se cada um dos estriados (do hemisfério direito e esquerdo) através de punção com uma caneta Harris Uni-Core de 2mm de diâmetro (Ted Pella, Inc), sobre gelo seco. Cada estriado foi depois dividido em duas amostras distintas: uma para análise proteica (*western blot*) e outra para análise do RNA (PCR⁵¹), que será realizada numa fase posterior. As amostras para *western blot* foram colocadas em *ependorfs* com 200µL de solução de lise RIPA⁵² [50mM Tris-HCl (pH 8), 150mM NaCl, 1% NP-40⁵³, 0,5% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS⁵⁴] contendo inibidores de proteases (Roche) (por sua vez, as amostras para PCR foram congeladas a -80°C em *ependorfs*). Posteriormente homogeneizaram-se as amostras para *western blot* por sonicação durante 5seg, com arrefecimento em gelo. Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000G, durante 15min, a 4°C, e os sobrenadantes congelados a -20°C.

2.6.1. Concentração proteica

A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (Bradford Protein Assay, Bio-Rad), que utiliza a BSA⁵⁵ como proteína padrão.

2.7. Western blot

Géis de SDS-PAGE⁵⁶ (4% *stacking*, 12% *running*) foram feitos de acordo com o procedimento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), usando 40µg de proteína. As amostras estriatais de cada uma das injeções efectuadas foram corridas individualmente com as amostras estriatais do hemisfério não injectado (controlo

⁵¹ PCR – *polymerase chain reaction*

⁵² RIPA - *radio immunoprecipitation assay buffer*

⁵³ NP-40 - *nonidet P-40*

⁵⁴ SDS - *sodium dodecyl sulfate*

⁵⁵ BSA - *bovine serum albumin*

⁵⁶ SDS-PAGE - *SDS - polyacrylamide gel electrophoresis*

interno), havendo assim quatro géis distintos por *time point*. Sucedeu-se a electrotransferência das proteínas para membranas PVDF⁵⁷ (GE Healthcare), seguindo protocolos padrão. As membranas foram depois incubadas em solução de bloqueio [TBS⁵⁸ (pH 7,6), 0.1% Tween 20, 5% leite], durante 1h, à temperatura ambiente, em rotação moderada, e de seguida em solução de bloqueio com o anticorpo primário anti-GFAP (1:1000, anticorpo monoclonal produzido em murganho, Cell Signaling) durante a noite, a 4°C, em rotação moderada. Após 3 lavagens de 10min em TBS-T (TBS, 0.1% Tween 20) procedeu-se à incubação das membranas em solução de bloqueio com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de murganho conjugado com fosfatase alcalina (1:10000, Amersham Biosciences) durante 2h, à temperatura ambiente, em rotação moderada. Sucederam-se novas lavagens das membranas, a revelação das bandas com ECF, o substrato da fosfatase alcalina, e a aquisição de imagens destas no VersaDoc (Bio-Rad). As membranas foram posteriormente lavadas e reincubadas com anti- β -actina (1:5000, anticorpo monoclonal produzido em murganho, Sigma), repetindo-se o processo descrito. As membranas com as amostras estriatais das injeções dos lentivírus foram ainda reincubadas com anti-GFP (1:1000, anticorpo monoclonal produzido em murganho, Roche), no caso do LV-eGFP, e com anti- β -galactosidase (1:1000, anticorpo monoclonal produzido em murganho, Cell Signaling), no caso do LV-nlsLacZ-shmutatx3.

Uma análise densitométrica das bandas correspondentes ao GFAP e à β -actina (para normalização) foi feita com o *software* Image J. Os níveis de expressão de GFAP após as injeções foram assim quantificados relativamente ao hemisfério não injectado. A análise estatística foi efectuada com recurso ao *software* GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

⁵⁷ PVDF - polyvinylidene difluoride

⁵⁸ TBS - Tris buffered saline

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. Resultados e Discussão

3.1. Resultados preliminares

Previamente, o nosso laboratório demonstrou a eficácia terapêutica do silenciamento gênico da ataxina 3 mutante humana mediado por shRNA⁵⁹, usando lentivírus, no estriado e cerebelo de modelos animais da doença de Machado-Joseph (MJD⁶⁰) [Alves, S. et al. (2008a); Nóbrega, C. et al (2013)]. Tendo em conta as evidências crescentes de que o processo de silenciamento gênico mediado por shRNAs pode conduzir a efeitos citotóxicos [Rossi, J.J. (2008); Kim, D.H. e Rossi, J.J. (2007)], decidiu-se averiguar a segurança da estratégia terapêutica anteriormente testada. Procedeu-se assim a uma avaliação da potencial toxicidade do shRNA lentiviral usado para o silenciamento da ataxina 3 mutante humana (shmutatx3), no estriado de murganhos. Para tal foram analisados três aspectos: a integridade neuronal, a resposta microglial e a resposta astrocítica.

Utilizaram-se murganhos *wild-type* adultos que foram injectados no estriado unilateralmente com lentivírus que codificam o shmutatx3 (LV-nlsLacZ-shmutatx3; no hemisfério direito, permanecendo o hemisfério esquerdo não injectado como controlo interno) ou bilateralmente com lentivírus sem efeito terapêutico (LV-eGFP; no hemisfério direito) e com PBS⁶¹ (no hemisfério esquerdo). Cada estriado dos murganhos permite assim avaliar uma condição distinta. Para seguir a eficácia do processo de transdução, os lentivírus usados possuem genes-repórter: no caso do LV-eGFP temos o gene eGFP⁶², que codifica uma variante da GFP otimizada geneticamente para expressão em células de mamíferos e para que tenha maior intensidade de fluorescência [Heim, R., Cubitt, A.B. e Tsien, R.Y. (1995)], e no caso do LV-nlsLacZ-shmutatx3 temos o gene nlsLacZ⁶³, que codifica uma variante da β -galactosidase com peptídeo sinal para localização nuclear [Bonnerot, C. et al (1987)] (a não ser que torne oportuno referir, daqui em diante será apenas designada por β -galactosidase). Ambos os genes-repórter estão associados ao promotor PGK⁶⁴. Os animais foram posteriormente sacrificados em quatro *time points* após as injeções: 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas e 5 meses.

⁵⁹ shRNA - *short-hairpin RNA (ribonucleic acid)*

⁶⁰ MJD - *Machado-Joseph disease*

⁶¹ PBS - *phosphate buffered saline*

⁶² eGFP - *enhanced green fluorescent protein*

⁶³ nlsLacZ - *gene encoding β -galactosidase tagged with nuclear location signal*

⁶⁴ PGK - *phosphoglycerate kinase*

Capítulo 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise histoquímica da expressão de eGFP e a análise imunohistoquímica da expressão de β -galactosidase (figura 4) em secções coronais de estriado revela uma expressão estável e crescente dos genes-repórter ao longo do tempo (figura 4 C e D; G e H; K e L; O e P). Para além disso a expressão dos genes-repórter abrange grande parte do estriado (resultado não mostrado). Esses resultados evidenciam um processo de transdução eficiente.

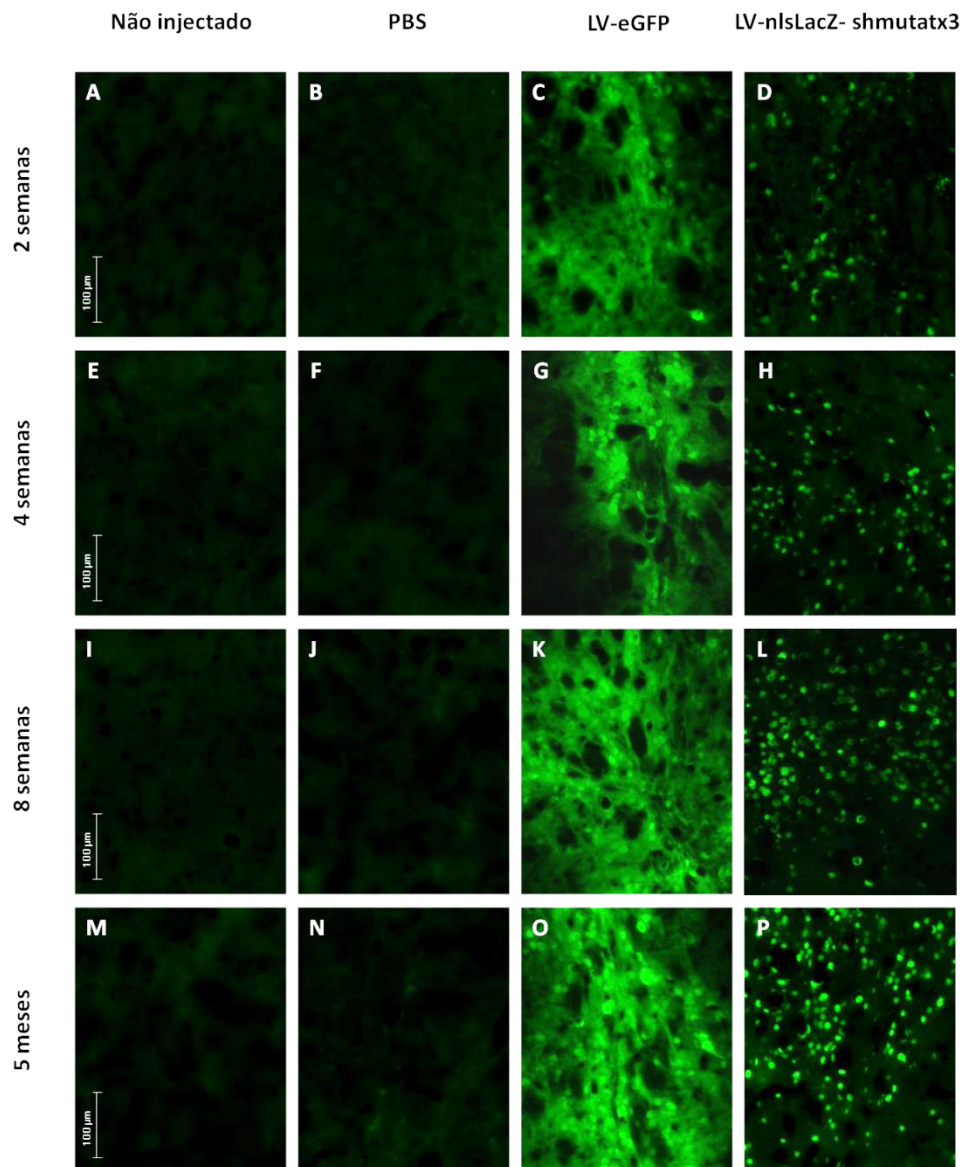


Figura 4 – Análise histoquímica da expressão de eGFP e análise imunohistoquímica da expressão de β -galactosidase. A-P) Imagens representativas da análise histoquímica da expressão de eGFP e da análise imunohistoquímica da expressão de β -galactosidase, por microscopia de fluorescência, em secções coronais de estriado dos murganhos injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 (no hemisfério direito, permanecendo o hemisfério esquerdo não injectado) ou bilateralmente com LV-eGFP

(no hemisfério direito) e com PBS (no hemisfério esquerdo). A eGFP e a β -galactosidase (com peptídeo sinal para localização nuclear) são os produtos de expressão dos genes-repórter usados para seguir a eficiência do processo de transdução: gene eGFP no caso do LV-eGFP e gene nlsLacZ no caso do LV-nlsLacZ-shmutatx3, respectivamente. A análise foi efectuada às 2 semanas [A] não injectado – n=4, B) PBS – n=3, C) LV-eGFP – n=3, D) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4], 4 semanas [E] não injectado – n=3, F) PBS – n=3, G) LV-eGFP – n=3, H) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3], 8 semanas [I] não injectado – n=4, J) PBS – n=3, K) LV-eGFP – n=3, L) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4] e 5 meses [M] não injectado – n=4, N) PBS – n=3, O) LV-eGFP – n=3, P) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4] após as injeções, em 8 secções/animal. Escala = 100 μ m.

As análises referidas foram feitas inicialmente em simultâneo com a análise imunohistoquímica da expressão de um marcador microglial, iba-1⁶⁵ [Ito, D. et al (1998)], ou com a análise imunohistoquímica da expressão de um marcador astrocítico, GFAP⁶⁶ [Eng, L.F. e Ghirnikar, R.S. e Lee, Y.L. (2000)] (resultados em dupla marcação não mostrados), não se tendo verificado expressão dos genes-repórter na microglia ou nos astrócitos. Tendo em conta que a transdução neuronal do LV-nlsLacZ-shmutatx3 já tinha sido verificada anteriormente no nosso laboratório [Alves, S. et al. (2008a)], os resultados indicam um processo de transdução exclusivamente neuronal.

É de realçar ainda que não se registou nenhuma morte após as injeções estereotáxicas. Para além disso, todos os animais no momento em que foram sacrificados apresentavam um peso normal para a idade. Também não se verificaram alterações comportamentais.

3.2. Avaliação da integridade neuronal

Com o objectivo de avaliar a integridade neuronal após as injeções procedeu-se à análise imunohistoquímica da expressão de dois marcadores neuronais, DARPP-32⁶⁷ (figura 5) e NeuN⁶⁸ (figura 6), em secções coronais de estriado. Procedeu-se ainda à análise histoquímica com violeta de cresil (figura 7), um corante usado em tecido nervoso para avaliar a integridade neuronal, sobretudo sinais de neurodegeneração, como picnose (intensa condensação da cromatina) que ocorre em condições

⁶⁵ iba-1 - *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*

⁶⁶ GFAP - *glial fibrillary acidic protein*

⁶⁷ DARPP-32 - *dopamine- and cAMP (cyclic adenosine monophosphate)-regulated phosphoprotein of 32KDa*

⁶⁸ NeuN - *neuron-specific nuclear protein*

apoptóticas ou necróticas. A proteína DARPP-32 é um intermediário fundamental em diversas vias de sinalização neuronais, que incluem as de neurotransmissores como a dopamina e o glutamato, sendo expressa abundantemente nos neurónios espinhosos médios (MSNs⁶⁹) do estriado que compreendem cerca de 95% dos neurónios estriatais. Constitui assim um marcador neuronal particularmente expresso no estriado [Svenningsson, P. et al (2004), Yger, M. e Girault, J. (2011)]. A proteína NeuN é um regulador de *splicing* neuronal, sendo expressa em todos os tipos de neurónios do sistema nervoso. É portanto um marcador neuronal ubíquo [Kim, K.K., Adelstein, R.S. e Kawamoto, S. (2009)]. O violeta de cresil é um corante básico que interage com as moléculas acídicas das células, sobretudo o RNA e o DNA⁷⁰. São assim geralmente marcados dois organelos: o retículo endoplasmático rugoso (RER⁷¹), devido à elevada quantidade de RNA que se concentra nos inúmeros ribossomas que possui (mRNA⁷², tRNA⁷³ e o próprio RNA ribossomal), e o núcleo, devido essencialmente ao DNA. Em condições celulares normais, uma parte do RER aparece evidenciada na forma de aglomerados que apresentam um tom violeta carregado. Esses aglomerados correspondem a locais de elevada densidade de ribossomas e foram denominados de corpos de Nissl. O núcleo, por sua vez, apresenta-se com um tom violeta normal. Em condições apoptóticas ou necróticas é comum verificar-se uma inversão do tom da marcação entre os dois organelos: o núcleo passa a ter um tom violeta carregado, devido à intensa condensação do DNA na cromatina (picnose), e o RER passa a ter um tom violeta normal, por vezes quase translúcido, devido à dissociação dos ribossomas. Devido ao facto dos neurónios serem as células neuronais mais activas em termos de transcrição e expressão genética, a marcação com violeta de cresil evidencia sobretudo os neurónios [Kádár, A. et al (2009); Garman, R.H. (2011)].

Os resultados obtidos na análise imunohistoquímica da expressão de DARPP-32 (figura 5) e de NeuN (figura 6) e os resultados obtidos na análise histoquímica com violeta de cresil (figura 7) são concordantes entre si e serão por isso interpretados em conjunto.

⁶⁹ MSNs - *medium-size spiny neurons*

⁷⁰ DNA - *deoxyribonucleic acid*

⁷¹ RER - *rough endoplasmic reticulum*

⁷² mRNA - *messenger RNA*

⁷³ tRNA - *transfer RNA*

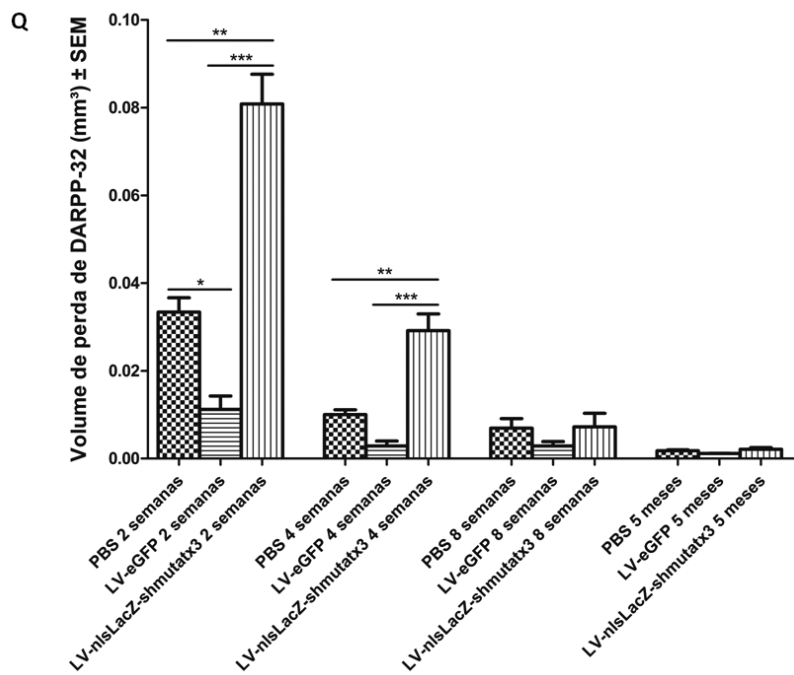
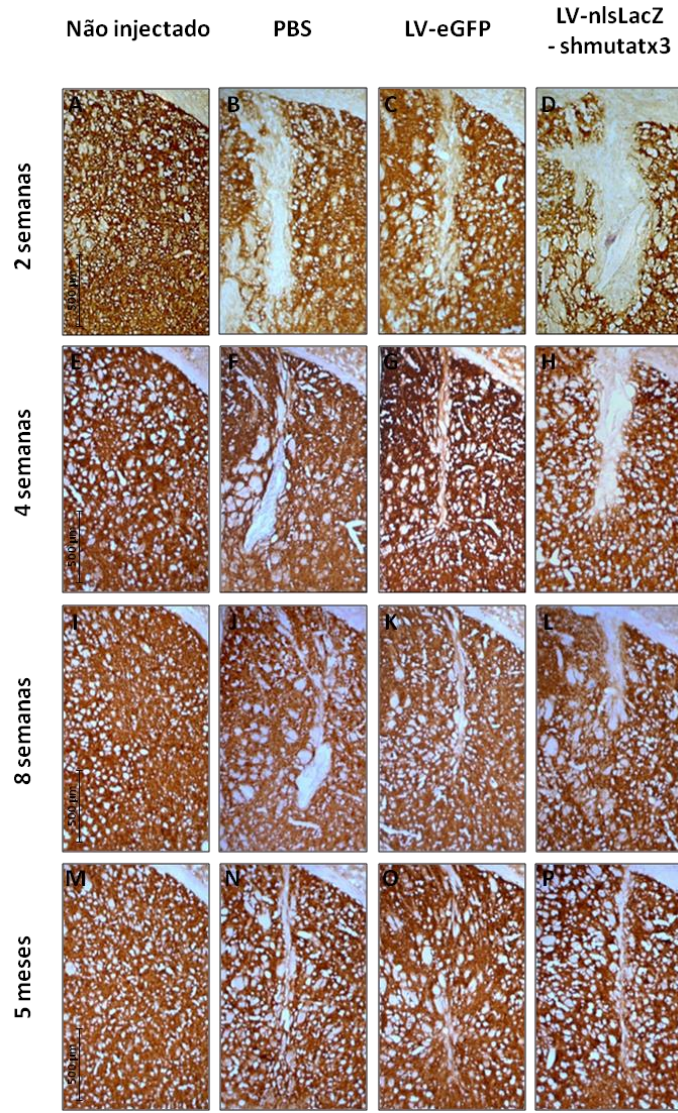
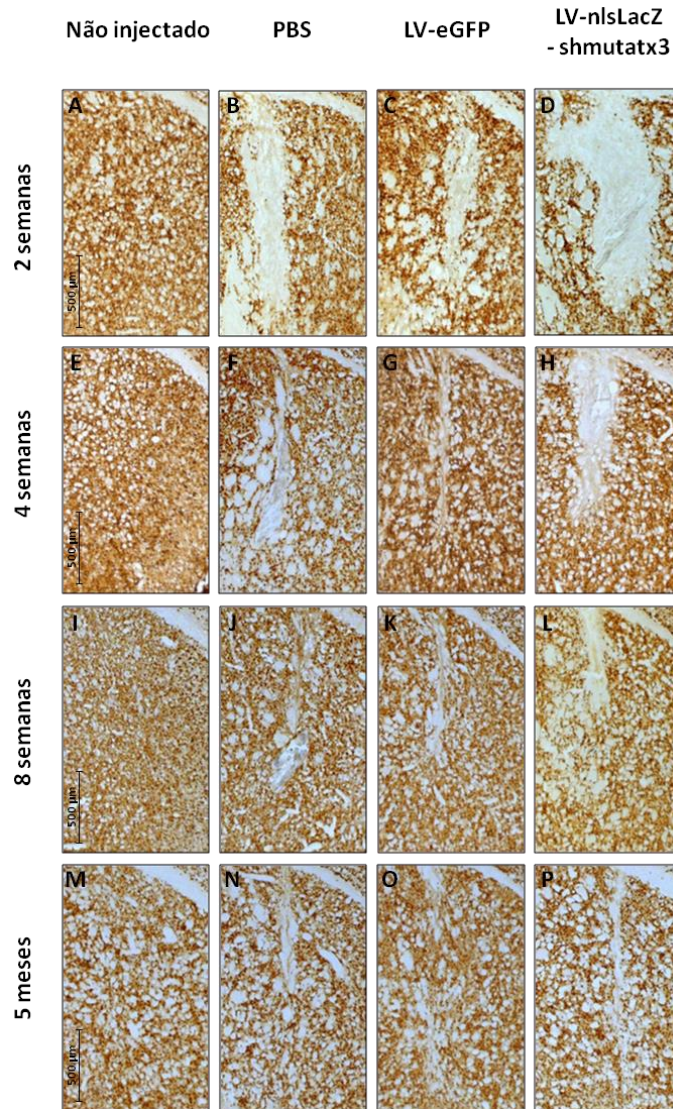


Figura 5 – Análise imunohistoquímica da expressão de DARPP-32. A-P) Imagens representativas da análise imunohistoquímica da expressão de DARPP-32, por microscopia de campo claro, em secções coronais de estriado dos murganhos injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 (no hemisfério direito, permanecendo o hemisfério esquerdo não injectado) ou bilateralmente com LV-eGFP (no hemisfério direito) e com PBS (no hemisfério esquerdo). A análise foi efectuada às 2 semanas [A] não injectado – n=4, B) PBS – n=3, C) LV-eGFP – n=3, D) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4], 4 semanas [E] não injectado – n=3, F) PBS – n=3, G) LV-eGFP – n=3, H) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3], 8 semanas [I] não injectado – n=4, J) PBS – n=3, K) LV-eGFP – n=3, L) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4] e 5 meses [M] não injectado – n=4, N) PBS – n=3, O) LV-eGFP – n=3, P) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4] após as injeções, em 12 secções/animal. Escala = 500µm. Q) Quantificação do volume de perda de DARPP-32 (mm³) após as injeções. Os valores correspondem à média ± SEM. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 [One-way ANOVA, teste Bonferroni (por *time point*)]. SEM – *standard error of the mean*.

Às 2 semanas, os resultados indicam uma neurodegeneração no estriado em todas as injeções, havendo uma perda de imuno-reatividade de DARPP-32 (figura 5 B-D e Q) e de NeuN (figura 6 B-D e Q), bem como picnose (figura 7 B-D). A neurodegeneração associada à injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 é a mais acentuada, seguindo-se a que resulta da injeção de PBS e depois a que resulta da injeção do LV-eGFP (figura 5 B-D e Q; figura 6 B-D e Q; figura 7 B-D). É de notar as diferenças significativas entre as diferentes injeções: LV-nlsLacZ-shmutatx3/LV-eGFP [figura 5 C, D e Q (*** P<0.001); figura 6 C, D e Q (*** P<0.001); figura 7 C e D], LV-nlsLacZ-shmutatx3/PBS [figura 5 B, D e Q (** P<0.01); figura 6 B, D e Q (** P<0.01); figura 7 B e D] e LV-eGFP/PBS [figura 5 B, C e Q (* P<0.05); figura 6 B, C e Q (* P<0.05); figura 7 B, C]. Entre as 4 semanas e os 5 meses verifica-se uma diminuição gradual da neurodegeneração no estriado em todas as injeções (figura 5 F-H; J-L; N-P e Q; figura 6 F-H; J-L; N-P e Q; figura 7 F-H; J-L; N-P), indicando que há uma recuperação funcional da zona lesada. Contudo existem diferenças: no caso da injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 e da injeção de PBS a recuperação funcional é quase completa aos 5 meses (figura 5 N, P e Q; figura 6 N, P e Q; figura 7 N, P) e no caso da injeção do LV-eGFP é quase completa desde as 4 semanas (a partir deste momento é mais lenta) (figura 5 G; K; O e Q; figura 6 G; K; O e Q; figura 7 G; K; O).

O shmutatx3 parece apresentar toxicidade numa fase inicial, uma vez que a neurodegeneração às 2 semanas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 é significativamente superior à que se verifica na injeção do LV-eGFP. Essa toxicidade poderá derivar da indução da resposta imunitária inata [Bridge, A.J. et al (2003), Hornung, V. et al. (2006)], dos efeitos *off-target* [Birmingham, A. et al. (2006), Jackson, A.L. et al. (2003), Jackson, A.L. et al. (2006)] e/ou da saturação da maquinaria

endógena de interferência por RNA (RNAi⁷⁴) [Grimm, D. et al. (2006), Yi, R. et al (2005), Castanotto, D. et al. (2007)]. Apesar da aparente toxicidade inicial, o shmutatx3 não é tóxico a longo prazo, uma vez que há uma recuperação funcional da zona lesada no estriado entre as 4 semanas e os 5 meses na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3, que é quase completa aos 5 meses. Esse aspecto revela que existe uma adaptação neuronal à transcrição constitutiva do shmutatx3.



⁷⁴ RNAi - RNA interference

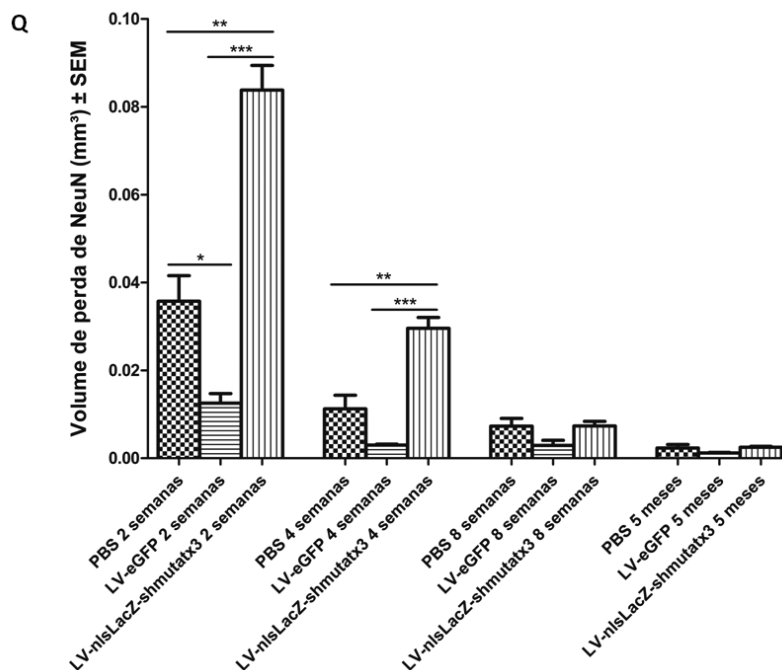


Figura 6 – Análise imunohistoquímica da expressão de NeuN. A-P) Imagens representativas da análise imunohistoquímica da expressão de NeuN, por microscopia de campo claro, em secções coronais de estriado dos murganhos injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 (no hemisfério direito, permanecendo o hemisfério esquerdo não injectado) ou bilateralmente com LV-eGFP (no hemisfério direito) e com PBS (no hemisfério esquerdo). A análise foi efectuada às 2 semanas [A] não injectado – n=4, B) PBS – n=3, C) LV-eGFP – n=3, D) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4], 4 semanas [E] não injectado – n=3, F) PBS – n=3, G) LV-eGFP – n=3, H) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3], 8 semanas [I] não injectado – n=4, J) PBS – n=3, K) LV-eGFP – n=3, L) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4] e 5 meses [M] não injectado – n=4, N) PBS – n=3, O) LV-eGFP – n=3, P) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4] após as injeções, em 12 secções/animal. Escala = 500µm. Q) Quantificação do volume de perda de NeuN (mm³) após as injeções. Os valores correspondem à média ± SEM. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 [One-way ANOVA, teste Bonferroni (por time point)]. SEM – standard error of the mean.

A recuperação funcional do estriado após lesão, que se verificou em todas as injeções, está bem documentada e poderá derivar de dois eventos distintos: *sprouting* neuronal (crescimento axonal ou dendrítico; evento neuroregenerativo), que permite o restabelecimento de conexões sinápticas entre neurónios, e neurogénese com origem na zona subventricular, que permite o repovoamento da zona lesada com novos neurónios [Arvidsson, A. et al (2002); Parent, J.M. et al (2002); Kernie, S.G. e Parent, J.M. (2010); Liberatore, G.T. et al (1999)]. Ambos parecem ser altamente regulados pela microglia e pelos astrócitos [Batchelor, P.E. et al (1999); Chen, Y. e Swanson, R.A. (2003); Song, H., Stevens, C.F. e Gage, F.H. (2002); Thored, P. et al (2009); Gemma, C. e Bachstetter, A.D. (2013)], cuja resposta após as injeções foi também avaliada e está descrita nos subcapítulos seguintes.

Apesar da recuperação funcional da zona lesada no estriado ter ocorrido em todas as injeções observaram-se diferenças: no caso da injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 e da injeção de PBS a recuperação é quase completa aos 5 meses e no caso da injeção do LV-eGFP é quase completa desde as 4 semanas (a partir deste momento é mais lenta). Tendo em conta que a neurodegeneração às 2 semanas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 é superior à que se verifica na injeção de PBS seria de esperar que o tempo de recuperação funcional com a injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 fosse maior, tal como acontece relativamente à injeção do LV-eGFP, porém o que se verifica é que é semelhante. Isso denota que a recuperação funcional é mais rápida na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3. Também, e de forma mais evidente, a recuperação funcional na injeção do LV-eGFP é mais rápida do que a verificada na injeção de PBS, o que explica a menor neurodegeneração associada à primeira logo às 2 semanas.

Alguma da diferença em termos de neurodegeneração observada entre as injeções do LV-nlsLacZ-shmutatx3 e do LV-eGFP pode estar relacionada com o facto destes terem genes-repórter diferentes. Essa observação tem particular relevância se tivermos em conta as evidências crescentes de que os produtos de expressão dos genes-repórter, designadamente a eGFP e a β -galactosidase com peptídeo sinal para localização nuclear, podem interferir com a homeostasia e provocar disfunção celular (de uma forma dependente dos níveis de expressão) [Agbulut, O. et al (2007); Krestel, H.E. et al (2004); Baens, M. et al (2006); Detrait, E.R. et al (2002)]. Um estudo em particular, realizado por Detrait e colegas, que parece ser o único na literatura que avalia nas mesmas condições a toxicidade da eGFP e da β -galactosidase com peptídeo sinal para localização nuclear (entre outros), verificou que a eGFP conduz a uma maior percentagem de células apoptóticas numa cultura primária de neurónios corticais comparativamente à β -galactosidase com peptídeo sinal para localização nuclear, de forma constante durante o período de avaliação após a transdução das células com *herpes simplex virus-based viral amplicon* (avaliação efectuada 1, 3, 5 dias após a transdução) [Detrait et al (2002)]. Se assumirmos que numa fase inicial após a transdução a eGFP é mais tóxica que a β -galactosidase com peptídeo sinal para localização nuclear, a maior neurodegeneração verificada às 2 semanas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 (quando comparamos com a que resulta da injeção do LV-eGFP) parece derivar exclusivamente do shmutatx3. Contudo estamos perante um estudo *in vitro*, podendo haver diferenças para um mesmo estudo *in vivo*. De forma a esclarecer esta questão, será oportuno injectar novos lentivírus com o mesmo gene-repórter: LV-nlsLacZ para comparar com LV-nlsLacZ-shmutatx3 ou LV-eGFP-shmutatx3 para comparar com LV-eGFP. Outra opção será injectar novos lentivírus sem gene-repórter.

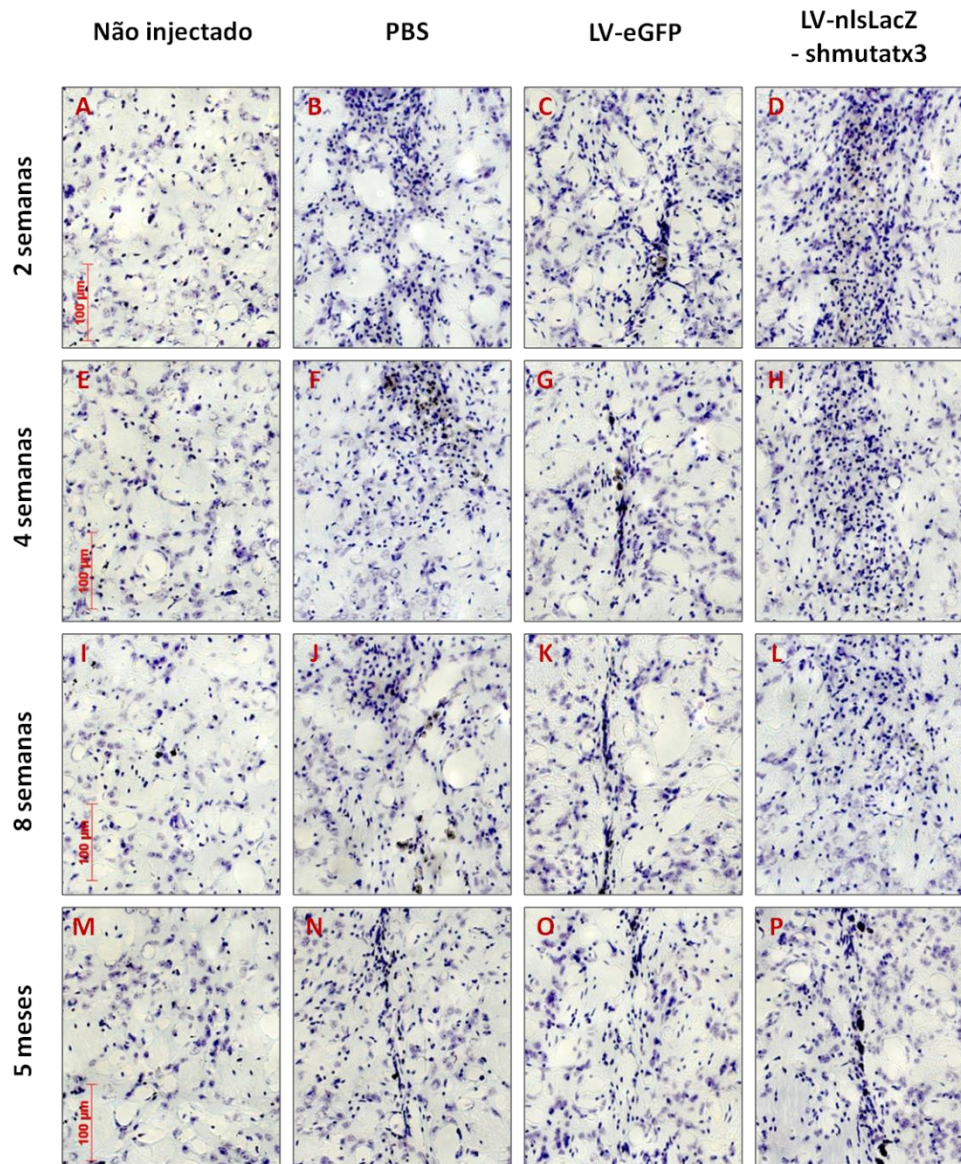


Figura 7 – Análise histoquímica com violeta de cresil. A-P) Imagens representativas da análise histoquímica com violeta de cresil, por microscopia de campo claro, em secções coronais de estriado dos murganhos injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 (no hemisfério direito, permanecendo o hemisfério esquerdo não injectado) ou bilateralmente com LV-eGFP (no hemisfério direito) e com PBS (no hemisfério esquerdo). A análise foi efectuada às 2 semanas [A] não injectado – n=4, [B] PBS – n=3, [C] LV-eGFP – n=3, [D] LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4], 4 semanas [E] não injectado – n=3, [F] PBS – n=3, [G] LV-eGFP – n=3, [H] LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3], 8 semanas [I] não injectado – n=4, [J] PBS – n=3, [K] LV-eGFP – n=3, [L] LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4] e 5 meses [M] não injectado – n=4, [N] PBS – n=3, [O] LV-eGFP – n=3, [P] LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4] após as injeções, em 8 secções/animal. Escala = 100µm.

3.3. Avaliação da resposta microglial

Com o objectivo de avaliar a resposta microglial após as injeções procedeu-se à análise imunohistoquímica da expressão de um marcador microglial, iba-1 [Ito, D. et al (1998)] (figura 8), em secções coronais de estriado. A microglia são os macrófagos residentes do sistema nervoso central, que tipicamente existe em repouso com uma morfologia ramificada. Em resposta a determinado insulto, a microglia torna-se activada, ocorrendo um alargamento celular e uma diminuição das ramificações. Paralelamente há um aumento da expressão de determinadas proteínas, tais como iba-1 [Hanisch, U. e Kettenmann, H.(2007)].

Às 2 semanas verifica-se que houve uma activação e um recrutamento da microglia em todas as injeções (figura 8 B-D). A injeção do LV-eGFP é a que tem uma maior presença de microglia activada, seguindo-se a injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 e depois a injeção de PBS (figura 8 B-D). Para além do que foi referido, se olharmos atentamente para a morfologia da microglia reparamos que na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 a maior parte da microglia parece ter uma forma amebóide ou globular com poucas ramificações (figura 8 D), sugerindo um estado de maior activação, enquanto que nas injeções do LVeGFP e de PBS a maior parte da microglia parece ter uma forma mais ramificada (figura 8 B e C), sugestiva de menor activação. Entre as 4 semanas e os 5 meses verifica-se uma desactivação e uma desmobilização da microglia em todas as injeções (figura 8 F-H; J-L e N-P), que levam naturalmente a um decréscimo sucessivo da presença de microglia activada. O processo de desactivação faz com que a microglia fique gradualmente mais ramificada (e também menos visível à medida que a expressão de iba-1 vai diminuindo). No caso da injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3, o processo de desactivação parece levar mesmo ao reaparecimento de ramificações às 4 semanas (figura 8 H).

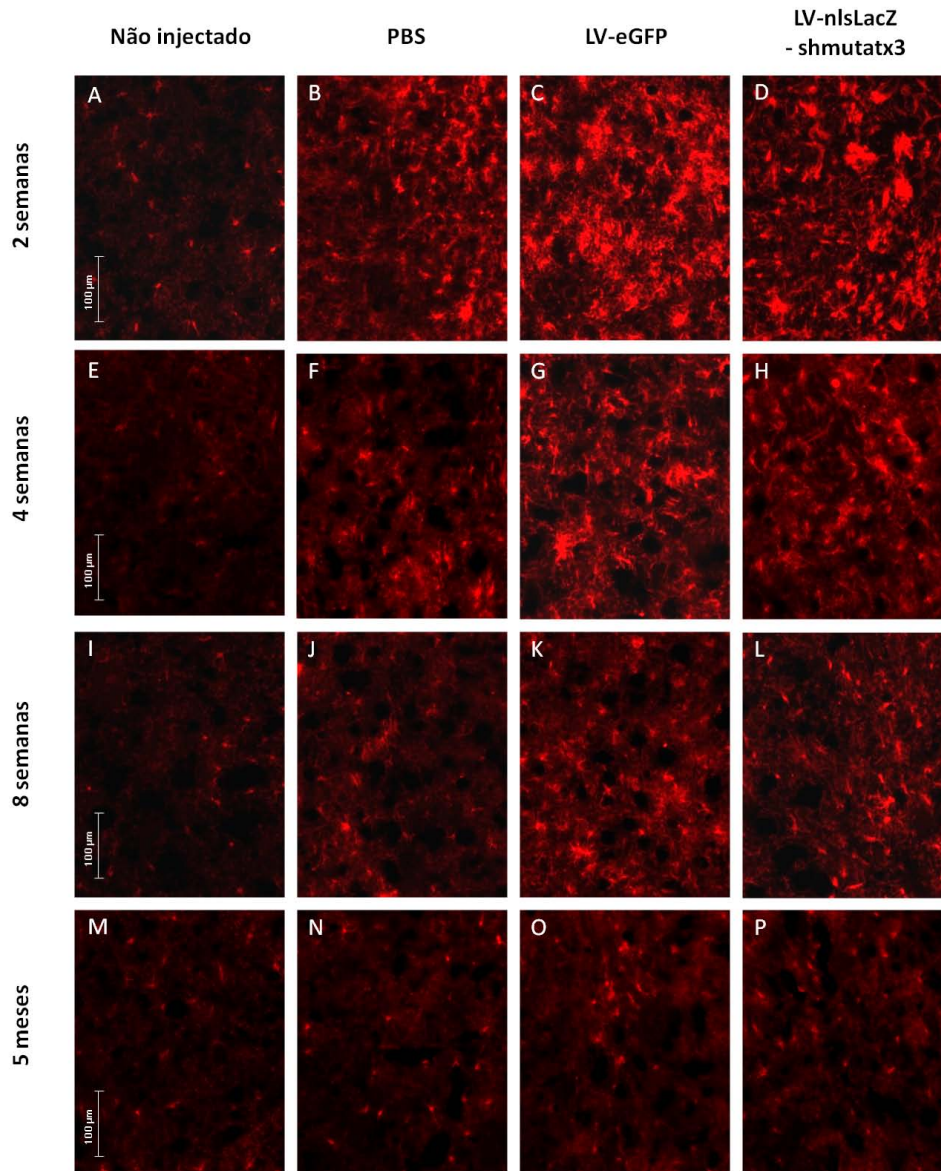


Figura 8 – Análise imunohistoquímica da expressão de iba-1. A-P) Imagens representativas da análise imunohistoquímica da expressão de iba-1, por microscopia de fluorescência, em secções coronais de estriado dos murganhos injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 (no hemisfério direito, permanecendo o hemisfério esquerdo não injectado) ou bilateralmente com LV-eGFP (no hemisfério direito) e com PBS (no hemisfério esquerdo). A análise foi efectuada às 2 semanas [A] não injectado – n=4, B) PBS – n=3, C) LV-eGFP – n=3, D) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4], 4 semanas [E] não injectado – n=3, F) PBS – n=3, G) LV-eGFP – n=3, H) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3], 8 semanas [I] não injectado – n=4, J) PBS – n=3, K) LV-eGFP – n=3, L) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4] e 5 meses [M] não injectado – n=4, N) PBS – n=3, O) LV-eGFP – n=3, P) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4] após as injeções, em 8 secções/animal. Escala = 100μm.

De acordo com a maioria dos estudos, a microglia activada (à semelhança dos macrófagos periféricos activados) pode assumir dois fenótipos funcionais distintos: o fenótipo pró-inflamatório (fenótipo M1; microglia M1), que se caracteriza pela libertação de citocinas pró-inflamatórias (ex. IL-1 β ⁷⁵ e TNF- α ⁷⁶) e outros factores pró-inflamatórios (ex. ROS⁷⁷), e o fenótipo anti-inflamatório (fenótipo M2; microglia M2), que se caracteriza pela libertação de citocinas anti-inflamatórias (ex. IL-10) e neurotrofinas (ex. BDNF⁷⁸ e IGF-1⁷⁹) [Colton, C.A. (2009); Boche, D., Perry, V.H. e Nicoll, J.A. (2013); Batchelor, P.E. et al (1999)]. O fenótipo M1 é o fenótipo presente numa “activação clássica da microglia” e pode ser induzido por LPS⁸⁰, IFN⁸¹ tipo I e IFN tipo II, entre outros [Kobayashi, K. et al (2013); Colton, C.A. et al (1992)]. Por sua vez, o fenótipo M2 é o fenótipo presente numa “activação alternativa da microglia” ou correspondente à desactivação do fenótipo M1 e pode ser induzido por IL-4 e IL-13, entre outros [Starossom, S.C. et al (2012); Cherry, J.D., Olschowka, J.A. e O'Banion, M.K. (2014)]. Numa escala linear de activação (ou desactivação, se for olhada no sentido inverso), o fenótipo M1 parece corresponder a uma microglia mais activada (com forma ameboide ou globular com poucas ramificações) e o fenótipo M2 parece corresponder a uma microglia menos activada (com forma mais ramificada), respectivamente [Thored, P. et al (2009); Marshall, S.A. et al (2013); Block, M.L. e Hong, J.S. (2005); Raivich, G. et al (1999)]. Sendo assim, a maior parte da microglia observada às 2 semanas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 (microglia mais activada) deverá ser uma microglia M1 (ou seja, parece haver a prevalência de uma microglia M1), enquanto que a maior parte da microglia observada entre as 4 semanas e os 5 meses na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 e em todos os *time points* nas restantes injeções (microglia menos activada; em desactivação) deverá ser uma microglia M2 (ou seja, parece haver a prevalência de uma microglia M2).

Devido à natureza dos factores segregados, a microglia M1 é um fenótipo de defesa, podendo ter um efeito neurotóxico se for persistente, tal como foi observado em várias doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson [Tang, Y. et al (2014)], a doença de Alzheimer [Mandrekar-Colucci, S., Karlo, J.C. e Landreth, G.E. (2012)], a esclerose amiotrófica lateral [Liao, B. et al (2012)] e a esclerose múltipla [Gao, Z. e Tsirka, S.E. (2011)]. Por sua vez, a microglia M2 é um fenótipo de reparação, tendo um efeito neuroprotector e promotor do *sprouting* neuronal e da neurogénese

⁷⁵ IL-1 β – *interleukin-1 beta*

⁷⁶ TNF- α - *tumor necrosis factor alpha*

⁷⁷ ROS - *reactive oxygen species*

⁷⁸ BDNF - *brain-derived neurotrophic factor*

⁷⁹ IGF-1 - *insulin-like growth factor-1*

⁸⁰ LPS - *lipopolysaccharide*

⁸¹ IFN - *interferon*

[Batchelor, P.E. et al (1999); Thored, P. et al (2009); Gemma, C. e Bachstetter, A.D. (2013)]. Tendo em conta o que foi referido, a prevalência de uma microglia M1 até às 2 semanas apenas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 poderá explicar a maior neurodegeneração nesta relativamente à verificada na injeção do LV-eGFP, bem como relativamente à verificada na injeção de PBS. Estudos *in vivo* envolvendo eventos agudos que provocam lesões no cérebro (à semelhança duma injeção intracraniana), como acidente vascular cerebral ou traumatismo craniano, parecem indicar que a prevalência de uma microglia M1 é um aspecto comum numa fase inicial após determinado insulto [Loane, D.J. e Byrnes, K.R. (2010); Thored, P. et al (2009)], sendo portanto provável que tenha ocorrido nas injeções do LV-eGFP e de PBS, mas apenas durante um curto intervalo de tempo. Por sua vez, a prevalência de uma microglia M2 desde as 4 semanas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 e desde um momento muito precoce anterior às 2 semanas nas restantes injeções poderá explicar a recuperação funcional da zona lesada em todas as injeções. Por outro lado, a maior presença de uma microglia M2 desde as 4 semanas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 relativamente à injeção de PBS poderá explicar a recuperação funcional mais rápida na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3. Para além disso, a maior presença de uma microglia M2 na injeção do LV-eGFP relativamente à injeção de PBS poderá explicar a recuperação funcional mais rápida na injeção do LV-eGFP (daí a menor neurodegeneração nesta logo às 2 semanas).

Falando do shmutatx3 podemos dizer que a aparente toxicidade numa fase inicial, mas não a longo prazo, poderá derivar da prevalência alongada de uma microglia M1, que dá lugar à prevalência de uma microglia M2 entre as 2 e as 4 semanas. Essa prevalência alongada, mas temporária, de uma microglia M1 poderá dever-se a uma activação da RIG-I⁸² pelo shmutatx3, que deverá ter sido também temporária. A transcrição do shmutatx3 está associada ao promotor H1, que é reconhecido pela RNA polimerase III. Esta RNA polimerase não executa a *cap* de 7-metilguanosina, deixando por isso o grupo 5'-PPP da *guide strand* proveniente do shmutatx3 desprotegido e passível de ser reconhecido pela RIG-I. A activação da RIG-I leva posteriormente à expressão de IFN tipo I [Bridge, A.J. et al (2003), Hornung, V. et al. (2006)]. “Esses IFN tipo I adicionais” na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 terão ditado a prevalência alongada de uma microglia M1. Os IFN tipo I parecem também diminuir o recrutamento da microglia [Colton, C.A. et al (1992)], tal como aparenta ter acontecido (a presença de microglia activada na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 é menor do que na injeção do LV-eGFP). Uma adaptação neuronal à transcrição constitutiva do shmutatx3 poderá explicar a activação presumivelmente temporária da

⁸² RIG-I - *retinoic-acid-inducible protein 1*

RIG-I. É de referir que o facto da indução da resposta imunitária inata parecer justificar a aparente toxicidade inicial do shmutatx3 não quer dizer que os efeitos *off-target* [Birmingham, A. et al. (2006), Jackson, A.L. et al. (2003), Jackson, A.L. et al. (2006)] e/ou a saturação da maquinaria endógena de RNAi [Grimm, D. et al. (2006), Yi, R. et al. (2005), Castanotto, D. et al. (2007)] não estejam também envolvidos.

A recuperação funcional mais rápida na injeção do LV-eGFP relativamente à verificada na injeção de PBS sugere que o vector lentiviral usado poderá ter um efeito que promove a recuperação funcional. A ideia de que um agente naturalmente imunogénico pode ter um efeito promotor da regeneração foi também confirmada num estudo realizado por Lu e Richardson, no qual se observou que a resposta inflamatória provocada pela injeção local de *Corynebacterium parvum* promove uma regeneração mais rápida da raiz dorsal (axónios aferentes), previamente seccionada, dos nervos espinhais (sistema nervoso periférico), isto é, promove um *sprouting* axonal mais rápido [Lu X. e Richardson, P.M. (1991)]. No caso da injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 há também uma recuperação funcional mais rápida relativamente à injeção de PBS. A ideia anterior também se deverá aplicar neste caso até certo ponto, uma vez que parte da microglia activada após a injeção deriva certamente da imunogenicidade do vector lentiviral, mas deverá ter sido o shmutatx3 que determinou a prevalência de uma microglia M2, e apenas às 4 semanas.

3.4. Avaliação da resposta astrocítica

Com o objectivo de avaliar a resposta astrocítica após as injeções procedeu-se à análise imunohistoquímica da expressão de um marcador astrocítico, GFAP [Eng, L.F. e Ghirnikar, R.S. e Lee, Y.L. (2000)] (figura 9), em secções coronais de estriado. Procedeu-se também, de forma complementar, à análise por *western blot* da expressão de GFAP (figura 10) em amostras de estriado. Os astrócitos são as células da glia mais comuns no sistema nervoso central, desempenhando importantes funções como assistência metabólica aos neurónios, manutenção do equilíbrio electrolítico extracelular, regulação do fluxo sanguíneo e participação/modulação da resposta imunitária. Perante a ocorrência de determinado insulto, os astrócitos tornam-se activados, verificando-se um alargamento celular e um alongamento das projecções típicas do estado de repouso. Paralelamente há um aumento da expressão de determinadas proteínas, tais como GFAP [Sofroniew, M.V. e Vinters, H.V. (2010); Farina, C., Aloisi, F. e Meinl, E. (2007); Barres, BA. (2008)].

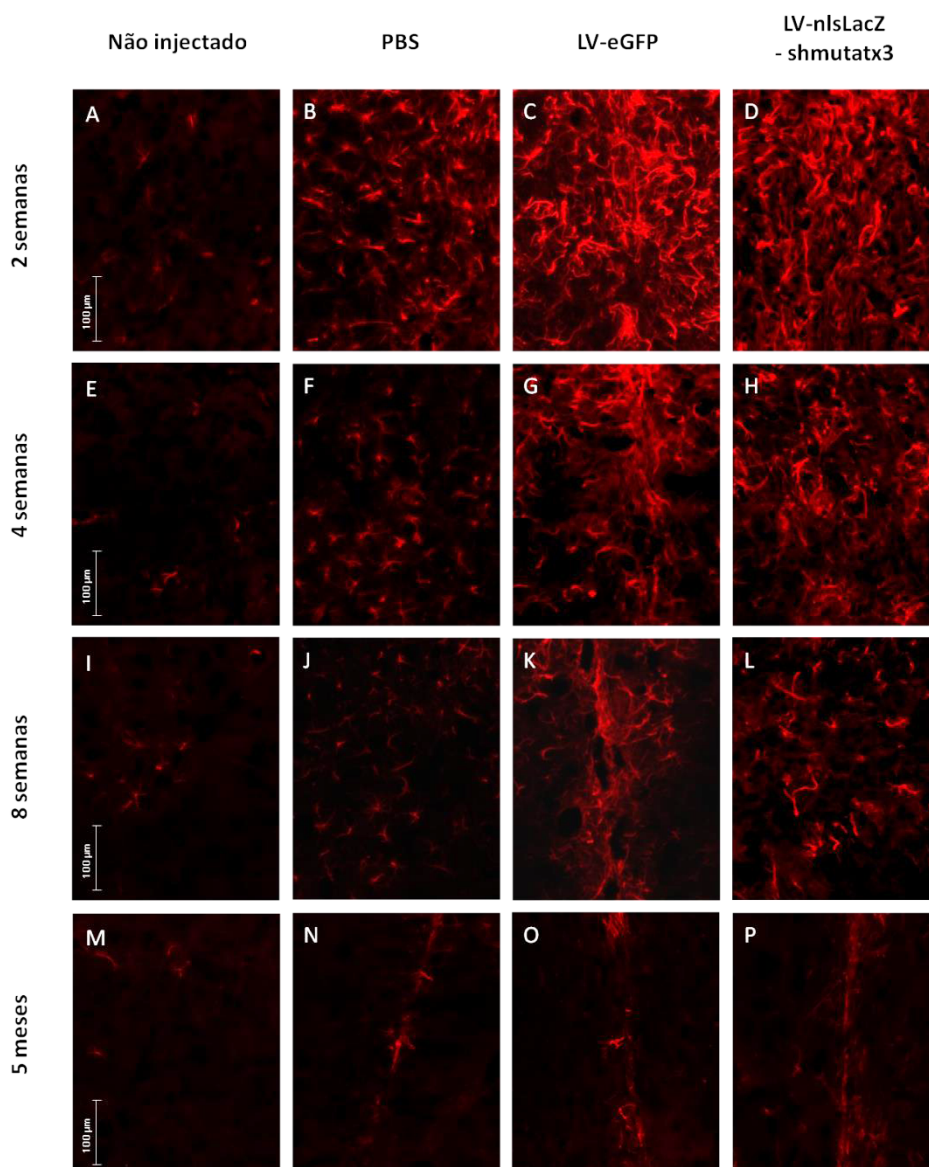


Figura 9 – Análise imunohistoquímica da expressão de GFAP. A-P) Imagens representativas da análise imunohistoquímica da expressão de GFAP, por microscopia de fluorescência, em secções coronais de estriado dos murganhos injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 (no hemisfério direito, permanecendo o hemisfério esquerdo não injectado) ou bilateralmente com LV-eGFP (no hemisfério direito) e com PBS (no hemisfério esquerdo). A análise foi efectuada às 2 semanas [A] não injectado – n=4, B) PBS – n=3, C) LV-eGFP – n=3, D) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4], 4 semanas [E] não injectado – n=3, F) PBS – n=3, G) LV-eGFP – n=3, H) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3], 8 semanas [I] não injectado – n=4, J) PBS – n=3, K) LV-eGFP – n=3, L) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4] e 5 meses [M] não injectado – n=4, N) PBS – n=3, O) LV-eGFP – n=3, P) LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=4] após as injeções, em 8 secções/animal. Escala = 100μm.

A análise imunohistoquímica às 2 semanas indica que houve uma activação e um recrutamento dos astrócitos em todas as injeções (figura 9 B-D). A injeção do LV-eGFP é a que tem uma maior presença de astrócitos activados, seguindo-se a injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 e depois a injeção de PBS (figura 9 B-D). Entre as 4 semanas

e os 5 meses verifica-se uma desactivação e uma desmobilização dos astrócitos em todas as injecções (figura 9 F-H; J-L e N-P), que levam naturalmente a um decréscimo sucessivo da presença de astrócitos activados. O processo de desactivação faz com que os astrócitos fiquem gradualmente com projecções mais curtas (e também menos visíveis à medida que a expressão de GFAP vai diminuindo). Desde as 4 semanas verifica-se a presença de uma cicatriz astrocítica na injecção do LV-eGFP [figura 9 G; K; O]. Nas injecções do LV-nlsLacZ-shmutatx3 e de PBS, a cicatriz astrocítica apenas é visível aos 5 meses [figura 9 N e P]. Os resultados sugerem que, de um modo geral, a presença de astrócitos activados parece acompanhar a presença de microglia activada.

A análise por *western blot* (figura 10) evidencia níveis de expressão de GFAP que estão de acordo com os verificados na análise imunohistoquímica, acompanhando o que foi dito em termos de activação e recrutamento dos astrócitos (aumento da expressão de GFAP no estriado) às 2 semanas e em termos de desactivação e desmobilização dos astrócitos (decréscimo da expressão de GFAP no estriado) nos restantes *time points*.

No que diz respeito à participação/modulação da resposta imunitária, os astrócitos activados podem assumir, tal como a microglia activada, dois fenótipos funcionais distintos: o fenótipo pró-inflamatório, que se caracteriza pela secreção de citocinas pró-inflamatórias (ex. IL-1 β e TNF- α) e outros factores pró-inflamatórios (ex. ROS), e o fenótipo anti-inflamatório, que se caracteriza pela libertação de citocinas anti-inflamatórias (ex. IL-10) e neurotrofinas (ex. BDNF, NGF⁸³ e GDNF⁸⁴), à semelhança da microglia M1 e da microglia M2, respectivamente [Jang, E. et al. (2013); Chen, Y. e Swanson, R.A. (2003); Brodie, C. et al (1998); Sofroniew, M.V. (2009); Batchelor, P.E. et al (1999)]. Tal como a microglia M1, o fenótipo pró-inflamatório dos astrócitos activados pode ter um efeito potencialmente neurotóxico [Sofroniew, M.V. (2009)], para além de poder ser induzido por IFN tipo I e IFN tipo II [Wang, R., Yang, B. e Zhang, D. (2011)]. Por sua vez, tal como a microglia M2, o fenótipo anti-inflamatório dos astrócitos activados tem um efeito neuroprotector e promotor do *sprouting* neuronal e da neurogénese [Batchelor, P.E. et al (1999); Chen, Y. e Swanson, R.A. (2003); Song, H., Stevens, C.F. e Gage, F.H. (2002)], para além de poder ser induzido por IL-4 [Brodie, C. et al (1998)].

Os resultados (sobretudo os da análise imunohistoquímica) parecem indicar que a presença de astrócitos activados acompanha a presença de microglia activada e portanto, tendo em conta o que foi referido, é possível que haja uma cooperação

⁸³ NGF - *nerve growth factor*

⁸⁴ GDNF - *glial cell line-derived neurotrophic factor*

entre ambos, em que o fenótipo pró-inflamatório dos astrócitos activados acompanha a microglia M1 e o fenótipo anti-inflamatório dos astrócitos activados acompanha a microglia M2. Sendo assim, a interpretação feita na resposta microglial deverá aplicar-se também à resposta astrocítica: a aparente toxicidade do shmutatx3 numa fase inicial, mas não a longo prazo, poderá derivar também da prevalência alongada de um fenótipo pró-inflamatório dos astrócitos activados, que dá lugar à prevalência de um fenótipo anti-inflamatório entre as 2 e as 4 semanas (devido provavelmente à activação temporária da RIG-I); a maior presença de um fenótipo anti-inflamatório dos astrócitos activados desde as 4 semanas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 relativamente à injeção de PBS poderá explicar também a recuperação funcional mais rápida na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3; a maior presença de um fenótipo anti-inflamatório dos astrócitos activados na injeção do LV-eGFP relativamente à injeção de PBS poderá explicar também a recuperação funcional mais rápida na injeção do LV-eGFP.

A cicatriz astrocítica é conhecida por rodear o tecido danificado após determinado insulto, sendo fundamental para o processo de recuperação funcional da zona lesada. Quase no final do processo é comum (e aparentemente normal) persistir durante meses. Essa persistência não é totalmente compreendida e impede que o processo de recuperação funcional termine de forma mais abrupta, já que funciona como uma barreira física (e até química) para o *sprouting* neuronal [Rolls, A., Shechter, R. e Schwartz, M. (2009); Silver, J. e Miller, J.H. (2004)]. Neste estudo, a cicatriz astrocítica foi apenas observada de forma mais evidente desde as 4 semanas na injeção do LV-eGFP e aos 5 meses nas restantes injeções, ou seja, a partir do momento em que o processo de recuperação funcional é quase completo. A persistência da cicatriz astrocítica desde as 4 semanas na injeção do LV-eGFP parece explicar a recuperação funcional mais lenta a partir desse momento.

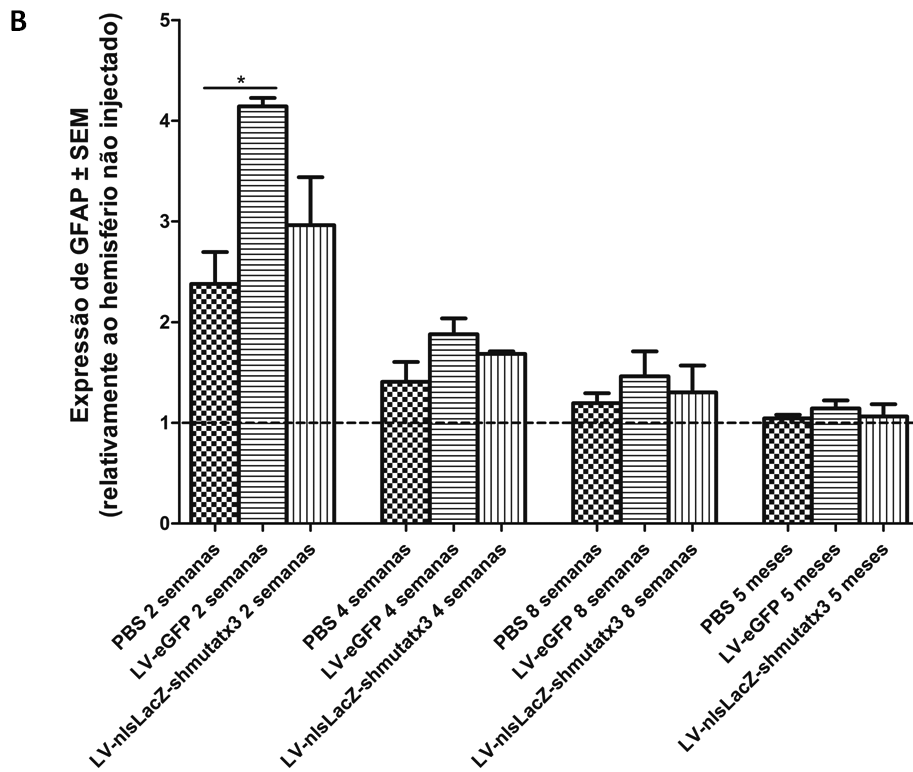
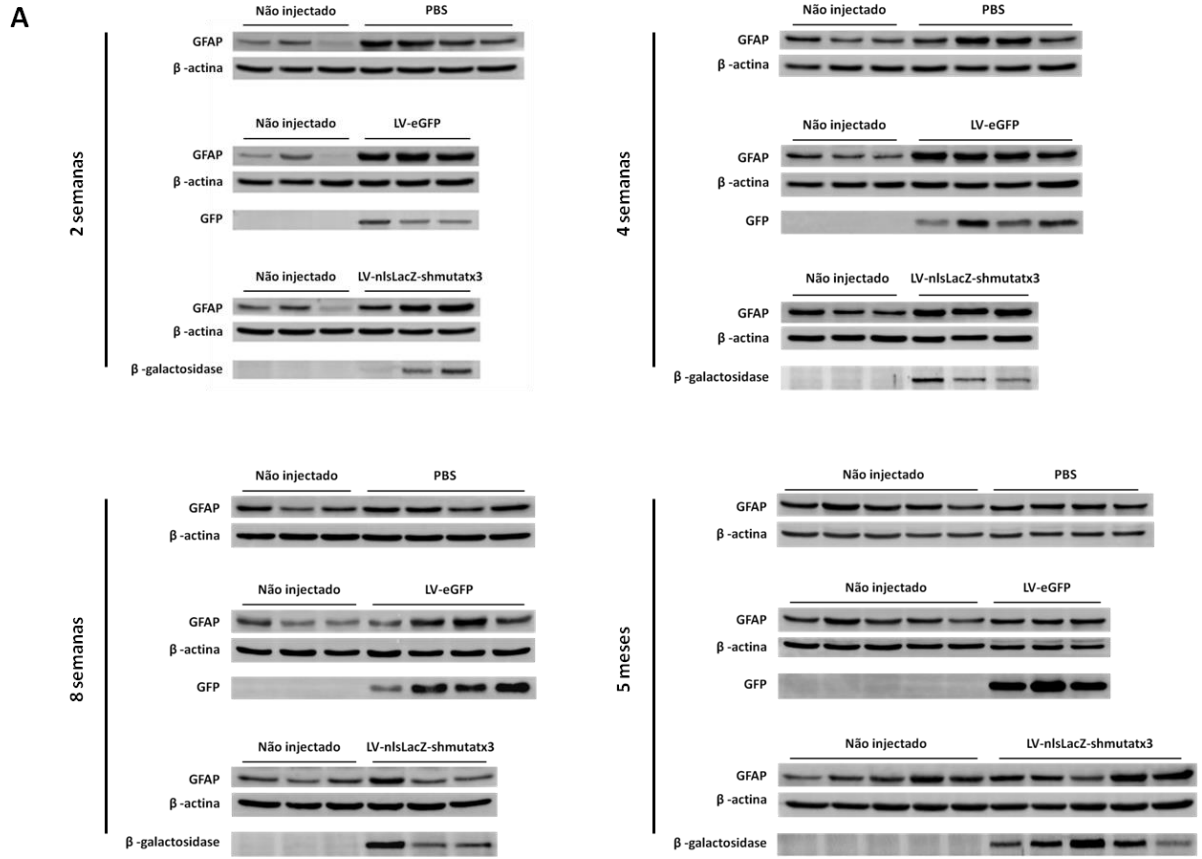


Figura 10 – Análise por *western blot* da expressão de GFAP. A) Imagens da análise por *western blot* da expressão de GFAP em amostras de estriado dos murganhos injectados unilateralmente com LV-nlsLacZ-shmutatx3 (no hemisfério direito, permanecendo o hemisfério esquerdo não injectado como controlo interno) ou bilateralmente com LV-eGFP (no hemisfério direito) e com PBS (no hemisfério esquerdo). A análise foi efectuada às 2 semanas [não injectado – n=3, PBS – n=4, LV-eGFP – n=4 (uma das amostras foi excluída, pois não apresentava expressão do gene-repórter) , LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3], 4 semanas [não injectado – n=3, PBS – n=4, LV-eGFP – n=4, LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3], 8 semanas [não injectado – n=3, PBS – n=4, LV-eGFP – n=4, LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=3] e 5 meses [não injectado – n=5, PBS – n=4, LV-eGFP – n=4 (uma das amostras foi excluída, pois não apresentava expressão do gene-repórter), LV-nlsLacZ-shmutatx3 – n=5] após as injeções. **B)** Quantificação dos níveis de expressão de GFAP após as injeções, relativamente ao hemisfério não injectado. A β -actina foi usada para normalização. Os valores correspondem à média \pm SEM. * $P < 0.05$ [One-way ANOVA, teste Bonferroni (por *time point*)]. SEM – *standard error of the mean*. GFAP – 50kDa, β -actina – 42kDa, GFP – 28kDa, β -galactosidase – 120kDa.

Capítulo 4

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

4. Conclusões e Perspectivas Futuras

Previamente, o nosso laboratório demonstrou a eficácia terapêutica do silenciamento génico da ataxina 3 mutante humana mediado por shRNA⁸⁵, usando lentivírus, no estriado e cerebelo de modelos animais da doença de Machado-Joseph (MJD⁸⁶). Tendo em conta as evidências crescentes de que o processo de silenciamento génico mediado por shRNAs pode conduzir a efeitos citotóxicos, decidiu-se averiguar a segurança da estratégia terapêutica anteriormente testada. Procedeu-se assim a uma avaliação da potencial toxicidade do shRNA lentiviral usado para o silenciamento da ataxina 3 mutante humana (shmutatx3), no estriado de murganhos.

Com esse propósito foram analisados três aspectos: a integridade neuronal (através da análise imunohistoquímica da expressão de dois marcadores neuronais, DARPP-32⁸⁷ e NeuN⁸⁸, e da análise histoquímica com violeta de cresil), a resposta microglial (através da análise imunohistoquímica da expressão de um marcador microglial, iba-1⁸⁹) e a resposta astrocítica (através da análise imunohistoquímica e da análise por *western blot* da expressão de um marcador astrocítico, GFAP⁹⁰) no estriado de murganhos *wild-type* adultos em quatro *time points* após a injeção dos lentivírus: 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas e 5 meses. Os murganhos foram injectados no estriado unilateralmente com lentivírus que codificam o shmutatx3 (LV-nlsLacZ-shmutatx3; no hemisfério direito, permanecendo o hemisfério esquerdo não injectado como controlo interno) ou bilateralmente com lentivírus sem efeito terapêutico (LV-eGFP; no hemisfério direito) e com PBS⁹¹ (no hemisfério esquerdo). Para seguir a eficácia do processo de transdução, os lentivírus usados possuem genes-repórter: no caso do LV-eGFP temos o gene eGFP⁹² e no caso do LV-nlsLacZ-shmutatx3 temos o gene nlsLacZ⁹³. A análise histoquímica da expressão de eGFP e a análise imunohistoquímica da expressão de β -galactosidase em secções coronais de estriado revelou uma expressão estável e crescente dos genes-repórter ao longo do tempo.

⁸⁵ shRNA - *short-hairpin RNA (ribonucleic acid)*

⁸⁶ MJD - *Machado-Joseph disease*

⁸⁷ DARPP-32 - *dopamine- and cAMP (cyclic adenosine monophosphate)-regulated phosphoprotein of 32KDa*

⁸⁸ NeuN - *neuron-specific nuclear protein*

⁸⁹ Iba-1 - *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*

⁹⁰ GFAP - *glial fibrillary acidic protein*

⁹¹ PBS - *phosphate buffered saline*

⁹² eGFP - *enhanced green fluorescent protein*

⁹³ nlsLacZ - *gene encoding β -galactosidase tagged with nuclear location signal*

O shmutatx3 parece apresentar toxicidade numa fase inicial, uma vez que os resultados referentes à avaliação da integridade neuronal indicam que a neurodegeneração às 2 semanas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 é significativamente superior à que se verifica na injeção do LV-eGFP. Apesar da aparente toxicidade inicial, o shmutatx3 não é tóxico a longo prazo, uma vez que há uma recuperação funcional da zona lesada no estriado entre as 4 semanas e os 5 meses na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3, que é quase completa aos 5 meses. Esse aspecto revela que existe uma adaptação neuronal à transcrição constitutiva do shmutatx3. Alguma da diferença em termos de neurodegeneração observada entre as injeções do LV-nlsLacZ-shmutatx3 e do LV-eGFP pode estar relacionada com o facto destes terem genes-repórter diferentes. De forma a esclarecer esta questão, será oportuno injectar novos lentivírus com o mesmo gene-repórter: LV-nlsLacZ para comparar com LV-nlsLacZ-shmutatx3 ou LV-eGFP-shmutatx3 para comparar com LV-eGFP. Outra opção será injectar novos lentivírus sem gene-repórter.

A avaliação da integridade neuronal revelou ainda que a recuperação funcional da zona lesada no estriado na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 é mais rápida do que a verificada na injeção de PBS. Também, e de forma mais evidente, a recuperação funcional na injeção do LV-eGFP é mais rápida do que na injeção de PBS.

Relativamente à avaliação da resposta microglial, os resultados sugerem a prevalência de uma microglia M1 (fenótipo pró-inflamatório ou de defesa que pode ter um efeito neurotóxico se for persistente) até às 2 semanas apenas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3, parecendo explicar a maior neurodegeneração nesta relativamente à verificada na injeção do LV-eGFP, bem como relativamente à verificada na injeção de PBS. Os resultados sugerem ainda a prevalência de uma microglia M2 (fenótipo anti-inflamatório ou de reparação que tem um efeito neuroprotector e promotor do *sprouting* neuronal e da neurogénese) desde as 4 semanas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 e desde um momento muito precoce anterior às 2 semanas nas restantes injeções, parecendo explicar a recuperação funcional da zona lesada em todas as injeções. Por outro lado, a maior presença de uma microglia M2 desde as 4 semanas na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3 relativamente à injeção de PBS parece explicar a recuperação funcional mais rápida na injeção do LV-nlsLacZ-shmutatx3. Para além disso, a maior presença de uma microglia M2 na injeção do LV-eGFP relativamente à injeção de PBS parece explicar a recuperação funcional mais rápida na injeção do LV-eGFP. Este último resultado sugere que o vector lentiviral usado poderá ter um efeito que promove a recuperação funcional.

Quanto à avaliação da resposta astrocítica, os resultados parecem indicar que a presença de astrócitos activados acompanha a presença de microglia activada e portanto, é possível que haja uma cooperação entre ambos, em que o fenótipo pró-inflamatório dos astrócitos activados acompanha a microglia M1 e o fenótipo anti-

inflamatório dos astrócitos activados acompanha a microglia M2. Sendo assim, a interpretação feita na resposta microglial deverá aplicar-se também à resposta astrocítica. Observou-se ainda a presença duma cicatriz astrocítica desde as 4 semanas na injeção do LV-eGFP e aos 5 meses nas restantes injeções, ou seja, a partir do momento em que o processo de recuperação funcional é quase completo.

Os resultados da avaliação da resposta microglial e da resposta astrocítica sugerem que a aparente toxicidade do shmutatx3 numa fase inicial, mas não a longo prazo, poderá derivar da prevalência alongada de uma microglia M1 e de um fenótipo pró-inflamatório dos astrócitos activados, que dá lugar à prevalência de uma microglia M2 e de um fenótipo anti-inflamatório dos astrócitos activados entre as 2 e as 4 semanas. Tal poderá dever-se a uma activação temporária da RIG-I⁹⁴ pelo shmutatx3 (e subsequente expressão de IFN⁹⁵ tipo I, que induzem a microglia M1 e o fenótipo pró-inflamatório dos astrócitos activados). É de referir que apesar da indução da resposta imunitária inata parecer justificar a aparente toxicidade inicial do shmutatx3 não quer dizer que os efeitos *off-target* e/ou a saturação da maquinaria endógena de RNAi não estejam também envolvidos, devendo por isso ser feita a sua avaliação.

⁹⁴ RIG-I - *retinoic-acid-inducible protein 1*

⁹⁵ IFN - *interferon*

Referências Bibliográficas

- Agbulut, O. et al (2007).** Green Fluorescent Protein Impairs Actin-Myosin Interactions by Binding to the Actin-binding Site of Myosin. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 10465-10471.
- Alves, S. et al. (2008a).** Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado–Joseph disease. *PLoS ONE* 3, e3341.
- Alves, S. et al. (2008b).** Striatal and nigral pathology in a lentiviral rat model of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet.* 17, 2071-2083.
- An, D.S. et al (2006).** Optimization and functional effects of stable short hairpin RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors. *Mol Ther* 14, 494–504.
- Arvidsson, A. et al (2002).** Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* 8, 963–70.
- Baens, M. et al (2006).** The Dark Side of EGFP: Defective Polyubiquitination. *PLoS ONE* 1, e54.
- Barres, BA. (2008).** The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60, 430–440.
- Batchelor, P.E. et al (1999).** Activated Macrophages and Microglia Induce Dopaminergic Sprouting in the Injured Striatum and Express Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *The Journal of Neuroscience* 19, 1708–1716.
- Birmingham, A. et al. (2006).** 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 3, 199–204.
- Block, M.L. e Hong, J.S. (2005).** Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol.* 76, 77-98.
- Boche, D., Perry, V.H. e Nicoll, J.A. (2013).** Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39, 3-18.
- Bonnerot, C. et al (1987).** A β -galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for developmental studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6795–6799
- Boudreau, R.L. et al (2009).** Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice. *Mol Ther* 17, 1053-1063.
- Boudreau, R.L., Monteys, A.M. e Davidson, B.L. (2008).** Minimizing variables among hairpin-based RNAi vectors reveals the potency of shRNAs. *Rna* 14, 1834–1844.
- Bridge, A.J. et al (2003).** Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34, 263–264.
- Brodie, C. et al (1998).** Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion. *J. Neuroimmunol.* 81, 20–30.
- Burnett, B., Li, F. e Pittman, R.N. (2003).** The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum. Mol. Genet.* 12, 3195–3205.
- Cancel, G. et al. (1995).** Marked phenotypic heterogeneity associated with expansion of a CAG repeat sequence at the spinocerebellar ataxia 3/Machado–Joseph disease locus. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 809–816.

- Carthew, R.W. e Sontheimer, E.J. (2009).** Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.
- Castanotto, D. et al. (2007).** Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. *Nucleic Acids Res* 35, 5154–5164.
- Chai, Y. et al. (2004).** Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *J. Biol. Chem.* 279, 3605–3611.
- Chen, Y. e Swanson, R.A. (2003).** Astrocytes and Brain Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23, 137–149.
- Cherry, J.D., Olschowka, J.A. e O'Banion, M.K. (2014).** Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* 11:98, 15 páginas.
- Colton, C.A. et al (1992).** Regulation of microglial function by interferons. *J Neuroimmunol.* 40,, 89-98.
- Colton, C.A. (2009).** Heterogeneity of Microglial Activation in the Innate Immune Response in the Brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 4, 399–418.
- Cummings, C.J. e Zoghbi, H.Y. (2000).** Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1, 281–328.
- Davidson, B.L. e McCray Jr., P.B. (2011).** Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet* 12, 329–340.
- de Almeida, L.P. et al (2002).** Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci.* 22, 3473-3483.
- de Vries, W. e Berkhout, B. (2008).** RNAi suppressors encoded by pathogenic human viruses. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2007-12.
- Detrait, E.R. et al (2002).** Reporter Gene Transfer Induces Apoptosis in Primary Cortical Neurons. *Molecular Therapy* 5, 723-730.
- Donaldson, K.M. et al. (2003).** Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100, 8892–8897.
- Doss-Pepe, E.W. et al. (2003).** Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6469–6483.
- Durr, A. et al. (1996).** Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann. Neurol.* 39, 490–499.
- Eng, L.F. e Ghirnikar, R.S. e Lee, Y.L. (2000).** Glial fibrillary acidic protein: GFAP—thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res* 25, 1439–1451.
- Farina, C., Aloisi, F. e Meinl, E. (2007).** Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in Immunology* 28, 138-145.
- Fire, A. et al. (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.

- Gao, Z. e Tsirka, S.E. (2011).** Animal models of MS reveal multiple roles of microglia in disease pathogenesis. *Neurology Research International* volume 2011, artículo 383087, 9 páginas.
- Garman, R.H. (2011).** Histology of the Central Nervous System. *Toxicol Pathol* 39, 22-35.
- Gaspar, C. (1996).** Linkage disequilibrium analysis in Machado-Joseph disease patients of different ethnic origins. *Hum Genet* 98, 620-624.
- Gemma, C. e Bachstetter, A.D. (2013).** The role of microglia in adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, artículo 229.
- Gregory, R. I. et al. (2004).** The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240.
- Grimm, D. et al. (2006).** Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537–541.
- Gwinn-Hardy, K. et al. (2001).** Spinocerebellar ataxia type 3 phenotypically resembling parkinson disease in a black family. *Arch. Neurol.* 58, 296–299.
- Hanisch, U. e Kettenmann, H.(2007).** Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience* 10, 1387-1394.
- Harper, S.Q. et al. (2005).** RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington’s disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 5820–5825.
- Hayashi, M., Kobayashi, K. e Furuta, H. (2003).** Immunohistochemical study of neuronal intranuclear and cytoplasmic inclusions in Machado-Joseph disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 57, 205-213.
- Heim, R., Cubitt, A.B. e Tsien, R.Y. (1995).** Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-664.
- Hoerter, J.A.H. e Walter. N.G. (2007).** Chemical modification resolves the asymmetry of siRNA strand degradation in human blood serum. *RNA* 13, 1887–1893.
- Hornung, V. et al. (2006).** 5-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994–997.
- Ito, D. et al (1998).** Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, IBA1. *Brain Res Mol Brain Res* 57, 1–9.
- Iwasaki, A. e Medzhitov, R. (2010).** Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science* 327, 291-295.
- Jackson, A.L. et al. (2003).** Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol* 21, 635–637.
- Jackson, A.L. et al. (2006).** Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12, 1179–1187.
- Jang, E. et al. (2013).** Phenotypic Polarization of Activated Astrocytes: The Critical Role of Lipocalin-2 in the Classical Inflammatory Activation of Astrocytes. *The Journal of Immunology* 191, 5204-5219.
- Kádár, A. et al (2009).** Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *J Neurosci Methods* 184, 115-118.

- Kawaguchi, Y. et al. (1994).** CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat. Genet.* 8, 221–228.
- Kernie, S.G. e Parent, J.M. (2010).** Forebrain neurogenesis after focal ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 37, 267–274.
- Kim, D.H. e Rossi, J.J. (2007).** Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8:173-184.
- Kim, K.K., Adelstein, R.S. e Kawamoto, S. (2009).** Identification of Neuronal Nuclei (NeuN) as Fox-3, a New Member of the Fox-1 Gene Family of Splicing Factors. *J. Biol. Chem.* 284, 31052-31061.
- Kobayashi, K. et al (2013).** Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death and Disease* 4, e525.
- Krestel, H.E. et al (2004).** Neuronal co-expression of EGFP and β -galactosidase in mice causes neuropathology and premature death. *Neurobiology of Disease* 17, 310–318.
- Kumar, H., Kawai, T. e Akira S. (2009).** Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem. J.* 420, 1–16.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lecellier, C.H. et al (2005).** A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 308, 557-60
- Lee, Y. et al. (2003).** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.
- Leung, R.K.M. e Whittaker P.A. (2005).** RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics* 107, 222–239.
- Li, F. et al. (2002).** Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J. Biol. Chem.* 277, 45004–45012.
- Liao, B. et al (2012).** Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental Neurology* 237, 147–152.
- Liberatore, G.T. et al (1999).** Sprouting of dopaminergic axons after striatal injury: confirmation by markers not dependent on dopamine metabolism. *Exp Neurol* 159, 565–573.
- Loane, D.J. e Byrnes, K.R. (2010).** Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 7, 366–377.
- Lu, C.S. et al. (2004).** The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 3 in a Taiwanese family. *Parkinsonism Relat. Disord.* 10, 369–373.
- Lu, X. e Richardson, P.M. (1991).** Inflammation near the nerve cell body enhances axonal regeneration. *J Neurosci* 11, 972-978.
- Lund, E. et al (2004).** Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95–98.
- Ma, J., Ye, K. e Patel, D.J. (2004).** Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429, 318-322.

- Maciel, P. et al. (2001).** Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch. Neurol.* 58, 1821–1827.
- Rosenberg, R.N. (1992).** Machado–Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration. *Mov. Disord.* 7, 193–203.
- Mandrekar-Colucci, S, Karlo, J.C. e Landreth, G.E. (2012).** Mechanisms underlying the rapid peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated amyloid clearance and reversal of cognitive deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 32, 10117–10128.
- Manjunath, N. et al (2009).** Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev.* 61, 732–745.
- Marshall, S.A. et al (2013).** Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: the importance of microglia phenotype. *Neurobiol Dis.* 54, 239–251.
- McBride, J.L. et al. (2008).** Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 5868–5873.
- Miller, T.M. et al. (2005).** Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57, 773–776.
- Nóbrega, C. et al (2013).** Silencing Mutant Ataxin-3 Rescues Motor Deficits and Neuropathology in Machado-Joseph Disease Transgenic Mice. *PLoS ONE* 8, e52396.
- Nóbrega, C. e Pereira de Almeida, L. (2012).** Machado-Joseph disease/Spinocerebellar ataxia type 3 em Spinocerebellar Ataxia. InTech. ISBN 979-953-307-095-6.
- Otsuka, M. et al (2007).** Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity* 27, 123-34.
- Parent, J.M. et al (2002).** Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann. Neurol.* 52, 802–13.
- Paulson, H.L. et al (1997).** Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol* 41, 453-462.
- Perez, M.K. et al (1998).** Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol* 143, 1457-1470.
- Raivich, G. et al (1999).** Molecular signals for glial activation: pro- and anti-inflammatory cytokines in the injured brain. *Acta Neurochir.* 73, 21–30.
- Raoul, C. et al. (2005).** Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 11, 423–428.
- Rodrigues, A.J. et al (2010).** Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death. *Biochim Biophys Acta* 1803:1154-1163.
- Rodriguez-Lebron, E. et al. (2005).** Intrastriatal rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Ther* 12, 618–633.
- Rolls, A., Shechter, R. e Schwartz, M. (2009).** The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 235-241.
- Rossi, J.J. (2008).** Expression Strategies for Short Hairpin RNA Interference Triggers. *Hum Gene Ther.* 19, 313–317.

- Schmidt, T. et al. (1998).** An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol.* 8, 669–679.
- Silver, J. e Miller, J.H. (2004).** Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 146-156.
- Sofroniew, M.V. (2009).** Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends In Neurosciences* 32, 638-47.
- Sofroniew, M.V. e Vinters, H.V. (2010).** Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35.
- Song, H., Stevens, C.F. e Gage, F.H. (2002).** Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39-44.
- Starossom, S.C. et al (2012).** Galectin-1 Deactivates Classically Activated Microglia and Protects from Inflammation-Induced Neurodegeneration. *Immunity* 37, 249–263.
- Stevanin, G. et al (1995).** The gene for spinal cerebellar ataxia 3 (SCA3) is located in a region of approximately 3 cM on chromosome 14q24.3-q32.2. *Am J Hum Genet* 56, 193-201.
- Subramony, S.H. et al. (2002).** Ethnic differences in the expression of neurodegenerative disease: Machado–Joseph disease in Africans and Caucasians. *Mov. Disord.* 17, 1068–1071.
- Sudarsky, L. e Coutinho, P. (1995).** Machado-Joseph disease. *Clin. Neurosci.* 3, 17–22.
- Svenningsson, P. et al (2004).** DARPP-32: An Integrator of Neurotransmission. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 269–96.
- Takiyama, Y. et al. (1994).** A clinical and pathologic study of a large Japanese family with Machado–Joseph disease tightly linked to the DNA markers on chromosome 14q. *Neurology* 44, 1302–1308.
- Tang, Y. et al (2014).** Jmjd3 is essential for the epigenetic modulation of microglia phenotypes in the immune pathogenesis of Parkinson’s disease. *Cell Death & Differentiation* 21, 369-380.
- Taroni, F. e DiDonato, S. (2004).** Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat. Rev.* 5, 641–655.
- Thored, P. et al (2009).** Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia* 57, 835–849.
- Tomari, Y. et al (2004).** A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306, 1377-80.
- Trottier, Y. et al. (1998).** Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3. *Neurobiol. Dis.* 5, 335–347.
- Uchihara, T. et al (2001).** Non-expanded polyglutamine proteins into intranuclear inclusions of hereditary ataxias: triple labelling immunofluorescent study. *Acta Neuropathol.* 102, 149-152.
- Wang, G. et al. (2000).** Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1795–1803.
- Wang, R., Yang, B. e Zhang, D. (2011).** Activation of interferon signaling pathways in spinal cord astrocytes from an ALS mouse model. *Glia* 59, 946–58.

Winter, J. et al (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11, 228-234.

Wullner, U. et al. (2005). Dopamine transporter positron emission tomography in spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, and 6. *Arch Neurol* 62, 1280–1285.

Xia, H. et al. (2004). RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10, 816–820.

Yamada, M. et al (2001). Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathol* 101, 140-144.

Yger, M. e Girault, J. (2011). DARPP-32, jack of all trades... Master of which? *Front. Behav. Neurosci.* 5, 1–14.

Yi, R. et al (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016 (2003).

Yi, R. et al (2005). Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *Rna* 11, 220–226.