

Patrícia Alexandra Silva Lima

The impact of aging in mutant ataxin-2 induced neurodegeneration



UAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2020

Patrícia Alexandra Silva Lima

The impact of aging in mutant ataxin-2 induced neurodegeneration

Mestrado em Ciências Biomédicas- Mecanismos de doenças

Trabalho efetuado sob a orientação de Clévio Nóbrega



UAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2020

Declaração de Autoria do Trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluídas.

Copyright ©

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Agradecimentos

Quero, primeiramente, agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Clévio Nóbrega, por quem eu tenho uma imensa admiração, não só por me receber no seu laboratório e orientar-me durante o ano letivo, mas também pelo apoio, disponibilidade, dedicação e conhecimento que me transmitiu durante todo o mestrado de Ciências Biomédicas.

Não posso também deixar de agradecer, à sua fantástica equipa de laboratório, por me acolherem tão bem e por todos os bons momentos, dentro e fora do mesmo. Quero agradecer, principalmente, à Adriana Marcelo, Rebekah Koppenol e André Conceição pela sua paciência e disponibilidade para me ensinar e ajudar nos momentos de maior dificuldade.

Um obrigada à Inês Afonso que me acompanhou durante todo o percurso de académico e que sempre me apoiou.

Gostaria ainda de agradecer aos meus pais e irmãos, o incentivo, a persistência e a motivação necessária para dar sempre o meu melhor. Um grande obrigada à minha avó Marieta, por todo o investimento e por acreditares nas minhas capacidades.

Obrigada a todos por tudo!

Patrícia Lima

2020

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	x
Abstract.....	xi
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xiv
1. Introdução:.....	1
1.1. Visão geral do Sistema Nervoso	1
1.2. Envelhecimento	1
1.2.1. Características do envelhecimento	1
1.2.1.1. Instabilidade genómica:	2
1.2.1.2. Encurtamento dos telómeros:.....	3
1.2.1.3. Alterações epigenéticas:	3
1.2.1.4. Diminuição da proteostase:.....	4
1.2.1.5. Desregulação da sensibilidade aos nutrientes:.....	4
1.2.1.6. Disfunção mitocondrial:	5
1.2.1.7. Senescência celular:	6
1.2.1.8. Exaustão das células estaminais:	7
1.2.1.9. Alteração da comunicação intercelular:.....	7
1.3. Envelhecimento e neurodegeneração.....	8
1.4. Doenças Neurodegenerativas.....	9
1.4.1. Principais achados neuropatológicos.....	9
1.5. Doenças poliglutaminas	10
1.5.1. Causas.....	12
1.5.2. Sintomas gerais e comuns entre as doenças de poliglutaminas.....	12
1.5.3. Achados celulares e moleculares das doenças de poliglutaminas	13

1.6.	Ataxia espinocerebelosa do tipo 2 (SCA2).....	16
1.6.1.	Gene causador.....	16
1.6.2.	Proteína.....	17
1.6.3.	Funções.....	17
1.6.4.	Doenças associadas ao gene <i>ATAXINA-2</i>	22
1.6.5.	Sintomas.....	24
1.6.6.	Características principais.....	24
1.6.7.	Mecanismos moleculares envolvidos na SCA2.....	25
1.7.	Modelos animais roedores de SCA2.....	27
1.7.1.	Modelo Q58:.....	28
1.7.2.	Modelo Q75:.....	29
1.7.3.	Modelo Q42KI:.....	30
1.7.4.	Modelo Q127:.....	30
1.7.5.	Modelo BAC-Q72:.....	31
1.7.6.	Modelo Q100-KI:.....	32
2.	Objetivo.....	35
3.	Materiais e Métodos:.....	36
3.1.	Animais:.....	36
3.2.	Produção dos vetores virais:.....	36
3.3.	Injeções esterotáxicas dos vetores lentivirais:.....	36
3.4.	Recolha de tecidos:.....	38
3.5.	Imunohistoquímica com revelação DAB:.....	38
3.6.	Imunohistoquímica com anticorpo secundário fluorescente:.....	39
3.7.	Coloração das secções cerebrais com violeta de cresilo:.....	40
3.8.	Microscopia:.....	41
3.9.	Extração e quantificação do RNA total:.....	41
3.10.	Extração e quantificação de proteína:.....	42

3.11. Quantificação dos agregados de ATXN2:	43
3.12. Quantificação do volume de marcador DARPP-32:.....	43
3.13. PCR quantitativo.....	43
3.14. SDS-PAGE e Western-Blot	44
3.15. Análise Estatística.....	45
4. Resultados:	46
4.1. O envelhecimento e a ATXN2 mutada contribuem para a formação de agregados proteicos e para a perda de marcação neuronal	46
4.2. A idade juntamente com a ATXN2 mutada está associada ao aumento da ativação da resposta inflamatória	54
4.3. A ATAXINA-2 mutante e a idade não alteram a expressão génica de elementos essenciais em diversos mecanismos celulares	58
4.4. A ATXN2 mutada diminui a ativação da atividade apoptótica e provoca alteração nas histonas	66
5. Discussão:.....	69
5.1. Formação de agregados de ATXN2 mutada e perda da integridade neuronal: 69	
5.2. A ATXN2 mutada conduz ao aumento da resposta inflamatória:	70
5.3. A ATXN2 mutada tem influência sobre o PABP:.....	71
5.4. A ATXN2 mutada e a idade não alteram os níveis de expressão génica de elementos essenciais nos processos autofágicos:	73
5.5. O aumento da idade e a presença de ATXN2 mutada não causam alterações na expressão génica de elementos mitocondriais:.....	73
5.6. A ATXN2 mutada em conjunto com a idade não provoca alterações na função sináptica:.....	74
5.7. A atividade do mTOR não é comprometida ao longo da idade na presença de ATXN2 mutada:	75
5.8. A ATXN2 mutada diminui a ativação da via apoptótica:.....	75
5.9. O papel das histonas pode estar comprometido devido à ação da ATXN2 mutada:	76

6.	Conclusão:	77
7.	Perspetivas futuras:.....	80
8.	Anexos:.....	81
9.	Bibliografia:.....	83

Resumo

Com o aumento da esperança de vida, cada vez mais aparecem doenças que previamente se desconheciam. Portanto, estas doenças não têm cura definitiva, existindo apenas terapêutica para alívio dos sintomas. As doenças neurodegenerativas inserem-se neste grupo de doenças sem cura. À medida que a idade aumenta, o cérebro é afetado pela diminuição e desregulação de certos mecanismos intra e intercelulares. É o caso da autofagia, cuja função de degradação e reciclagem de proteínas e organelos diminui durante o desenvolvimento. Nisto resulta, a acumulação de proteínas de conformação anormal e na formação de agregados proteicos que se tornam evidentes nos neurónios. As doenças de poliglutaminas são um grupo de nove doenças neurodegenerativas, que engloba a Ataxia Espinocerebelosa do tipo 2 (SCA2). A SCA2 é provocada pela expansão anormal do trato CAG que codifica para uma expansão anormal de glutaminas na proteína responsável pela patologia, ATAXINA-2. Dois achados comuns das doenças de poliglutaminas são a presença de agregados neuronais da proteína mutante nas regiões afetadas do cérebro e a desregulação do mecanismos de degradação proteica, como a autofagia. Este projeto teve como objetivo avaliar o efeito da neurodegeneração causada pela ATAXINA-2 mutante nos murganhos jovens e idosos. O aumento da idade contribuiu para um aumento na formação de agregados de ATAXINA-2 mutante e também para a perda neuronal. Os danos nas células provocados pela proteína mutada conduzem à ativação da resposta inflamatória através do recrutamento de astrócitos e ativação da microglia, que se torna mais acentuado numa idade mais avançada. Além disso, a ATAXINA-2 mutada provoca uma redução da ativação da via apoptótica e da quantidade de histonas e, possivelmente, o recrutamento do PABP para os agregados proteicos. Contudo, não foram observadas alterações nos sistemas autofágicos, mitocondriais, sinápticos e na sensibilidade da regulação de nutrientes.

Palavras chave: Estriado • Envelhecimento • ATAXINA-2 • Autofagia • Agregados • Neurodegeneração

Abstract

With the increase in life expectancy, diseases that were previously unknown have increasingly appear. Therefore, these diseases have no definitive cure, therefore only exists therapy for symptoms relief. Neurodegenerative diseases are part of this group of diseases with no cure. As age increases, the brain is affected by the decrease and dysregulation of certain intra and intercellular mechanisms. This is the case of autophagy; whose function of degradation and recycling proteins and organelles decreases during aging. This results in the accumulation of abnormally shaped proteins and the formation of protein aggregates that become evident in neurons. Polyglutamine diseases are a group of nine neurodegenerative diseases, including type 2 spinocerebellar ataxia (SCA2). SCA2 is caused by the abnormal expansion of the CAG tract that encodes for an abnormal expansion of glutamines in the protein responsible for the pathology, ATAXIN-2. Two common hallmarks of polyglutamine diseases are the presence of neuronal aggregates of the mutant protein in the affected regions of the brain and the dysregulation of protein degradation mechanisms, such as autophagy. This project aimed to evaluate the effect of neurodegeneration caused by the mutant ATAXIN-2 on young and old mice. The increase in age contributed to an increase of the formation of mutant ATAXIN-2 aggregates and also to neuronal loss. Cell damage caused by the mutated protein leads to the activation of the inflammatory response through the recruitment of astrocytes and activation of the microglia, which becomes more pronounced at an older age. In addition, the mutated ATAXIN-2 causes a reduction in the activation of the apoptotic pathway and the number of histones and possibly the recruitment of PABP to protein aggregates. However, no changes were observed in the autophagic, mitochondrial, synaptic systems and in the sensitivity of nutrient regulation.

Keywords: Striatum • Aging • ATAXIN-2 • Autophagy • Aggregates • Neurodegeneration

Índice de Figuras

Figura 1.1. - Características do envelhecimento.....	2
Figura 1.2. - Mecanismos moleculares e celulares envolvidos na patologia das doenças de poliglutaminas.....	15
Figura 1.3. - Estrutura secundária da ATAXINA-2 humana.....	17
Figura 1.4. - Funções da Ataxina-2.....	22
Figura 3.1. - Desenho experimental	37
Figura 4.1. - O envelhecimento contribui para a formação de agregados de ATXN2 ...	49
Figura 4.2. - A ATAXINA-2 mutante compromete a integridade neuronal.	52
Figura 4.3. - Evidências de morte neuronal nos animais jovens e idosos, independentemente da presença de ATXN2 mutada.....	53
Figura 4.4. - A idade está associada ao aumento da ativação da resposta inflamatória.	56
Figura 4.5. - A ATAXINA-2 está associada ao aumento da ativação da resposta inflamatória.....	57
Figura 4.6. - A ATAXINA-2 mutante e a idade não alteram a expressão génica de elementos essenciais em diversos mecanismos celulares.....	61
Figura 4.7. - A ATAXINA-2 mutante e a idade não alteram a expressão génica de elementos essenciais em diversos mecanismos celulares.....	65
Figura 4.8. - A ATAXINA-2 mutada conduz a alterações nos processos apoptótico e alterações epigenéticas	67
Figura.6.1. - A ATAXINA-2 mutada conduz à neurodegeneração que é agravada com o envelhecimento.....	78
Figura 8.1. - Imagens de microscopia representativas de marcação DARPP-32 nos animais idosos não injetados.	81
Figura 8.3. - Imagens representativas de microscopia para a marcação imunohistoquímica do Iba1 nos animais idosos não injetados	82

Índice de Tabelas

Tabela 1.1.1. - Características das doenças de poliglutaminas.....	10
Tabela 1.2. - Resumo do fenótipo e neuropatologia de cada um dos modelos de murganho para SCA2 descritos e altura inicial em que cada um destes aspetos é detetado.	34
Tabela 3.1. - Primers e respetiva diluição utilizados no PCR quantitativo	44

Lista de Abreviaturas

AMP - *Adenosine monophosphate* (Adenosina monofosfato)

AMPK-AMP-*activated protein kinase* (Proteína cinase ativada por AMP)

AP - Ântero-posterior

ATP - *Adenosine triphosphate* (Adenosina trifosfato)

ATXN2-AS - *Anti-sense* da ATXN2

A2BP-1 - *Ataxin-2 binding protein 1* (Proteína de ligação à Ataxina-2 do tipo 1)

BAC - *Bacterial Artificial Chromosomes* (Cromossomas artificiais da Bactérias)

bp - *base pairs* (par de bases)

CACNA1a - *Calcium channel, voltage dependent, P/Q type, a1A subunit* (Canal de cálcio dependente de voltagem do tipo P/Q subunidade a1A)

cDNA - *complementary DNA* (DNA complementar)

DARPP-32 - *dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 32 kD*

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DRPLA - *dentatorubral-pallidoluysian atrophy* (Atrofia dentatorubro-palidoluisiana)

DV - Dorsoventral

GDI-1 GDP - *dissociation inhibitor* (Inibidor da dissociação do GDP)

HD - Huntington disease (doença de Huntington)

IGF-1 - *Insulin-like growth factor 1* (fator de crescimento semelhante à insulina)

IIS - *Insulin/IGF-1 signaling* (via de sinalização da insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina)

InsP3R19 - Recetor do tipo 1 inositol 1,4,5-trifosfato

kb - *kilobases* (quilobases)

kDa - *kiloDalton* (quiloDalton)

Lsm - *Like Sm* (Do tipo Sm)

LsmAD- *Lsm-associated domain* (Domínio associado ao Lsm)

LTD - *Long Term Depression* (Depressão a longo-termo)

ML - Medio-Lateral

mRNA - RNA mensageiro

mTOR - *Mammalian target of Rapamycin* (Alvo de mamífero da Rapamicina)

NAA-N - acetilaspártato

NAD⁺ - *Nicotinamide adenine dinucleotide* (Dinucleótido de nicotinamida e adenina)

NF-κB - *Nuclear factor-κB* (Factor nuclear κB)

NGS - *Normal goat serum* (Soro normal de cabra)

PABP - *poly(A)-binding protein* (Proteína de ligação à cadeia poly-(A))

PBS - *Phosphate buffer solution* (Solução tampão de fosfato)

Pcp2 - *Purkinje cell protein 2* (Proteína 2 da célula de Purkinje)

PER - Proteína *PERIOD*

PFA -Paraformaldeído

RBP-RNA - *binding protein* (Proteína capaz de ligar ao RNA)

RNA - *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

ROS - *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigénio)

RRM-RNA - *Recognition Motif* (Domínio de reconhecimento de RNA)

SBMA - *spinal bulbar muscular atrophy* (Atrofia muscular bulbar e espinhal)

SCA1 - Ataxia espinocerebelosa do tipo 1

SCA2 - Ataxia espinocerebelosa do tipo 2

SCA3 - Ataxia espinocerebelosa do tipo 3

SCA6 - Ataxia espinocerebelosa do tipo 6

SCA7 - Ataxia espinocerebelosa do tipo 7

SCA17 - Ataxia espinocerebelosa do tipo 17

SIRT - Sirtuina

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

snRNPs - *spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins* (Pequenas ribonucleoproteínas nucleares)

TBP - *TATA box binding protein* (Proteína de ligação à TATA box)

TYF - Proteína *TWENTY-FOUR*

U.a. – Unidades arbitrárias

UPS - *Ubiquitin proteasome system* (Sistema Ubiquitina Proteossoma)

UTR - untranslated region (Região não traduzida)

1. Introdução:

1.1. Visão geral do Sistema Nervoso

A homeostasia do organismo é regulada principalmente pelo sistema nervoso, que monitoriza e responde a todas as alterações no ambiente externo e interno (Farley et al. 2014), sendo responsável por diversas funções, tais como a memória, percepção, comportamento, movimentos voluntários, entre outras.

De uma forma geral, o sistema nervoso divide-se em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é constituído pelo cérebro e espinal medula, enquanto o SNP abrange todo o tecido neural exterior ao SNC.

A unidade funcional do sistema nervoso é o neurónio. Os neurónios aferentes ou sensoriais transportam a informação para o SNC, que processa a informação e inicia uma resposta através dos neurónios eferentes ou motores. Os neurónios são altamente dependentes de glucose e oxigénio para produzir adenosina trifosfato (ATP) que suporta as diversas atividades celulares (Farley et al. 2014).

O cérebro é constituído por diferentes estruturas com funções distintas (Hendry et al. 2014). Por exemplo, o hipotálamo é responsável pelas emoções, pelo ritmo circadiano, por regular a temperatura corporal e ainda pela regulação do consumo de alimentos e água, entre outras funções. Já o cerebelo exerce um papel na coordenação e refinamento do movimento, no tónus muscular e na manutenção da postura (Hendry et al. 2014). O estriado, por seu lado, está associado ao comportamento motivacional para obter uma recompensa e à criação de hábitos (Burton, Nakamura, and Roesch 2015).

1.2. Envelhecimento

1.2.1. Características do envelhecimento

Todos os organismos vivos estão sujeitos ao processo de envelhecimento, caracterizado pelo declínio funcional ao longo do tempo (Lopez-Otin et al. 2013). O envelhecimento deve-se essencialmente a danos celulares que vão acumulando com o passar do tempo e que mais tarde se traduzem no declínio das funções fisiológicas. As características típicas do envelhecimento incluem diversos mecanismos moleculares que são detalhados nas secções seguintes (Fig. 1.1.).

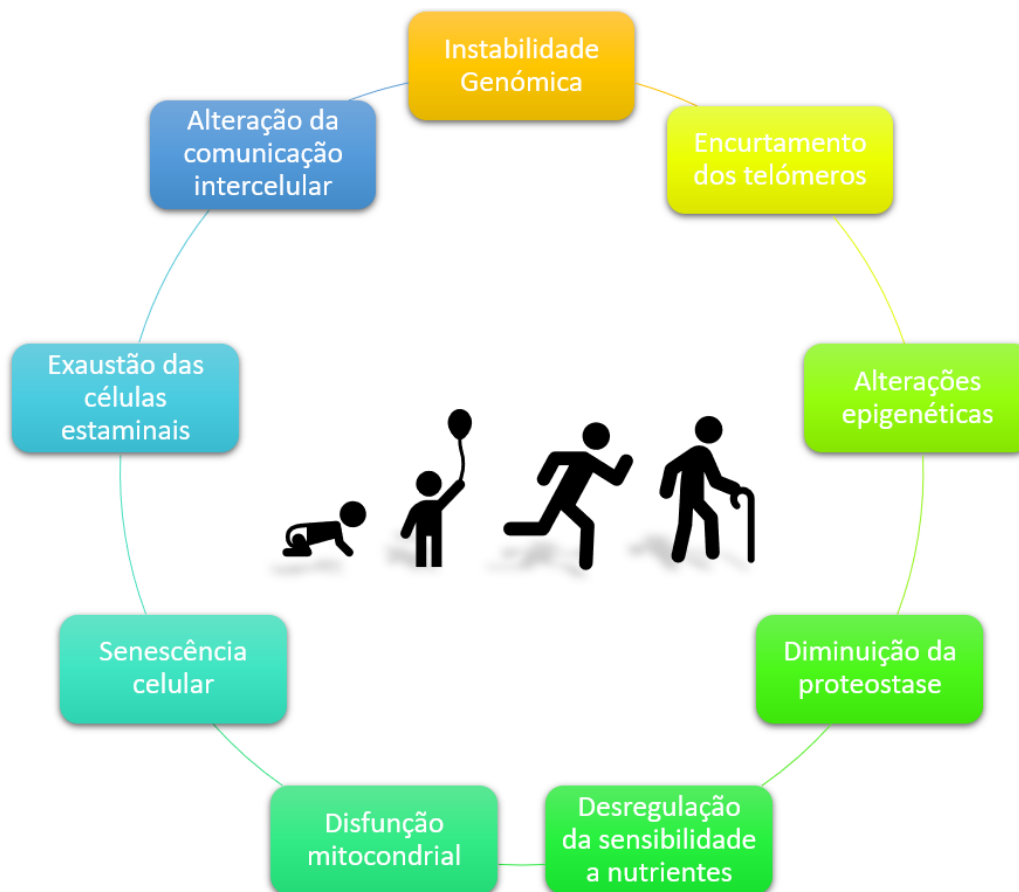


Figura 1.1.- Características do envelhecimento. O esquema enumera as diversas características típicas do envelhecimento: instabilidade genómica, encurtamento dos telómeros, alterações epigenéticas, diminuição da proteostase, desregulação da sensibilidade a nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão das células estaminais, alteração da comunicação intercelular (baseado no artigo Lopez-Otin et al. 2013).

1.2.1.1. Instabilidade genómica:

Com o aumento da idade, vão sendo acumulados danos genéticos que podem ser mutações pontuais, perda e/ou ganho de cromossomas, alteração de genes devido a integração de vírus ou de transposões, translocações e encurtamento dos telómeros. A integridade do genoma é afetada de uma forma quase aleatória por fatores exógenos, sejam eles biológicos, químicos ou físicos, e por fatores endógenos, como espécies reativas de oxigénio (ROS - *Reactive oxygen species*), erros de replicação do DNA e reações hidrolíticas espontâneas. Os mecanismos de reparação do DNA reduzem os danos genéticos e mantêm a integridade no genoma (Lopez-Otin et al. 2013). Estes mecanismos de reparação incluem o método de reparação por excisão do nucleótido para danos no DNA de cadeia simples e o método de reparação por homologia ou pela junção das extremidades não homólogas para quebras de DNA de cadeia dupla (Kubben and Misteli

2017). Contudo, a eficácia destes mecanismos de reparação de DNA tende a diminuir ao longo do processo de envelhecimento, o que contribui para o aumento das anomalias genéticas, que por sua vez podem ativar oncogenes ou inativar genes supressores de tumor, resultando na tumorigênese (Kubben and Misteli 2017). Defeitos na arquitetura nuclear, como por exemplo, na lâmina nuclear, que contribui para dar estrutura à cromatina e a complexos proteicos que regulam a estabilidade do material genético, também contribuem para a instabilidade genômica (Lopez-Otin et al. 2013).

1.2.1.2. Encurtamento dos telómeros:

Os telómeros são sequências repetidas nas extremidades dos cromossomas que ajudam a prevenir que estas sejam reconhecidas como quebras de cadeia dupla (Kubben and Misteli 2017). Ao longo do tempo, os telómeros sofrem deterioração, isto é, tornam-se mais curtos a cada divisão celular (Lopez-Otin et al. 2013; Kubben and Misteli 2017). Isto deve-se à diminuição da funcionalidade da telomerase, uma DNA polimerase especializada capaz de replicar completamente as extremidades do DNA (Lopez-Otin et al. 2013). Dado que os telómeros encurtam com a idade, a capacidade proliferativa das células reduz-se, o que contribui para o envelhecimento.

1.2.1.3. Alterações epigenéticas:

As alterações epigenéticas incluem a remodelação da cromatina, alteração dos padrões de metilação do DNA e modificações pós-tradução das histonas, que afetam a integridade genômica e a expressão de genes em todas as células e tecidos durante o processo de envelhecimento (Lopez-Otin et al. 2013; Kubben and Misteli 2017). A formação e manutenção dos padrões epigenéticos resultam da ação de múltiplos sistemas enzimáticos, tais como complexos proteicos envolvidos na remodelação da cromatina, histonas acetilases e desacetilases, histonas metilases e desmetilases e DNA metiltransferases. Sabe-se que, as marcas epigenéticas associadas à idade incluem a perda global das histonas e da heterocromatina, a diminuição da trimetilação da H3K27 ou da metilação H3K9, o aumento da trimetilação da H4K20 ou da H3K4 e o aumento da acetilação da H4K16 (Lopez-Otin et al. 2013; Kubben and Misteli 2017).

1.2.1.4. Diminuição da proteostase:

A proteostase, também conhecida por homeostasia proteica, abrange diversos mecanismos, que funcionam de forma coordenada, e que são responsáveis pela estabilização da conformação apropriada e degradação das proteínas (Lopez-Otin et al. 2013). A estabilização das proteínas é controlada pelas chaperonas, enquanto que a degradação de proteínas pode ser realizada através do sistema autofágico lisossomal ou do sistema ubiquitina-proteossoma (UPS - *Ubiquitin proteasome system*), ambos prevenindo a acumulação de componentes danificados. Durante o envelhecimento, a atividade das chaperonas é afetada e a atividade dos sistemas de degradação de proteínas diminui. Isto traduz-se, num aumento de agregados proteicos ou de proteínas com uma conformação anormal, contribuindo para uma desregulação celular e para um aumento do risco para desenvolver determinadas patologias associadas à idade (Lopez-Otin et al. 2013).

1.2.1.5. Desregulação da sensibilidade aos nutrientes:

A desregulação da sinalização metabólica provoca anomalias em vários eventos celulares, que estão implicados nas doenças associadas à idade (Kubben and Misteli 2017).

A via de sinalização da insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*), também denominada por via IIS (*Insulin/IGF-1 signaling*) é ativada pelo excesso de nutrientes e permite às células identificar a presença de glucose (Lopez-Otin et al. 2013; Kubben and Misteli 2017). A via IIS tem como alvos, elementos que estão associados ao envelhecimento, tais como os complexos mTOR (*Mammalian target of Rapamycin* ou Alvo de mamífero da Rapamicina) e a família de fatores de transcrição FOXO (Lopez-Otin et al. 2013). A ativação da via IIS diminui a atividade do mTOR e promove processos anabólicos (Kubben and Misteli 2017). A diminuição da sinalização da IIS durante um curto período, pode ser benéfica, pois minimiza o crescimento celular, de modo a centralizar a energia para a reparação dos danos celulares. No entanto, se a diminuição da sinalização desta via for prolongada, pode ser bastante prejudicial e promover o envelhecimento, como é o caso dos neurónios que são altamente dependentes de glucose e exigem uma elevada taxa metabólica, o que os torna bastante sensíveis a alterações na via de sinalização IIS (Kubben and Misteli 2017).

A diminuição dos níveis de IGF-1 e da IIS são características comuns ao envelhecimento fisiológico (Lopez-Otin et al. 2013).

O mTOR é responsável pela sensibilidade a elevadas concentrações de aminoácidos. A mTOR cinase pertence ao mTORC1 e mTORC2, dois complexos multiproteicos que regulam aspectos do metabolismo anabólico (Lopez-Otin et al. 2013). A inibição da mTORC1 é fenotipicamente semelhante à restrição calórica, sendo que esta última está associada ao aumento da esperança de vida (Johnson, Rabinovitch, and Kaeberlein 2013). Assim, as vias mTORC1 e IIS, que sinalizam a atividade anabólica, aceleram o processo de envelhecimento (Lopez-Otin et al. 2013).

O AMPK (AMP - *activated protein kinase* ou Proteína cinase ativada por AMP) e as sirtuinas detetam baixos estados de energia, sinalizados por níveis elevados de AMP (*Adenosine monophosphate* ou Adenosina monofosfato) e NAD^+ (*Nicotinamide adenine dinucleotide* ou dinucleótido de nicotinamida e adenina), respetivamente. O AMPK e as sirtuinas atuam de uma forma oposta à via IIS e mTOR, porque sinalizam o catabolismo e a carência de nutrientes. As sirtuinas e o AMPK, quando regulados positivamente, favorecem o envelhecimento saudável (Lopez-Otin et al. 2013). O AMPK silencia a atividade do mTORC1, enquanto a SIRT1 (sirtuina 1) conduz ao desencadeamento de uma resposta metabólica complexa que envolve o aumento das defesas antioxidantes, da formação de mitocôndrias e do aumento da oxidação dos ácidos gordos (Lopez-Otin et al. 2013). A atividade tanto da AMPK como da SIRT1 tende a diminuir com a idade (Kubben and Misteli 2017).

Resumindo, a diminuição da sinalização de nutrientes aumenta a esperança de vida, enquanto a via de sinalização anabólica acelera o envelhecimento (Lopez-Otin et al. 2013).

1.2.1.6. Disfunção mitocondrial:

Durante o envelhecimento, a eficácia da cadeia respiratória mitocondrial diminui, há um aumento da fuga de elétrons e a produção de ATP é reduzida (Lopez-Otin et al. 2013).

A disfunção mitocondrial progressiva, resultante do envelhecimento, conduz ao aumento da produção de ROS. Os ROS, em resposta a sinais fisiológicos ou em condições de stress, desencadeiam sinais de sobrevivência e proliferação. Com o passar do tempo, os níveis de ROS continuam a aumentar de modo a manter a sobrevivência celular.

Porém, a um determinado nível, os ROS perdem o seu efeito benéfico e provocam danos mitocondriais e celulares (Lopez-Otin et al. 2013). Os níveis de ROS podem ser reduzidos, através da ação dos mecanismos antioxidantes, contudo, a atividade destes mecanismos tende também a diminuir com o aumento da idade (Kubben and Misteli 2017).

A disfunção mitocondrial pode ainda contribuir para o envelhecimento através de outros mecanismos (Lopez-Otin et al. 2013). Por exemplo, a sinalização apoptótica pode ser afetada por deficiências mitocondriais e, conseqüentemente, aumentar a tendência de permeabilização das mitocôndrias e desencadear reações inflamatórias.

Além disso, a membrana mitocondrial externa está associada ao retículo endoplasmático, portanto, se as membranas associadas à mitocôndria forem afetadas, a disfunção mitocondrial pode ter também um impacto na sinalização entre organelos (Lopez-Otin et al. 2013).

1.2.1.7. Senescência celular:

A senescência celular consiste no bloqueio estável do ciclo celular associado a alterações fenotípicas (Lopez-Otin et al. 2013). Este fenômeno resulta de danos no DNA, do encurtamento dos telômeros e da não repressão do locus INK4/ARF. As vias p16INK4A/Rb e p19ARF/p53 estão envolvidas na indução da senescência (Lopez-Otin et al. 2013). A ativação temporária das vias supressoras de tumor p16-Rb e p53-p21 permitem a reparação de danos celulares antes de continuar o processo de proliferação (Kubben and Misteli 2017). Contudo, quando estas vias são ativadas por longos períodos, podem desencadear uma sinalização inflamatória, que resulta na secreção de citocinas e interleucinas pelas células senescentes. Esta secreção, associada à senescência pode prejudicar a comunicação entre células do sistema imunitário e células senescentes, o que impede que as células senescentes sejam removidas (Kubben and Misteli 2017). O aumento de células senescentes durante o envelhecimento, indica que há uma diminuição da sua taxa de remoção e/ou do aumento da sua taxa de formação (Lopez-Otin et al. 2013).

A senescência celular contribui para o envelhecimento, uma vez que o número de células senescentes aumenta com a idade. Por outro lado, a senescência previne o aumento de células danificadas e potencialmente oncogênicas, e ainda permite que estas sejam removidas pelo sistema imunitário. No entanto, as células senescentes que são removidas

têm de ser repostas nos tecidos através da mobilização de células progenitoras. Contudo, a capacidade regenerativa das células progenitoras é mais reduzida nos organismos envelhecidos, logo, a quantidade de células senescentes aumenta e, por sua vez, agrava os danos e contribui ainda mais para o envelhecimento (Lopez-Otin et al. 2013).

1.2.1.8. Exaustão das células estaminais:

O potencial regenerativo dos tecidos diminui com o envelhecimento, acompanhado da acumulação de danos no DNA, do encurtamento dos telômeros e da sobre-expressão de proteínas inibitórias do ciclo celular (Lopez-Otin et al. 2013). A manutenção do organismo a longo prazo pode ser prejudicada pela deficiente proliferação das células estaminais e progenitoras, ou pela sua proliferação excessiva, que acelera a exaustão dos nichos de células estaminais (Lopez-Otin et al. 2013).

1.2.1.9. Alteração da comunicação intercelular:

A comunicação intercelular, seja neuronal, neuroendócrina, ou endócrina, está também alterada com o envelhecimento (Lopez-Otin et al. 2013). A sinalização neuro-hormonal torna-se desregulada, alterando a composição do ambiente peri e extracelular, diminuindo a imuno-sobrevivência contra células pré-malignas e agentes patogênicos e aumentando as reações inflamatórias. Todos estes eventos afetam as propriedades mecânicas e funcionais dos tecidos.

O envelhecimento nos mamíferos é acompanhado por um fenótipo pró-inflamatório denominado “*inflammaging*”. Este, pode ser causado pela ativação aumentada do fator de transcrição NF- κ B (*Nuclear factor- κ B* ou Factor nuclear κ B), pela acumulação de danos nos tecidos, pela tendência das células senescentes em libertar citocinas pró-inflamatórias, pela falha progressiva do um sistema imunitário, ou pela ocorrência de uma resposta autofágica defeituosa. A função do sistema imunitário adaptativo diminui, logo, a capacidade de remoção de células infetadas, de agentes infecciosos, de células a sofrerem transformação maligna e a diminuição de células senescentes, podendo assim, agravar o fenótipo do envelhecimento a um nível sistémico. O envelhecimento e a inflamação estão correlacionados, uma vez que o NF- κ B é ativado no hipotálamo em resposta ao stress e às respostas inflamatórias. Por sua vez, o NF- κ B induz, nos neurónios, uma via de sinalização que reduz a produção da hormona libertadora de gonadotropina. A diminuição

desta hormona, contribui para diversos fenótipos associados ao envelhecimento, tais como: a atrofia da pele, a fragilidade dos ossos, a redução da neurogénese e a fraqueza muscular. As SIRT1, SIRT2 e SIRT6 podem desacetilar histonas e componentes das vias de sinalização inflamatórias, como o NF- κ B ou as suas subunidades, o que resulta na regulação negativa ou na repressão da transcrição dos genes associados à inflamação. Deste modo, a resposta inflamatória associada ao envelhecimento pode ser afetada pelas sirtuinas. As citocinas inflamatórias atuam de forma contagiosa e permitem o envelhecimento dos tecidos vizinhos. Além disso, a senescência celular pode ser induzida nas células vizinhas por células senescentes, por processos que envolvem ROS ou ainda via contacto célula-célula (Lopez-Otin et al. 2013).

1.3. Envelhecimento e neurodegeneração

Tal como todos os órgãos de um organismo, o cérebro, também é suscetível a determinadas patologias associadas ao aumento da idade (Anderton 2002). As células de diversas regiões do sistema nervoso são afetadas pelo processo de envelhecimento, o que conduz ao declínio das funções cognitivas, sensoriais e motoras (Rego 2017). Dado que, as células cerebrais estão mais suscetíveis a alterações no DNA, alterações metabólicas, à acumulação de proteínas danificadas e a níveis elevados de stress oxidativo, estas são, de uma forma geral, das células mais afetadas pelo envelhecimento (Rego 2017).

Com o aumento da idade, a capacidade cognitiva começa a diminuir (Anderton 2002). O declínio funcional não patológico do cérebro pode ser causado por fatores ambientais e genéticos. A partir dos 60 anos de idade, ocorre uma diminuição do volume e do peso cerebral, um aumento do volume ventricular e de espaços por onde circula o líquido cefalorraquidiano (Anderton 2002). As zonas cerebrais principalmente afetadas pela perda de volume são: o córtex cerebral, o hipocampo e a matéria branca (Jernigan et al. 2001). A amígdala, o hipocampo e o córtex cerebral são algumas das regiões com maior perda neuronal (Anderton 2002). Contudo, existem alguns neurónios que sofrem apenas encolhimento dos corpos celulares. Noutras regiões do cérebro, como é o caso do núcleo basal, ocorre o encolhimento do corpo celular neuronal e perda neuronal (Anderton 2002). É também comum, existir uma disfunção sináptica (Masliah et al. 1993), como por exemplo, menor excitabilidade inicial, maior dificuldade em gerar potenciais de ação e menor número de espinhas dendríticas nos gânglios basais, que por sua vez, prejudica a execução de movimentos complexos (Walsh and Akopian 2019).

Para além da perda de volume e de neurónios, os cérebros envelhecidos apresentam perfis de expressão génica e proteica alterados, verificando-se um aumento da expressão de genes envolvidos na resposta ao stress na inflamação e uma diminuição da expressão de genes envolvidos na reparação do DNA, no metabolismo de proteínas e nas atividades trópicas (Anderton 2002).

1.4. Doenças Neurodegenerativas

1.4.1. Principais achados neuropatológicos

O maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas é, de facto, o envelhecimento (Hung et al. 2010). A probabilidade de desenvolver este tipo de patologias aumenta drasticamente a partir dos 60 anos (Rego 2017). Os mecanismos moleculares associados ao envelhecimento, tais como: a disfunção mitocondrial, reparação do DNA deficiente, acumulação do stress oxidativo, erosão dos telómeros e capacidade de regeneração de tecidos diminuída, são fatores que também contribuem para a patogénese molecular das doenças neurodegenerativas (Hung et al. 2010). Para além destas características, as doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento são também caracterizadas pela acumulação de proteínas com uma conformação anormal. A incorreta conformação das proteínas pode também estar associada à idade, uma vez que, o sistema de controlo de qualidade da síntese de proteínas diminui ao longo do tempo. Esta acumulação proteica pode conduzir à formação de agregados proteicos e, consequentemente, contribuir para o desenvolvimento da patologia (Hung et al. 2010).

As células do sistema nervoso estão sujeitas a elevados níveis de stress oxidativo, metabólico e iónico ao longo do tempo e, a dada altura, estas mesmas células deixam de ter a capacidade de se adaptar a estes níveis de stress, resultando na acumulação de lípidos de membranas, de DNA e de proteínas danificadas (Rego 2017). Como consequência, a acumulação destas moléculas danificadas prejudica a função de determinados organelos celulares e a capacidade de reparação e/ou eliminação de proteínas com conformação anormal, contribuindo para a morte neuronal e, por fim, para o desenvolvimento da doença (Rego 2017).

Os neurónios são células muito vulneráveis ao envelhecimento devido à grande dependência do transporte axonal para manter a função e suporte trófico, à sua elevada necessidade energética e à extensa área de projeção, que aumenta a exposição das células

a elementos tóxicos (Rego 2017). Nos neurónios ocorrem, ao longo do tempo, alterações estruturais e funcionais nas proteínas, resultando na formação de agregados proteicos insolúveis, uma vez que o UPS e a autofagia tal como já foi referido, encontram-se alterados no processo de envelhecimento. Estes agregados podem acumular-se tanto no interior como no exterior das células. Os agregados podem contribuir de uma forma significativa para a patologia de algumas doenças neurodegenerativas, e estar associados ao declínio cognitivo (Rego 2017).

1.5. Doenças poliglutaminas

Até à data, estão descritas nove doenças poliglutaminas (polyQ) (Tabela 1.1.), um grupo que inclui a doença de Huntington (HD), a doença de Kennedy ou SBMA (*spinal bulbar muscular atrophy*), a DRPLA (*dentatorubral-pallidoluysian atrophy*) e as ataxias espinocerebelosas do tipo 1 (SCA1), 2 (SCA2), 3 (SCA3), 6 (SCA6), 7 (SCA7) e 17 (SCA17) (Stoyas and La Spada 2018; Rego 2017; Matos, de Macedo-Ribeiro, and Carvalho 2011). Estas doenças são autossómicas dominantes, à exceção da SBMA que se trata de uma doença recessiva ligada ao cromossoma X (Rego 2017; Fan et al. 2014).

Tabela 1.1. - Características das doenças de poliglutaminas (Adaptado de: Stoyas and La Spada 2018; Rego 2017; Matos, de Macedo-Ribeiro, and Carvalho 2011)

Doença	SCA1	SCA2	SCA3	SCA6	SCA7	SCA17	DRPLA	SBMA	HD
Proteína Mutada	Ataxina-1	Ataxina-2	Ataxina-3	CACNA1a	Ataxina-7	TBP	Atrofina-1	Recetor de Androgénio	Huntingtina
# repetições CAG normal	6-39	15-24	10-51	4-20	4-35	25-42	7-35	5-36	6-34
# repetições CAG patológico	40-83	32-200	55-87	20-33	37-306	47-63	49-88	37-70	40-121
Localização dos agregados	Núcleo	Núcleo e Citoplasm	Núcleo e axónio	Núcleo e citoplasma	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Núcleo e citoplasma
Regiões mais afetadas	Cerebelo, núcleo dentado, tronco cerebral	Cerebelo, tronco cerebral, lobos frontotem porais	Cerebelo, gânglios da base, tronco cerebral e medula espinhal	Cerebelo e oliva inferior	Cerebelo, tronco cerebral, córtex visual, mácula	Cerebelo e oliva inferior	Cerebelo, cerebral, gânglios da base, corpos de Luys	Neurónio motores da ponta anterior da medula espinhal e tronco cerebral	Estriado e córtex cerebral

1.5.1. Causas

Uma característica comum das doenças poliglutaminas é a expansão anormal de sequências repetitivas do trinucleótido CAG na região codificante dos genes responsáveis por cada uma das doenças (Zoghbi and Orr 2000; Matos, de Macedo-Ribeiro, and Carvalho 2011). A mutação afeta genes e proteínas diferentes para cada uma das doenças de poliglutaminas, seja a nível da sequência de aminoácidos, da sua estrutura ou da função biológica (Rego 2017). A expansão de poliglutaminas pode ocorrer em diferentes locais da proteína, isto é, no meio da sequência de aminoácidos, junto ao N-terminal ou ao C-terminal (Rego 2017). O limite de repetições CAG é variável para cada uma das doenças, a partir do qual os indivíduos desenvolvem sintomatologia (Zoghbi and Orr 2000). De um modo geral, existe uma correlação inversa entre a idade em que as patologias se manifestam e o número de repetições CAG (Matos, de Macedo-Ribeiro, and Carvalho 2011; Zoghbi and Orr 2000). Assim sendo, números de repetições CAG elevados, correlacionam-se com um aparecimento da doença mais precoce, mais severo, generalizado e de mais rápida progressão (Rego 2017; Zoghbi and Orr 2000; Michalik and Van Broeckhoven 2003).

A “antecipação” é outra característica das doenças de poliglutaminas (Stoyas and La Spada 2018). As expansões do segmento de poliglutaminas apresentam instabilidade na transmissão para a geração seguinte, quando o número de repetições é patogénico ou se situa no limite superior dos valores normais (Rego 2017). A transmissão paterna está associada a uma maior instabilidade, o que resulta no aumento do número de repetições CAG (Geschwind 1997; Stoyas and La Spada 2018). Também pode ocorrer instabilidade na transmissão materna, contudo, esta está mais associada a uma redução da expansão de poliglutaminas na geração seguinte (Rego 2017). A instabilidade do número de repetições do trinucleótido CAG difere nas regiões cerebrais e nos diferentes tipos celulares do sistema nervoso central, manifestando-se na forma de mosaicismos somáticos (Rego 2017).

1.5.2. Sintomas gerais e comuns entre as doenças de poliglutaminas

Cada uma das doenças afeta, de forma seletiva, determinadas regiões do sistema nervoso central, apesar da expressão das proteínas mutadas ser normalmente ubíqua (Rego 2017). Os sintomas clínicos são bastante variados, no entanto, têm em comum, como resultado, uma perda neuronal progressiva (Rego 2017; Matos, de Macedo-Ribeiro,

and Carvalho 2011), originando disfunções motoras, ataxia progressiva, movimentos sacádicos lentos, disartria, disfagia, dificuldades cognitivas, distonia, demência e parkinsonismo (Fan et al. 2014). Os sintomas das formas mais comum das doenças de poliglutaminas surgem geralmente na idade adulta, e os doentes tendem a morrer entre 10 a 30 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas (Rego 2017).

1.5.3. Achados celulares e moleculares das doenças de poliglutaminas

As nove doenças de poliglutaminas têm em comum eventos patológicos moleculares e celulares provocados pela expansão anormal de poliglutaminas (Stoyas and La Spada 2018). Estes mecanismos patológicos (Figura 1.2), que podem atuar de forma cooperativa ou em cascata, incluem: a disfunção mitocondrial; danos no DNA; desregulação dos mecanismos de controlo de qualidade proteica e a sua degradação; sequestro de outras proteínas para os agregados e disrupção da sua função; desregulação da transcrição, disrupção das membranas celulares e subcelulares; alterações nos processos de endocitose e no transporte mediado por microtúbulos (Stoyas and La Spada 2018; Adegbuyiro et al. 2017).

A expansão de poliglutaminas provoca alterações na estrutura e nas interações proteicas, promovendo a formação de agregados intranucleares, que consistem em achados neuropatológicos das doenças de poliglutaminas e que podem contribuir para a patogénese deste tipo de doenças (Michalik and Van Broeckhoven 2003; Adegbuyiro et al. 2017). Porém, o papel dos agregados proteicos é controverso, pois têm sido descritos como tóxicos, contribuindo para a patogénese das doenças de poliglutaminas, mas por outro lado, têm também sido descritos como benéficos, uma vez que a sua formação pode servir como resposta celular protetora, de modo a sequestrar espécies proteicas anormais (Stoyas and La Spada 2018; Takeuchi and Nagai 2017; Adegbuyiro et al. 2017). A expansão de poliglutaminas pode também prejudicar a normal função da proteína (Stoyas and La Spada 2018; He, Lin, and Qin 2010). Por outro lado, a proteína patológica pode ganhar uma função que no seu estado normal não teria (Stoyas and La Spada 2018).

É comum, existir agregados de proteínas mutadas no núcleo, no citoplasma, ou em ambos, nos neurónios das regiões cerebrais afetadas (Michalik and Van Broeckhoven 2003). Os agregados envolvem diferentes moléculas, incluindo as formas normais e expandidas das proteínas de poliglutaminas e outras moléculas que são recrutadas para os mesmos (Adegbuyiro et al. 2017). O processo de agregação inicia-se por uma fase lenta

de nucleação, que permite a formação e alongação de fibrilhas insolúveis. Segue-se a fase de crescimento ou de alongação, na qual se observa a rápida expansão das fibrilhas agregadas. A agregação pode ocorrer através do rearranjo dos monómeros de poliglutaminas, que formam um núcleo que promove a formação de fibrilhas, ou então, pode ocorrer através do rearranjo estrutural de diversos oligómeros solúveis para formar um núcleo multimérico que conduz à formação de fibrilhas. Ambos os mecanismos de agregação podem ocorrer em simultâneo (Adegbuyiro et al. 2017). Os agregados são indicadores da desregulação da proteostase (Stoyas and La Spada 2018), uma vez que, estas estruturas são compostas por fragmentos tóxicos produzidos pela clivagem proteolítica que não são devidamente removidos pelo UPS e autofagia (Stoyas and La Spada 2018; Cortes and La Spada 2015).

A autofagia está associada à resposta das células ao stress, tendo um papel essencial na manutenção da proteostase (Cortes and La Spada 2015). Nos neurónios, o processo de autofagia está envolvido na degradação de proteínas de conformação anormal ou de organelos disfuncionais, que pode ocorrer como resposta à disfunção do UPS, causada pelas proteínas expandidas e agregadas (Stoyas and La Spada 2018). No entanto, diversos estudos apontam para que a autofagia também esteja desregulada em praticamente todas as doenças de poliglutaminas (Cortes and La Spada 2015).

As doenças de poliglutaminas estão também associadas à disfunção mitocondrial (Stoyas and La Spada 2018). Dado que os neurónios requerem necessidades energéticas elevadas e dependem do ATP produzido pela respiração celular na mitocôndria, são, portanto, bastante afetados pelas deficiências bioenergéticas. De facto, nestas doenças verifica-se um comprometimento dos complexos da cadeia de transporte de eletrões, uma diminuição da produção de ATP e um aumento dos níveis de ROS. Uma vez que as vias mitocondriais podem ser afetadas pela sobre-expressão das proteínas de poliglutaminas mutantes, a patogénese das doenças de poliglutaminas pode também estar associada à morte celular mediada pela mitocôndria (Stoyas and La Spada 2018).

As espécies agregadas interagem, sequestram e, conseqüentemente, afetam a função de proteínas envolvidas na transcrição, na homeostase proteica, na homeostase redox e no transporte vesicular (Adegbuyiro et al. 2017). Uma vez que os agregados contêm proteínas de conformação anormal, conseguem atrair proteossomas e chaperonas moleculares, entre outras moléculas (Michalik and Van Broeckhoven 2003). As chaperonas associam-se de forma transiente aos agregados, no entanto, o proteossoma

permanece nos agregados com o intuito de degradar as proteínas ubiquinadas presentes nestas estruturas. Desta forma, a disponibilidade dos proteossomas na célula diminui, e conseqüentemente, a capacidade de remoção de outras proteínas celulares danificadas ou com conformação anormal, também reduz. Como resultado, pode ser ativada uma resposta de stress celular e induzida a apoptose (Michalik and Van Broeckhoven 2003).

As proteínas patogênicas agregadas podem interagir com outras proteínas livres e recrutá-las para os agregados. Fora dos seus segmentos poliglutamínicos, as proteínas patogênicas de cada uma das doenças poliglutaminas são diferentes entre si, o que significa que, para cada uma destas doenças, a proteína mutada interage e recruta grupos de proteínas diferentes para os agregados. Deste modo, nas diversas doenças poliglutaminas são afetadas diferentes funções celulares e que se traduz por fenótipos distintos (Michalik and Van Broeckhoven 2003), existindo no entanto, algumas vias e mecanismos moléculares que estão afetados de forma comum a todas as doenças de poliglutaminas.

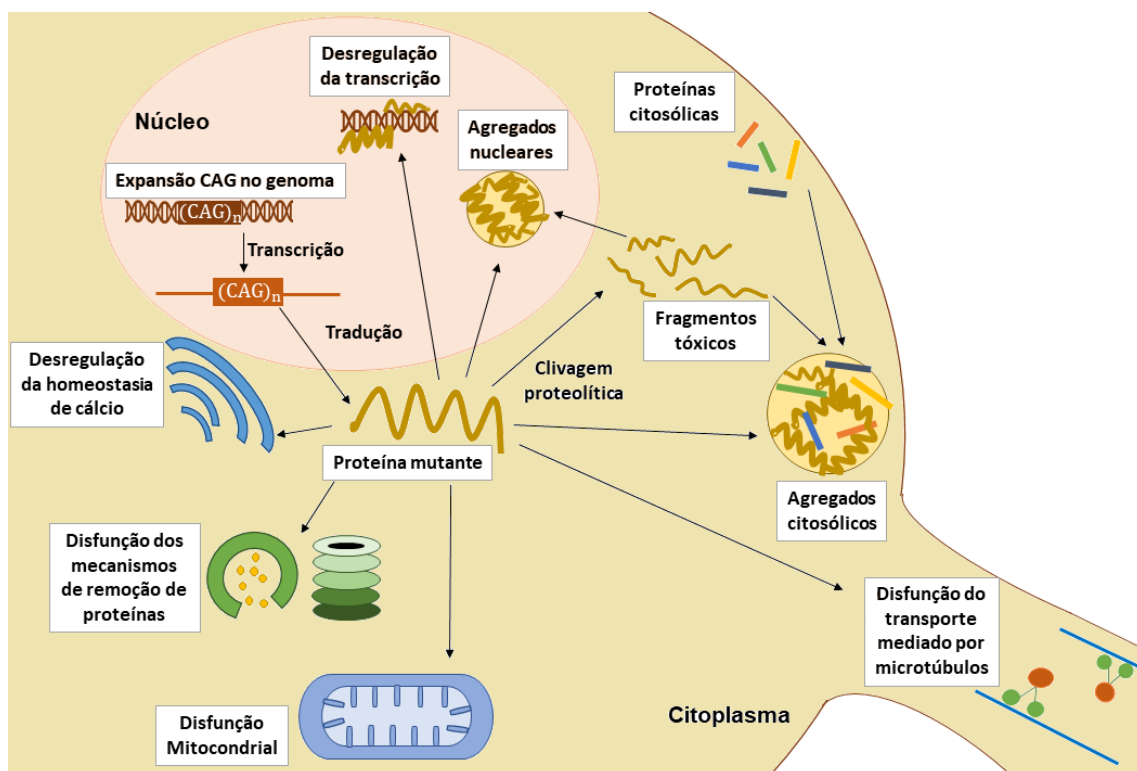


Figura 1.2- Mecanismos moleculares e celulares envolvidos na patologia das doenças de poliglutaminas. No núcleo, o gene com a expansão CAG é transcrito no mRNA, que posteriormente será traduzido para proteína no citoplasma. A proteína resultante, contém um segmento de poliglutaminas expandido e, portanto, terá uma conformação anormal. Esta proteína mutada pode sofrer clivagem proteolítica e gerar pequenos fragmentos tóxicos. Além disso, pode também provocar a desregulação da homeostasia do cálcio, disfunção dos mecanismos de remoção de proteínas, tais como: a autofagia e

o UPS, disfunção mitocondrial e disfunção do transporte mediado por microtúbulos. As proteínas com o trato de poliglutaminas expandido e os fragmentos tóxicos podem formar agregados citosólicos e recrutar outras proteínas citosólicas, afetando a sua função. Por outro lado, podem ser transferidos para o núcleo, onde afetam a transcrição ou, também formar agregados nucleares (baseado no artigo de Stoyas and La Spada 2018 e Alves-Cruzeiro et al. 2016).

1.6. Ataxia espinocerebelosa do tipo 2 (SCA2)

1.6.1. Gene causador

O gene responsável pela SCA2, *ATAXINA-2* (*ATXN2*, ID:6311), localiza-se no cromossoma 12q24.1 (Gispert et al. 1993). Este gene é altamente conservado entre diversos organismos eucariotas (Jimenez-Lopez and Guzman 2014). Contudo, a expansão do segmento de poliglutaminas no N-terminal da *ATAXINA-2* é restrita especificamente aos primatas (Jimenez-Lopez and Guzman 2014).

A região codificante do gene da *ATAXINA-2* tem cerca de 130 kb e engloba 25 exões com cerca de 4500 bp (Sahba et al. 1998). No primeiro exão codificante encontra-se a repetição do trinucleótido CAG, portanto, as proteínas apresentam o segmento poliglutaminico no N-terminal (Sahba et al. 1998).

O alelo normal do gene da *ATAXINA-2* tem a estrutura $(CAG)_8CAA(CAG)_4CAA(CAG)_8$ (Imbert et al. 1996). A forma mais comum do alelo normal apresenta duas interrupções de CAA, que também codifica para a glutamina, porém, as interrupções entre os trinucleótidos CAG pode ser apenas uma, ou podem ser até três (Imbert et al. 1996; Cancel et al. 1997; Saleem et al. 2000). Por outro lado, o alelo patológico não apresenta interrupções entre as repetições CAG (Imbert et al. 1996; Sanpei et al. 1996; Giunti et al. 1998; Saleem et al. 2000).

O gene é expresso em diversos tecidos, estando presente no cérebro, pâncreas, placenta, músculo esquelético, fígado, coração, rim e pulmão (Pulst et al. 1996; Sanpei et al. 1996). No cérebro, o mRNA da *ATAXINA-2* pode ser detetado no tálamo, amígdala, hipotálamo, hipocampo, *substantia nigra*, núcleo caudado, núcleo subtalâmico e corpo caloso (Sanpei et al. 1996), sendo a sua expressão mais elevada nas células de Purkinje (Huynh et al. 1999).

1.6.2. Proteína

A proteína ATAXINA-2 (número de acesso na base de dados UniProt: Q99700) é o produto do gene *ATXN2* e tem uma massa molecular de aproximadamente 140 kDa (Pulst et al. 1996; Sanpei et al. 1996; Albrecht et al. 2004). Na sua forma normal, a proteína inclui frequentemente 22 glutaminas no segmento de poliglutaminas e tem ao todo cerca de 1312 resíduos (Albrecht et al. 2004).

A ATAXINA-2 (Fig. 1.3) contém dois domínios globulares denominados *Like Sm* (Lsm) e *Lsm-associated domain* (LsmAD) (Albrecht et al. 2004). A proteína contém também o motivo PAM2 que interage com a *poly(A)-binding protein* (PABPC1). A ATAXINA-2 também contém na sua sequência péptidos (R)RG capazes de ligar-se ao RNA noutras proteínas.

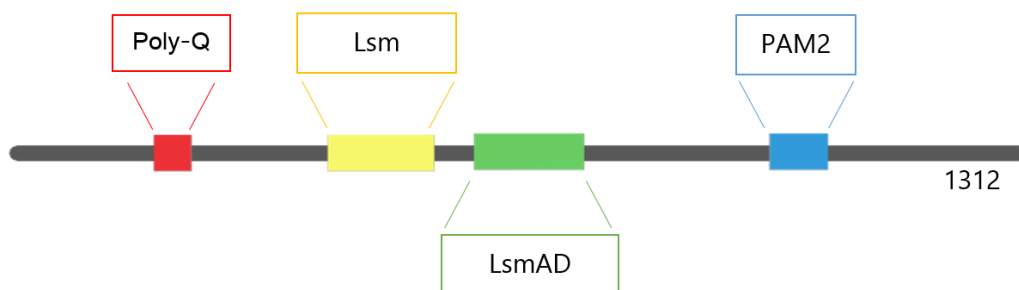


Figura 1.3. - Estrutura secundária da ATAXINA-2 humana. Esta proteína contém 1312 resíduos, e inclui os domínios Lsm, LsmAD e PAM2 que conferem à proteína determinadas funções associadas ao metabolismo do RNA. Junto ao N-terminal, encontra-se o trato poliglutaminico (Poly-Q).

1.6.3. Funções

O papel da ATAXINA-2 é bastante diverso (Fig. 1.4.). Esta proteína está associada a funções moleculares, celulares e fisiológicas:

A. Metabolismo do RNA: como proteína ligante de RNA, a ATAXINA-2 está envolvida no processamento de mRNA (Albrecht et al. 2004). Os domínios Lsm conferem às proteínas funcionalidades associadas ao processamento de RNA, tal como a modificação do RNA, *splicing* do pré-mRNA, *decapping* e degradação do mRNA. Algumas proteínas que contenham estes domínios podem também ser componentes de pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs - *spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins*) (Albrecht et al. 2004). O motivo *Sm* está incluído nas proteínas Lsm (He and Parker 2000), estando envolvidos na interação específica entre proteínas

necessárias para a associação do snRNP; logo, a presença deste motivo na ATAXINA-2 sugere que esta pode interagir com os snRNPs (Neuwald and Koonin 1998). Deste modo, a regulação do *splicing* pode ser afetada pela expansão de poliglutaminas no N-terminal da proteína, que altera ou impede as interações proteicas (Neuwald and Koonin 1998).

A proteína A2BP-1 (*ataxin 2 binding protein 1*) é uma proteína que contém um domínio de reconhecimento de RNA, o RRM (*RNA Recognition Motif*), e interage com o C-terminal da ATAXINA-2, (Albrecht et al. 2004; Shibata, Huynh, and Pulst 2000) sendo esta interação independente do segmento de poliglutaminas (Shibata, Huynh, and Pulst 2000). A proteína homóloga à ATAXINA-2 na levedura, a Pbp1, não só interage com o homólogo do PABPC1 humano, PAB1 na levedura, como também regula a poliadenilação após o *splicing* do pré-mRNA (Albrecht et al. 2004). O Pbp1 possui funções semelhantes à ATAXINA-2, pois também está envolvido no processamento de mRNA, incluindo a edição, o *splicing*, a exportação e degradação do mRNA (Ralser et al. 2005). A ATAXINA-2 interage diretamente com o PABP (Ralser et al. 2005; Nobrega et al. 2015) e pode associar-se aos polirribossomas, independentemente do tamanho da expansão de glutaminas (Satterfield and Pallanck 2006).

B. Regulação de R-loops: Um R-loop consiste numa estrutura com três cadeias de ácidos nucleicos, isto é, uma cadeia de RNA e as duas cadeias de DNA (positiva e negativa) (Aguilera and Garcia-Muse 2012), estando descritos como possíveis causadores de instabilidade genómica (Aguilera and Garcia-Muse 2012). A ATAXINA-2 pode ter um papel na repressão dos R-loops, uma vez que a depleção da sua expressão resulta na acumulação de R-loops em células humanas e na levedura (Abraham et al. 2016).

C. Regulação da sinalização de cálcio: A homeostasia do cálcio é regulada por diversos canais de cálcio nas células de Purkinje e noutros neurónios, tais como, sensores de cálcio e cinases/fosfatases dependentes de cálcio (Lee et al. 2018). A expansão anormal de glutaminas na ATAXINA-2 pode estar implicada na desregulação da sinalização de cálcio nas células Purkinje e, conseqüentemente, conduzir à degeneração destas células, contribuindo assim para a doença (Kasumu and Bezprozvanny 2012).

D. Manutenção da morfologia e dinâmica do Retículo Endoplasmático: A ATAXINA-2 associa-se de forma transiente aos ribossomas que estão ligados à membrana do retículo endoplasmático rugoso (van de Loo et al. 2009), tendo um papel importante na manutenção da sua morfologia e na dinâmica deste organelo (Del Castillo et al. 2019). O retículo endoplasmático é rico em proteínas capazes de se ligar ao RNA e a sua estrutura e função pode ser mediada pela ATAXINA-2. Visto que a ATAXINA-2 tem um papel no metabolismo do RNA (Albrecht et al. 2004), esta proteína facilita a tradução do mRNA codificante para componentes estruturais do retículo endoplasmático ou para proteínas associadas a este organelo (Del Castillo et al. 2019). Desta forma, a ATAXINA-2 mantém a estrutura apropriada do retículo endoplasmático e, conseqüentemente, facilita as funções do mesmo (Del Castillo et al. 2019).

E. Formação dos grânulos de stress: Diversos tipos de stress celular induzem a formação de grânulos de stress citoplasmáticos nas células eucarióticas (Buchan and Parker 2009). Os grânulos de stress contêm vários componentes que estão envolvidos no processo de iniciação da tradução, mRNAs não traduzidos, proteínas capazes de ligar ao RNA (RBPs - *RNA binding proteins*), entre outros elementos (Buchan and Parker 2009; Anderson and Kedersha 2006; Nunes et al. 2019). São recrutadas para os grânulos de stress, proteínas que estabilizam ou destabilizam o RNA, como por exemplo, o PABP (Kedersha and Anderson 2002). A ATAXINA-2 é também recrutada para os grânulos de stress, possivelmente através da interação com o PABP (Ralser et al. 2005). Os grânulos de stress podem também incluir a DDX6 (Nonhoff et al. 2007). Através dos domínios Lsm/LsmAD, a ATAXINA-2 interage com o DEAD/Hbox RNA helicase DDX6, podendo esta interação também facilitar o seu recrutamento para estes *foci*. O aumento da expressão da ATAXINA-2 não afeta os grânulos de stress. No entanto, o número e tamanho dos grânulos de stress diminuí drasticamente quando a expressão de ATAXINA-2 diminui. Portanto, esta proteína pode ter um papel essencial na formação dos grânulos de stress (Nonhoff et al. 2007).

F. Promove a apoptose: A ATAXINA-2 pode estar envolvida na regulação da sensibilidade das células ao estímulo apoptótico (Meunier et al. 2002). A morte celular e o aparecimento de células apoptóticas pode ser despoletada pela caspase 8 (Wiedemeyer

et al. 2003). A ativação desta caspase parece coincidir com a regulação positiva da ATAXINA-2, enquanto que a ATAXINA-2 mutada é menos eficiente na sensibilização das células ao estímulo apoptótico (Wiedemeyer et al. 2003).

G. Regulação do metabolismo: A ATAXINA-2 tem um papel na homeostasia da energia celular e pode atuar como um mediador metabólico e sensor de nutrientes (Lee et al. 2018). O *knock-out* da Ataxina-2 em murganhos provoca obesidade, hepatosteatose e dislipidemia, acompanhado por uma diminuição dos recetores de insulina no fígado e no pâncreas, e por um aumento dos níveis de insulina no pâncreas (Lastres-Becker et al. 2008). Além disso, a depleção da Ataxina-2 causou uma diminuição da esfingomiélin, aumento de gangliósidos e ainda desencadeou alterações na homeostasia do colesterol no cerebelo (Lastres-Becker et al. 2008). Portanto, a atividade pós-transcricional da ATAXINA-2 pode controlar a sinalização de insulina e possivelmente o metabolismo lipídico nos neurónios (Lee et al. 2018).

H. Desenvolvimento do organismo e reprodução: Em *C. elegans*, o homólogo da ATAXINA-2 é importante para o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário (Kiehl, Shibata, and Pulst 2000; Ciosk, DePalma, and Priess 2004). Esta proteína em *C. elegans* demonstra também ser essencial para o tamanho apropriado das gónadas e para o início da oogénese (Ciosk, DePalma, and Priess 2004). A ausência da sua expressão afeta a regulação espacial e temporal, provocando defeitos no desenvolvimento da linhagem germinal (Ciosk, DePalma, and Priess 2004).

I. Formação dos filamentos de actina: A Datx2, o homólogo da ATAXINA-2 na *Drosophila melanogaster*, demonstrou ser um regulador sensível à dosagem da formação de filamentos de actina no citoesqueleto (Satterfield 2002). Alterações na expressão desta proteína provoca defeitos na formação dos filamentos de actina e, conseqüente degeneração de tecidos, letalidade e esterilidade feminina. A Datx2 atua de forma indireta sobre a actina, através do controlo da localização, estabilidade ou tradução do mRNA que codifica para proteínas essenciais para a polimerização da actina, uma vez que o Datx2 e os filamentos de actina não interagem diretamente (Satterfield 2002).

J. Regulação da sinalização do TOR: o TOR tem 2 complexos distintos, o complexo TOR1 (TORC1) e o complexo TOR2 (TORC2), que são proteínas cinases que regulam processos de crescimento celular em resposta à disponibilidade de nutrientes (Wullschleger, Loewith, and Hall 2006). Em resposta ao stress de nutrientes, os níveis de ATAXINA-2 aumentam, e esta proteína modula a sinalização da via PI3K/mTOR (Lastres-Becker et al. 2016). O *knockdown* e *knock-out* da Ataxina-2 em murganhos em condições de privação de nutrientes conduz à ativação da via mTOR, o que sugere que a Ataxina-2 inibe a sinalização mTOR (Lastres-Becker et al. 2016; Ostrowski, Hall, and Mekhail 2017). Em *C. elegans*, o homólogo da ATAXINA-2 regula o tamanho corporal e celular através do controlo sobre a via mTOR, pois esta proteína associa-se ao GDI-1 (*GDP dissociation inhibitor*, um inibidor da troca de GDP-GTP que atua nos membros da família Ras) e inibe o mTORC1 (Bar et al. 2016).

K. Ritmo circadiano: O relógio circadiano consiste num ciclo endógeno, no qual diferentes processos oscilam e estão sincronizados (Ostrowski, Hall, and Mekhail 2017). A proteína PERIOD na *Drosophila*, dPER, é um componente crítico do ritmo circadiano (Yu and Hardin 2006). A *Datx2* permite a tradução de PER na *Drosophila* (Lim and Allada 2013). A depleção da *Datx2* ou a presença da sua forma mutante, resulta na diminuição dos níveis de PER e altera o ritmo circadiano, o qual é restaurado pela expressão da ATAXINA-2 normal. A proteína TYF (TWENTY-FOUR) interage com ATAXINA-2 e esta é essencial para a ativação da tradução do PER (Lim and Allada 2013). Nos mamíferos, o relógio é mais complexo, pois envolve três proteínas PERIOD (PER1, PER2 e PER3) homólogas à proteína PER da *Drosophila* (Zylka et al. 1998). O *knock-out* da Ataxina-2 em murganhos não provocou alterações nos níveis das proteínas PER1 e PER2 em comparação com os murganhos normais, o que sugere que a Ataxina-2 pode não estar diretamente envolvida na ativação da tradução da PER1 e PER2 (Pfeffer et al. 2017). No entanto, estes animais, após a desregulação transiente do ciclo circadiano, demoraram mais tempo a reajustar o seu ciclo, comparado com os murganhos normais, o que sugere que o ciclo circadiano é afetado pela ausência da Ataxina-2 (Pfeffer et al. 2017).



Figura 1.4.- Funções da Ataxina 2. O esquema enumera as diversas funções da Ataxina 2 descritas. Esta proteína tem um papel: no metabolismo do RNA; na regulação de R-loops; na regulação da sinalização de Cálcio; na manutenção da morfologia e dinâmica do Reticulo Endoplasmático; na formação dos grânulos de stress; na promoção da apoptose; na regulação do metabolismo; no desenvolvimento do organismo e na reprodução; na formação dos filamentos de actina; na regulação da sinalização do TOR e, por fim, no ritmo circadiano.

1.6.4. Doenças associadas ao gene ATAXINA-2

O alelo normal do gene *ATAXINA-2* tem cerca de 21 a 23 repetições CAG, sendo mais frequente as 22 repetições (Geschwind 1997). Contudo, quando a expansão é superior a 35 repetições, o gene torna-se patológico e provoca a doença ataxia espinocerebelosa do tipo 2 (SCA2: *Spinocerebellar Ataxia Type 2*; OMIM #183090) (Geschwind 1997). O número de repetições CAG patológicas mais comum nos doentes com SCA2 é de 37 (Pulst et al. 1996). Geralmente, a doença tende a manifestar-se por volta dos 30 anos (Geschwind 1997). Contudo, a idade em que a doença se desenvolve varia consoante o número de repetições (Pulst et al. 1996). Verifica-se que existe uma correlação inversa entre o número de repetições CAG e a idade em que a doença se manifesta, isto é, quanto maior o número de repetições, mais cedo se desenvolve a doença (Imbert et al. 1996).

A SCA2 é o segundo tipo de ataxia espinocerebelosa mais comum, logo a seguir à SCA3, e distribui-se geograficamente pelo mundo (Durr 2010), com maior prevalência em Cuba (Auburger et al. 1990).

A ATAXINA-2 normal, devido às suas diversas funções, pode estar também associada a outras doenças neurodegenerativas, tais como a SCA1 (Al-Ramahi et al. 2007), SCA3 (Nobrega et al. 2015; Lessing 2008), Esclerose Amiotrófica Lateral (Elden et al. 2010) e doença de Parkinson (Gwinn-Hardy et al. 2000).

A Ataxina-1 expandida, responsável pela SCA1, interage com a Ataxina-2 normal (Al-Ramahi et al. 2007). O aumento da expressão de Ataxina-2 aumenta a toxicidade da Ataxina-1, enquanto a diminuição dos níveis de Ataxina-2, reduzem a neurodegeneração causada pela Ataxina-1. Além disso, a Ataxina-1 mutada conduz à acumulação de Ataxina-2 no núcleo que, por sua vez, contribui para o aumento da toxicidade provocada pela Ataxina-1 e, conseqüentemente, para a patogénese da Ataxia espinocerebelosa do tipo 1 (Al-Ramahi et al. 2007).

Na SCA3 ou doença de Machado-Joseph, os níveis de mRNA ou de proteína da Ataxina-2 estão reduzidos (Nobrega et al. 2015) e, para além disso, esta proteína é recrutada para os agregados nucleares de Ataxina-3 mutante, o que leva a uma redução citoplasmática da proteína Ataxina-2. A diminuição dos níveis de Ataxina-2 resulta num aumento da disponibilidade da PABP e, por sua vez, conduz ao aumento do número de agregados nucleares de Ataxina-3. Ao restaurar os níveis de Ataxina-2, ocorre uma diminuição do número de agregados e dos níveis de espécies solúveis de Ataxina-3 mutada, atenuando anormalidades neuropatológicas, como, por exemplo, a perda de volume neuronal e de células de Purkinje (Nobrega et al. 2015).

A Ataxina-2 e a TDP-43, uma proteína associada à patogénese da Esclerose Amiotrófica Lateral, podem interagir de forma dependente de RNA e associar-se num complexo (Elden et al. 2010). A Ataxina-2 mutada pode alterar a toxicidade da TDP-43. Além disso, a expansão do gene *ATXN2*, principalmente entre 27 a 33 repetições, é um fator de risco para o desenvolvimento de Esclerose Amiotrófica Lateral (Elden et al. 2010).

Ao analisar uma família com historial clínico de Doença de Parkinson, verificou-se que, para além da sintomatologia desta doença, os doentes apresentavam também um fenótipo atáxico (Gwinn-Hardy et al. 2000). A ataxia era provocada por mutações no

locus SCA2, no qual, um dos alelos apresentava uma expansão de glutaminas. Esta expansão de glutaminas aumentava nas seguintes gerações, sendo também observável o efeito de antecipação, isto é, a doença manifestava-se mais precocemente nas novas gerações (Gwinn-Hardy et al. 2000).

1.6.5. Sintomas

Os sintomas apresentados pelos doentes com SCA2 incluem ataxia da marcha precoce, ataxia apendicular, disartria, distonia, disfagia, sinais Babinski, sinais piramidais, movimentos sacádicos lentos, neuropatia, demência, fasciculações fasciais, oftalmoparese supranuclear, aumento do tónus e dos reflexos do tendão (Geschwind 1997).

1.6.6. Características principais

Os doentes com SCA2 apresentam determinados achados cerebrais patológicos, como a perda neuronal severa na *substantia nigra*, das células de Purkinje do cerebelo (Huynh et al. 1999), como também, perda neuronal no globo pálido, no estriado e no córtex cerebral (Estrada et al. 1999). Os cérebros dos doentes apresentam uma diminuição do peso dos hemisférios cerebrais e dos gânglios basais (Estrada et al. 1999). Também se observa atrofia cerebral moderada, perda axonal, astrogliose e aumento da microglia em regiões específicas do cérebro (Huynh et al. 1999; Estrada et al. 1999).

No cerebelo destes doentes, verifica-se uma redução do seu peso e volume, uma diminuição da camada molecular e ainda perda de algumas fibras de mielina (Estrada et al. 1999). O gene da *ATAXINA-2* é expresso na maioria dos órgãos e a proteína tem uma ampla distribuição neuronal (Huynh et al. 1999). Talvez porque, os seus níveis de expressão são mais elevados nas células de Purkinje, as quais são também a população celular que sofre maior perda neuronal. Nas células de Purkinje, a *ATAXINA-2* encontra-se distribuída pelo citoplasma, enquanto na maioria dos restantes neurónios, como no caso dos neurónios dentados, dos neurónios piramidais do córtex e do hipocampo, a *ATAXINA-2* encontra-se num polo do citoplasma (Huynh et al. 1999). Na SCA2, as células de Purkinje apresentam ainda deformações nos axónios e uma fraca arborização dendrítica (Estrada et al. 1999).

1.6.7. Mecanismos moleculares envolvidos na SCA2

A mutação no gene da *ATAXINA-2* provoca na proteína um ganho de função (Pulst et al. 1996). Nas fases iniciais da doença, formam-se agregados citoplasmáticos de *ATAXINA-2* mutada, enquanto nas fases finais, estão presentes agregados nucleares (Koyano et al. 2014). Nos doentes com SCA2, nem sempre se observa a formação de agregados intranucleares nas células de Purkinje degeneradas do cerebelo ou do tronco cerebral, o que sugere que estes podem não ser essenciais para a patogénese da doença (Huynh et al. 2000).

A autofagia e o UPS são as típicas vias de degradação de proteínas com conformação anormal (Alves-Cruzeiro et al. 2016). O FBXW8 é uma subunidade do complexo ubiquitina ligase e pode desregular a *ATAXINA-2* mutante (Damrath et al. 2012). Além disso, a PARK2, um E3 ubiquitina ligase, e o FBXW8 podem ser sequestrados para os agregados de *ATAXINA-2* mutante (Halbach et al. 2015). Estas evidências sugerem que o UPS pode estar prejudicado, o que resulta no aumento da clivagem das proteínas mutantes em fragmentos pequenos e tóxicos e, conseqüentemente, promove a acumulação de proteínas anormais, contribuindo para a neurodegeneração (Alves-Cruzeiro et al. 2016).

Sabe-se que a *ATAXINA-2* tem um papel associado à regulação da tradução e no metabolismo do mRNA (Satterfield and Pallanck 2006; Albrecht et al. 2004; Shibata, Huynh, and Pulst 2000). Esta proteína localiza-se no retículo endoplasmático (van de Loo et al. 2009) e no aparelho de Golgi (Huynh et al. 2003). A expansão anormal de poliglutaminas da *ATAXINA-2*, afasta esta proteína do complexo de Golgi, provoca a sua disrupção e, conseqüentemente, conduz à morte celular por apoptose (Huynh et al. 2003). A *ATAXINA-2* promove a estabilidade do mRNA através da sua capacidade de se ligar diretamente ao 3' UTR dos mRNAs (Yokoshi et al. 2014). A *ATAXINA-2* mutada desregula, de uma maneira dependente do tamanho da expansão, a capacidade da proteína normal em estabilizar o mRNA, diminuindo a sua competência na regulação positiva da expressão proteica (Yokoshi et al. 2014). De um modo geral, o *turnover* proteico da célula é afetado pela expansão de poliglutaminas, devido ao facto de os sistemas de síntese e de degradação proteica estarem prejudicados (Alves-Cruzeiro et al. 2016). Na SCA2, verifica-se que os neurónios são bastante suscetíveis a alterações no *turnover* proteico, visto que estas células têm a função de estabelecer e manter a atividade sináptica (Alves-Cruzeiro et al. 2016).

Na doença SCA2, observa-se a desregulação da sinalização de cálcio que afeta principalmente as células de Purkinje, contribuindo para a sintomatologia desta doença (Kasumu and Bezprozvanny 2012). A depressão a longo-termo (LTD - *Long Term Depression*) nas células de Purkinje é intensificada pelo aumento dos níveis de cálcio intracelulares mediado pela ATAXINA-2 mutada. Consequentemente, a atividade destas células é suprimida, traduzindo-se no fenótipo atáxico (Kasumu and Bezprozvanny 2012). Como referido anteriormente, a ATAXINA-2 localiza-se no retículo endoplasmático, o depósito de cálcio intracelular (van de Loo et al. 2009). A ATAXINA-2 mutada interage com o recetor do tipo 1 inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3R19), favorecendo a libertação do cálcio intracelular nas culturas primárias de células de Purkinje em modelos de murganhos SCA2 transgênicos (Liu et al. 2009). A ocorrência destes eventos provoca um aumento da sensibilidade destas células à morte celular por apoptose, induzida pelo glutamato (Liu et al. 2009). Os sintomas destes murganhos podem ser aliviados por várias estratégias que afetam a atividade dos recetores de cálcio intracelulares e dos recetores de potássio ativados pelo cálcio, o que indica que um dos mecanismos principais da degeneração das células de Purkinje na SCA2 pode ser a desregulação do cálcio (Kasumu, Liang, et al. 2012; Kasumu, Hougaard, et al. 2012; Liu et al. 2009).

A modulação de genes mutados através de miRNAs, a produção de moléculas de RNA mutantes pela transcrição *anti-sense* e o sequestro de proteínas capazes de ligar ao RNA constituem mecanismos de toxicidade do RNA para a neurodegeneração (Alves-Cruzeiro et al. 2016). Na SCA2, verifica-se a transcrição bidirecional do gene *ATXN2* que resulta na produção de transcritos *anti-sense* (*ATXN2-AS*) neurotóxicos (Li et al. 2016). Contudo, apenas o *ATXN2-AS* mutante, com a expansão do trinucleótido CUG, provoca toxicidade nas células (Li et al. 2016).

Os mecanismos moleculares patológicos envolvidos na patologia da SCA2 estão resumidos abaixo na Fig. 1.5.

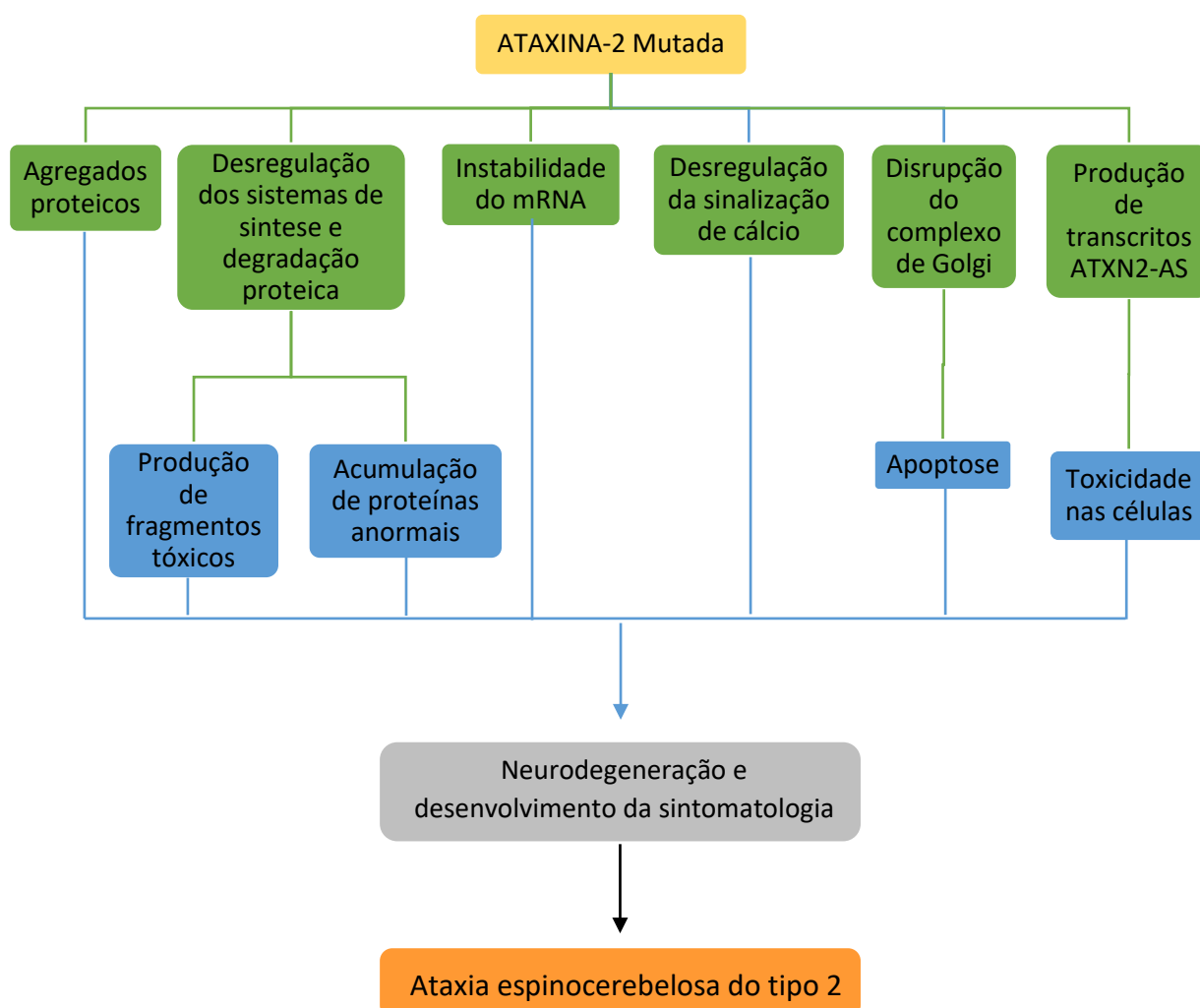


Figura 1.5. - Esquema representativo dos mecanismos moleculares envolvidos na patologia da SCA2. A ATAXINA-2 mutada conduz à formação de agregados citoplasmáticos, provoca instabilidade do mRNA e a desregulação da sinalização de cálcio. Além disso, contribui para a desregulação dos sistemas de síntese e degradação de proteínas que, por sua vez, conduz ao aumento da produção de pequenos fragmentos tóxicos e do número de proteínas de conformação anormal presentes na célula. A expansão de poliglutaminas na ATAXINA-2 causa a disrupção do complexo de Golgi, resultando na apoptose celular. Ainda se verifica a transcrição bidirecional do gene e, conseqüentemente, a produção de transcritos anti-sense da ATXN2 mutada, que é tóxica para as células. Todos estes eventos conduzem à neurodegeneração e ao aparecimento dos sintomas da doença, contribuindo para o desenvolvimento da doença SCA2.

1.7. Modelos animais roedores de SCA2

A ATAXINA-2 humana apresenta homologia elevada com a Ataxina-2 no murganho, tanto a nível de mRNA, como de proteína (Nechiporuk et al. 1998). Contudo,

a ausência do segmento de poliglutaminas na Ataxina-2 dos roedores, sugere que as doenças poliglutaminas não se desenvolvem nestes animais, mas apenas em primatas.

O mRNA do gene da *Ataxina-2* nos murganhos é expresso em diversos tecidos do organismo, tais como, o cérebro, o intestino, o baço, o músculo esquelético, o rim, o fígado, o pulmão e o coração (Nechiporuk et al. 1998). No cérebro, a Ataxina-2 é expressa em níveis mais elevados nas células de Purkinje do cerebelo e nos neurónios do tronco cerebelar. Contudo, a sua expressão é mais reduzida no córtex cerebral, no giro dentado do hipocampo e nos neurónios da camada granular do cerebelo (Nechiporuk et al. 1998).

Atualmente, não existe cura para a SCA2, sendo que a única terapia baseia-se nos cuidados paliativos e na utilização de fármacos para alívio dos sintomas (Alves-Cruzeiro et al. 2016). No entanto, estes métodos de tratamento não impedem a progressão da doença, pelo que existiu a necessidade de desenvolver modelos animais com o intuito de testar novas estratégias terapêuticas efetivas que possam ser introduzidas na prática clínica. Os modelos de murganho para a SCA2 mimetizam o fenótipo da doença, o que permite estudar, tanto a progressão da doença, como também testar novas estratégias terapêuticas. Até à data, foram descritos seis modelos de murganho para a SCA2 utilizando diferentes estratégias (Alves-Cruzeiro et al. 2016):

1.7.1. Modelo Q58:

O primeiro modelo de murganho a ser desenvolvido para a SCA2 consiste num modelo animal transgénico que expressa o gene *ATXN2* humano no seu comprimento total, com uma expansão de 58 CAG (Q58) (Huynh et al. 2000). O gene humano encontra-se sob a regulação do promotor heterólogo *Pcp2* (*Purkinje cell protein 2*), que direciona a expressão do transgene especificamente para as células de Purkinje do animal. Os grupos controlo e modelo heterozigótico expressavam o cDNA da *ATAXINA-2* humana com 22 glutaminas (Q22). Às 16 semanas, os modelos Q58 começaram a manifestar o fenótipo, pois demonstraram aperto (*clamping*) e redução no comprimento da passada. Também às 16 semanas, verificou-se um pior desempenho no teste rotarod nos animais Q58 homozigóticos. Porém, os animais Q58 homozigóticos e heterozigóticos demonstraram deficiências motoras progressivas que se tornaram severas às 26 semanas de idade (Huynh et al. 2000). Outras características fenotípicas dos animais Q58 incluem descoordenação e perda de equilíbrio no teste de caminhar ao longo de uma barra,

caracterizadas pelo aumento do número de deslizos das patas e de longos períodos de latência para atravessar a barra (Liu et al. 2009). Estas deficiências motoras foram-se agravando de uma forma progressiva com o aumento da idade (Liu et al. 2009).

A neuropatologia do modelo Q58 homocigótico foi analisada através da imunoreatividade de um marcador de disfunção neuronal, a calbindina-28K, que é expressa nas células de Purkinje (Huynh et al. 2000). A imunoreatividade da calbindina-28K mostrou estar diminuída às 4 semanas de idade, com uma diminuição acentuada entre as 7 e 14 semanas, semelhante à perda de células de Purkinje em doentes de SCA2 com 41 repetições. Foi ainda observada a perda progressiva das células de Purkinje, que atingiu os 50% por volta das 24 e 27 semanas de idade (Huynh et al. 2000). Às 24 semanas de idade, o perfil eletrofisiológico dos animais Q58 era anormal, sendo visível um aumento da variabilidade de intervalos entre disparos, uma diminuição da frequência e do número de disparos das células Purkinje (Kasumu, Liang, et al. 2012). Este perfil eletrofisiológico anormal às 24 semanas de idade coincide com a altura em que se manifesta o fenótipo nestes animais (Liu et al. 2009). O perfil eletrofisiológico dos murganhos Q58 piorou progressivamente com a idade (Kasumu, Liang, et al. 2012). Portanto, a progressiva descoordenação motora com a idade (Liu et al. 2009) pode ser causada pelo agravamento progressivo do perfil eletrofisiológico das células de Purkinje (Kasumu, Liang, et al. 2012).

1.7.2. Modelo Q75:

O segundo modelo de murganho foi criado através da inserção do gene *ATXN2* humano com uma expansão de 75 CAG (Q75), e que estava sob o controlo do próprio promotor do SCA2 humano (Aguilar et al. 2006). A utilização deste promotor permitiu a expressão ubíqua do transgene pelo corpo do animal, sendo detetado no cérebro, no fígado, no tecido muscular, no rim e nos pulmões. O número de repetições de CAG manteve-se constante ao longo das gerações.

Foi visível um comportamento atáxico no teste rotarod nos modelos animais Q75 homocigóticos às 6 semanas e nos modelos animais Q75 heterocigóticos às 12 semanas. Atendendo que os animais normais não tiveram qualquer problema no desempenho durante a realização do teste, os resultados sugerem que os níveis de expressão da

ATAXINA-2 mutante podem influenciar o momento em que se manifesta a sintomatologia.

Relativamente à neuropatologia, nos modelos Q75 observou-se, ao fim de um ano: neurodegeneração dos neurónios de Purkinje no córtex cerebral; diminuição da expressão da calbindina-28K; redução da arborização dendrítica e encolhimento dos corpos celulares das células de Purkinje (Aguiar et al. 2006).

1.7.3. Modelo Q42KI:

O terceiro modelo de murganho desenvolvido consistiu numa abordagem diferente das anteriores, sendo este o primeiro modelo de murganho *Knock-in* para SCA2 (Damrath et al. 2012). Para tal, o gene normal da Ataxina-2 do murganho foi substituído por um gene mutado, com uma expansão de 42 CAG (Q42), através de recombinação homóloga nas células estaminais embrionárias. O gene mutante estava sob o controlo do próprio promotor endógeno do gene da Ataxina-2 do animal. A sua expressão estava presente no cerebelo e no córtex.

Logo na primeira semana de idade, foi visível uma redução significativa do peso corporal dos modelos *Knock-in* em relação aos animais controlo, que permaneceu ao longo da vida destes animais. Os modelos SCA2 também demonstraram um fenótipo atáxico bastante ligeiro. No entanto, aos 18 meses, os animais homozigóticos apresentaram diferenças significativas no rotarod acelerado, ao contrário dos animais heterozigóticos que não demonstraram diferenças em relação aos animais normais (Damrath et al. 2012).

Os aspetos neuropatológicos apenas revelaram, às 24 semanas de idade, agregados citoplasmáticos de Ataxina-2 nas células de Purkinje dos murganhos *Knock-in*. Não foram observados nestes animais agregados nucleares, perda neuronal, nem neurodegeneração (Damrath et al. 2012).

1.7.4. Modelo Q127:

O seguinte modelo a ser desenvolvido era também ele transgénico, com uma expansão de 127 CAG (Q127). O gene estava sob a regulação do promotor Pcp2, de modo

a direcionar a degeneração nas células de Purkinje e, conseqüentemente, obter um fenótipo atáxico (Hansen et al. 2013).

O fenótipo começou a manifestar-se às 8 semanas de idade nos murganhos transgênicos, caracterizado por disfunção motora durante a realização do teste rotarod acelerado. Este comportamento agravou-se de forma progressiva com o aumento da idade.

Quanto à neuropatologia, os murganhos Q127 apresentavam às 4 semanas de idade, agregados perinucleares de Ataxina-2 nas células de Purkinje. Com o envelhecimento, aumentaram, tanto o número e tamanho de agregados, como o número de células de Purkinje, com agregados. Às 6 semanas de idade, os animais transgênicos apresentavam um perfil eletrofisiológico das células de Purkinje alterado, com uma baixa frequência de disparos progressiva. Às 12 semanas de idade, era visível nestes animais, a diminuição progressiva da espessura da camada molecular e da expressão de genes específicos das células de Purkinje. Às 40 semanas, observou-se a perda neuronal e uma redução do número de células de Purkinje (Hansen et al. 2013).

1.7.5. Modelo BAC-Q72:

Foi desenvolvido um modelo de murganho transgênico através do *Bacterial Artificial Chromosomes* (BAC), com uma expansão de 72 CAG (BAC-Q72) (Dansithong et al. 2015). O BAC consiste na construção de DNA, baseando-se no plasmídeo funcional de fertilidade ou F-plasmídeo, que permite inserir a sequência completa do gene com as regiões não codificantes (Dansithong et al. 2015; Alves-Cruzeiro et al. 2016). Foi também desenvolvido um grupo controle, que expressava o gene completo da *ATAXINA-2* humana com 22 glutaminas (BAC-Q22) (Dansithong et al. 2015). Tanto no grupo modelo, como no controle, o transgene estava sob a regulação do promotor humano endógeno, o que permitiu que a sua expressão fosse ubíqua ao longo do corpo dos animais. O mRNA era detetável no SNC, no fígado e no coração, enquanto a proteína era expressa no cerebelo.

Às 8 semanas, os animais transgênicos do grupo modelo e controle apresentavam uma redução de peso relativamente aos animais normais. Os modelos animais BAC-Q72 começaram a manifestar deficiências na coordenação motora às 16 semanas de idade, com uma visível diminuição do período de latência para cair durante a realização do teste

rotarod acelerado, que se agravou de forma progressiva até às 36 semanas de idade (Dansithong et al. 2015).

Relativamente à neuropatologia, os murganhos modelo com 72 repetições apresentavam, às 24 semanas, uma diminuição da expressão das proteínas Calbindina e Pcp2 no cerebelo e o encolhimento da arborização dendrítica das células de Purkinje (Dansithong et al. 2015).

1.7.6. Modelo Q100-KI:

O último modelo de murganho descrito para SCA2 consiste num modelo *Knock-in* com 100 repetições (Sen, Canet-Pons, et al. 2019). O vetor composto por 100 repetições CAG e as respetivas sequências vizinhas foi inserido no exão 1 da *Atxn2* do animal, através de recombinação homóloga nas células estaminais embrionárias. O gene estava sobre o controlo do promotor endógeno da *Atxn2* do animal. Tanto o promotor como a estrutura exão-intrão foram mantidas intactas para preservar a regulação nativa da expressão do gene. Ao longo de sucessivas gerações de murganhos, observou-se a expansão do número de repetições e mosaicismos somáticos. Os autores, apesar de se referirem ao modelo como *Atxn2-CAG100-KIN*, os animais utilizados apresentavam variações no comprimento das repetições. A proteína mutante estava presente nos neurónios do hipocampo, do córtex cerebral, do cerebelo, dos núcleos do tronco cerebral e nas áreas do prosencéfalo ventral (Sen, Canet-Pons, et al. 2019).

Todos os animais mutantes manifestaram uma perda progressiva de peso em relação aos animais normais. No entanto, entre as 5 e as 20 semanas de idade, as fêmeas mutantes homozigóticas tiveram um aumento excessivo de peso. Com a progressão da doença, estas fêmeas perderam drasticamente peso, chegando a atingir um estado atrofico. Por outro lado, as fêmeas heterozigóticas e os machos homozigóticos e heterozigóticos não apresentaram este aumento de peso inicial.

Aos 12 meses, os animais modelo demonstraram passadas irregulares e movimentos descoordenados. A partir dos 3 meses, os animais mutantes demonstraram uma diminuição progressiva do esforço máximo feito pelos membros anteriores. Entre as 20 semanas e os 12 meses, os animais Q100, manifestaram deficiências motoras no rotarod acelerado, que progrediu rapidamente aos 14 meses. No entanto, os animais mutantes heterozigóticos não demonstraram problemas durante a realização deste teste.

Os animais demonstraram ainda desequilíbrio durante o *open field* e deficiências motoras progressivas tais como ataxia, redução da força e aperto nos membros posteriores. Aos 14 meses, os murganhos homozigóticos sofriam de deficiências motoras severas e encontravam-se numa fase terminal da doença.

A neuropatologia dos animais modelo caracterizou-se pela redução de peso e atrofia cerebral, sendo mais evidente nos murganhos homozigóticos, do que nos murganhos heterozigóticos. Estavam presentes agregados citosólicos da proteína mutada nas células de Purkinje do cerebelo, nos neurónios do córtex cerebral, do hipocampo, dos núcleos da ponte e olivar inferior e nos neurónios motores da medula espinhal. A partir dos 3 meses, ainda antes da manifestação de quaisquer sintomas, já eram visíveis pequenos agregados nas células de Purkinje do cerebelo nos animais mutantes. Com o envelhecimento dos animais, ocorreu o aumento progressivo do tamanho dos agregados e da insolubilidade da proteína mutante. A partir dos 6 meses de idade, era visível a localização simultânea dos agregados com a PABP, com sinais de p62 (marcador da autofagia) e com a ubiquitina (marcador de UPS) no cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal. Os níveis totais de um metabolito essencial para o armazenamento de energia e para as reações de acetilação no sistema nervoso, o N-acetilaspártato (NAA), utilizado como biomarcador de disfunção ou morte neuronal, diminuíram. Esta redução dos níveis de NAA é também observado noutras doenças neurodegenerativas (Sen, Canet-Pons, et al. 2019). O modelo Q100-KI demonstrou alterações da expressão de genes essenciais para reações enzimáticas do metabolismo ceramida-esfingomielina, que se traduzem no comprometimento da mielinização (Sen, Arsovic, et al. 2019). Este modelo demonstra um padrão neuropatológico semelhante aos doentes de SCA2 (Sen, Canet-Pons, et al. 2019).

Tabela 1.2- Resumo do fenótipo e neuropatologia de cada um dos modelos de murganho para SCA2 descritos e altura inicial em que cada um destes aspetos é detetado.

Modelo	Q58	Q75	Q42KI	Q127	BAC-Q72	Q100-KI
Fenótipo e altura de deteção	Aperto; Redução do comprimento de passada; Aumento do número de deslizos das patas; Longos períodos de latência para atravessar a barra. 16 semanas	Comportamento atáxico 6 semanas (homozigóticos) 12 semanas (heterozigóticos)	Ataxia ligeira. 18 meses	Disfunção motora. 8 semanas	Diminuição do período de latência para cair. 16 semanas	Passadas irregulares; Movimentos descoordenados; Redução da força nos membros posteriores e anteriores; Aperto; Desequilíbrio; Ataxia; Redução. 3 meses
Neuropatologia e altura de deteção	Diminuição da imunoreatividade da calbindina-28K; Perda progressiva das células de Purkinje; Perfil eletrofisiológico anormal. 4 semanas	Neurodegeneração; Redução da expressão da calbindina-28K; Redução da arborização dendrítica e dos corpos celulares das células de Purkinje. 1 ano	Agregados nas células de Purkinje. 24 semanas	Agregados nas células de Purkinje; Aumento do número/tamanho de agregados e do número de células de Purkinje com agregados; Perfil eletrofisiológico das células de Purkinje alterado; Redução progressiva da espessura da camada molecular; Redução da expressão de genes específicos das células de Purkinje; Perda neuronal; Redução do número de células de Purkinje. 4 semanas	Redução da expressão da Calbindina e Pep2 no cerebelo; Redução da arborização dendrítica das células de Purkinje. 24 semanas	Redução de peso e atrofia cerebral; Agregados nas células de Purkinje e outros neurónios; Aumento do tamanho dos agregados e da insolubilidade da proteína mutante; Localização coincidente dos agregados com PABP, sinais de p62 e com a ubiquitina; Redução dos níveis totais de NAA; Comprometimento da mielinização. 3 meses

2. Objetivo

Este trabalho tem como principal objetivo avaliar a neurodegeneração induzida pela ATAXINA-2 no estriado de murganhos C57BL/6 jovens (3 meses) e envelhecidos (18 meses), comparando eventuais diferenças a nível histoquímico e molecular entre as regiões com a forma normal e a forma mutada da ATAXINA-2.

Deste objetivo geral, diversos objetivos foram definidos, tais como:

- a) quantificação do número de agregados de ATAXINA-2 mutante presentes no estriado dos animais injetados com 3 e 18 meses;
- b) avaliação quantitativa da perda de marcação neuronal;
- c) avaliação qualitativa da presença de inflamação;
- d) detecção de morte neuronal;
- e) análise dos níveis de expressão de elementos que interagem com a ATAXINA-2;
- f) análise dos níveis de expressão de componentes envolvidos nos processos de autofagia e na regulação do sensor de nutrientes;
- g) análise dos níveis de expressão de marcadores neuronais, da mitocôndria, da inflamação e da comunicação sináptica;
- h) análise da expressão proteica de fatores associados ao envelhecimento.

3. Materiais e Métodos:

3.1. Animais:

Para este estudo foram utilizados murganhos C57BL/6, machos e fêmeas com 3 meses ($n = 6$) e 18 meses ($n = 6$) de idade (Biotério, CBMR/UAlg, Portugal). Estes foram mantidos em ciclos de luz-escuro de 12 horas, num ambiente com temperatura e humidade controlada e com livre acesso a água e comida. Os animais foram colocados nas gaiolas em grupos inferiores a 3 animais por gaiola. Todos os cuidados e procedimentos foram realizados de acordo com a Diretiva da União Europeia 86/609/EEC para a utilização de animais no laboratório. Os investigadores receberam um certificado da *Federation of Laboratory Animal Science Association* (FELASA) e todos os procedimentos tiveram aprovação prévia das autoridades portuguesas (Direção-Geral de Alimentação e Veterinária – DGAV). Todos os procedimentos experimentais efetuados estão devidamente aprovados pela DGAV (Projeto *Neuropath*, referência 421/2019).

Para desenvolver os modelos de murganho para a SCA2, foram injetados vetores lentivirais com *ATAXINA-2* humana com 23 repetições CAG (normal) no estriado esquerdo e vetores lentivirais com *ATAXINA-2* humana com 82 repetições CAG (mutante) no estriado direito. Como grupo controlo, foram utilizados murganhos C57BL/6 não injetados ($n = 2$) com idade correspondente aos animais modelo.

3.2. Produção dos vetores virais:

O cDNA codificante para a *ATXN2* humana com 23 repetições CAG e para a *ATXN2* humana com 82 repetições CAG, foram clonados num vetor lentiviral inativado e produzidos de acordo com o método descrito anteriormente pela Vira Vector (Coimbra, Portugal) (de Almeida et al. 2002).

3.3. Injeções esterotáxicas dos vetores lentivirais:

Para as injeções esterotáxicas dos vetores lentivirais, os animais foram primeiramente anestesiados através de injeção peritoneal de Nimatek (100 mg/mL) e Domitor (1 mg/mL). As injeções foram efetuadas bilateralmente no estriado esquerdo (AP: 0,6 mm; ML: 1,8 mm; DV: -3,3 mm) e no estriado direito (AP: 0,6 mm; ML: -1,8 mm; DV: -3,3

mm) (Fig. 6). Todos os animais receberam uma única injeção de lentivírus com *ATXN2* mutante no estriado direito e uma única injeção com o vetor lentiviral com *ATXN2* normal no estriado esquerdo (Fig. 3.1.). Os animais receberam cerca de 2 mL de vetores virais numa concentração total de 800 ng/ul, a uma taxa de injeção de 0,25 µL/min através de um injetor automático (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) com uma agulha de calibre 34 associada a uma seringa Hamilton de 10 µL (Hamilton® TLC syringe model 1701 RN, REF: HAM7653-01). Após o final da injeção, a agulha foi mantida durante 5 minutos antes de ser retirada do cérebro do animal de forma a permitir a difusão dos vetores lentivirais e minimizar o seu refluxo. Após as injeções esterotáxicas, os animais foram reanimados através da injeção do reversor da anestesia.

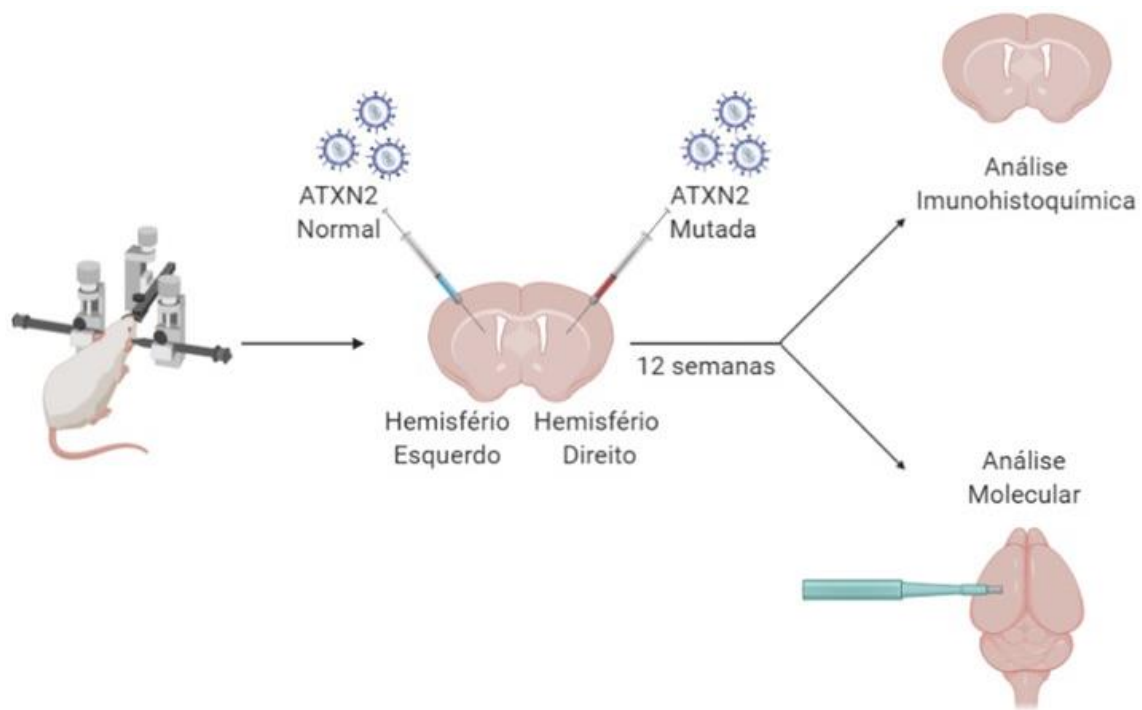


Figura 3.1. - Desenho experimental. Através de injeções esterotáxicas, os animais de 3 e 18 meses receberam uma injeção única de vetores lentivirais com ATAXINA-2 mutada no estriado direito e com ATAXINA-2 normal no estriado esquerdo. Após o sacrifício destes mesmos animais, os cérebros foram recolhidos e selecionados aleatoriamente para análise histológica (animais injetados com 3 meses, n=6; animais injetados com 18 meses, n=3; animais com 18 meses não injetados, n=3) e molecular (animais injetados com 3 meses, n=6; animais injetados com 18 meses, n=3; animais com 18 meses não injetados, n=4).

3.4. Recolha de tecidos:

Doze semanas após as injeções com vetores lentivirais, os animais foram aleatoriamente selecionados para a recolha do cérebro na sua totalidade, para posterior análise imunohistoquímica, ou para a recolha do tecido estriatal, para extração de RNA e proteína (Fig. 6). Os animais foram anestesiados com Nimetek (100 mg/mL) e Domitor (1 mg/mL).

Os animais para análise imunohistoquímica foram sacrificados através da perfusão cardíaca com PFA (4% de Paraformaldeído em 0,1M de PBS (*Phosphate buffer solution* ou solução tampão de fosfato)). Após a recolha dos cérebros, estes foram mantidos em solução de PFA a 4°C durante 24h. Após este período, foram incubados na solução 20% de sacarose em PBS 0,1M, durante 48h a 4°C. Depois, retirou-se a solução com sacarose, e os cérebros foram congelados a -80°C. Os cérebros foram depois processados em secções numa orientação coronal e com uma espessura de 20 µm, utilizando um criostato (LEICA CM3050 S). As secções cerebrais recolhidas, foram colocadas em placas de 48 poços, com solução 0,05M azida em PBS 0,1M. As placas foram armazenadas a 4°C até à realização da imunohistoquímica.

Os animais utilizados para análise molecular foram sacrificados através de deslocamento cervical. Do cérebro dos animais, recolheu-se um o tecido estriatal esquerdo e direito, utilizando uma caneta Harris Uni-Core com 2,0mm de diâmetro (Ted Pella Inc., Redding, California, USA). Estes tecidos foram congelados de imediato a -80°C.

3.5. Imunohistoquímica com revelação DAB:

As secções cerebrais selecionadas foram retiradas da solução 1% azida em PBS, para a solução de PBS 0,1M, para remover os resíduos de azida nos tecidos. De seguida, estas mesmas secções foram transferidas para solução de hidrócloro de fenilhidrazina (50 mg/mL, Sigma-Aldrich, REF: 114715-5G), com uma diluição de 1:1000 em PBS 0,1M, onde foram incubadas a 37°C, durante 30 minutos. Após este período, as secções foram lavadas três vezes em PBS 0,1M, à temperatura ambiente, sob agitação moderada, sendo que, a primeira lavagem durou 5 minutos, e as duas restantes 10 minutos. Seguidamente, as secções foram colocadas em solução de bloqueio (10% de soro normal de cabra; NGS, Gibco, 0,1% de Triton X-100 em PBS 0,1M), durante 1h à temperatura ambiente, com

agitação moderada. Ao fim deste tempo, as secções foram incubadas no anticorpo primário, para a Ataxina-2 (1:1000; BD Biosciences, CAT:611378) ou DARPP-32 (1:1000; Millipore Corp., 290 Concord RD, Billerica MA, USA, CAT: AB10518), em solução de bloqueio, durante a noite a 4°C sob agitação moderada. No dia seguinte, as secções foram lavadas três vezes em PBS 0,1M, com uma primeira lavagem de 5 minutos e as restantes de 10 minutos. De seguida, aplicou-se o anticorpo secundário biotilado contra a espécie respetiva do anticorpo primário (Goat anti-mouse IgG antibody (H+L) biotiladed: 1:200, Vector Laboratories Inc., CA, USA, CAT: BA-9200; Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (H+L), Biotinylated: 1:200, Vector Laboratories Inc., CA, USA, CAT: BA-1000) em solução de bloqueio, no qual as secções permaneceram incubadas durante 2h à temperatura ambiente, sob agitação moderada. Seguiu-se novamente uma lavagem em PBS 0,1M três vezes, primeiramente, durante 5 minutos e as seguintes durante 10 minutos. Depois, para amplificação do sinal, incubou-se as secções na solução com o sistema de amplificação ABC (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, West Grove, USA, REF: PK6100), entre 30 a 40 minutos à temperatura ambiente, com agitação moderada. As secções foram lavadas novamente três vezes em PBS 0,1M, durante 5, 10 e 10 minutos, respetivamente. Posteriormente, as secções foram transferidas, uma de cada vez, para a solução de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro (peroxidase substrate kit, DAB, Vector Laboratories, CA, USA, REF: SK-4100), até ser visível a marcação, e retiradas de imediato para PBS 0,1M. Para retirar o excesso de DAB, procedeu-se novamente a três lavagens em PBS 0,1M, com uma primeira lavagem de 5 minutos e as restantes de 10 minutos. Depois montaram-se as secções nas lâminas gelatinadas e deixaram-se secar à temperatura ambiente. Seguiu-se o processo de desidratação, no qual as secções foram emersas nas seguintes soluções pela seguinte ordem: água destilada (30 segundos), etanol a 70% (3 minutos), etanol a 96% (3 minutos), etanol a 100% (3 minutos), substituto do Xileno (3 minutos). Por fim, montou-se a lamela com solução de Eukitt® (O. Kindler GmbH & CO, Freiburg, Germany, Lote: BCBT5431).

3.6. Imunohistoquímica com anticorpo secundário fluorescente:

As secções cerebrais selecionadas foram retiradas da solução 1% azida em PBS, para a solução de PBS 0,1M, para remover a azida dos tecidos. De seguida, as secções foram lavadas três vezes em PBS 0,1M, à temperatura ambiente, sob agitação moderada, sendo que, a primeira lavagem teve uma duração de 5 minutos, e as duas restantes de 10 minutos.

Seguidamente, as secções foram colocadas em solução de bloqueio (10% de soro normal de cabra; NGS, Gibco, 0,1% de Triton X-100 em PBS 0,1M), durante 1h à temperatura ambiente, sobre agitação moderada. Ao fim deste tempo, as secções foram incubadas no anticorpo primário, GFAP (1:1000, Biolegend, CAT: 644702) e IBA1 (1:1000, Millipore Corp., 290 Concord RD, Billerica MA, USA, CAT: MABN92), com diluição 1:1000 em solução de bloqueio, durante a noite a 4°C, sob agitação moderada. No dia seguinte, as secções foram lavadas três vezes em PBS 0,1M, com uma primeira lavagem de 5 minutos e as restantes de 10 minutos. De seguida, aplicou-se o anticorpo secundário fluorescente Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1:200, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, REF: A11001) ou Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 (1:200, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, REF: A11005), em solução de bloqueio. As secções foram incubadas no anticorpo secundário durante 2h à temperatura ambiente, com agitação moderada e protegidas da luz. Seguiu-se novamente a lavagem das secções três vezes em PBS 0,1M, a primeira durante 5 minutos e as duas restantes com 10 minutos, protegidos da luz. Depois, montaram-se as secções nas lâminas gelatinadas e deixaram-se secar à temperatura ambiente, num ambiente escuro. Por fim, foi adicionada a lamela com solução Floromount™ com DAPI (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, REF: 00-4959-52).

3.7. Coloração das secções cerebrais com violeta de cresilo:

As secções cerebrais foram colocadas em PBS 0,1M, para retirar a azida dos tecidos. De seguida, montou-se as secções nas lâminas gelatinadas e deixou-se secar. Posteriormente, as lâminas com as secções foram emergidas em diversas soluções pela seguinte ordem: água destilada (30 segundos), Etanol 96% (3 minutos), Etanol 100% (3 minutos), substituto do Xileno (3 minutos), Etanol 70% (3 minutos), água destilada (30 segundos), solução de violeta de cresilo (5 minutos), água destilada (30 segundos), Etanol 70% (1 minuto), Etanol 96% (3 minutos), Etanol 100% (3 minutos), substituto do Xileno (3 minutos). Por fim, montou-se a lamela com solução de Eukitt® (O. Kindler GmbH & CO, Freiburg, Germany).

3.8. Microscopia:

As imagens das secções com marcação da Ataxina-2 foram obtidas através do microscópio Zeiss Axio Scan.Z1, com uma câmara Hitachi HV-F203SCL acoplada, numa objetiva de 20x.

Para obter as imagens das secções com marcação DARPP-32 e de violeta de cresilo, foi utilizada uma ampliação de 5x e 20x, respetivamente, num microscópio Zeiss Axio Imager.Z2, com a câmara AxioCamICc3 acoplada, associado ao software AxioVision.

A captura de imagens das secções com marcação GFAP e IBA1, foi feita numa objetiva de 5x, através do microscópio Zeiss Axio Imager.Z2, com a câmara AxioCamHR3 acoplada, associado ao software AxioVision. Para visualização das marcações DAPI, GFAP e IBA1, utilizou-se os canais de emissão DAPI, Alexa 488 e Alexa 594, respetivamente.

3.9. Extração e quantificação do RNA total:

O RNA total extraído do estriado esquerdo e direito foi realizado com o Nucleospin RNA Kit – NZYtech, seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, adicionou-se 1100 µL de QIAzol às amostras e, com a ajuda de uma seringa e agulha, homogeneizou-se as mesmas. De seguida, agitou-se vigorosamente por 30 segundos e deixou-se assentar durante 5 minutos. Ao fim deste tempo, foi adicionado 200 µL de d-clorofórmio às amostras e agitou-se novamente vigorosamente por 15 segundos, deixando as amostras assentar entre 2 a 3 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, a fase aquosa (~500 µL) foi transferida para um tubo de 1,5 mL livre de RNase. A este tubo foi também adicionado aproximadamente o mesmo volume de etanol a 70% (~500 µL) e posteriormente misturado, utilizando o vórtex. Transferiu-se até 700 µL das amostras para uma coluna com uma argola azul colocada sobre um tubo de recolha de 2 mL. Posteriormente, centrifugou-se durante 30 segundos a 11000g. Descartou-se o fluído e repetiu-se a adição dos 700 µL com posterior centrifugação até terminar a solução da mistura de amostra com etanol a 70%. A coluna de argola azul foi colocada num novo tubo de recolha com 2 mL. Seguidamente, adicionou-se o buffer NI à coluna de argola azul, centrifugou-se durante 30 segundos a 11000g, e no final, a solução resultante foi descartada. Aplicou-se 95 µL da mistura de reação de DNase (10 µL de DNase1

reconstituída para 90 µL de buffer de Digestão, por amostra) diretamente no centro da membrana de sílica da coluna e incubou-se à temperatura ambiente durante 15 minutos. Ao fim deste período, adicionou-se 200 µL de buffer NWR1 à coluna de argola azul, centrifugou-se durante 1 minuto a 11000g e, no final, descartou-se o tubo de recolha, transferindo a coluna para um novo tubo. Adicionou-se 600 µL de buffer NWR2 à coluna de argola azul e centrifugou-se durante 1 minuto a 11000g. A solução obtida foi descartada e a coluna foi colocada novamente no mesmo tubo de recolha. Adicionou-se 250 µL de buffer NWR2 para a coluna de argola azul seguido da centrifugação a 11000g durante 2 minutos. A solução e o tubo de recolha foram descartados e a coluna de argola azul foi transferida para um tubo de 1,5 mL livre de RNase. Adicionou-se 30 µL de H₂O livre de RNase (do Kit) no centro da membrana de sílica da coluna. Centrifugou-se durante 1 minuto a 11000 g e, de seguida, o RNA foi colocado no gelo. Por fim, a concentração de RNA foi determinada usando o espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific). O RNA foi armazenado a -80°C até à sua utilização.

3.10. Extração e quantificação de proteína:

Adicionou-se 1100 µL de QIAzol às amostras e, com a ajuda de uma seringa e agulha, homogeneizou-se as mesmas. De seguida, agitou-se vigorosamente por 30 segundos e deixou-se assentar durante 5 minutos. Ao fim deste tempo, foi adicionado 200 µL de d-clorofórmio às amostras e agitou-se novamente vigorosamente por 15 segundos, deixando as amostras assentar entre 2 a 3 minutos, à temperatura ambiente. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi recolhida para a extração de RNA e adicionou-se 300 µL de etanol a 100% à interfase e fase fenólica. Cuidadosamente, misturou-se as amostras por inversão, que posteriormente foram incubadas à temperatura ambiente, entre 2 a 3 minutos. De seguida, centrifugou-se as amostras a 2000g durante 2 minutos a 4°C, para sedimentar o DNA. O sobrenadante fenol/etanol com a fração de proteína foi transferido para um tubo de 15 mL, seguindo-se a adição de 1,5 mL de Isopropanol, para precipitar a proteína. De seguida, misturou-se por inversão durante 15 segundos. O volume foi separado em dois tubos de 1,5 mL e incubou-se as amostras à temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12 000g, durante 10 minutos a 4°C e removeu-se o sobrenadante. Adicionou-se 1 mL da solução de Guanidina-etanol (0.3 M hidrocloreto de guanidina em etanol a 95%), a cada tubo com o *pellet* de proteína e misturou-se no

vórtex. Incubou-se à temperatura ambiente durante 20 minutos. De seguida, centrifugou-se as amostras a 7500g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido. Repetiu-se o processo a partir da adição da solução de guanidina-etanol mais duas vezes. Seguidamente, adicionou-se 1 mL de etanol a 100% a cada *pellet* que continha proteína e misturou-se no vórtex. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 20 minutos. Seguiu-se a centrifugação a 7500g durante 5 minutos, à temperatura ambiente, removeu-se o sobrenadante e o *pellet* foi deixado a secar ao ar pelo menos durante 10 minutos. Adicionou-se 40 µL de solução de Ureia/DDT (10 M ureia, 50 mM DTT em água e inibidor de protease) e quebrou-se o *pellet* através de moagem até homogeneizar a solução. De seguida, incubou-se à temperatura ambiente durante 1 hora. Ao fim deste tempo, as amostras foram incubadas a 95°C durante 3 minutos e colocadas de imediato em gelo. Por fim, sonicou-se as amostras e quantificou-se a proteína através do método de Bradford.

3.11. Quantificação dos agregados de ATXN2:

Para cada secção, o número de agregados de ATXN2 foram contabilizados manualmente nos estriados esquerdo e direito, através do software de análise de imagem (ZEN 3.1 lite, Zeiss).

3.12. Quantificação do volume de marcador DARPP-32:

Utilizando o programa Zen 3.1, a área depleta de marcador DARPP-32 foi delineado e a sua área foi calculada para cada uma das secções coronais de cérebro de murganho. Somou-se a área total de todas as secções e multiplicou-se pelo valor da espessura de corte das secções (200 µm). Por fim, converteu-se o valor em µm³ para mm³.

3.13. PCR quantitativo

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg RNA total extraído do estriado, utilizando o kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi diluído em água desionizada sem DNase. O PCR em tempo real quantitativo foi realizado utilizando o kit SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). Os primers utilizados foram pré-desenhados pela Invitrogen (ThermoFisher Scientific) e

estão descritos na tabela 3.1. com as respectivas diluições ideais para o tecido a analisar. O protocolo do PCR quantitativo consistiu num ciclo a 95° C durante 30s, seguido de 45 ciclos de dois passos: o primeiro a 95° C por 5s e o segundo a 55° C por 15s. O protocolo da curva de desnaturação começou imediatamente após o PCR quantitativo e consistiu em 5s a 65° C, com aumentos de 0,5° C em cada passo, até atingir os 95° C. Para cada gene, os valores de limite mínimo de ciclos, as curvas padrão e a eficiência do PCR e dos primers foram determinadas automaticamente pelo software BioRadCFX (Bio-Rad).

Tabela 3.1. - Primers e respetiva diluição utilizados no PCR quantitativo. Os primers utilizados foram utilizados com o objetivo de avaliar diferenças da expressão génica nas diferentes condições experimentais, à exceção do HPRT, que serviu como gene controlo. A diluição de cada um dos primers era a mais adequada para o tipo de tecido a analisar e foi feito em água desionizada sem DNase.

Primer	Diluição
HPRT	1:10 / 1:20
ATXN2	1:10
PABPC1	1:10
DARPP-32	1:100
GFAP	1:10
LC-3b	1:20
Beclina	1:20
p62	1:20
PGC-1 α	1:10
TFAM	1:10
VGLUT	1:10
PSD95	1:10
mTOR	1:10

3.14. SDS-PAGE e Western-Blot

Foram carregadas a mesma quantidade de proteína (60 mg) para cada condição experimental nos géis SDS-PAGE (7,5% e 12% para o *Running* e 4% para o *Stacking*). As amostras de estriado direito dos animais com 18 meses injetados com ATAXINA-2

mutante, de estriado esquerdo dos animais com 18 meses injetados com ATAXINA-2 normal, e os estriados esquerdo e direito dos animais com 18 meses não injetados, foram carregados nos géis. Após a transferência das proteínas para as membranas PVDF (GE Healthcare), estas foram incubadas em solução de bloqueio (BSA 3%/TBS-*Tween* 20 (TBS-T)) durante 1h à temperatura ambiente, sob agitação moderada. Depois, as membranas foram incubadas no anticorpo primário diluído 1:1000 em BSA 3%/TBS-T a 4° C durante a noite, sob agitação moderada. Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo monoclonal anti- β -actina de murganho (Lot: 048M4843, Sigma); anticorpo policlonal anti-DARPP-32 de murganho (Lot:28285, BD Biosciences); anticorpo monoclonal anti-Ataxina-2 de murganho (Lot:7257617, BD Bioscience); anticorpo de coelho anti-caspase-3 clivada (Asp175) (Lot: 9661, Cell Signaling); anticorpo monoclonal anti-fosfo-histona H2A.X (Ser139), clone JBW301 (Lot: 3179928, Millipore). No dia seguinte, após 3 lavagens de 10 min. em TBS-T, as membranas foram incubadas no anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina apropriado (*Goat* IgG anti-*mouse* (NA931, GE Healthcare) e *Goat* IgG anti-*rabbit* (NA934, GE Healthcare)) diluído 1:10000 em BSA 3%/TBS-T durante 2h à temperatura ambiente, sob agitação moderada. Seguiu-se 3 lavagens de 10 min. em TBS-T, e posterior revelação com o reagente quimiluminescente ECL (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). As imagens da marcação foram obtidas no ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad). A quantificação foi feita pela análise densitométrica através do software Image J. A densidade ótica foi normalizada com respeito à proteína padrão (β -actina).

3.15. Análise Estatística

A análise estatística foi feita através do software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, USA). Para a comparação entre duas condições utilizou-se o paired t-test na quantificação do volume de perda de DARPP-32 entre os animais jovens e idosos e o *unpaired t test (two-tailed)*, para as restantes análises. Os resultados são expressos pela média \pm EPM.

4. Resultados:

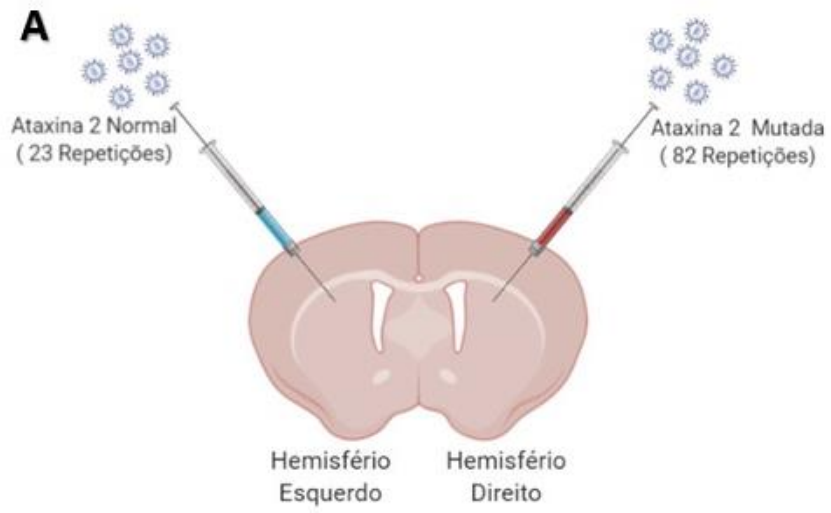
Durante o processo de envelhecimento, diversos mecanismos celulares, como por exemplo, mecanismos de remoção de proteínas, de reparação de danos celulares, entre outros, ficam comprometidos e a sua eficiência diminui (Lopez-Otin et al. 2013; Kubben and Misteli 2017), promovendo a acumulação de danos nas células. Por outro lado, sabe-se que ATAXINA-2 mutante tende a formar agregados proteicos (Koyano et al. 2014; Hung et al. 2010) e a sequestrar outras proteínas para estas estruturas (Halbach et al. 2015). Estes agregados podem tornar-se tóxicos para as células neuronais (Alves-Cruzeiro et al. 2016), uma vez que afetam os mesmos mecanismos celulares influenciados pelo envelhecimento.

Deste modo, com este projeto pretende-se avaliar as diferenças provocadas pela forma mutada da ATAXINA-2 com 82 repetições de glutaminas, tanto a nível histológico, como a nível molecular, em murganhos jovens (com 3 meses) e em murganhos idosos (18 meses). Os murganhos C57BL/6 com 3 e 18 meses receberam no estriado direito uma injeção de vetores lentivirais que expressavam a forma mutada da ATXN2 humana e no estriado esquerdo uma injeção de vetores lentivirais que expressavam a forma normal da ATXN2 humana. Após 12 semanas da injeção, estes animais foram sacrificados, e recolheu-se o cérebro inteiro e amostras de ambos os lados do estriado para posterior análise imunohistoquímica e molecular, respetivamente.

4.1. O envelhecimento e a ATXN2 mutada contribuem para a formação de agregados proteicos e para a perda de marcação neuronal

Sabe-se, atualmente, que a ATAXINA-2 na sua forma mutada tende a formar agregados proteicos (Koyano et al. 2014; Huynh et al. 2000). Com o fim de analisar o efeito da idade na formação de agregados de ATXN2 mutada, procedeu-se à análise imunohistoquímica com um anticorpo monoclonal para a ATXN2, que marca a presença desta proteína em secções coronais do cérebro dos animais injetados. A imunohistoquímica no cérebro dos murganhos revelou a presença de ATAXINA-2 no estriado injetado com ATXN2 mutada (Fig. 4.1. B, C). A transdução do estriado dos murganhos com ATAXINA-2 mutada conduziu à formação de agregados (fig. 4.1. B, C) que foram posteriormente quantificados (Fig. 4.1. D). A quantificação dos agregados proteicos de ATXN2 demonstrou uma diferença significativa ($p= 0,0132$) entre os

animais jovens e idosos injetados, sendo que os animais jovens apresentam um número de agregados de ATXN2 mutada (7808 ± 1094 , n=5), significativamente inferior aos animais idosos (15685 ± 2378 , n=3) (Fig. 4.1. D).



Animais jovens

Animais idosos

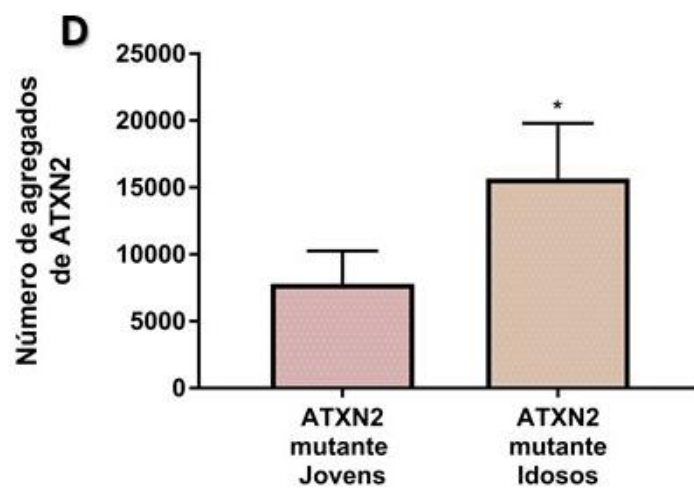
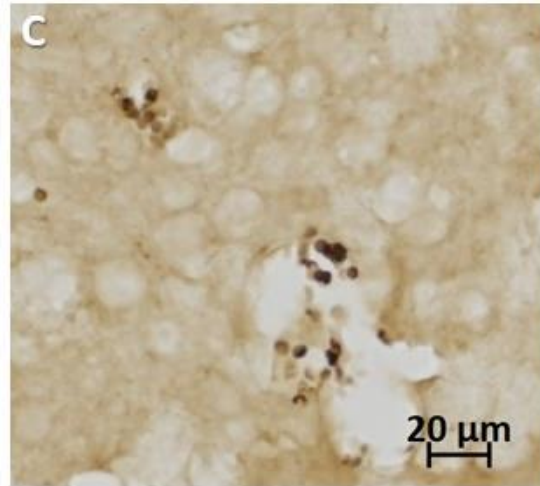
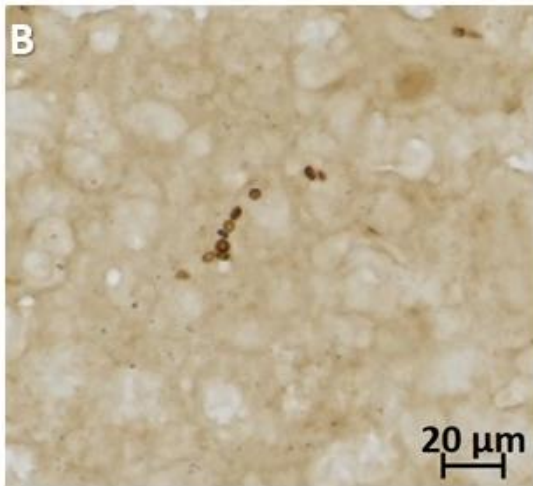


Figura 4.1. - O envelhecimento contribui para a formação de agregados de ATXN2. A) Através de injeção esterotáxica, os vetores lentivirais a expressar a ATXN2 com 23 e 82 repetições de glutaminas foram injetados no estriado esquerdo e direito, respectivamente. B) Imagem representativa de microscopia de marcação ATXN2 no estriado esquerdo às 12 semanas após a injeção, onde estão presentes células com ATAXINA-2 (a castanho). C) Imagem representativa de microscopia de marcação ATXN2 no estriado direito às 12 semanas após a injeção, onde são visíveis os agregados proteicos de ATXN2 mutada (seta). D) Análise quantitativa dos agregados de ATXN2 dos animais jovens (n=6) e idosos (n=3) após as 12 semanas de injeção. Os murganhos idosos apresentavam um número de agregados de ATXN2 mutante superior aos murganhos jovens. Os valores do gráfico estão expressos pela média \pm EPM (erro padrão da média) (Unpaired t test two-tailed, *: $p < 0.05$).

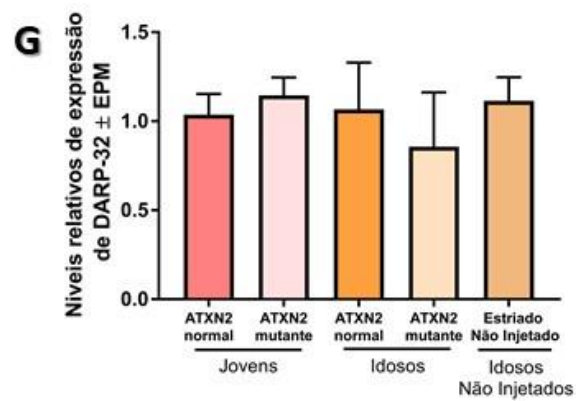
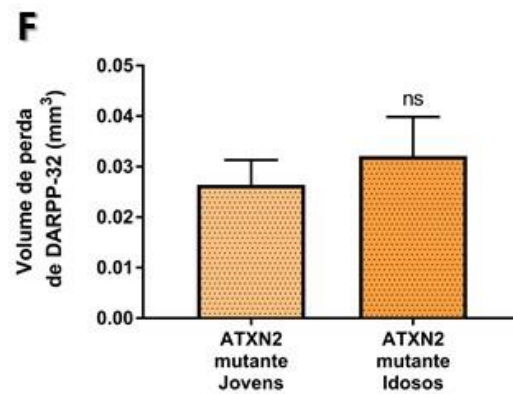
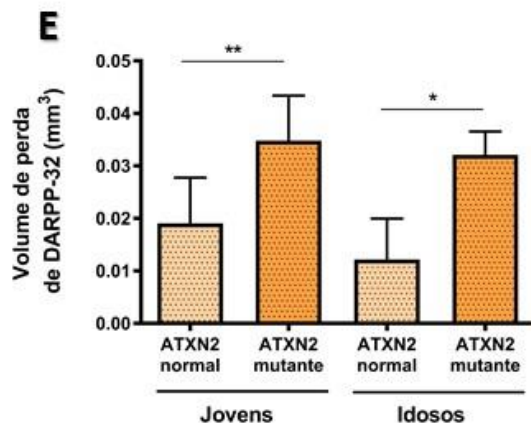
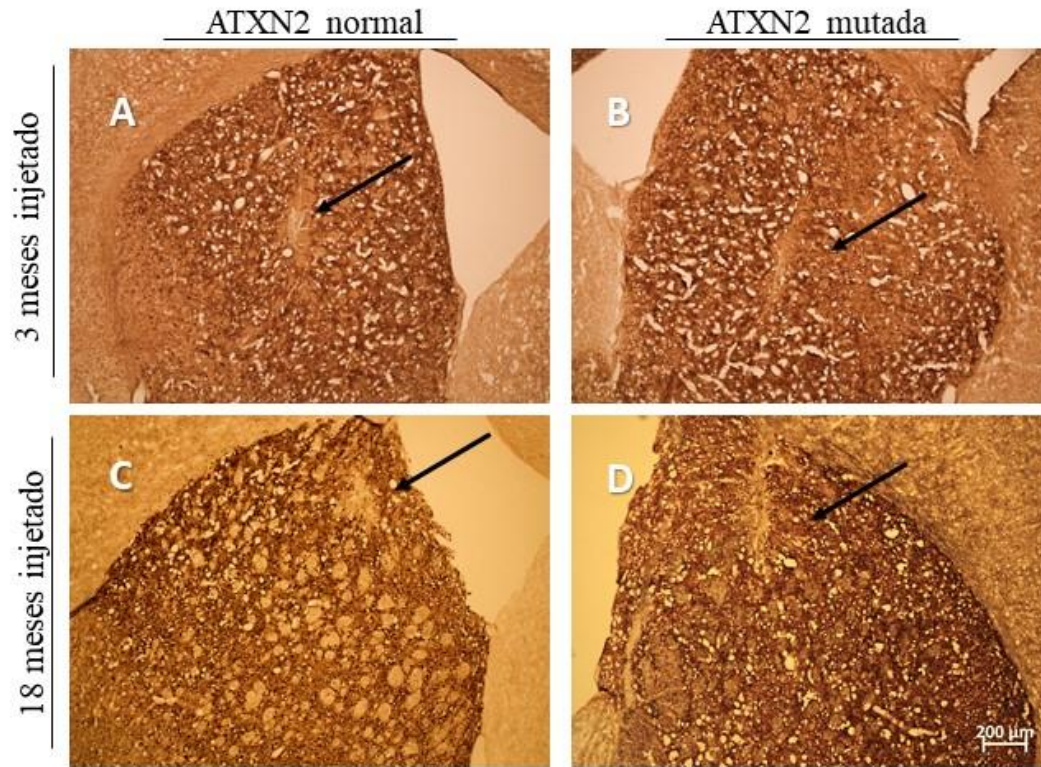
A ATAXINA-2 mutante pode tornar-se tóxica para as células neuronais e conduzir à neurodegeneração (Alves-Cruzeiro et al. 2016). Para investigar se a integridade e função neuronal eram afetadas de forma mais acentuada devido à ATXN2 mutante, durante o envelhecimento realizou-se a análise imunohistoquímica para a *Dopamine- and cyclic AMP - regulated phosphoprotein of 32 kD* (DARPP-32) (Fig.4.2.) e de coloração violeta de cresilo (Fig. 9), ambos marcadores neuronais. Também foram analisados os níveis de expressão de mRNA de DARPP-32 através de PCR quantitativo em tempo real (Fig. 4.2. G) e dos níveis desta proteína através de Western Blot (Fig. 4.2. H, I).

Após as 12 semanas de injeção, a expressão de ATXN2 mutante conduziu à perda localizada da imunoreatividade do anticorpo anti-DARPP-32 nos animais injetados, tanto nos jovens, como nos idosos (Fig. 4.2. A-D). A perda de marcação de DARPP-32 era visível na região mais superior do estriado, onde decorreu a injeção (Fig. 4.2. A-D). O estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais jovens e idosos apresentou uma maior área sem marcação de DARPP-32 em relação ao estriado destes mesmos animais injetados com ATXN2 normal (Fig 4.2. E). Ao comparar apenas o estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais jovens e idosos, verificou-se que os animais idosos tinham um volume de perda de DARPP-32 tendencialmente superior ($0,03209 \pm 0,004478$; n=3), aos animais jovens ($0,02639 \pm 0,002199$, n=5) (Fig. 4.2. F). Contudo, esta diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,2421$) (Fig. 4.2. F). Os animais idosos não injetados não mostraram qualquer perda de marcação DARPP-32 (Anexos-Fig. 8.1.).

A análise dos níveis de mRNA de DARPP-32 após as 12 semanas de injeção, através de PCR quantitativo em tempo real, nos animais jovens, revelou níveis bastante aproximados entre o estriado injetado com ATXN2 mutada ($1,145 \pm 0,1003$) e o estriado

injetado com ATXN2 normal ($1,037 \pm 0,1159$) (Fig. 4.2. G). Por outro lado, nos animais idosos injetados, os níveis de expressão de DARPP-32 eram tendencialmente mais reduzidos no estriado com ATXN2 mutada ($0,8567 \pm 0,3047$), relativamente ao estriado com ATXN2 normal ($1,067 \pm 0,2628$) (Fig. 4.2. G). Notou-se que o estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais idosos têm menor expressão de DARPP-32 do que os animais jovens (Fig. 4.2. G). O mesmo verificou-se ao comparar o estriado injetado com a ATXN2 mutada dos animais idosos com o estriado dos animais idosos não injetados ($1,114 \pm 0,1337$) (Fig. 4.2. G). Porém, nenhuma destas diferenças observadas é estatisticamente significativa.

Consistentemente com a análise imunohistoquímica e de PCR quantitativo em tempo real, a análise de Western Blot revelou que os níveis proteicos de DARPP-32 eram tendencialmente inferiores no estriado dos animais idosos injetados com ATXN2 mutada ($0,6868 \pm 0,1593$), em relação ao estriado destes mesmos animais injetados com ATXN2 normal ($0,7951 \pm 0,4453$) (Fig. 4.2. H, I), porém, não é uma diferença significativa. Os animais idosos não injetados apresentam maiores níveis de proteína DARPP-32 ($1,15 \pm 0,04181$), em relação a ambos os estriados dos animais idosos injetados (Fig. 8H, I). No entanto, existe uma diferença significativa ($p= 0,0162$) entre o estriado injetado com ATXN2 mutada e o estriado não injetado, onde se observou uma clara redução dos valores de DARPP-32 nos animais injetados (Fig. 4.2. H, I).



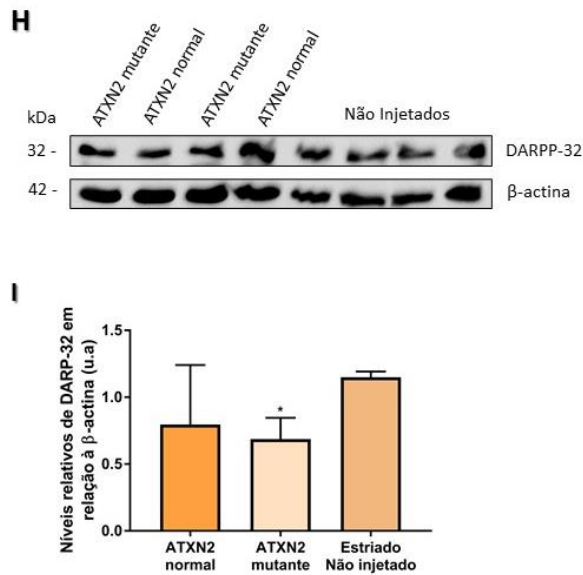


Figura 4.2. - A ATAXINA-2 mutante compromete a integridade neuronal. A-D) Imagens de microscopia representativas de marcação DARPP-32 às 12 semanas após a injeção, usando 18 secções coronais de estriado por animal. E) Quantificação do volume com perda de imunoreatividade do anticorpo anti-DARPP-32 no estriado esquerdo e direito dos animais jovens e idosos injetados ($n=6$ animais jovens injetados com ATXN2 mutada no estriado direito e ATXN2 normal no estriado esquerdo; $n=3$ animais idosos injetados com ATXN2 mutada no estriado direito e ATXN2 normal no estriado esquerdo; o gráfico de barras representa a média \pm EPM de volume de perda de DARPP-32 (mm^3). Paired t test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). Nos animais jovens e idosos, o estriado injetado com ATXN2 mutada revela um maior volume com perda de marcador DARPP-32, comparativamente ao estriado injetado com ATXN2 normal. F) Quantificação do volume com perda de imunoreatividade do anticorpo anti-DARPP-32 no estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais jovens e idosos ($n=6$ animais jovens injetados com ATXN2 mutada no estriado direito; $n=3$ animais idosos injetados com ATXN2 mutada no estriado direito; o gráfico de barras representa a média de volume \pm EPM de perda de DARPP-32 (mm^3). Unpaired t -test: ns, não significativo). Nos animais idosos, o estriado injetado com ATXN2 mutada revela um ligeiro aumento de perda de marcador DARPP-32, relativamente aos animais jovens. G) Quantificação dos níveis de mRNA de DARPP-32 às 12 semanas após a injeção do estriado direito e esquerdo dos animais jovens e idosos e dos níveis de mRNA nos animais não injetados ($n=6$ animais jovens injetados com ATXN2 mutada no estriado direito e ATXN2 normal no estriado esquerdo; $n=3$ animais idosos injetados com ATXN2 mutada no estriado direito e ATXN2 normal no estriado esquerdo; $n=4$ animais idosos não injetados). O gráfico de barras representa a média \pm EPM dos níveis de mRNA de DARPP-32 (u.a). Unpaired t test. De um modo geral, os valores de DARPP-32 são bastante aproximados entre as diferentes condições experimentais, à exceção do estriado injetado com ATXN2 mutada nos animais idosos, que apresentam uma redução em relação às restantes condições experimentais. H, I) Análise de Western Blot dos níveis de DARPP-32 às 12 semanas após a injeção nos estriados esquerdo e direito dos animais idosos e dos animais idosos não injetados. ($n=2$ animais idosos injetados com ATXN2 mutada no estriado direito e com ATXN2 normal no estriado esquerdo; $n=2$ animais idosos não injetados). O gráfico de barras representa a média \pm EPM dos níveis de proteína de DARPP-32 (u.a). Unpaired t test: *, $p < 0.05$). Os níveis de proteína DARPP-32 são mais reduzidos no estriado injetado com ATXN2 mutada em relação ao estriado esquerdo injetado com ATXN2 normal e ao estriado dos animais não injetados.

A coloração com violeta de cresilo demonstrou a presença de núcleos picnóticos, um indicador de morte celular por necrose ou apoptose, em ambos os estriados dos murganhos jovens e idosos que foram injetados (Fig. 4.3.). Observaram-se núcleos picnóticos nos animais jovens, tanto na presença de ATXN2 normal, como na presença de ATXN2 mutada (Fig. 4.3. A, B). Por outro lado, nos animais idosos, existiam mais núcleos picnóticos na presença de ATXN2 mutada, do que na presença de ATXN2 normal (Fig. 4.3. C, D). Contudo, não existem diferenças visíveis na formação de núcleos picnóticos entre os animais jovens e idosos.

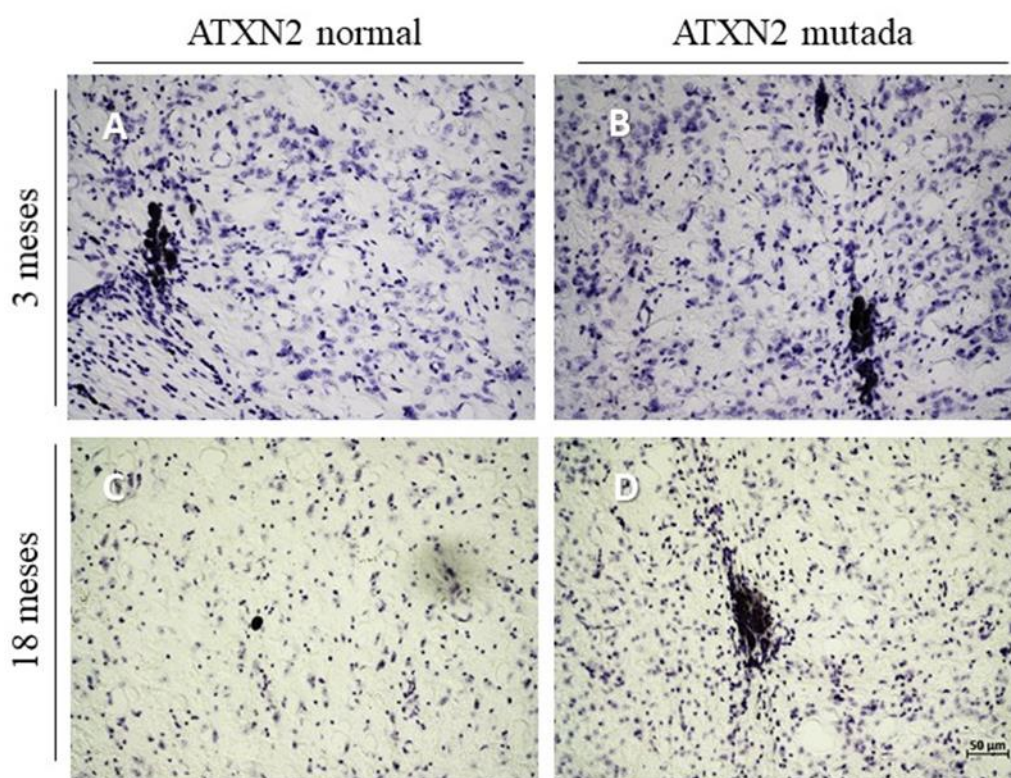


Figura 4.3. - Evidências de morte neuronal nos animais jovens e idosos, independentemente da presença de ATXN2 mutada. A-D) Imagens representativas de microscopia para a coloração violeta de cresilo às 12 semanas após a injeção usando 4 secções coronais do estriado por animal (n=6 murganhos jovens injetados com ATAXINA-2 mutada no estriado direito e com ATAXINA-2 normal no estriado esquerdo, n=3 murganhos idosos injetados ATAXINA-2 mutada no estriado direito e com ATAXINA-2 normal no estriado esquerdo). Os estriados esquerdo e direito dos animais com 3 e 18 meses apresentam núcleos picnóticos.

4.2. A idade juntamente com a ATXN2 mutada está associada ao aumento da ativação da resposta inflamatória

Já está descrito que o envelhecimento nos mamíferos está correlacionado com o processo pró-inflamatório (Lopez-Otin et al. 2013). A fim de investigar se a ATAXINA-2 mutada provocava alterações na resposta inflamatória associada ao envelhecimento, procedeu-se à análise imunohistoquímica do GFAP e do Iba1, marcadores de astrócitos e microglia, respetivamente, nas secções coronais dos cérebros dos animais jovens e idosos injetados e dos animais idosos não injetados. Para complementar, analisou-se também os níveis de mRNA do GFAP através de PCR quantitativo em tempo real.

Após as 12 semanas de injeção, foi possível observar a marcação de GFAP e de Iba1 em ambos os hemisférios do cérebro dos animais injetados com 3 meses (jovens) (Fig. 4.4. A, B; Fig. 4.5. 1A, B) e com 18 meses (idosos) (Fig. 4.4. C, D; Fig. 4.5. C, D). Por outro lado, nos animais idosos não injetados não se observou uma marcação evidente de GFAP e de Iba1 (Anexos - Fig. 8.2. e 8.3.).

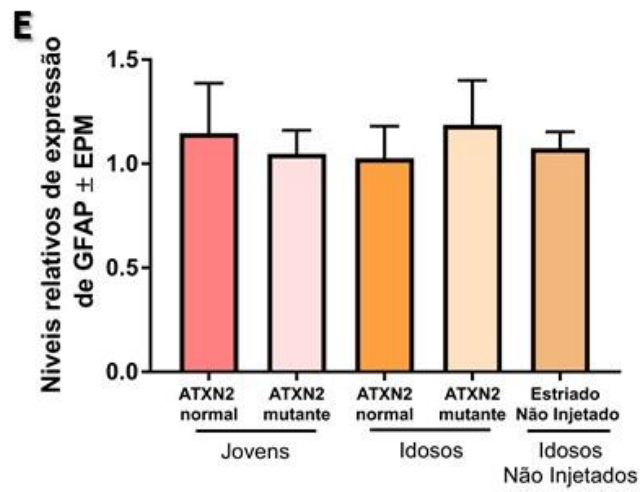
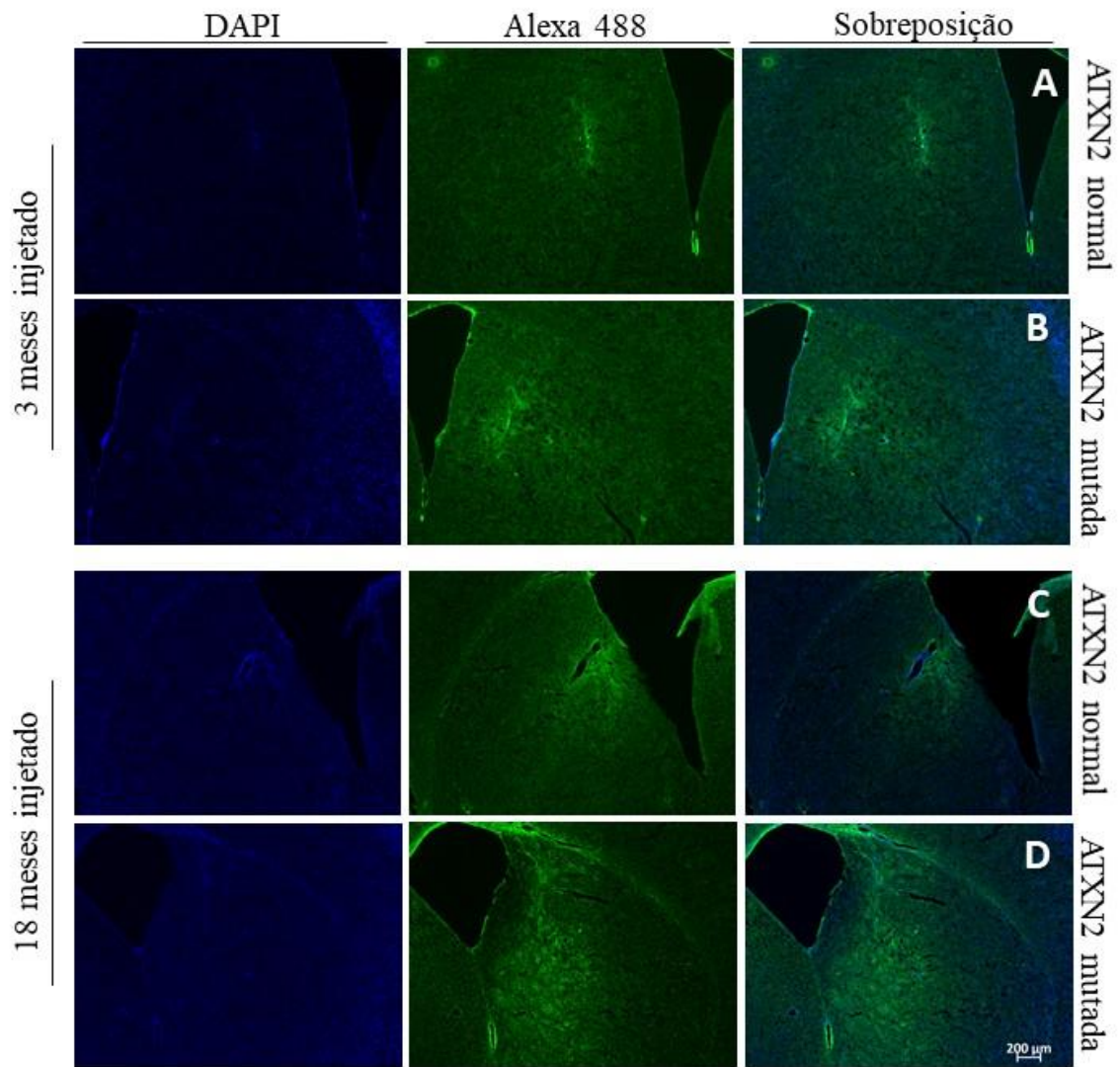


Figura 4.4. - A idade está associada ao aumento da ativação da resposta inflamatória. A-D) Imagens representativas de microscopia para a marcação imunohistoquímica do GFAP às 12 semanas após a injeção, utilizando 6 secções coronais de estriado por animal (murganhos injetados com 3 meses com ATAXINA-2 normal no estriado esquerdo e com ATAXINA-2 mutada no estriado direito: n=6, murganhos injetados com 18 meses com ATAXINA-2 normal no estriado esquerdo e com ATAXINA-2 mutada no estriado direito: n=3). Após as 12 semanas de injeção observa-se maior marcação de GFAP no estriado direito, relativamente ao estriado esquerdo, nos animais jovens e idosos. Os animais idosos apresentam maior marcação de GFAP no estriado direito com ATAXINA-2 mutada, em comparação com o estriado direito com ATAXINA-2 mutada dos animais jovens. E) Quantificação dos níveis de mRNA do GFAP após as 12 semanas de injeção nos estriados esquerdo e direito, com ATXN2 normal e mutada, respetivamente, dos animais jovens e idosos e do estriado dos animais não injetados (n=6, murganhos jovens injetados com ATXN2 normal no estriado esquerdo e com ATXN2 mutada no estriado direito; n=3 murganhos idosos injetados com ATXN2 normal no estriado esquerdo e com ATXN2 mutada no estriado direito; n=4 murganhos idosos não injetados. O gráfico de barras representa a média \pm EPM dos níveis de mRNA de GFAP (u.a). Unpaired t test). Os níveis de GFAP são mais elevados no estriado direito com ATXN2 mutada dos animais idosos, em comparação com o estriado esquerdo com ATXN2 normal destes mesmos animais, com os animais jovens na mesma condição e com os animais idosos não injetados.

Nos murganhos injetados com 3 e 18 meses, as marcações de GFAP e de Iba1 eram visíveis em ambos os estriados, estando mais presente na região superior desta estrutura, onde foi feita a injeção. Contudo, de um modo geral, o estriado injetado com ATAXINA-2 mutada apresenta uma maior marcação de GFAP (Fig. 4.4. B, D), comparativamente, ao estriado injetado com ATAXINA-2 normal (Fig. 4.4. A, C). O mesmo se observou para o Iba1, em que os animais jovens e idosos revelaram maior marcação no estriado injetado com ATXN2 mutada (Fig. 4.5 B, D), em relação ao estriado injetado com ATXN2 normal (Fig. 4.5. A, C). Verificou-se uma marcação de GFAP mais evidente no estriado injetado com ATXN2 mutada nos animais idosos do que nos animais jovens (Fig. 4.4. B, D). Ao contrário do GFAP, não se observaram diferenças de marcação de Iba1 nos estriados injetados com ATXN2 mutada entre os animais jovens e idosos (Fig. 4.5. B, D).

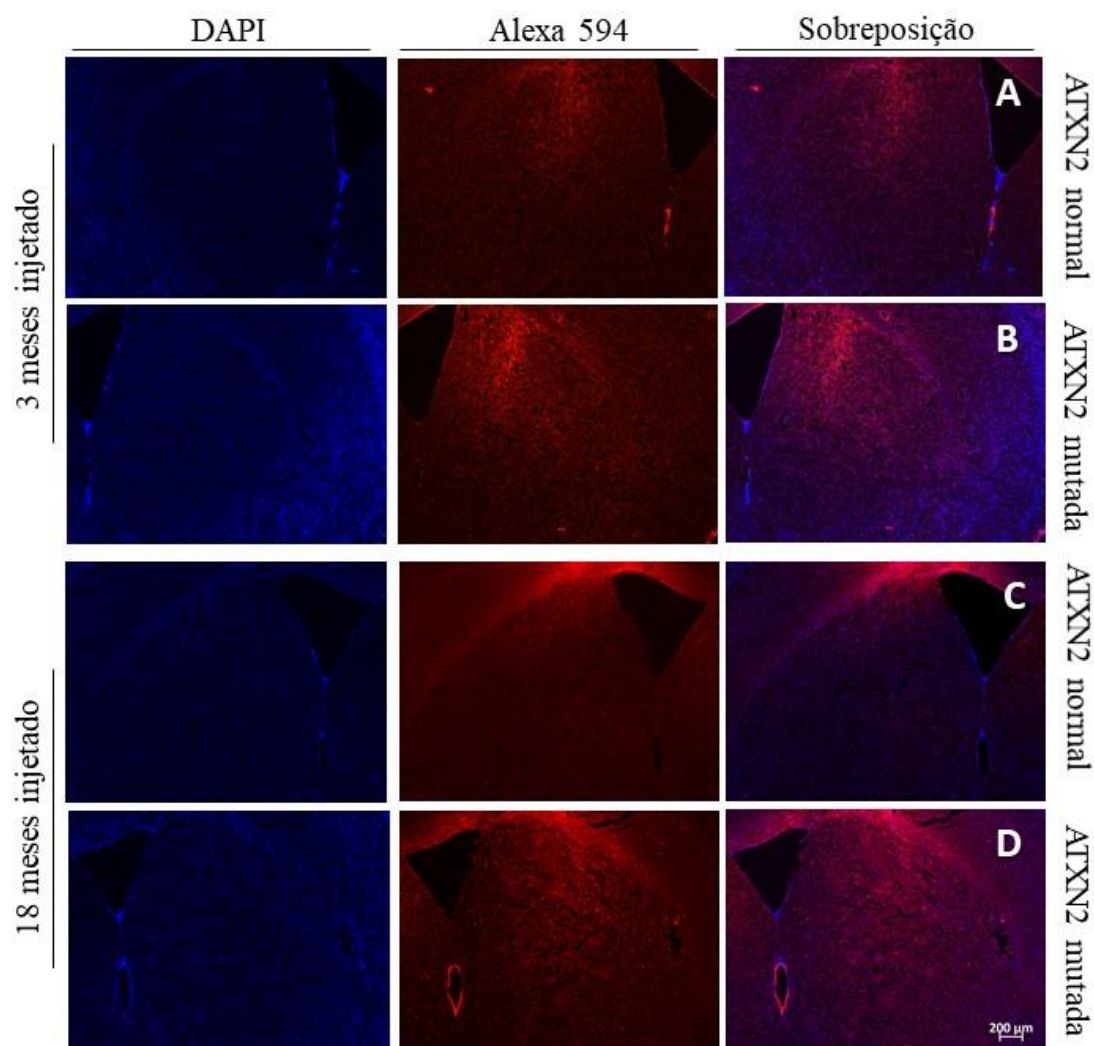


Figura 4.5. - A ATAXINA-2 está associada ao aumento da ativação da resposta inflamatória A-D) Imagens representativas de microscopia para a marcação imunohistoquímica do Iba1 às 12 semanas após a injeção, utilizando 6 secções coronais de estriado por animal (n=6 murganhos jovens injetados com 3 meses com ATAXINA-2 normal no estriado esquerdo e com ATAXINA-2 mutante no estriado direito, n=3 murganhos idosos injetados com 18 meses com ATAXINA-2 normal no estriado esquerdo e com ATAXINA-2 mutante no estriado direito). Após as 12 semanas de injeção, é visível marcação de Iba1 em ambos os lados do estriado, sendo mais acentuada no estriado direito. Não há diferenças de marcação entre o estriado direito dos murganhos jovens e idosos.

Através da análise dos níveis de mRNA de GFAP, notou-se uma expressão tendencialmente superior de GFAP no estriado injetado com ATXN2 normal ($1,147 \pm 0,2402$) do que no estriado injetado com ATXN2 mutada ($1,048 \pm 0,1127$) nos animais jovens (Fig. 4.4. E). Ao contrário dos animais jovens, nos animais idosos injetados, os níveis de expressão de GFAP tinham tendência para ser mais elevados no estriado

injetado com ATXN2 mutada ($1,187 \pm 0,214$) do que o estriado injetado com ATXN2 normal ($1,027 \pm 0,1545$) (Fig. 4.4. E). Ao comparar o estriado direito com ATXN2 mutada dos animais jovens e idosos, verificou-se que a expressão de GFAP é tendencialmente elevada nos animais idosos (Fig. 4.4. E). O mesmo se observou ao comparar o estriado dos animais idosos injetado com ATXN2 mutada com o estriado dos animais não injetados ($1,074 \pm 0,07928$), havendo uma maior tendência de expressão de GFAP nos animais idosos injetados (Fig. 4.4. E). No entanto, qualquer diferença dos níveis de expressão de GFAP entre as várias condições experimentais não é estatisticamente significativa.

4.3. A ATAXINA-2 mutante e a idade não alteram a expressão gênica de elementos essenciais em diversos mecanismos celulares

A ATAXINA-2 interage com o PABP (Ralsler et al. 2005; Nobrega et al. 2015), promovendo a associação da ATAXINA-2 aos polirribossomas (Satterfield and Pallanck 2006). Para investigar se a relação da ATAXINA-2 com o PABP era alterada durante o envelhecimento na presença da ATXN2 mutada, analisaram-se os níveis de mRNA da Ataxina-2 endógena de murganho e de *Pabpc1* através de PCR quantitativo em tempo real (Fig. 4.6.A, B). Após as 12 semanas da injeção, os níveis de expressão de Ataxina-2 endógena eram bastante aproximados entre todas as condições experimentais (Fig. 4.6.A). Portanto, não houve diferenças significativas na expressão de Ataxina-2 endógena (Fig. 4.6.A). Também os níveis de *Pabpc1* eram semelhantes entre o estriado injetado com ATXN2 normal ($1,005 \pm 0,04463$) e o estriado injetado com ATXN2 mutada ($1,002 \pm 0,01356$) nos animais jovens (Fig. 4.6.B). Por outro lado, nos animais idosos existiu uma tendência para aumento dos níveis de *Pabpc1* no estriado com ATXN2 mutada ($1,177 \pm 0,0584$) em relação ao estriado com ATXN2 normal ($1,01 \pm 0,08622$), porém, esta diferença não é estatisticamente significativa. Ao comparar o estriado direito dos animais idosos com ATXN2 mutada e o estriado dos animais não injetados ($1,116 \pm 0,03422$), observou-se uma tendência para aumento de mRNA de *Pabpc1* nos animais idosos injetados, contudo, esta diferença também não é significativa. Por outro lado, houve uma diferença significativa ($p=0,0093$) entre o estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais jovens e idosos, sendo que os animais idosos tinham uma expressão mais elevada de *Pabpc1* (Fig. 4.6.B).

Com o envelhecimento, determinados mecanismos celulares como a autofagia, começam a sofrer alterações, o que pode contribuir para o desenvolvimento de determinadas patologias (Rego 2017). Para além disso, nas doenças de poliglutaminas, como é o caso da SCA2, sabe-se que ocorre a desregulação da autofagia (Cortes and La Spada 2015). De modo a avaliar o impacto da ATXN2 mutada juntamente com o envelhecimento sobre a autofagia, analisou-se os níveis de mRNA de LC-3b (Fig. 4.6.C), Beclina (Fig. 4.6.D), e p62 (Fig. 4.6.E), através de PCR quantitativo em tempo real.

De modo geral, os níveis de LC-3b foram tendencialmente mais elevados nos animais jovens injetados em relação aos animais idosos injetados e não injetados, sendo que estes dois últimos grupos demonstraram valores de expressão de LC-3b bastante aproximados (Fig. 4.6.C). Após as 12 semanas de injeção, os níveis de LC-3b nos animais jovens eram tendencialmente elevados no estriado injetado com ATXN2 mutada ($1,698 \pm 0,3972$), em relação ao estriado injetado com ATXN2 normal ($1,36 \pm 0,4004$). Nos animais idosos injetados, a expressão de LC-3b era aproximadamente semelhante entre os estriados com ATXN2 normal ($1,017 \pm 0,1241$) e com ATXN2 mutada ($1,113 \pm 0,06064$). Os animais idosos não injetados ($1,041 \pm 0,04681$) também apresentavam valores bastante semelhantes a ambos os estriados dos animais injetados. No entanto, qualquer diferença dos níveis de mRNA de LC-3b não é estatisticamente significativa (Fig. 4.6.C).

No caso da Beclina, os níveis de expressão tinham uma tendência elevada no estriado injetado com ATXN2 normal ($1,008 \pm 0,06253$), relativamente ao estriado injetado com ATXN2 mutada ($0,7617 \pm 0,1218$) nos animais jovens (Fig. 4.6.D). Ao contrário do observado nos animais jovens, nos animais idosos injetados houve uma tendência para o aumento dos níveis de Beclina no estriado com ATXN2 mutada ($1,063 \pm 0,07356$), em relação ao estriado com ATXN2 normal ($0,895 \pm 0,005$) (Fig. 4.6.D). Ao comparar os animais jovens e idosos injetados, notou-se um tendencial aumento dos níveis de mRNA de Beclina no estriado com ATXN2 dos animais idosos (Fig. 4.6.D). Os níveis de mRNA da Beclina eram bastante semelhantes entre os animais idosos injetados e não injetados ($1,009 \pm 0,03857$) (Fig. 4.6.D). Apesar de se observarem algumas diferenças ligeiras nos níveis de expressão de Beclina, estas não são estatisticamente significativas.

Ao analisar os níveis de expressão do p62, verificou-se que o estriado direito dos animais jovens injetados com ATXN2 mutada ($1,19 \pm 0,1437$) apresenta valores tendencialmente superiores ao estriado esquerdo injetado com ATXN2 normal ($1,018 \pm 0,08023$) (Fig. 4.6.E). Já nos animais idosos injetados, os níveis de mRNA de p62 eram

bastante aproximados entre o estriado com ATXN2 normal ($1,003 \pm 0,07311$) e com ATXN2 mutada ($0,9867 \pm 0,0348$) (Fig. 4.6.E). No entanto, observou-se uma tendencial diminuição dos valores de p62 no estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais idosos, relativamente ao dos animais jovens. Esta mesma observação ocorre no estriado dos animais idosos não injetados, que apresentou valores tendencialmente mais elevados ($1,131 \pm 0,1498$), em relação ao estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais idosos injetados (Fig. 4.6.E). Contudo, estas diferenças nos níveis de mRNA de p62 também não são estatisticamente significativas.

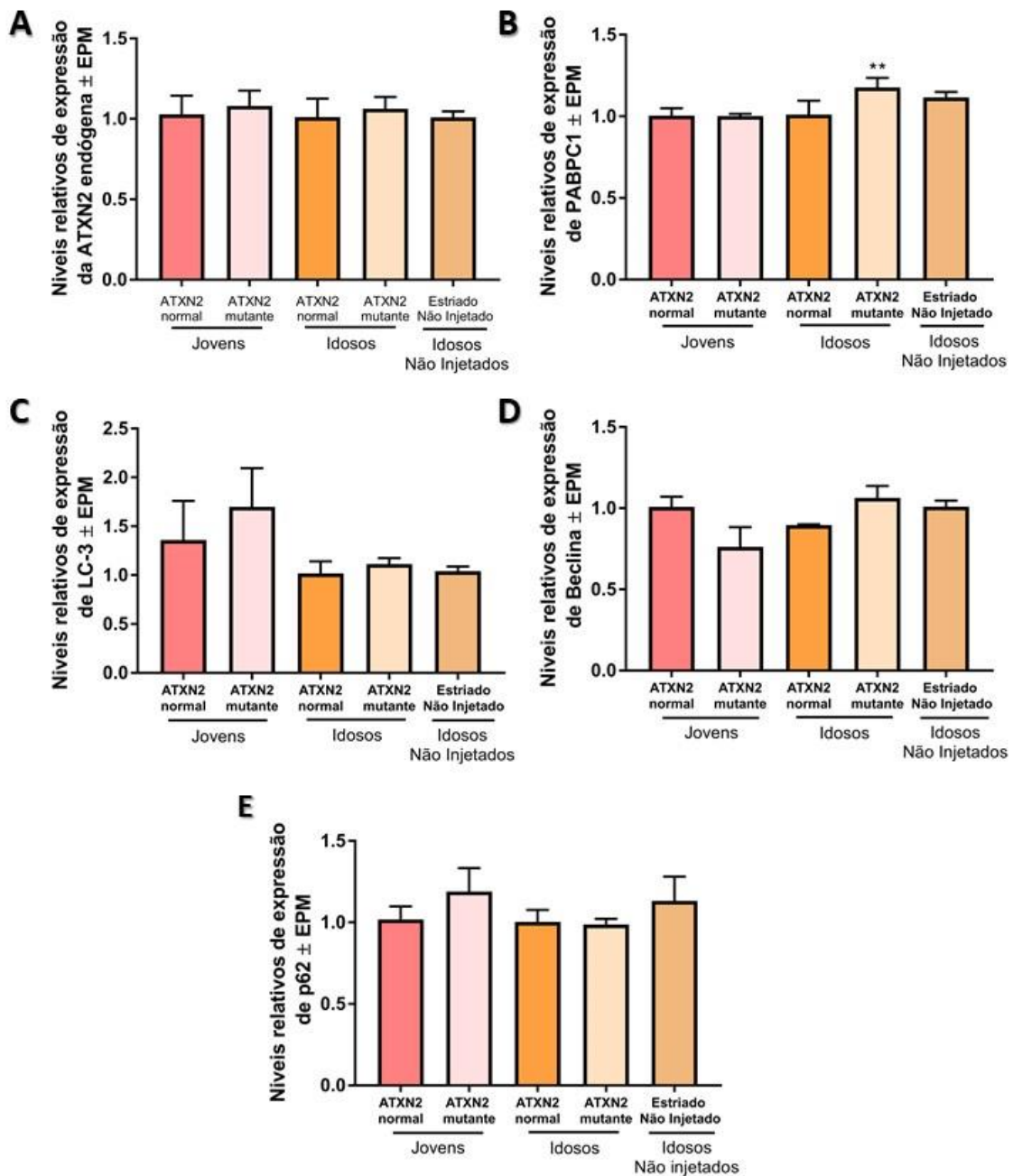


Figura 4.6. - A ATAXINA-2 mutante e a idade não alteram a expressão gênica de elementos essenciais em diversos mecanismos celulares. A-B) Quantificação dos níveis de mRNA de Ataxina-2 endógena de murgancho (A), de PABPC1 (B), de LC-3b (C), de Beclina (D) e de p62 (E) às 12 semanas após a injeção ($n=6$ murganchos jovens injetados com ATAXINA-2 normal no estriado esquerdo e ATAXINA-2 mutada no estriado direito; $n=3$ murganchos idosos injetados com ATAXINA-2 normal no estriado esquerdo e ATAXINA-2 mutada no estriado direito; $n=4$ murganchos idosos não injetados). Não existem diferenças significativas nos níveis de expressão de Ataxina-2 endógena entre as diferentes condições experimentais, porém existe um aumento da expressão de PABPC1 no estriado com expressão da forma mutada da ATAXINA-2 humana nos animais idosos injetados, em relação ao estriado correspondente dos animais jovens. Não existem diferenças significativas entre as diferentes condições experimentais para a LC-3b, Beclina e p62. Os valores estão expressos pela média \pm EPM, (Unpaired t-test, two-tailed).

O envelhecimento promove a disfunção mitocondrial, que de certa forma contribui para o desenvolvimento de certos eventos patológicos, tanto a nível molecular, como celular (Lopez-Otin et al. 2013). Além disso, a disfunção mitocondrial está também associada às doenças de poliglutaminas devido à sobre-expressão das proteínas mutantes responsáveis por este tipo de doenças (Stoyas and La Spada 2018). Assim, para investigar a disfunção mitocondrial provocada pelo envelhecimento em conjunto com a ATXN2 mutada, analisou-se o mRNA de PGC-1 α (Fig. 4.7.F) e de TFAM (Fig. 4.7.G), através de PCR quantitativo em tempo real.

Após as 12 semanas de injeção, os níveis de PGC-1 α foram tendencialmente mais elevados no estriado injetado com ATXN2 mutada ($1,187 \pm 0,2138$), em relação ao estriado injetado ATXN2 normal ($1,018 \pm 0,08207$) nos animais jovens (Fig. 4.7.F). O mesmo se observou para os animais idosos injetados, contudo a diferença entre o estriado com ATXN2 mutada ($1,06 \pm 0,1405$) e o estriado com ATXN2 normal ($1,007 \pm 0,08413$) é menor, comparativamente aos animais jovens (Fig. 4.7.F). No entanto, notou-se uma tendência para a diminuição dos níveis de mRNA do PGC-1 α no estriado com ATXN2 mutada dos animais jovens para os animais idosos injetados (Fig. 4.7.F). Ao comparar o estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais idosos com o estriado dos animais não injetados ($1,098 \pm 0,1438$), estas duas condições experimentais demonstraram valores de PGC-1 α bastante aproximados (Fig. 4.7.F). Contudo, estas diferenças dos níveis de PGC-1 α não são estatisticamente significativas. Ao analisar os níveis de expressão de TFAM, notou-se que todas as condições experimentais tinham valores bastante aproximados e, portanto, não existem diferenças significativas entre si (Fig. 4.7.G).

Durante o envelhecimento pode ocorrer disfunção sináptica (Masliah et al. 1993; Walsh and Akopian 2019). Para avaliar a função sináptica e se esta sofria alterações devido ao efeito do envelhecimento e da ATXN2 mutada, analisou-se os níveis de mRNA de Vglut (Fig. 4.7.H) e psd95 (Fig. 4.7.I) através de PCR quantitativo em tempo real.

Após as 12 semanas de injeção, os níveis de mRNA de Vglut tinham uma tendência elevada no estriado injetado com ATXN2 mutada ($1,253 \pm 0,223$), em relação ao estriado injetado com ATXN2 normal ($1,12 \pm 0,2217$) nos animais jovens (Fig. 4.7.H). Por outro lado, nos animais idosos injetados, tanto o estriado com ATXN2 normal ($1,25 \pm 0,4899$), como o estriado com ATXN2 mutada ($1,287 \pm 0,5659$) apresentavam valores de Vglut bastante aproximados (Fig. 4.7.H). Os animais idosos não injetados ($1,266 \pm 0,3073$) revelaram valores de Vglut semelhantes a ambos os estriados dos animais idosos injetados

(Fig. 4.7.H). Ao comparar o estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais jovens e idosos, notou-se que os níveis de mRNA de Vglut eram também aproximados, havendo uma ligeira tendência para aumentar nos animais idosos. Não se encontraram diferenças significativas nos níveis de mRNA de Vglut entre as diversas condições experimentais.

Em relação aos níveis de mRNA do psd95, observou-se que o estriado injetado com ATXN2 normal ($1,005 \pm 0,04822$) e com ATXN2 mutada ($0,9983 \pm 0,07905$) nos animais jovens tinham valores semelhantes (Fig. 4.7.I). Por outro lado, nos animais idosos injetados, os níveis de expressão de psd95 eram tendencialmente elevados no estriado com ATXN2 mutada ($1,147 \pm 0,1126$), em relação ao estriado com ATXN2 normal ($1,017 \pm 0,1272$) (Fig. 4.7.I). Comparando o estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais jovens e idosos injetados, notou-se que os valores de psd95 eram tendencialmente superiores nos animais idosos (Fig. 4.7.I). O mesmo acontece entre o estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais idosos injetados e o estriado dos animais idosos não injetados ($1,058 \pm 0,07568$) (Fig. 4.7.I). Contudo, não existem diferenças significativas nos níveis de mRNA do psd95 entre as várias condições experimentais.

O envelhecimento está associado à desregulação metabólica (Kubben and Misteli 2017), que afeta vias de sinalização de elementos responsáveis pela sensibilidade de nutrientes (Lopez-Otin et al. 2013). Por outro lado, a ATAXINA-2 tem um papel como mediador metabólico e sensor de nutrientes (Lee et al. 2018), mas também modula a sinalização de outras vias responsáveis pela sensibilidade de nutrientes (Lastres-Becker et al. 2016; Ostrowski, Hall, and Mekhail 2017). Assim, para investigar se existiam alterações na regulação do sensor de nutrientes provocada pelo envelhecimento em conjunto com a ATXN2 mutada, através de PCR quantitativo em tempo real, analisou-se o mRNA de mTOR, um elemento responsável pela sensibilidade a elevadas concentrações de aminoácidos (Lopez-Otin et al. 2013) (Fig. 4.7.J). Após as 12 semanas de injeção, os níveis de expressão de mTOR apresentavam uma tendência ligeiramente elevada no estriado injetado com ATXN2 normal ($1,015 \pm 0,08135$), em relação ao estriado injetado com ATXN2 mutada ($0,9317 \pm 0,08093$) nos animais jovens (Fig. 4.7.J). Nos animais idosos injetados, os valores de mTOR eram semelhantes entre os estriados com ATXN2 normal ($1,04 \pm 0,1929$) e com ATXN2 mutada ($1,05 \pm 0,1044$) (Fig. 4.7.J). Comparando o estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais jovens e idosos, notou-se um tendencial aumento dos níveis de expressão de mTOR nos animais idosos (Fig. 4.7.J). Os valores de mTOR eram também tendencialmente superiores no estriado

injetado com ATXN2 mutada dos animais idosos injetados, em relação ao estriado dos animais idosos não injetados ($1,008 \pm 0,07745$) (Fig. 4.7.J). No entanto, as diferenças dos níveis de mRNA do mTOR observadas não foram estatisticamente significativas.

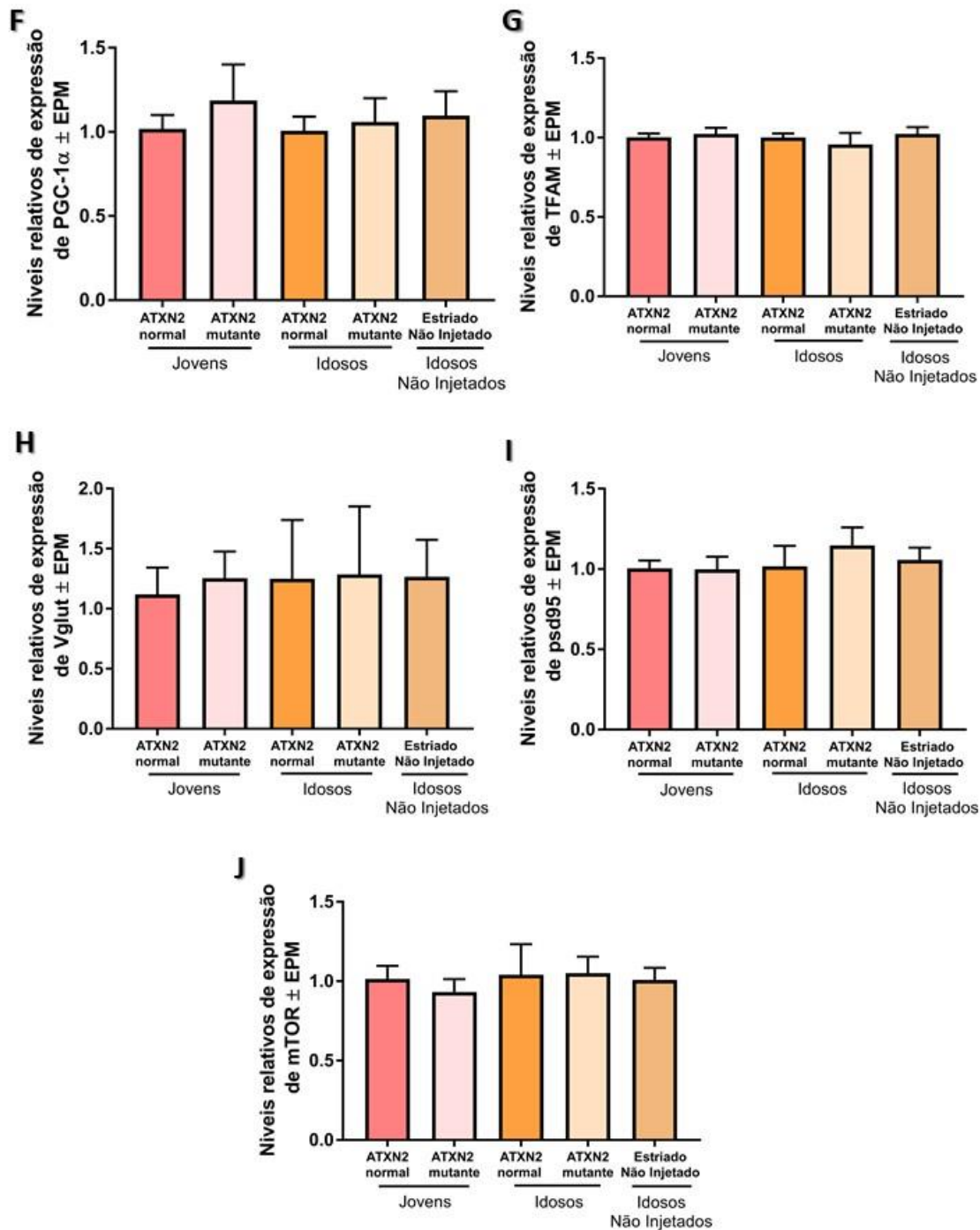


Figura 4.7. - A ATAXINA-2 mutante e a idade não alteram a expressão gênica de elementos essenciais em diversos mecanismos celulares. Quantificação dos níveis de mRNA de PGC-1 α (F), de TFAM (G), de Vglut (H), de psd95 (I) e de mTOR (J) às 12 semanas após a injeção (n=6 murganhos jovens injetados com ATAXINA-2 normal no estriado esquerdo e ATAXINA-2 mutada no estriado direito; n=3 murganhos idosos injetados com ATAXINA-2 normal no estriado esquerdo e ATAXINA-2 mutada no estriado direito; n=4 murganhos idosos não injetados). Não existem diferenças significativas entre as diferentes condições experimentais para o PGC-1 α , TFAM, Vglut, psd95 e mTOR. Os valores estão expressos pela média \pm EPM, (Unpaired t-test, two-tailed).

4.4. A ATXN2 mutada diminui a ativação da atividade apoptótica e provoca alteração nas histonas

Mutações na ATAXINA-2 podem conduzir à morte celular por apoptose (Huynh et al. 2003). Com o intuito de investigar se havia maior ativação da via de sinalização da apoptose, analisou-se os níveis de proteína da caspase-3 clivada, um elemento desta via de sinalização, após as 12 semanas de injeção nos animais idosos injetados e nos animais idosos não injetados. A análise por Western Blot revelou níveis de caspase-3 clivada tendencialmente inferiores no estriado dos animais idosos injetados com ATXN2 mutada ($0,2963 \pm 0,005402$), em relação ao estriado destes mesmos animais injetado com ATXN2 normal ($0,6026 \pm 0,3083$), porém esta diferença não é significativa (Fig. 4.8.C). Os animais idosos não injetados apresentaram níveis de caspase-3 clivada superiores ($0,9047 \pm 0,1299$), em relação aos animais idosos injetados. Contudo, existe uma diminuição significativa dos níveis de proteína da caspase-3 clivada no estriado dos animais idosos injetados com ATXN2 mutada, em relação aos animais não injetados (Fig. 4.8.C).

Durante o normal processo de envelhecimento ocorrem alterações epigenéticas que englobam por exemplo a modificação pós-tradução das histonas (Lopez-Otin et al. 2013; Kubben and Misteli 2017). Para detetar se a ATAXINA-2 mutada causava alterações nas histonas, analisou-se, através de Western Blot os níveis de proteína da Fosfo-histona H2A.X nos animais idosos injetados e não injetados após as 12 semanas de injeção. Observou-se que os níveis de Histona H2A.X eram bastante semelhantes entre o estriado dos animais idosos injetados com ATXN2 normal ($0,9252 \pm 0,3181$) e o estriado destes mesmos animais injetado com ATXN2 mutada ($0,9665 \pm 0,1004$) (Fig. 4.8.D). Contudo, os níveis de Histona H2A.X eram bastante mais elevados nos animais idosos não injetados ($1,598 \pm 0,05418$), em relação a ambos os estriados dos animais injetados (Fig. 4.8.D). Existe uma diminuição estatisticamente significativa no estriado com ATXN2 mutada nos animais idosos injetados, relativamente aos animais não injetados (Fig. 4.8.D).

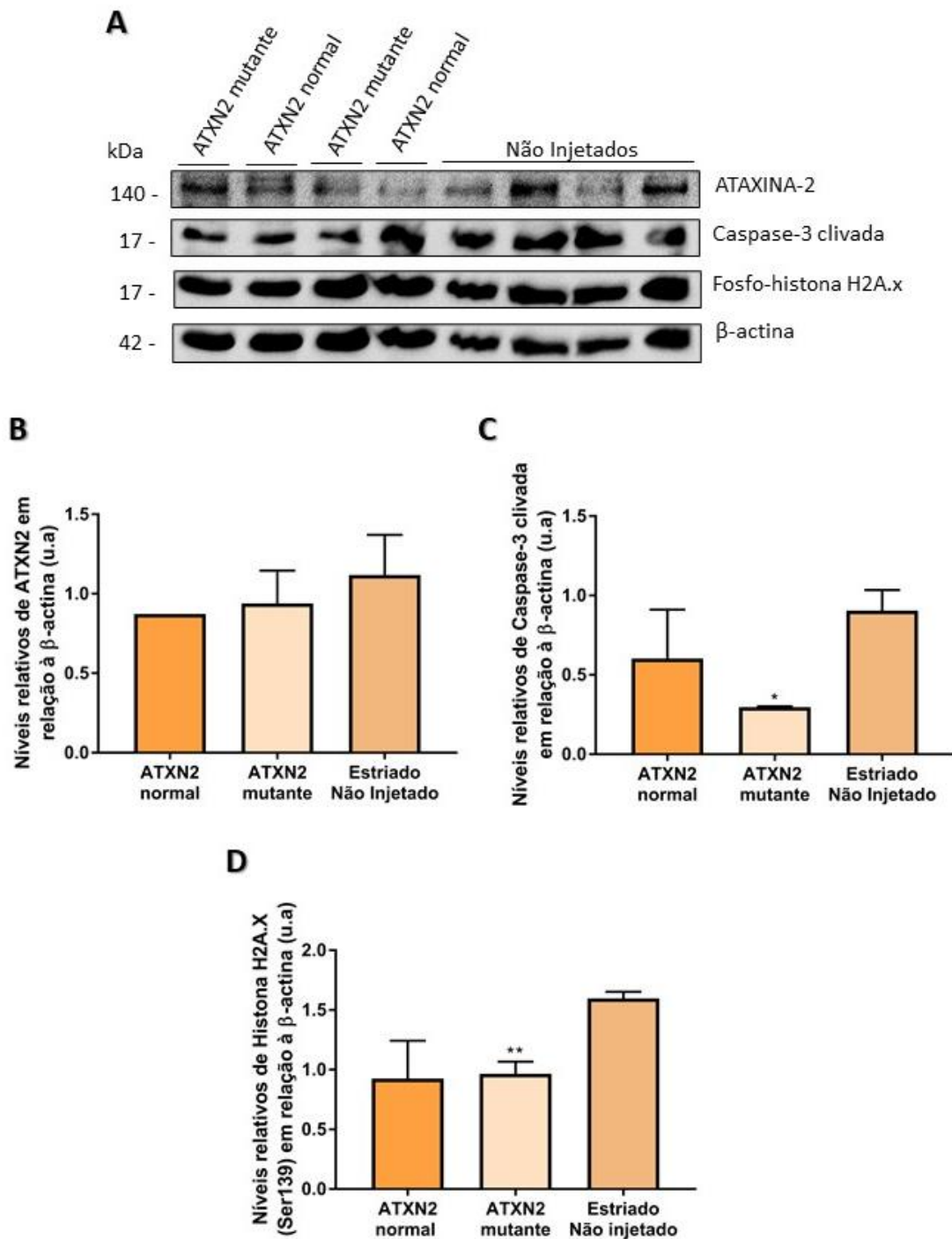


Figura 4.8. - A ATAXINA-2 mutada conduz a alterações nos processos apoptótico e alterações epigenéticas. A-D) Análise de Western Blot dos níveis de ATXN2 (B), da caspase-3 clivada (C) e de Histona H2A.X às 12 semanas após a injeção nos estriados esquerdo e direito dos animais idosos injetados e dos animais idosos não injetados. ($n=2$ animais idosos injetados com ATXN2 normal no estriado esquerdo e com ATXN2 mutada no estriado direito; $n=2$ animais idosos não injetados). O gráfico de barras representa a média \pm EPM dos níveis de proteína de ATXN2, caspase-3 clivada e de Fosfo-histona H2A.x (u.a). Unpaired t test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). Os níveis de ATXN2 são aproximadamente semelhantes entre ambos os estriados dos animais injetados, mas existe um ligeiro aumento desta proteína nos animais não injetados. Os níveis de caspase-

3 clivada são bastante mais reduzidos no estriado injetados com ATXN2 mutada, em relação ao estriado injetado com ATXN2 normal e o estriado não injetado. Os níveis de Fosfo-histona H2A.X são semelhantes entre o estriado injetado com ATXN2 normal e mutada, mas existe uma diminuição acentuada desta proteína no estriado injetado com ATXN2 mutada, relativamente ao estriado dos animais não injetados.

5. Discussão:

5.1. Formação de agregados de ATXN2 mutada e perda da integridade neuronal:

As proteínas poliglutaminas quando mutadas sofrem alterações na sua estrutura e na forma de interagir com outras proteínas, conduzindo à formação de agregados proteicos com propriedades tóxicas nas células neuronais (Michalik and Van Broeckhoven 2003; Adegbuyiro et al. 2017). No caso da ATAXINA-2 mutada, os agregados formados são sobretudo citoplasmáticos (Koyano et al. 2014). Estes agregados podem tornar-se tóxicos para as células e desta forma contribuir para o desenvolvimento de determinadas patologias (Stoyas and La Spada 2018; Takeuchi and Nagai 2017; Adegbuyiro et al. 2017). Após as 12 semanas de injeção, foi detetada ATAXINA-2 no hemisfério injetado com ATXN2 mutada. A ATAXINA-2 mutada com uma expansão de 82 repetições de glutaminas conduziu à formação de agregados nos animais injetados com 3 meses (jovens) e 18 meses (idosos). De facto, a ATXN2 mutada injetados nos murganhos jovens e idosos levou à formação de agregados. Os animais idosos apresentavam aproximadamente o dobro do número de agregados de ATXN2 mutada em relação aos animais jovens. Estes resultados demonstram que o aumento da idade compromete as vias de degradação de proteínas, resultando na acumulação de proteínas mutadas e formação de agregados proteicos.

O envelhecimento é um dos fatores principais para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Hung et al. 2010; Rego 2017), principalmente devido à diminuição do sistema de controlo de qualidade de proteínas que, por sua vez, contribui para a acumulação de proteínas anormais que formam os agregados proteicos (Hung et al. 2010). Portanto, os resultados deste projeto estão em concordância com a literatura, visto que se formam mais agregados nos animais idosos, em relação aos animais jovens, que poderão contribuir para o desenvolvimento de patologia.

Os neurónios são das células mais afetadas pelo envelhecimento, uma vez que são bastante suscetíveis a elevados níveis de stress oxidativo, a alterações metabólicas e no DNA, como também a acumular proteínas danificadas (Rego 2017). Portanto, é comum nos humanos, a partir dos 60 anos de idade, haver uma diminuição do volume e peso cerebral juntamente com um aumento do volume ventricular (Anderton 2002; Jernigan et al. 2001), devido à perda neuronal e encolhimento dos corpos celulares dos neurónios

(Anderton 2002). A perda neuronal severa é também um achado cerebral patológico recorrente nos doentes com SCA, que ocorre principalmente no cerebelo, mas também no globo pálido, no córtex cerebral e no estriado (Huynh et al. 1999; Estrada et al. 1999). De facto, observou-se no estriado injetado com ATXN2 mutada maiores áreas sem marcação de DARPP-32, em relação ao estriado injetado com ATXN2 normal nos animais jovens e idosos, o que sugere que a expressão de ATXN2 mutada conduziu à perda localizada da imunoreatividade do anticorpo anti-DARPP-32, após as 12 semanas de injeção. Além disso, os níveis de proteína de DARPP-32 apresentaram uma redução significativa no estriado injetado com ATXN2 mutada dos animais idosos, em relação aos animais não injetados. Dado que, ocorre a perda de imunoreatividade de DARPP-32 e uma redução dos seus níveis proteicos no estriado dos animais injetados com ATXN2 mutada, verifica-se que a ATXN2 mutada provoca perda neuronal, independentemente da idade.

Para confirmar a morte neuronal, procedeu-se à análise com coloração violeta de cresilo, que demonstrou a presença de núcleos picnóticos nos estriados injetados com ATXN2 normal e com ATXN2 mutada, não havendo grandes diferenças entre ambos os estriados e os animais jovens e idosos. Também não se observaram diferenças entre os animais jovens e idosos através deste método.

A acumulação de proteínas danificadas e a formação de agregados de ATXN2 mutada, possivelmente, compromete a função de determinados organelos que, posteriormente, irá provocar diversos danos celulares que contribuem para a morte neuronal observada. Esta sequência de eventos patológicos é comumente observada nas doenças neurodegenerativas (Rego 2017).

5.2. A ATXN2 mutada conduz ao aumento da resposta inflamatória:

O envelhecimento está associado a um fenótipo pró-inflamatório chamado de “*inflammaging*”, que se pode dever a diversas causas como, por exemplo, a acumulação de danos nos tecidos ou devido a problemas na resposta autofágica, entre outros (Lopez-Otin et al. 2013). Algo que se observa nos doentes SCA2, para além da perda neuronal, é também um aumento da microglia e astrogliose em determinadas regiões do cérebro (Huynh et al. 1999; Estrada et al. 1999).

A análise imunohistoquímica após as 12 semanas de injeção, revelou a marcação de GFAP e de Iba1 em ambos os hemisférios do cérebro dos animais jovens e idosos injetados, mas não se observou marcação de GFAP e de Iba1 nos animais idosos não injetados. O estriado direito injetado com ATAXINA-2 mutada nos animais jovens e idosos apresenta mais marcação de GFAP e de Iba1, em comparação com o estriado esquerdo injetado com ATAXINA-2 normal. Porém, repara-se que a marcação de GFAP é mais evidente no estriado direito injetado com ATXN2 mutada nos animais idosos, do que nos animais jovens. enquanto que, para o Iba1, não se observam diferenças de marcação entre os animais jovens e os animais idosos. Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois observa-se a ocorrência de astrogliose e ativação da microglia no estriado na presença de ATXN2 mutada (Huynh et al. 1999; Estrada et al. 1999).

Os perfis de expressão génica no cérebro sofrem alterações durante o envelhecimento, pelo que existe um aumento da expressão de genes envolvidos no processo de inflamação (Anderton 2002). A análise dos níveis de GFAP após as 12 semanas de injeção não demonstrou diferenças significativas entre os estriados injetados com ATXN2 normal e com ATXN2 mutada nos animais jovens, idosos e nos animais não injetados.

Estes dados em conjunto sugerem que a ATXN2 mutada, independentemente da idade, provoca o aumento da resposta inflamatória através da astrogliose e da ativação da microglia.

5.3. A ATXN2 mutada tem influência sobre o PABP:

A ATAXINA-2 tem um papel bastante vasto no metabolismo do mRNA (Satterfield and Pallanck 2006; Albrecht et al. 2004; Shibata, Huynh, and Pulst 2000), desde estabilizar o mRNA ligando-se diretamente ao 3' UTR dos mRNAs (Yokoshi et al. 2014), como também liga de forma transiente ao retículo endoplasmático rugoso, rico em proteínas capazes de ligar ao RNA (van de Loo et al. 2009) e facilita a tradução do mRNA codificante para componentes estruturais do retículo endoplasmático ou proteínas associadas a este organelo (Del Castillo et al. 2019). Além disso, devido aos seus domínios Lsm, a ATAXINA-2 pode também interagir com os snRNPs e promover o splicing (Neuwald and Koonin 1998). Estes processos do metabolismo do mRNA podem

ser afetados pela expansão de glutaminas na ATAXINA-2, uma vez que compromete as interações proteicas (Yokoshi et al. 2014; Neuwald and Koonin 1998).

Antes do recrutamento dos ribossomas e do início da tradução, o PABPC1 medeia a circulação do mRNA através da ligação à cauda poli-(A) dos mRNAs (Svitkin et al. 2009). A ATAXINA-2 interage, de forma independente da expansão de poliglutaminas, com o PABP, de modo a associar-se aos polirribossomas (Ralser et al. 2005; Nobrega et al. 2015; Satterfield and Pallanck 2006).

Os níveis de mRNA da Ataxina-2, após as 12 semanas de injeção, mantiveram-se inalterados entre os estriados injetados com ATXN2 normal e ATXN2 mutada nos animais jovens e idosos, como também nos animais idosos não injetados. Não houve diferenças significativas nos níveis de mRNA do PABPC1 entre os estriados injetados com ATXN2 normal e mutada dos animais jovens e idosos e os animais não injetados. Porém, houve um aumento significativo dos níveis de Pabpc1 no estriado injetado com ATXN2 mutada nos animais idosos, em relação aos animais jovens. Estes resultados estão de acordo com um estudo em que se descobriu que a ATXN2 mutada sequestrava o PABPC1, observando-se que os níveis de mRNA do Pabpc1 no córtex aumentavam na presença de ATXN2 mutada com 42 repetições CAG (Damrath et al. 2012), o que conduziu por sua vez ao aumento dos níveis desta proteína solúvel. A ATXN2 mutada demonstrou um aumento da sua insolubilidade ao longo do tempo que, por sua vez, provocou o aumento da insolubilidade do PABPC1, através do sequestro desta proteína (Damrath et al. 2012). As mesmas observações foram feitas no cerebelo, na qual o sequestro e aumento da insolubilidade do PABPC1 poderá ter comprometido o processamento do RNA e a síntese proteica, conduzindo à morte celular nas células de mamífero (Thangima Zannat, Bhattacharjee, and Bag 2011).

Estas observações indicam que a ATXN2 mutada sequestra o PABPC1 e diminui a sua solubilidade na células. Deste modo, o aumento dos níveis de mRNA do PABPC1 podem ser um mecanismo compensatório para repor os níveis desta proteína na célula.

5.4. A ATXN2 mutada e a idade não alteram os níveis de expressão génica de elementos essenciais nos processos autofágicos:

O envelhecimento é acompanhado da diminuição da atividade dos sistemas de degradação de proteínas (Lopez-Otin et al. 2013). As vias de degradação de proteínas incluem a autofagia e o UPS (Alves-Cruzeiro et al. 2016). Estas vias, não são apenas afetadas pelo envelhecimento, mas também, pela ATAXINA-2 mutada (Damrath et al. 2012) (Halbach et al. 2015) (Alves-Cruzeiro et al. 2016), devido à interação e sequestro de componentes das estruturas essenciais para a degradação de proteínas (Halbach et al. 2015). Assim sendo, os sistemas de autofagia e UPS podem ser afetados pelo envelhecimento e pelas doenças de poliglutaminas (Lopez-Otin et al. 2013; Cortes and La Spada 2015). A diminuição da eficácia ou desregulação da autofagia e do UPS, conduz à acumulação de proteínas com conformação anormal, ao aumento da clivagem das proteínas mutantes em pequenos fragmentos tóxicos e à formação de agregados proteicos (Alves-Cruzeiro et al. 2016). Os agregados, são compostos pelos fragmentos tóxicos e, portanto, são indicadores que existe a desregulação da proteostase (Stoyas and La Spada 2018; Cortes and La Spada 2015).

Os perfis de expressão génica e proteica no cérebro tendem a modificar-se ao longo da idade e quando esta é avançada, ocorre a diminuição da expressão de genes envolvidos no metabolismo de proteínas (Anderton 2002). Após as 12 semanas de injeção, a análise dos níveis de mRNA de LC-3b, Beclina e p62, marcadores da autofagia, apesar de se verificar ligeiras diferenças entre os animais jovens e idosos injetados e os animais não injetados, estas não são diferenças significativas. Deste modo, não são detetadas alterações na regulação da proteostase através da análise da sua expressão génica, mas, possivelmente, poderiam ser detetadas alterações através de análise proteica destes mesmos marcadores.

5.5. O aumento da idade e a presença de ATXN2 mutada não causam alterações na expressão génica de elementos mitocondriais:

Outro evento comum no envelhecimento é a disfunção mitocondrial (Lopez-Otin et al. 2013), que também pode ocorrer nas doenças de poliglutaminas (Stoyas and La Spada 2018). Nas doenças de poliglutaminas, os complexos da cadeia respiratória são afetados e ocorre a diminuição da produção de ATP e o aumento dos níveis de ROS, o que

prejudica bastante os neurónios devido às duas necessidades energéticas elevadas e dependência de ATP, produzido pela respiração celular mitocôndria (Stoyas and La Spada 2018). Os níveis de mRNA do PGC-1 α após as 12 semanas de injeção mostraram ligeiras alterações entre os estriados injetados com ATXN2 normal e mutada nos animais jovens e idosos injetados e nos animais não injetados, porém sem diferença significativa. Os níveis de mRNA do TFAM eram bastante semelhantes entre as várias condições experimentais, pelo que, também não se verificaram diferenças significativas. Estes resultados não demonstram alterações na função mitocondrial ao longo do envelhecimento na presença de ATXN2 mutada, no entanto, estudos adicionais com outros marcadores podem ajudar a melhor compreender o impacto desta proteína mutada na função da mitocôndria.

5.6. A ATXN2 mutada em conjunto com a idade não provoca alterações na função sináptica:

É também comum durante o envelhecimento ocorrer a disfunção sináptica (Masliah et al. 1993), que se manifesta por menor excitabilidade inicial, maior dificuldade em gerar potenciais de ação e menor número de espinhas dendríticas nos gânglios basais que, por sua vez, comprometem a execução de determinados movimentos (Walsh and Akopian 2019).

A ATXN2 interage com uma rede de proteínas sinápticas (Paciorkowski et al. 2011) e parece ter um papel importante para a plasticidade sináptica a longo termo dos neurónios de projeção olfativos na *Drosophila* (McCann et al. 2011). Num modelo animal *knock-in* com 100 repetições CAG na ATAXINA-2 verificou-se que uma expansão de poliglutaminas elevada causava a perda de fatores axonais e pré-sinápticos que estariam associados a deficiências motoras e sensoriais observadas neste modelo animal (Canet-Pons et al. 2019). Além disso, observou-se em doentes com SCA2 com uma expansão superior a 200 CAG que o fenótipo severo observado pode estar correlacionado com problemas na interação da ATXN2, com proteínas estruturais pós-sinápticas (Paciorkowski et al. 2011).

Na análise dos níveis de mRNA de Vglut e de psd95, marcadores sinápticos, após as 12 semanas de injeção, apesar de haver ligeiras discrepâncias entre as várias condições experimentais, não se observaram diferenças significativas.

5.7. A atividade do mTOR não é comprometida ao longo da idade na presença de ATXN2 mutada:

O complexo mTOR é responsável pela sensibilidade a elevadas concentrações de aminoácidos e regula aspetos do metabolismo anabólico (Lopez-Otin et al. 2013). A atividade do mTOR é inibida pela via IIS (Lopez-Otin et al. 2013; Kubben and Misteli 2017) e pelo AMPK (Lopez-Otin et al. 2013). Quando a atividade do mTOR é inibida, o fenótipo assemelha-se ao fenótipo da restrição calórica, que favorece um aumento da esperança de vida (Johnson, Rabinovitch, and Kaeberlein 2013). Porém, durante o envelhecimento, os níveis de IIS (Lopez-Otin et al. 2013) e a atividade do AMPK (Kubben and Misteli 2017) diminuem. Deste modo, era de esperar que os níveis de mRNA do mTOR aumentassem durante o envelhecimento. De facto, houve um pequeno aumento dos níveis de mRNA do mTOR nos animais idosos, contudo, este aumento não é estatisticamente significativo. Isto pode dever-se à presença de ATXN2, uma vez que esta tem a capacidade de inibir a sinalização mTOR (Lastres-Becker et al. 2016; Ostrowski, Hall, and Mekhail 2017).

5.8. A ATXN2 mutada diminui a ativação da via apoptótica:

A caspase 8 ativa a caspase-3 através da clivagem proteolítica da pro-caspase-3. (Stennicke, Yangi X., and Reed 1998; Alan G. Porter 1999). A caspase-3 ativada, desencadeia a apoptose celular (Alan G. Porter 1999). Mutações na ATAXINA-2 resultam numa diminuição da eficiência da sensibilização das células ao estímulo apoptótico (Wiedemeyer et al. 2003).

Após as 12 semanas de injeção nos animais idosos, os níveis de caspase-3 clivada eram bastante reduzidos no estriado injetado com ATXN2 mutada em relação ao estriado injetado com ATXN2 normal e o estriado dos animais não injetados. O elevado valor dos níveis de caspase-3 nos animais não injetados indica que as vias apoptóticas são ativadas nas células do estriado. O mesmo não se verifica, no estriado injetado com ATXN2 mutada, pois o valor reduzido nos níveis de caspase-3 clivada, indica que vai haver menor ativação da apoptose, criando de facto uma diminuição da sensibilidade das células a este estímulo, como referido por (Wiedemeyer et al. 2003). Deste modo, as células danificadas não são removidas por apoptose e acumulam-se no cérebro, pelo que, poderão sofrer

outras alternativas de morte celular ou então acumulam-se e provocam inflamação e danos no tecido cerebral.

5.9. O papel das histonas pode estar comprometido devido à ação da ATXN2 mutada:

Com o aumento da idade é normal ocorrerem alterações epigenéticas, como por exemplo, a modificação pós-tradução das histonas (Lopez-Otin et al. 2013; Kubben and Misteli 2017). Por tal, analisou-se os níveis de Fosfo-histona H2A.X através de Western Blot após as 12 semanas de injeção, com o intuito de detetar alterações nas histonas nos animais envelhecidos na presença de ATXN2 mutada. De facto, observou-se que existiu uma redução dos seus níveis proteicos no estriado injetado com ATXN2 mutada, em relação ao estriado dos animais não injetados. Uma vez que não há diferenças entre os estriados dos animais injetados, mas sim em relação aos animais não injetados, talvez a injeção e não apenas a ATXN2 mutada poderá ter provocado alterações nas histonas.

Resumindo, os resultados sugerem que o aumento da idade compromete principalmente os processos de degradação proteica e contribuem para a acumulação da ATXN2 mutada e para a formação de agregados no interior das células. Estes agregados poderão sequestrar outras proteínas celulares, como o PABPC1, e comprometer o metabolismo de mRNA que, por sua vez, irá afetar a síntese de proteínas essenciais para os diversos mecanismos celulares. Portanto, com o passar do tempo, a célula acumula danos. Numa idade jovem, estes danos podem ser reparados, mas numa idade mais avançada a capacidade de reparação de danos celulares é diminuída. Portanto, nos animais envelhecidos, poderá haver a acumulação de células danificadas que desencadeiam o aumento da resposta inflamatória. Devido à baixa ativação da caspase-3, as células danificadas, em princípio, não são removidas por apoptose, mas poderão sofrer outro tipo de morte celular, dado que existe maior perda neuronal nos animais envelhecidos.

6. Conclusão:

A presença de ATXN2 mutante conduz à formação de agregados proteicos, que é mais acentuada numa idade mais avançada. A quantidade elevada de agregados nos animais mais idosos pode ser responsável pelo aumento da resposta inflamatória, em relação aos animais jovens, detetado através do aumento de marcação da microglia e de astrócitos. Além disso, os agregados de ATXN2 mutante podem também levar à morte celular e perda de neurónios, observada através da presença de núcleos picnóticos e da perda de volume de marcação DARPP-32. No entanto, a análise dos níveis proteicos de caspase-3 clivada indicam que, na presença de ATXN2 mutada, a ativação da via apoptótica é reduzida, pelo que as células danificadas pela ATXN2 mutada ou mesmo como consequência do envelhecimento, poderão acumular-se no tecido cerebral e contribuir para o aumento da resposta inflamatória, ou então morrerem por outras vias alternativas, como a necrose.

O aumento de agregados de ATXN2-2 mutada nos animais mais idosos poderá levar ao recrutamento de PABP para os agregados proteicos e, conseqüentemente, afetar o metabolismo de RNA. A célula pode ter de aumentar a transcrição de PABP, atuando como método compensatório para repor os níveis proteicos de PABP citoplasmáticos.

No entanto, a forma mutada da ATXN2 com 82 repetições de glutaminas não provocam alterações nos níveis de mRNA de componentes essenciais no processo da autofagia e na função sináptica, sendo interessante também avaliar a nível proteico para confirmar se estes resultados são consistentes. Estes resultados poderão dever-se ao facto de haver um aumento nos níveis de mRNA de PABP que, por sua vez, irá conduzir ao aumento desta proteína no citoplasma, a níveis suficientes de exercer o seu papel no metabolismo de RNA.

Contudo, através da análise dos resultados obtidos de mTOR, não é possível afirmar se a ATXN2 mutada tem ou não efeito sobre o sensor de regulação de nutrientes, uma vez que, se desconhece se a expansão de glutaminas influencia o papel inibitório da ATXN2 sobre o mTOR.

A presença de ATXN2 mutada provocou uma redução dos níveis proteicos das histonas, o que sugere que a ATXN2 mutada poderá afetar as marcações epigenéticas e a expressão genética.

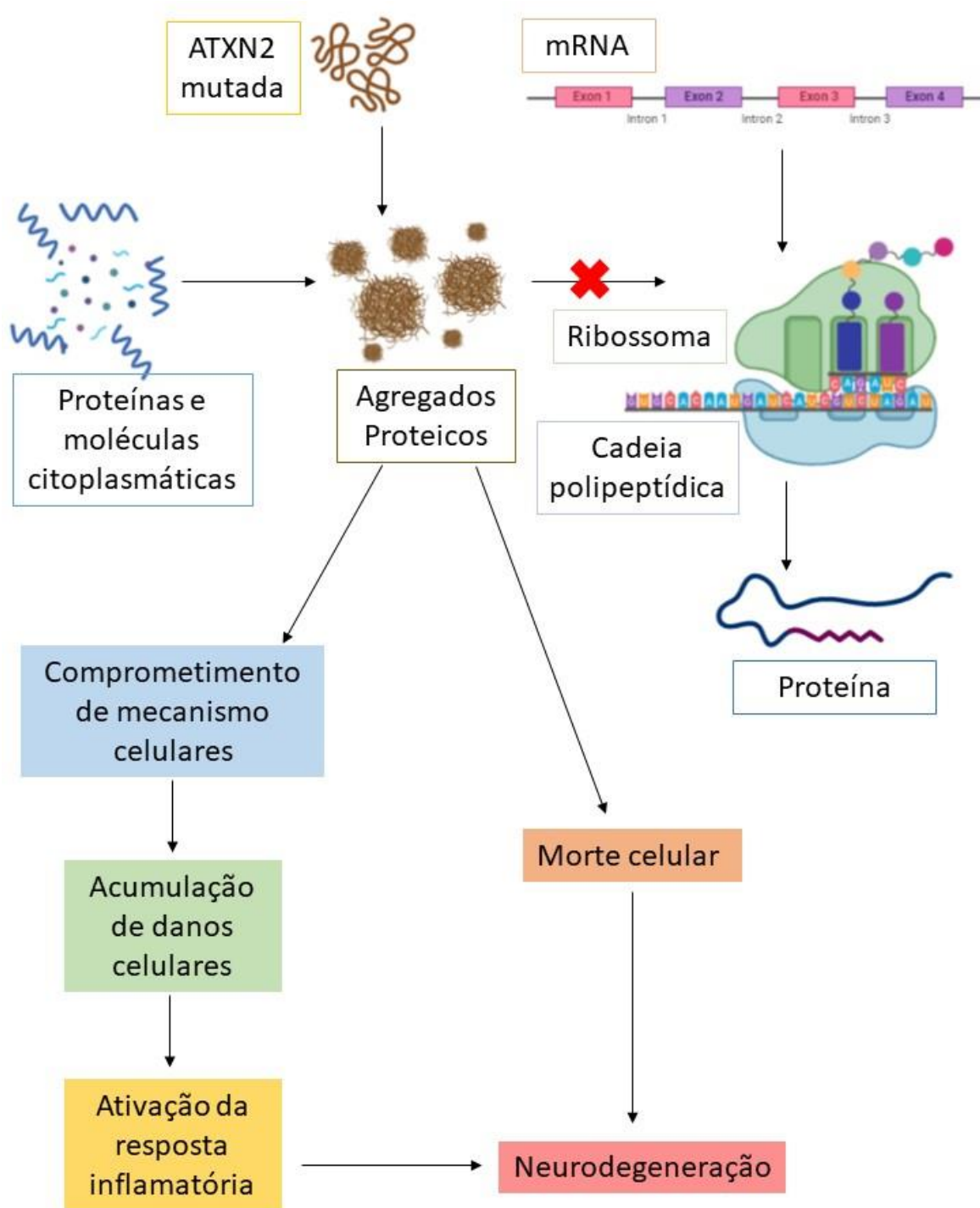


Figura.6.1. - A ATAXINA-2 mutada conduz à neurodegeneração que é agravada com o envelhecimento. Devido ao aumento da idade, a eficácia dos mecanismos de degradação proteica diminui e, portanto, há uma acumulação de proteínas danificadas na célula, como é o caso da ATXN2 mutada. Estas proteínas mutadas irão formar agregados proteicos e podem recrutar outras proteínas ou moléculas citoplasmáticas, que podem estar envolvidas em diversos mecanismos celulares, como por exemplo, o metabolismo e processamento do mRNA, que é o caso da PABP. Devido ao recrutamento destas proteínas para os agregados, a sua disponibilidade na célula diminui e, portanto, estes mecanismos onde as proteínas estavam envolvidas deixam de ser corretamente funcionais. Deste modo, a célula começa a acumular diversos danos. A acumulação de danos pode desencadear uma resposta inflamatória. Por outro

lado, a acumulação de agregados proteicos pode induzir a morte dos neurónios. O aumento da resposta inflamatória e a morte neuronal provocam a neurodegeneração.

7. Perspetivas futuras:

Futuramente, pretende-se aumentar o número de animais para cada condição experimental utilizada neste projeto, para obter uma melhor robustez da análise estatística. Seria interessante complementar a análise dos níveis de mRNA, com os níveis proteicos, para avaliar e detetar melhor as diferenças que possam ocorrer na transcrição, no processamento e tradução do mRNA e, possivelmente, na função proteica.

Além disso, posteriormente ao referido no parágrafo acima, poderiam desenvolver-se modelos animais com ambos os lados do estriado com a forma da ATAXINA-2 mutada, como também com a ATAXINA-2 mutada no cerebelo, de modo a complementar o estudo com a análise comportamental.

8. Anexos:

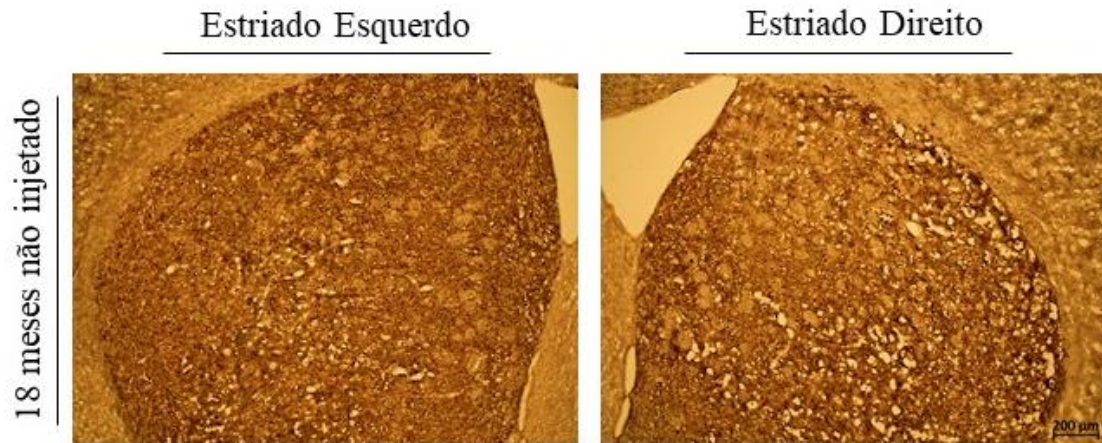


Figura 8.1. - Imagens de microscopia representativas de marcação DARPP-32 nos animais idosos não injetados, usando 18 secções coronais de estriado por animal ($n=3$ animais idosos não injetados). Não se observou perda de imunoreatividade do anticorpo anti-DARPP-32 no estriado esquerdo e direito dos animais idosos não injetados.

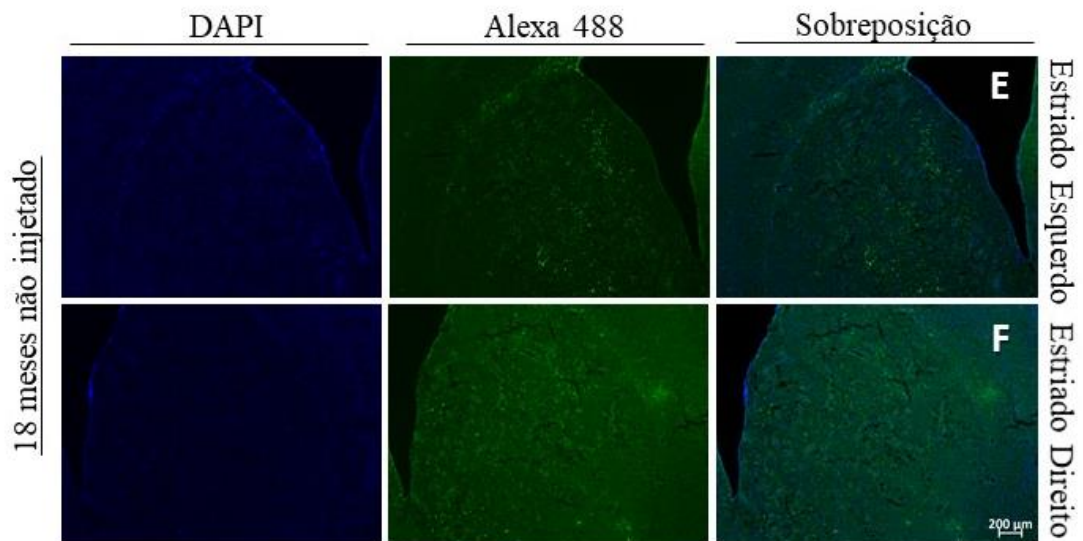


Figura 8.2. - Imagens representativas de microscopia para a marcação imunohistoquímica do GFAP nos animais idosos não injetados, utilizando 6 secções coronais de estriado por animal ($n=3$ murganhos idosos não injetados). Os animais idosos não injetados não apresentam evidente marcação de GFAP.

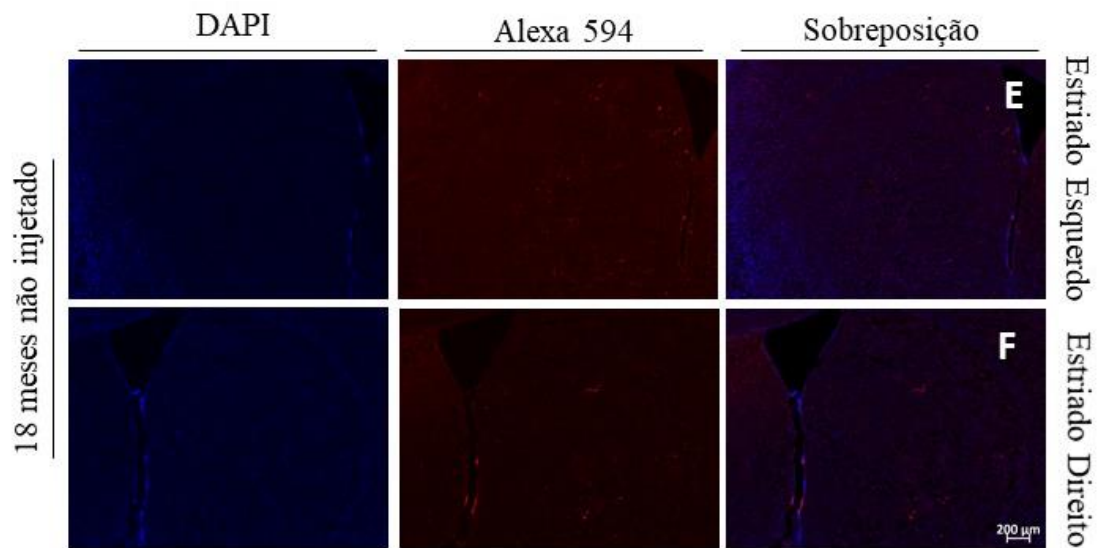


Figura 8.3. - *Imagens representativas de microscopia para a marcação imunohistoquímica do Iba1 nos animais idosos não injetados, utilizando 6 secções coronais de estriado por animal (n=3 murganhos idosos não injetados). Os animais idosos não injetados não apresentam evidente marcação de Iba1.*

9. Bibliografía:

- Abraham, K. J., J. N. Chan, J. S. Salvi, B. Ho, A. Hall, E. Vidya, R. Guo, S. A. Killackey, N. Liu, J. E. Lee, G. W. Brown, and K. Mekhail. 2016. 'Intersection of calorie restriction and magnesium in the suppression of genome-destabilizing RNA-DNA hybrids', *Nucleic Acids Res*, 44: 8870-84.
- Adegbuyiro, A., F. Sedighi, A. W. th Pilkington, S. Groover, and J. Legleiter. 2017. 'Proteins Containing Expanded Polyglutamine Tracts and Neurodegenerative Disease', *Biochemistry*, 56: 1199-217.
- Aguilar, J., J. Fernandez, A. Aguilar, Y. Mendoza, M. Vazquez, J. Suarez, J. Berlanga, S. Cruz, G. Guillen, L. Herrera, L. Velazquez, N. Santos, and N. Merino. 2006. 'Ubiquitous expression of human SCA2 gene under the regulation of the SCA2 self promoter cause specific Purkinje cell degeneration in transgenic mice', *Neurosci Lett*, 392: 202-6.
- Aguilera, A., and T. Garcia-Muse. 2012. 'R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability', *Mol Cell*, 46: 115-24.
- Al-Ramahi, I., A. M. Perez, J. Lim, M. Zhang, R. Sorensen, M. de Haro, J. Branco, S. M. Pulst, H. Y. Zoghbi, and J. Botas. 2007. 'dAtaxin-2 mediates expanded Ataxin-1-induced neurodegeneration in a Drosophila model of SCA1', *PLoS Genet*, 3: e234.
- Alan G. Porter, Reiner U. JaÈ nicke. 1999. 'Emerging roles of caspase-3 in apoptosis', *Cell Death and Differentiation*, 6: 99-104.
- Albrecht, M., M. Golatta, U. Wullner, and T. Lengauer. 2004. 'Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3', *Eur J Biochem*, 271: 3155-70.
- Alves-Cruzeiro, J. M., L. Mendonca, L. Pereira de Almeida, and C. Nobrega. 2016. 'Motor Dysfunctions and Neuropathology in Mouse Models of Spinocerebellar Ataxia Type 2: A Comprehensive Review', *Front Neurosci*, 10: 572.
- Anderson, P., and N. Kedersha. 2006. 'RNA granules', *J Cell Biol*, 172: 803-8.
- Anderton, Brian H. 2002. 'Ageing of the brain', *Mechanisms of Ageing and Development*, 123: 811-17.
- Auburger, G., G. O. Diaz, R. F. Capote, S. G. Sanchez, M. P. Perez, M. E. del Cueto, M. G. Meneses, M. Farrall, R. Williamson, S. Chamberlain, and et al. 1990. 'Autosomal dominant ataxia: genetic evidence for locus heterogeneity from a Cuban founder-effect population', *Am J Hum Genet*, 46: 1163-77.
- Bar, D. Z., C. Charar, J. Dorfman, T. Yadid, L. Tafforeau, D. L. Lafontaine, and Y. Gruenbaum. 2016. 'Cell size and fat content of dietary-restricted Caenorhabditis elegans are regulated by ATX-2, an mTOR repressor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: E4620-9.
- Buchan, J. R., and R. Parker. 2009. 'Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation', *Mol Cell*, 36: 932-41.
- Burton, A. C., K. Nakamura, and M. R. Roesch. 2015. 'From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: neural correlates of reward-guided decision-making', *Neurobiol Learn Mem*, 117: 51-9.
- Cancel, G., A. Durr, O. Didierjean, G. Imbert, K. Burk, A. Lezin, S. Belal, A. Benomar, M. Abada-Bendib, C. Vial, J. Guimaraes, H. Chneiweiss, G. Stevanin, G. Yvert, N. Abbas, F. Saudou, A. S. Lebre, M. Yahyaoui, F. Hentati, J. C. Vernant, T. Klockgether, J. L. Mandel, Y. Agid, and A. Brice. 1997. 'Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia 2: a study of 32 families', *Hum Mol Genet*, 6: 709-15.
- Canet-Pons, Júlia, Nesli-Ece Sen, Aleksandar Arsovic, Luis-Enrique Almaguer-Mederos, Melanie V. Halbach, Jana Key, Claudia Döring, Anja Kerksiek, Gina Picchiarelli, Raphaelle Cassel, Frédérique René, Stéphane Dieterlé, Nina Hein-Fuchs, Renate König, Luc Dupuis, Dieter Lütjohann, Suzana Gispert, and Georg Auburger. 2019. 'Atxn2-CAG100-KnockIn mouse spinal cord shows progressive TDP43 pathology associated with cholesterol biosynthesis suppression'.

- Ciosk, R., M. DePalma, and J. R. Priess. 2004. 'ATX-2, the *C. elegans* ortholog of ataxin 2, functions in translational regulation in the germline', *Development*, 131: 4831-41.
- Cortes, C. J., and A. R. La Spada. 2015. 'Autophagy in polyglutamine disease: Imposing order on disorder or contributing to the chaos?', *Mol Cell Neurosci*, 66: 53-61.
- Damrath, E., M. V. Heck, S. Gispert, M. Azizov, J. Nowock, C. Seifried, U. Rub, M. Walter, and G. Auburger. 2012. 'ATXN2-CAG42 sequesters PABPC1 into insolubility and induces FBXW8 in cerebellum of old ataxic knock-in mice', *PLoS Genet*, 8: e1002920.
- Dansithong, W., S. Paul, K. P. Figueroa, M. D. Rinehart, S. Wiest, L. T. Pflieger, D. R. Scoles, and S. M. Pulst. 2015. 'Ataxin-2 regulates RGS8 translation in a new BAC-SCA2 transgenic mouse model', *PLoS Genet*, 11: e1005182.
- de Almeida, Luis Pereira, Christopher A. Ross, Diana Zala, Patrick Aebischer, and Nicole Déglon. 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', *The Journal of Neuroscience*, 22: 3473-83.
- Del Castillo, U., M. M. Gnazzo, C. G. Sorensen Turpin, K. C. Q. Nguyen, E. Semaya, Y. Lam, M. A. de Cruz, J. N. Bembenek, D. H. Hall, B. Riggs, V. I. Gelfand, and A. R. Skop. 2019. 'Conserved role for Ataxin-2 in mediating endoplasmic reticulum dynamics', *Traffic*, 20: 436-47.
- Durr, Alexandra. 2010. 'Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond', *The Lancet Neurology*, 9: 885-94.
- Elden, A. C., H. J. Kim, M. P. Hart, A. S. Chen-Plotkin, B. S. Johnson, X. Fang, M. Armakola, F. Geser, R. Greene, M. M. Lu, A. Padmanabhan, D. Clay-Falcone, L. McCluskey, L. Elman, D. Jühr, P. J. Gruber, U. Rub, G. Auburger, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, V. M. Van Deerlin, N. M. Bonini, and A. D. Gitler. 2010. 'Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS', *Nature*, 466: 1069-75.
- Estrada, R., J. Galarraga, G. Orozco, A. Nodarse, and G. Auburger. 1999. 'Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2): morphometric analyses in 11 autopsies', *Acta Neuropathol*, 97: 306-10.
- Fan, H. C., L. I. Ho, C. S. Chi, S. J. Chen, G. S. Peng, T. M. Chan, S. Z. Lin, and H. J. Harn. 2014. 'Polyglutamine (PolyQ) diseases: genetics to treatments', *Cell Transplant*, 23: 441-58.
- Farley, A., C. Johnstone, C. Hendry, and E. McLafferty. 2014. 'Nervous system: part 1', *Nurs Stand*, 28: 46-51.
- Geschwind, D. H., Perlman, S., Figueroa, C. P., Treiman, L. J., & Pulst, S. M. 1997. '<The Prevalence and Wide Clinical Spectrum of the Spinocerebellar.pdf>', *American journal of human genetics*, 60(4): 842-50.
- Gispert, S., R. Twells, G. Orozco, A. Brice, J. Weber, L. Heredero, K. Scheufler, B. Riley, R. Allotey, C. Nothers, and et al. 1993. 'Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1', *Nat Genet*, 4: 295-9.
- Giunti, P., G. Sabbadini, M. G. Sweeney, M. B. Davis, L. Veneziano, E. Mantuano, A. Federico, R. Plasmati, M. Frontali, and N. W. Wood. 1998. 'The role of the SCA2 trinucleotide repeat expansion in 89 autosomal dominant cerebellar ataxia families. Frequency, clinical and genetic correlates', *Brain*, 121 (Pt 3): 459-67.
- Gwinn-Hardy, K., J. Y. Chen, H. C. Liu, T. Y. Liu, M. Boss, W. Seltzer, A. Adam, A. Singleton, W. Koroshetz, C. Waters, J. Hardy, and M. Farrer. 2000. 'Spinocerebellar ataxia type 2 with parkinsonism in ethnic Chinese', *Neurology*, 55: 800-5.
- Halbach, M. V., T. Stehning, E. Damrath, M. Jendrach, N. E. Sen, A. N. Basak, and G. Auburger. 2015. 'Both ubiquitin ligases FBXW8 and PARK2 are sequestered into insolubility by ATXN2 PolyQ expansions, but only FBXW8 expression is dysregulated', *PLoS One*, 10: e0121089.
- Hansen, S. T., P. Meera, T. S. Otis, and S. M. Pulst. 2013. 'Changes in Purkinje cell firing and gene expression precede behavioral pathology in a mouse model of SCA2', *Hum Mol Genet*, 22: 271-83.

- He, Weihai, and Roy Parker. 2000. 'Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing', *Current Opinion in Cell Biology*, 12: 346-50.
- He, X. H., F. Lin, and Z. H. Qin. 2010. 'Current understanding on the pathogenesis of polyglutamine diseases', *Neurosci Bull*, 26: 247-56.
- Hendry, C., A. Farley, E. McLafferty, and C. Johnstone. 2014. 'Nervous system: part 2', *Nurs Stand*, 28: 45-9.
- Hung, C. W., Y. C. Chen, W. L. Hsieh, S. H. Chiou, and C. L. Kao. 2010. 'Ageing and neurodegenerative diseases', *Ageing Res Rev*, 9 Suppl 1: S36-46.
- Huynh, D. P., K. Figueroa, N. Hoang, and S. M. Pulst. 2000. 'Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human', *Nat Genet*, 26: 44-50.
- Huynh, D. P., H. T. Yang, H. Vakharia, D. Nguyen, and S. M. Pulst. 2003. 'Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death', *Hum Mol Genet*, 12: 1485-96.
- Huynh, Duong P., Marc R. Del Bigio, Diane H. Ho, and Stefan- M. Pulst. 1999. 'Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2', *Annals of Neurology*, 45: 232-41.
- Imbert, G., F. Saudou, G. Yvert, D. Devys, Y. Trottier, J. M. Garnier, C. Weber, J. L. Mandel, G. Cancel, N. Abbas, A. Durr, O. Didierjean, G. Stevanin, Y. Agid, and A. Brice. 1996. 'Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats', *Nat Genet*, 14: 285-91.
- Jernigan, Terry L., Sarah L. Archibald, Christine Fennema-Notestine, Anthony C. Gamst, Julie C. Stout, Julie Bonner, and John R. Hesselink. 2001. 'Effects of age on tissues and regions of the cerebrum and cerebellum', *Neurobiology of Aging*, 22: 581-94.
- Jimenez-Lopez, D., and P. Guzman. 2014. 'Insights into the evolution and domain structure of Ataxin-2 proteins across eukaryotes', *BMC Res Notes*, 7: 453.
- Johnson, S. C., P. S. Rabinovitch, and M. Kaerberlein. 2013. 'mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease', *Nature*, 493: 338-45.
- Kasumu, A., and I. Bezprozvanny. 2012. 'Deranged calcium signaling in Purkinje cells and pathogenesis in spinocerebellar ataxia 2 (SCA2) and other ataxias', *Cerebellum*, 11: 630-9.
- Kasumu, A. W., C. Hougaard, F. Rode, T. A. Jacobsen, J. M. Sabatier, B. L. Eriksen, D. Strobaek, X. Liang, P. Egorova, D. Vorontsova, P. Christophersen, L. C. Ronn, and I. Bezprozvanny. 2012. 'Selective positive modulator of calcium-activated potassium channels exerts beneficial effects in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 2', *Chem Biol*, 19: 1340-53.
- Kasumu, A. W., X. Liang, P. Egorova, D. Vorontsova, and I. Bezprozvanny. 2012. 'Chronic suppression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-mediated calcium signaling in cerebellar purkinje cells alleviates pathological phenotype in spinocerebellar ataxia 2 mice', *J Neurosci*, 32: 12786-96.
- Kedersha, N., and P. Anderson. 2002. 'Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability', *Biochem Soc Trans*, 30: 963-9.
- Kiehl, Tim-Rasmus, Hiroki Shibata, and Stefan- M. Pulst. 2000. 'The Ortholog of Human Ataxin-2 is Essential for Early Embryonic Patterning in *C. elegans*', *Journal of Molecular Neuroscience*, 15: 231-42.
- Koyano, S., S. Yagishita, Y. Kuroiwa, F. Tanaka, and T. Uchihara. 2014. 'Neuropathological staging of spinocerebellar ataxia type 2 by semiquantitative 1C2-positive neuron typing. Nuclear translocation of cytoplasmic 1C2 underlies disease progression of spinocerebellar ataxia type 2', *Brain Pathol*, 24: 599-606.
- Kubben, N., and T. Misteli. 2017. 'Shared molecular and cellular mechanisms of premature ageing and ageing-associated diseases', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 595-609.

- Lastres-Becker, I., S. Brodesser, D. Lutjohann, M. Azizov, J. Buchmann, E. Hintermann, K. Sandhoff, A. Schurmann, J. Nowock, and G. Auburger. 2008. 'Insulin receptor and lipid metabolism pathology in ataxin-2 knock-out mice', *Hum Mol Genet*, 17: 1465-81.
- Lastres-Becker, I., D. Nonis, F. Eich, M. Klinkenberg, M. Gorospe, P. Kotter, F. A. Klein, N. Kedersha, and G. Auburger. 2016. 'Mammalian ataxin-2 modulates translation control at the pre-initiation complex via PI3K/mTOR and is induced by starvation', *Biochim Biophys Acta*, 1862: 1558-69.
- Lee, J., M. Kim, T. Q. Itoh, and C. Lim. 2018. 'Ataxin-2: A versatile posttranscriptional regulator and its implication in neural function', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 9: e1488.
- Lessing, D., & Bonini, N. M. 2008. '<Polyglutamine Genes Interact to Modulate the Severity and Progression of Neurodegeneration in Drosophila.pdf>', *PLoS biology*, 6(2): e29.
- Li, P. P., X. Sun, G. Xia, N. Arbez, S. Paul, S. Zhu, H. B. Peng, C. A. Ross, A. H. Koeppen, R. L. Margolis, S. M. Pulst, T. Ashizawa, and D. D. Rudnicki. 2016. 'ATXN2-AS, a gene antisense to ATXN2, is associated with spinocerebellar ataxia type 2 and amyotrophic lateral sclerosis', *Ann Neurol*, 80: 600-15.
- Lim, C., and R. Allada. 2013. 'ATAXIN-2 activates PERIOD translation to sustain circadian rhythms in Drosophila', *Science*, 340: 875-9.
- Liu, J., T. S. Tang, H. Tu, O. Nelson, E. Herndon, D. P. Huynh, S. M. Pulst, and I. Bezprozvanny. 2009. 'Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 2', *J Neurosci*, 29: 9148-62.
- Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer. 2013. 'The hallmarks of aging', *Cell*, 153: 1194-217.
- Masliah, E., M. Mallory, L. Hansen, R. DeTeresa, and R. D. Terry. 1993. 'Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging', *Neurology*, 43: 192-7.
- Matos, C. A., S. de Macedo-Ribeiro, and A. L. Carvalho. 2011. 'Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease', *Prog Neurobiol*, 95: 26-48.
- McCann, C., E. E. Holohan, S. Das, A. Dervan, A. Larkin, J. A. Lee, V. Rodrigues, R. Parker, and M. Ramaswami. 2011. 'The Ataxin-2 protein is required for microRNA function and synapse-specific long-term olfactory habituation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: E655-62.
- Meunier, C., D. Bordereaux, F. Porteu, S. Gisselbrecht, S. Chretien, and G. Courtois. 2002. 'Cloning and characterization of a family of proteins associated with Mpl', *J Biol Chem*, 277: 9139-47.
- Michalik, A., and C. Van Broeckhoven. 2003. 'Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited', *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 2: R173-86.
- Nechiporuk, T., D. P. Huynh, K. Figueroa, S. Sahba, A. Nechiporuk, and S. M. Pulst. 1998. 'The mouse SCA2 gene: cDNA sequence, alternative splicing and protein expression', *Hum Mol Genet*, 7: 1301-9.
- Neuwald, A. F., and E. V. Koonin. 1998. 'Ataxin-2, global regulators of bacterial gene expression, and spliceosomal snRNP proteins share a conserved domain', *J Mol Med (Berl)*, 76: 3-5.
- Nobrega, C., S. Carmo-Silva, D. Albuquerque, A. Vasconcelos-Ferreira, U. G. Vijayakumar, L. Mendonca, H. Hirai, and L. P. de Almeida. 2015. 'Re-establishing ataxin-2 downregulates translation of mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease', *Brain*, 138: 3537-54.
- Nonhoff, U., M. Ralser, F. Welzel, I. Piccini, D. Balzereit, M. L. Yaspo, H. Lehrach, and S. Krobitsch. 2007. 'Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules', *Mol Biol Cell*, 18: 1385-96.
- Nunes, C., I. Mestre, A. Marcelo, R. Koppenol, C. A. Matos, and C. Nobrega. 2019. 'MSGP: the first database of the protein components of the mammalian stress granules', *Database (Oxford)*, 2019.
- Ostrowski, L. A., A. C. Hall, and K. Mekhail. 2017. 'Ataxin-2: From RNA Control to Human Health and Disease', *Genes (Basel)*, 8.

- Paciorkowski, A. R., Y. Shafrir, J. Hrivnak, M. C. Patterson, M. B. Tennison, H. B. Clark, and C. M. Gomez. 2011. 'Massive expansion of SCA2 with autonomic dysfunction, retinitis pigmentosa, and infantile spasms', *Neurology*, 77: 1055-60.
- Pfeffer, M., S. Gispert, G. Auburger, H. Wicht, and H. W. Korf. 2017. 'Impact of Ataxin-2 knock out on circadian locomotor behavior and PER immunoreaction in the SCN of mice', *Chronobiol Int*, 34: 129-37.
- Pulst, S. M., A. Nechiporuk, T. Nechiporuk, S. Gispert, X. N. Chen, I. Lopes-Cendes, S. Pearlman, S. Starkman, G. Orozco-Diaz, A. Lunkes, P. DeJong, G. A. Rouleau, G. Auburger, J. R. Korenberg, C. Figueroa, and S. Sahba. 1996. 'Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2', *Nat Genet*, 14: 269-76.
- Ralser, M., M. Albrecht, U. Nonhoff, T. Lengauer, H. Lehrach, and S. Krobitsch. 2005. 'An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2', *J Mol Biol*, 346: 203-14.
- Rego, A.C.; Duarte, C.B.; Oliveira, C. R. 2017. *Neurociências*.
- Sahba, S., A. Nechiporuk, K. P. Figueroa, T. Nechiporuk, and S. M. Pulst. 1998. 'Genomic structure of the human gene for spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) on chromosome 12q24.1', *Genomics*, 47: 359-64.
- Saleem, Q., S. Choudhry, M. Mukerji, L. Bashyam, M. V. Padma, A. Chakravarthy, M. C. Maheshwari, S. Jain, and S. K. Brahmachari. 2000. 'Molecular analysis of autosomal dominant hereditary ataxias in the Indian population: high frequency of SCA2 and evidence for a common founder mutation', *Hum Genet*, 106: 179-87.
- Sanpei, K., H. Takano, S. Igarashi, T. Sato, M. Oyake, H. Sasaki, A. Wakisaka, K. Tashiro, Y. Ishida, T. Ikeuchi, R. Koide, M. Saito, A. Sato, T. Tanaka, S. Hanyu, Y. Takiyama, M. Nishizawa, N. Shimizu, Y. Nomura, M. Segawa, K. Iwabuchi, I. Eguchi, H. Tanaka, H. Takahashi, and S. Tsuji. 1996. 'Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT', *Nat Genet*, 14: 277-84.
- Satterfield, T. F., Jackson, S. M., & Pallanck, L. J. 2002. '<A Drosophila homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation..pdf>', *Genetics*, 162(4): 1687–702.
- Satterfield, T. F., and L. J. Pallanck. 2006. 'Ataxin-2 and its Drosophila homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes', *Hum Mol Genet*, 15: 2523-32.
- Sen, N. E., A. Arsovic, D. Meierhofer, S. Brodesser, C. Oberschmidt, J. Canet-Pons, Z. E. Kaya, M. V. Halbach, S. Gispert, K. Sandhoff, and G. Auburger. 2019. 'In Human and Mouse Spinocerebellar Tissue, Ataxin-2 Expansion Affects Ceramide-Sphingomyelin Metabolism', *Int J Mol Sci*, 20.
- Sen, N. E., J. Canet-Pons, M. V. Halbach, A. Arsovic, U. Pilatus, W. H. Chae, Z. E. Kaya, K. Seidel, E. Rollmann, M. Mittelbronn, D. Meierhofer, C. I. De Zeeuw, L. W. J. Bosman, S. Gispert, and G. Auburger. 2019. 'Generation of an Atxn2-CAG100 knock-in mouse reveals N-acetylaspartate production deficit due to early Nat8l dysregulation', *Neurobiol Dis*, 132: 104559.
- Shibata, H., D. P. Huynh, and S. M. Pulst. 2000. 'A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2', *Hum Mol Genet*, 9: 1303-13.
- Stennicke, H. R. , Ju"rgensmeier, J. M., Shin, H. , Deveraux, Q. , Wolf, B. B., Zhou Q. Ellerby Yangi X. , M. H., Ellerby, L.M. , Dale, B., Green, D. R., and J. C. Reed, Froelichi C. J. , Salvesen G. S. . 1998. 'Pro-caspase-3 Is a Major Physiologic Target of Caspase-8', *The Journal of biological chemistry*, 273: 27084–90.
- Stoyas, C. A., and A. R. La Spada. 2018. 'The CAG-polyglutamine repeat diseases: a clinical, molecular, genetic, and pathophysiologic nosology', *Handb Clin Neurol*, 147: 143-70.
- Svitkin, Y. V., V. M. Evdokimova, A. Brasey, T. V. Pestova, D. Fantus, A. Yanagiya, H. Imataka, M. A. Skabkin, L. P. Ovchinnikov, W. C. Merrick, and N. Sonenberg. 2009. 'General RNA-

- binding proteins have a function in poly(A)-binding protein-dependent translation', *EMBO J*, 28: 58-68.
- Takeuchi, T., and Y. Nagai. 2017. 'Protein Misfolding and Aggregation as a Therapeutic Target for Polyglutamine Diseases', *Brain Sci*, 7.
- Thangima Zannat, M., R. B. Bhattacharjee, and J. Bag. 2011. 'Depletion of cellular poly (A) binding protein prevents protein synthesis and leads to apoptosis in HeLa cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 408: 375-81.
- van de Loo, S., F. Eich, D. Nonis, G. Auburger, and J. Nowock. 2009. 'Ataxin-2 associates with rough endoplasmic reticulum', *Exp Neurol*, 215: 110-8.
- Walsh, J. P., and G. Akopian. 2019. 'Physiological aging at striatal synapses', *J Neurosci Res*, 97: 1720-27.
- Wiedemeyer, R., F. Westermann, I. Wittke, J. Nowock, and M. Schwab. 2003. 'Ataxin-2 promotes apoptosis of human neuroblastoma cells', *Oncogene*, 22: 401-11.
- Wullschleger, S., R. Loewith, and M. N. Hall. 2006. 'TOR signaling in growth and metabolism', *Cell*, 124: 471-84.
- Yokoshi, M., Q. Li, M. Yamamoto, H. Okada, Y. Suzuki, and Y. Kawahara. 2014. 'Direct binding of Ataxin-2 to distinct elements in 3' UTRs promotes mRNA stability and protein expression', *Mol Cell*, 55: 186-98.
- Yu, W., and P. E. Hardin. 2006. 'Circadian oscillators of Drosophila and mammals', *J Cell Sci*, 119: 4793-5.
- Zoghbi, H. Y., and H. T. Orr. 2000. 'Glutamine repeats and neurodegeneration', *Annu Rev Neurosci*, 23: 217-47.
- Zylka, Mark J., Lauren P. Shearman, David R. Weaver, and Steven M. Reppert. 1998. 'Three period Homologs in Mammals: Differential Light Responses in the Suprachiasmatic Circadian Clock and Oscillating Transcripts Outside of Brain', *Neuron*, 20: 1103-10.