

Margarida Inês de Goes e Revez

## **Estudo do papel da ataxina-2 no envelhecimento neuronal**



2021

Margarida Inês de Goes e Revez

# **Estudo do papel da ataxina-2 no envelhecimento neuronal**

Mestrado em Oncobiologia – Mecanismos Moleculares do Cancro

Supervisor: Prof. Clévio Nóbrega, PhD

Sara Carmo Silva, PhD



Faro, 2021

## **Estudo do papel da ataxina-2 no envelhecimento neuronal**

Declaração de autoridade de 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 incluída.

Copyright © Margarida Inês de Goes e Revez

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou em forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Professor Doutor Clévio Nóbrega, por me deixar fazer parte desta equipa maravilhosa, por toda a paciência, por toda a disponibilidade, por toda a dedicação e por todas os momentos que nos fez divertir para além do trabalho. Obrigada por nos ensinar o quão maravilhosa é a Ciência e por transmitir tão bem os seus ensinamentos. Muito obrigada, por tudo.

Gostaria de agradecer a todos os colegas do MNGT, por me terem acolhido tão bem, por toda a ajuda prestada e por todos os momentos de aprendizagem e de risadas juntos, obrigada a todos.

Gostaria também de agradecer à Adriana Marcelo, à Rebekah Kopennol e ao André Conceição pela disponibilidade de tempo para me ajudarem, pela paciência e por toda a partilha de sabedoria.

Queria também agradecer à Telma Castro pela amizade ao longos destes anos, por todas as horas de estudo, trabalho e pela ajuda que me deste, por todos os momentos bom e menos bons que compartilhamos juntas e por estares sempre presente. Muito obrigada amiga. À Raquel Encarnação pela amizade, por estares sempre presente para me ouvires nas alturas mais complicadas, por me ajudares, por me aconselhares e pela companhia durante este processo. Obrigada também aos restantes amigos que me acompanharam ao longo deste projeto.

Gostaria também de agradecer ao Emanuel Duarte por todo o apoio que me dás, por estares sempre presente e nunca me deixares desistir, por todos estes anos que temos vivenciamos juntos e por toda a paciência que tens para comigo. Obrigada por tudo.

E por fim, gostaria de agradecer à minha família em especial à Inês Gois, ao Manuel Gonçalves, à Ana Inês Gonçalves e à Lúcia Inês por me apoiarem sempre. Mas principalmente queria agradecer aos meus pais, Maria Helena Gois e Jacinto Revez porque sem eles nada disto seria possível, obrigada por sempre acreditarem em mim, e me encorajarem, obrigada por tornarem possível concretizar todos os meus sonhos, no entanto um obrigado não chega.

Obrigada a todos, por tudo.

## Índice

<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de Anexos</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>x</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Envelhecimento</b> .....	<b>1</b>
1.1. Marcadores moleculares do envelhecimento .....	1
<b>2. Importância do hipotálamo no envelhecimento</b> .....	<b>12</b>
2.1. Funções hipotalâmicas .....	13
2.1.1. Resposta hipotalâmica ao ritmo circadiano.....	14
2.1.2. Controlo hipotalâmico da resposta ao stress .....	15
2.1.3. Importância do hipotálamo na regulação do balanço energético .....	16
2.2. Alterações neuronais provocadas pelo processo de envelhecimento .....	19
2.3. Notas finais acerca do hipotálamo .....	21
<b>3. Ataxina-2</b> .....	<b>21</b>
3.1. Doenças de Poliglutaminas.....	21
3.2. Gene <i>ATXN2</i> e proteína Ataxina-2 .....	23
3.3. Homólogos, Ortólogos e Parólogos da Ataxina-2 .....	24
3.4. Funções da Ataxina-2.....	25
3.4.1. Metabolismo do RNA e tradução.....	25
3.4.2. Formação de Grânulos de Stress .....	26
3.4.3. Reorganização do citoesqueleto e endocitose .....	27
3.4.4. Sinalização de Cálcio .....	28
3.5. Funções fisiológicas da ataxina-2 .....	29
3.5.1. Alvos da Rapamicina .....	29
3.5.2. Ritmo Circadiano.....	29
3.5.3. Sinalização da insulina .....	30
3.6. Ataxina-2 e o cancro .....	31
<b>Objetivos</b> .....	<b>33</b>
<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>34</b>
<b>1. Estudos <i>in vivo</i></b> .....	<b>34</b>
1.1. Animais .....	34
1.2. Vectores virais .....	35
1.3. Injecção esterotáxica .....	36
1.4. Monitorização do Peso Corporal .....	36
1.5. Estudos Comportamentais .....	37
1.6. Testes de tolerância à glucose .....	37
1.7. Teste de tolerância à insulina .....	38
1.8. Recolha do sangue e de tecidos .....	39
<b>1. Análise Histológica</b> .....	<b>39</b>
1.1. Preparação dos cortes de parafina .....	39
1.2. Secções .....	40
1.3. Coloração hematoxilina-eosina .....	40
1.3.1. Microscopia.....	40
<b>2. Análise Molecular</b> .....	<b>41</b>

2.1.	Extração de RNA e Proteína.....	41
2.2.	PCR quantitativo (qPCR) .....	42
1.1.	Análise Estatística .....	43
<b>Resultados .....</b>		<b>44</b>
1.	<b>Monitorização do peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo da experiência.....</b>	<b>44</b>
2.	<b>A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo conduz a uma diminuição do peso corporal. ....</b>	<b>46</b>
3.	<b>A sobre-expressão de ataxina-2 no hipotálamo promove o aumento da sensibilidade à insulina.....</b>	<b>49</b>
4.	<b>A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo promove uma diminuição no peso do tecido adiposo branco e aumento na área dos adipócitos. ....</b>	<b>55</b>
5.	<b>A ataxina-2 diminui anomalias histológicas associadas à idade no fígado. ....</b>	<b>57</b>
6.	<b>A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo não reverte as anomalias no pâncreas relacionadas com o envelhecimento. ....</b>	<b>58</b>
7.	<b>A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo promove alterações em diversos marcadores moleculares associados ao envelhecimento.....</b>	<b>60</b>
7.1.	A sobre-expressão de ataxina-2 no hipotálamo promove uma diminuição dos níveis de POMC e um aumento nos níveis de AgRP.....	61
7.2.	A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo não promove alterações nos níveis de mTOR. 62	62
7.3.	A sobre-expressão da ataxina-2 promove a diminuição dos níveis de um marcador de inflamação. ....	63
7.4.	A sobre-expressão da ataxina-2 não altera os níveis de marcadores da autofagia.....	64
.....		<b>65</b>
<b>Discussão .....</b>		<b>66</b>
<b>Conclusão .....</b>		<b>70</b>
<b>Referências .....</b>		<b>71</b>
<b>Anexos.....</b>		<b>87</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1 - Marcadores moleculares do envelhecimento.</b> .....	2
<b>Figura 2 - Via de sinalização que correlaciona o complexo mTORC1 e mTORC2 ao processo de envelhecimento.</b> .....	10
<b>Figura 3 - Localização do hipotálamo no cérebro humano, e representação esquemáticas das suas regiões constituintes.</b> .....	13
<b>Figura 4 – Regulação da fisiologia dos órgãos periféricos pelo ritmo circadiano.</b> .	15
<b>Figura 5 - O envelhecimento, a partir do hipotálamo provoca diversas disregulações nas funções dos órgãos e tecidos.</b> .....	18
<b>Figura 6 - O hipotálamo controla diversos aspetos do envelhecimento sistémico.</b> .	20
<b>Figura 7 - Estrutura do gene ATXN2 humano no cromossoma 12 e da proteína da ataxina-2.</b> .....	24
<b>Figura 8 - Interação da ataxina-2 com proteínas envolvidas no mRNA.</b> .....	26
<b>Figura 8 - Interação da ataxina-2 com proteínas envolvidas no mRNA.</b> .....	26
<b>Figura 9 - A ataxina-2 medeia a sinalização de cálcio.</b> .....	28
<b>Figura 10 - Funções da Ataxina-2.</b> .....	31
<b>Figura 11 - Desenho experimental.</b> .....	35
<b>Figura 12 - Monitorização do peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo da experiência.</b> .....	45
<b>Figura 13 - A sobre-expressão de ataxina-2 no hipotálamo conduz a uma diminuição do peso corporal em relação aos grupos controlo.</b> .....	48
<b>Figura 14 - Níveis de glucose no sangue (teste GTT) nos diferentes grupos experimentais antes e depois da injeção estereotáxica.</b> .....	51
<b>Figura 15 - A sobre-expressão de ataxina-2 não altera a sensibilidade à insulina.</b> .	54
<b>Figura 16 - A sobre-expressão de ataxina-2 reduz o peso do tecido WAT e promove um aumento na área dos adipócitos.</b> .....	56
<b>Figura 17 - A ataxina-2 promove um aumento de peso do fígado e melhora o score histológico de lesão hepático.</b> .....	58
<b>Figura 18 – A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo não reverte as anomalias no pâncreas associadas com o envelhecimento.</b> .....	59
<b>Figura 19 - A sobre-expressão de ataxina-2 no hipotálamo não altera os níveis de expressão da ataxina-2 endógena e do PABPC1.</b> .....	61
<b>Figura 20 - A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo conduziu a uma diminuição nos níveis de POMC e a um aumento nos níveis de AgRP.</b> .....	62
<b>Figura 21 - A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo não altera os níveis de mTOR.</b> .....	63
<b>Figura 22 - A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo reduz a expressão de TNF-alpha.</b> .....	64
<b>Figura 23 – A sobre-expressão de ataxina-2 no hipotálamo não modifica os níveis de mRNA de genes envolvidos na autofagia.</b> .....	65

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Alterações provocadas pelo processo de envelhecimento nos péptidos e neuopéptidos nos diferentes órgãos e tecidos. ....	17
<b>Tabela 2</b> - Número de repetições e respetiva proteína de doenças de poliglutamina. ....	22
<b>Tabela 3</b> - Primers e diluições utilizadas no qPCR. As respetivas diluições são as mais adequadas para o tipo de tecido a analisar, que neste caso era o hipotálamo. O primer GAPDH serviu de gene controlo interno nesta análise. ....	42

Lista de Anexos

<b>Anexo 1 - Não se observaram alterações no BAT entre os diferentes grupos experimentais. ....</b>	<b>87</b>
<b>Anexo 2 - Não se observaram alterações no GUT entre os grupos experimentais em estudo. ....</b>	<b>88</b>
<b>Anexo 3 - Sequências dos diferentes primers utilizados neste estudo. ....</b>	<b>89</b>
<b>Anexo 4 - Animais injetados com ataxina-2 apresentam baços mais pesados. ....</b>	<b>89</b>
<b>Anexo 5 - Os animais injetados com ataxina-2 apresentam maior número de ilhotas. ....</b>	<b>90</b>

## Lista de Abreviaturas

3'UTR – three prime untranslated region  
A2D – ataxin-2 domain protein  
A2RP – ataxin-2 related protein  
AgRP – agouti-related peptide  
AHN – anterior hypothalamic nucleus  
Akt – protein kinase B  
AMPK - 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase  
ANS – autonomic nervous system  
ARH – arcuate nucleus  
ATP – adenosine triphosphate  
ATX2- injetados com ataxina-2  
ATXN2 – ataxin-2 gene  
ATXN2 KO - Ataxin-2 knock-out  
ATXN2-CAG42-KI – knock-in of a 42Q version of ataxin-2  
ATXN2L - Ataxin-2 Like  
AUC – area under the curve  
AVP – neuron vasopressin-secreting  
BAT – brown adipose tissue  
*C. elegans* – *caenorhabditis elegans*  
Ca<sup>2+</sup> - calcium ions  
CBMR- Center for Biomedical Research  
CKK - colesistocinin  
dATXN2 - domain ataxin-2  
DGAV - Direção-Geral de Alimentação e Veterinária  
DHA – dorsal hypothalamic area  
dl - decilitro  
DMN – dorsomedial hypothalamic nucleus  
DNA- desoxyribonucleic acid  
dPABP1 – domain poly(A) binding-protein 1  
eEF2 – eukaryotic elongation factor 2  
EGFR - epidermal growth factor receptor  
eIF4E – eukaryotic translation initiation factor 4E  
eIF4F - eukaryotic translation initiation factor 4F  
ER – endoplasmatic reticulum  
ERK1 – extracellular signal-regulated kinase 1  
ERK2 - extracellular signal-regulated kinase 2  
FELASA - Federation of Laboratory Animal Science Association  
FOXO – forkhead box O  
g – grama  
GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
GFP- green fluorescent protein  
GH – growth hormone

GHRH - growth hormone-releasing hormone  
 GnRH – gonadotropin- releasing hormone  
 GTT - glucose tolerance test  
 GUT- intestino  
 H3 K56Ac – acetylation of the globular domain of histone H3 in lysine 56  
 H4 K16Ac – acetylation of histone H4 N-terminal tail on the lysine 16  
 HD – Huntington disease  
 HP1 $\alpha$  - heterochromatin protein 1 $\alpha$   
 HPA - hypothalamic-pituitary-adrenal  
 HSCs – hematopoietic stem cells  
 IGF-1 – insulin-like growth factor 1  
 INK4/ARF –  
 Ins- IGF-1 - insulin signaling pathway and IGF-1  
 InsP<sub>3</sub>R1 – inositol 1, 4, 5- trisphosphate (InsP<sub>3</sub>) receptor type 1  
 InsR – insulin receptors  
 IRs - insulin receptors  
 ITPR1 – inositol 1, 4, 5 -trisphosphate receptor type 1  
 ITT - insulin tolerance test  
 KDa – kilodalton  
 kg – quilograma  
 KNDy - kisspeptin/neurokinin B and dynorphin  
 LC3 – 1A/1B-light chain 3  
 LHA – lateral hypothalamic area  
 Lsm – like sm  
 LsmAD – Lms - associated  
 ME – median eminence  
 mg – miligrama  
 min – minuto  
 ml – mililitro  
 MnK1 – mitogen-activated protein kinase interacting kinase 1  
 mRNA – messenger RNA  
 mtDNA – mitochondrial DNA  
 mTOR- mammalian target of rapamycin  
 mTORC1 - mTOR complexo 1  
 mTORC2 – mTOR complexo 2  
*MYCN – N-myc proto-oncogene protein*  
*n – número de animais*  
 NAC - nascent polypeptide-associated complex  
 NF- $\kappa$ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
 NI- não injetados  
 NPY – neuropeptide Y  
 NTS – nucleus tractus solitarius  
 °C – graus Celsius  
 P62 – protein 62  
 PABC1 – polyadenylate-binding protein 1  
 PABP – poly(A) – binding protein  
 PAM2 – poly(A) – binding protein (Pab 1) associated motif 2  
 PBN – parabrachial nucleus  
 Pbp1 – penicillin-binding protein 1  
 PCR – polymerase chain reaction

PFA – perifornical area  
PGK1 – phosphoglycerate kinase 1  
PI3 – phosphoinositide 3-kinase  
POA - preoptic area  
polyQ – polyglutamin tract  
POMC – pró-opiomelanocortin  
PON – medial postoptic nucleus  
PTEN – phosphatase and TENsin homolog delete chromosome 10  
PVN – paraventricular nucleus  
RNA – ribonucleic acid  
ROS – oxigen reactive species  
RRMs – recognition RNA motifs  
RT-qPCR – real time quantitative PCR  
S6K – kinase S6  
SCA2 - Spinocerebellar ataxia type 2  
SCA2-58Q – SCA2 cDNA with 58 CAG repeat  
SCA3 - Spinocerebellar ataxia type 3  
SCN – suprachiasmatic nucleus  
seg - segundo  
SGs - stress granules  
SNA – sistema nervoso autónomo  
TNF- $\alpha$  - tumor necrosis factor  $\alpha$   
TOR – target of rapamycin  
TRDs – trinucleotide repeat disorders  
UV – ultravioleta  
VIP – vasoactive intestinal peptide  
VMN – ventromedial nucleus  
WAT –white adipose tissue  
 $\mu$ l – microlitro  
 $\mu$ m- micrómetro

## Abstract

The aging process is a set of changes that occur in the entire organism as a consequence of degenerative damage that affects biological, molecular, and physiological processes. The hypothalamus plays an important role in several physiological functions associated with the aging process. There are several mediators involved in the process of regulating these functions, one of which is Ataxin-2.

Ataxin-2 is a cytoplasmic protein with an important role in the RNA metabolic process, regulation of translation, stress granule assembly, calcium homeostasis and insulin signalization, among others.

This study aims to evaluate the impact of Ataxin-2 expression in the hypothalamus, assessing molecular and physiological characteristics of the aging process.

For that, C5BL/J6 mice were randomly divided into three groups and subsequently submitted to stereotaxic injections of lentiviral vectors encoding for human ATX2 and for GFP (as control). There were three experimental groups: one with non-injected mice, one with mice injected with Ataxin-2, and one with mice injected with GFP. Results show that Ataxin-2 caused the mice to gain weight and the tissues of the mice injected with Ataxin-2 revealed to be like young mice histology, with Ataxin-2 reducing the levels of inflammation on a molecular level.

These data could suggest that Ataxin-2 delays the aging process, proving to have a very important role in regulating molecular and physiological functions in the hypothalamus during that process. However, further investigation is needed to establish Ataxin-2 as a regulatory aging mediator.

## Resumo

O envelhecimento é um processo biológico natural que ocorre em todos os organismos. É um processo caracterizado pela perda gradual e global de funções fisiológicas, biológicas e por processos moleculares que conduzem a alterações que comprometem a função de células, tecidos e órgãos e culminam com a morte do organismo.

O hipotálamo é uma pequena parte do cérebro que controla a maioria das funções fisiológicas alteradas pelo processo de envelhecimento. De entre muitas funções, o hipotálamo tem também a capacidade de detetar inflamação, por meio de sinais sistêmicos no sangue. O hipotálamo desempenha funções essenciais como o controlo do ritmo circadiano, a resposta ao stress, a regulação do balanço energético e a regulação da homeostasia corporal. Todas estas funções fazem com que o hipotálamo desempenhe um papel fundamental no processo de envelhecimento.

A ataxina-2 é uma proteína citoplasmática que se encontra quer em tecidos embrionários, quer em tecidos adultos. No cérebro é nas células de Purkinje do cerebelo onde apresenta maiores níveis de expressão. Esta proteína desempenha funções no papel do metabolismo de RNA, na regulação da tradução, na formação de grânulos de stress, na reorganização do citoesqueleto, na sinalização de cálcio, na sinalização de insulina, entre outros.

Um estudo anterior demonstrou que a ataxina-2 hipotalâmica mitigou alguns danos provocados pela obesidade a nível da sensibilidade à insulina, na inflamação e na degradação dos órgãos periféricos. Como tal, sendo os danos provocados pela obesidade uma consequência que acelera o processo de envelhecimento, fomos estudar a ataxina-2 hipotalâmica no processo de envelhecimento. Assim, este estudo teve como principal objetivo avaliar o impacto local da ataxina-2 no hipotálamo em características moleculares e fisiológicas do envelhecimento.

Neste estudo, murganhos C57BL/6J foram divididos aleatoriamente em três grupos, sendo submetidos a injeções exterotáticas de vetores lentivirais que codificam para *ATXN2* humana e para o GFP. No estudo três grupos experimentais foram constituídos, o grupo dos animais não injetados, o grupo dos animais injetados com ataxina-2 e o grupo dos animais injetados com GFP.

Os resultados obtidos demonstraram que a ataxina-2 reverte alguns dos danos causados pelo envelhecimento. Nomeadamente, nos animais injetados com a ataxina-2, foi possível observar que o peso dos animais aumentou comparativamente aos dos grupos

controle, a nível de danos em órgãos e tecidos foi-nos possível concluir, através da análise histológica, que os órgãos e tecidos destes animais se assemelhavam aos de animais jovens. A nível molecular observou-se que a ataxina-2 reduziu os níveis de inflamação, comparativamente aos grupos controle. Por fim observou-se também que os animais injetados com GFP, apresentaram características semelhantes aos animais não injetados, o que sugere que a cirurgia esterotáxica não levou a alterações no funcionamento do hipotálamo.

Este trabalho permitiu concluir que a ataxina-2 parece desempenhar um papel fundamental na regulação de funções moleculares e fisiológicas pelo hipotálamo no processo de envelhecimento. No entanto, mais estudos serão necessários para estabelecer a ataxina-2 como um mediador regulatório do envelhecimento e para melhor compreender a nível molecular as vias de regulação envolvidas.

Palavras-chave: envelhecimento, hipotálamo, ataxina-2, inflamação, via mTOR.



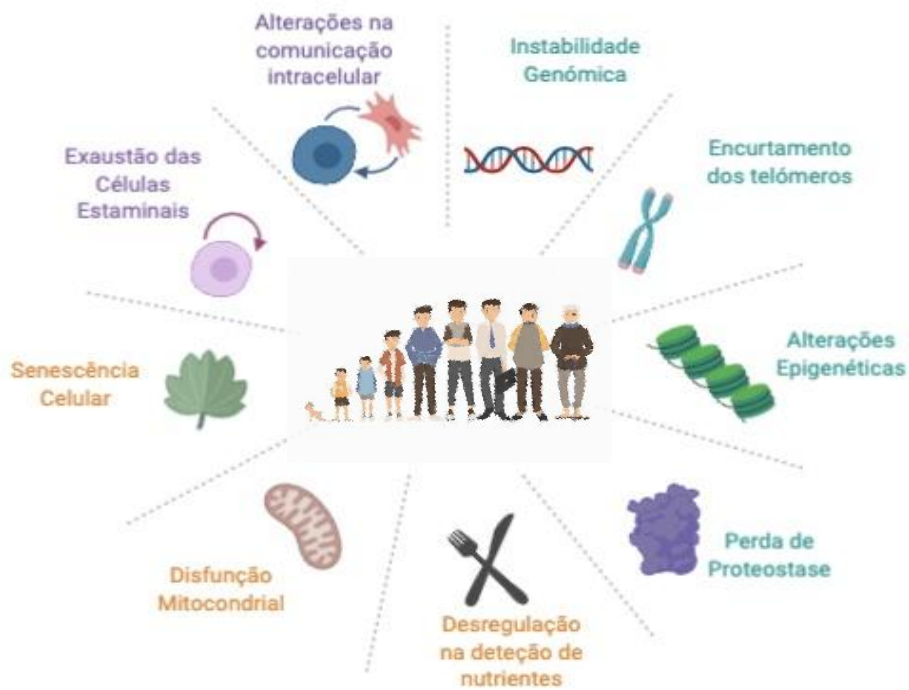
## Introdução

### 1. Envelhecimento

O envelhecimento é um dos processos biológicos mais estudados, mas que ao mesmo tempo gera mais dúvidas em torno do seu desenvolvimento. O envelhecimento é um fenómeno natural que se caracteriza pela acumulação progressiva de defeitos degenerativos que afetam os processos moleculares, biológicos e fisiológicos, incluindo por exemplo, os ciclos de respiração, o sono, a pressão arterial, a visão, e diversos mecanismos e vias moleculares. Estas alterações, conduzem por sua vez, a danos que comprometem a função das células e tecidos, aumentando o risco de mortalidade celular e em consequência, do organismo (Kim *et al.*, 2018; Pinto da Costa *et al.*, 2016).

#### 1.1. Marcadores moleculares do envelhecimento

O processo de envelhecimento tem sido alvo de muitos estudos, de forma a compreender todos os mecanismos, processos e danos que se encontram na sua base e desenvolvimento. Foram propostas nove características principais do envelhecimento (Figura 1) que contribuem para as lesões e danos provocados nas células, que ficaram conhecidos como os *Hallmarks of Aging* (marcadores moleculares do envelhecimento). Estes foram definidos tendo como base três critérios principais: (1) devem manifestar-se no processo de envelhecimento normal; (2) o seu agravamento deve consequentemente acelerar o envelhecimento; e (3) ao prevenir ou atrasar o seu desenvolvimento, o processo de envelhecimento deverá ser retardado (López-Otín *et al.*, 2013). As nove características moleculares são: instabilidade genómica, redução do tamanho dos telómeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, desregulação de vias de deteção e resposta a nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão das células estaminais e alteração da comunicação intracelular (López-Otín *et al.*, 2013).



**Figura 1 - Marcadores moleculares do envelhecimento.**

Ao longo do processo de envelhecimento foram-se destacando danos e lesões celulares associados a características específicas, as quais foram definidas com base em três critérios e como tal ficaram conhecidas como os nove marcadores moleculares do envelhecimento. As nove características são: a instabilidade genómica, redução do tamanho dos telómeros, as alterações epigenéticas, a perda de proteostase, desregulação de vias de deteção e resposta a nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão das células estaminais e alteração da comunicação intracelular. Adaptado de López-Otín *et al.*, 2013.

### 1.1.1. Instabilidade genómica

O DNA é diariamente atacado por agentes endógenos e exógenos bem como lesões extrínsecas e intrínsecas, onde se incluem os erros na replicação do DNA, as espécies reativas de oxigénio (ROS), as radiações UV, mutações pontuais, translocações, ganho e perda de cromossomas, encurtamento dos telómeros, entre outros. Estes agentes contribuem então para a instabilidade genómica e posteriormente para o envelhecimento, uma vez que se originam mutações somáticas no DNA nuclear, mutações e deleções no DNA mitocondrial (mtDNA) e defeitos nas laminas nucleares, originando deste modo um défice na reparação de DNA. Em resposta a estas alterações o organismo desenvolve uma série de mecanismos de reparação de DNA de modo a combater os danos provocados. Quando as células perdem a capacidade de reparar os erros ocorridos ou estes aumentam o dano no DNA, existe uma exacerbação do fenótipo de envelhecimento celular (Rebello-Marques *et al.*, 2018; López-Otín *et al.*, 2013).

### 1.1.2. Encurtamento dos telómeros

Tal como mencionado no ponto anterior, com o decorrer da idade, os danos provocados ao DNA afetam cada vez mais o genoma. No entanto, existem regiões genômicas mais suscetíveis do que outras, como é o caso dos telómeros. Estes são estruturas complexas de ribonucleoproteínas que protegem as informações contidas no DNA ao longo do ciclo celular, impedindo a perda de DNA cromossômico durante a divisão celular. O comprimento dos telómeros encontra-se associado à quantidade de vezes que ocorre divisão celular. Se esta ocorrer de uma forma sucessiva irá provocar uma diminuição no comprimento dos telómeros, até que os mesmos atinjam um tamanho de tal forma reduzido que impede a iniciação de uma nova divisão celular, causando assim senescência celular ou apoptose, os quais são fatores cruciais no processo de envelhecimento (Oeseburg *et al.*, 2009). Contudo, determinados organismos possuem a capacidade de reparação dos telómeros, através da telomerase, uma polimerase de DNA com capacidade de reparação das extremidades terminais de moléculas lineares de DNA. No entanto, a maior parte das células somáticas dos mamíferos não expressam telomerase, o que conduz a um progressivo encurtamento das extremidades dos cromossomas (López-Otín *et al.*; 2013). Um estudo em murganhos deficientes em telomerase, onde se observava um envelhecimento prematuro, veio demonstrar que a ativação de telomerase permite a manipulação do tamanho dos telómeros de modo a controlar o tempo de vida, permitindo assim reverter o processo de envelhecimento (Jaskelioff *et al.*; 2011). Como tal, este processo pode tornar-se um alvo terapêutico para o combate ao envelhecimento.

### 1.1.3. Alterações Epigenéticas

Ao longo da vida, as células e tecidos sofrem mudanças epigenéticas que envolvem alterações nos padrões de metilação de DNA, modificações de histonas e remodelação da cromatina. A metilação do DNA desempenha um papel importante ao longo do desenvolvimento uma vez que é utilizada para silenciar os genes de tecidos onde a sua expressão não é necessária, bem como na formação de estruturas compactas de cromatina, como é o caso da heterocromatina. Com o envelhecimento dá-se um declínio progressivo nos níveis de DNA metiltransferase, o que origina uma diminuição global

da metilação de DNA (Pal *et al.*, 2016). Por outro lado, as histonas sofrem uma variedade de modificações pós-tradução, em que cada modificação permite a regulamentação do uso subjacente de sequências de DNA. Funcionalmente, interrompem a organização da cromatina ou fornecem novas superfícies de ligação para o recrutamento de diferentes proteínas em regiões específicas da cromatina. As modificações das histonas são removidas por enzimas específicas, no entanto, durante o processo de envelhecimento a atividade e a função de algumas dessas enzimas alteram-se, originando assim alterações no epigenoma. São várias as modificações que afetam o processo de envelhecimento, no entanto, a acetilação e metilação dos resíduos de lisina são as mais importantes, onde se observa o exemplo, a acetilação do domínio globular da histona H3 na lisina 56 (H3 K56Ac) e a acetilação da cauda N-terminal da histona H4 na lisina 16 (H4 K16Ac), ambas influenciadoras do processo de envelhecimento (Pal *et al.*, 2016). Enzimas modificadoras de DNA e histonas, bem como proteínas da heterocromatina 1 $\alpha$  (HP1 $\alpha$ ) e os fatores de remodelação da cromatina são alterações que provocam determinadas mudanças na arquitetura da cromatina. bem como a perda de redistribuição global da heterocromatina, que são características fundamentais do envelhecimento (Tsurumi and Li, 2012; Pollina and Brunet, 2011). Contudo, e ao contrário do que acontece com outros processos moleculares e celulares, as alterações epigenéticas são reversíveis, constituindo um alvo interessante para o desenvolvimento de novas terapêuticas de anti-envelhecimento (López-Otín *et al.*, 2013).

#### 1.1.4. Perda de proteostase

O comprometimento da homeostasia proteica, também conhecida como proteostase, encontra-se associada ao envelhecimento e a algumas doenças associadas ao mesmo (Powers *et al.*, 2009). A matriz do controlo de qualidade é garantida por mecanismos distintos que envolvem a localização, a concentração, a conformação e a rotatividade das proteínas, para que estas adquiram a sua estrutura funcional de forma correta. Engloba ainda os mecanismos que conduzem à remoção e degradação das proteínas que não adquiram uma estrutura funcional correta, tal como o processo de autofagia, que é um processo celular catabólico de degradação e reciclagem de organelos e macromoléculas danificadas. A autofagia inclui três diferentes formas que se baseiam nos componentes que são sequestrados e degradados: (1) microautofagia que sequestra componentes citoplasmáticos diretamente do lisossoma; (2) autofagia mediada por

chaperonas que degrada seletivamente proteínas de carga específica que são reconhecidas e entregues ao lisossoma a partir de um complexo de chaperonas; (3) autofagia (ou autofagia) que degrada material citoplasmático por meio do encapsulamento de um autofagossoma que se irá fundir com o lisossoma (Ren and Zhang, 2018; Lapierre *et al.*, 2015; López-Otín *et al.*, 2013). Uma perda de função ou incoordenação destes processos origina a acumulação de proteínas danificadas, associadas ao envelhecimento e a condições neurológicas relacionadas com a idade, como por exemplo, a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (López-Otín *et al.*, 2013).

#### 1.1.5. Desregulação das vias de detecção de nutrientes

Ao processo de envelhecimento encontram-se associadas vias que desempenham um papel importante no mesmo, dos quais se destacam a via de sinalização mTOR (mammalian target of rapamycin) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1). A secreção de IGF-1 é induzida pela hormona de crescimento (GH), que é produzida pela glândula pituitária, e atua principalmente nos hepatócitos induzindo a secreção de IGF-1 (Lazar *et al.*, 2016). A longevidade tem sido associada à redução da função dos recetores de insulina, IGF-1 e GH e os seus efeitos intracelulares em vias de sinalização, como é exemplo a via da Akt e do mTOR (Brazilia *et al.*, 2012). A restrição calórica tem vindo a ser associada ao aumento da esperança de vida, mediado por uma atenuação das vias de sinalização de IGF-1 e da insulina (Fontana *et al.*, 2010). Existem ainda fatores que favorecem o envelhecimento, como é o caso da sobre-ativação das vias de sinalização, mTOR, Akt, IGF-1 e insulina, as quais desempenham um papel determinante na detecção e resposta a nutrientes. Como tal existe um equilíbrio entre moléculas com propriedades de anti-envelhecimento, na escassez de nutrientes, [fator de transcrição FOXO, gene supressor de tumores PTEN e a *5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK)], contra as que favorecem o envelhecimento, demonstrando a relevância da detecção desregulada de nutrientes como uma marca do envelhecimento (Rebelo-Marques *et al.*, 2018). Assim, a desregulação destas vias de sinalização pode ser considerada um marcador do envelhecimento (Rebelo-Marques *et al.*, 2018; Slack *et al.*, 2011; Kenyon *et al.*, 1993).

### 1.1.6. Disfunção Mitocondrial

A mitocôndria desempenha um importante papel no metabolismo e na bioenergia, bem como na determinação do tempo de vida e no envelhecimento. Estes organelos desempenham ainda um papel central na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, que se formam ao nível do complexo I e III da cadeia respiratória, bem como na formação de moléculas de adenosina trifosfato (ATP) (Boengler *et al.*, 2017). Com o avançar da idade, observa-se um declínio na integridade mitocondrial e na biogénese, devido a alterações na dinâmica mitocondrial que prejudicam a remoção das mitocôndrias disfuncionais, o que provoca um aumento da perda de eletrões, bem como uma redução na formação de ATP (López-Otín *et al.*, 2013; Ristow *et al.*, 2011). Também se observa um aumento na produção de ROS devido à disfunção mitocondrial, sendo a sua função ativar respostas homeostáticas compensatórias. Com o aumento do stress celular e as alterações presentes no processo de envelhecimento, os níveis de ROS, podem, após alcançar um determinado limite, aprofundar os danos relacionados com a idade (Boengler *et al.*, 2017).

### 1.1.7. Senescência Celular

A senescência celular, é uma interrupção estável do ciclo celular combinada com modificações fenotípicas, muitas vezes associadas ao encurtamento dos telómeros. No entanto, danos causados em regiões não teloméricas do DNA e a depressão do *locus* INK4/ARF, que ocorrem progressivamente no envelhecimento, também causam senescência celular (Campisi *et al.*, 2007; Collado *et al.*, 2007). Diversos estudos têm utilizado a  $\beta$ -galactosidase para identificar a senescência em tecidos. Num estudo pioneiro foram observados valores mais elevados de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência em ratos idosos, na pele, no pulmão e baço, comparativamente a ratos mais jovens. No entanto, no coração, músculo esquelético e tecidos renais, o mesmo não foi observado, o que veio suscitar algumas dúvidas relativamente a este marcador do envelhecimento (Dimri *et al.*, 1995). No entanto, o processo de senescência apresenta como principal finalidade evitar a proliferação de células danificadas e desencadear a sua degradação a partir do sistema imunitário, originando uma resposta compensatória celular benéfica, o que contribui para a homeostasia tecidual. Quando os tecidos

atingem a sua capacidade regenerativa, a resposta compensatória aos danos torna-se prejudicial e acelera o processo de envelhecimento (Van Deursen *et al.*, 2014).

#### 1.1.8. Exaustão das Células Estaminais

Os tecidos envelhecidos sofrem um declínio da sua capacidade homeostática e regenerativa, que tem sido atribuído a alterações degenerativas nas células estaminais específicas dos tecidos, nichos de células estaminais e na regulação da atividade das mesmas (Oh *et al.*, 2014). Estudos em ratos envelhecidos demonstraram um decréscimo geral na atividade do ciclo celular das células estaminais hematopoiéticas (HSCs), o que se correlaciona com a acumulação de danos no DNA e com a sobre-expressão de proteínas inibidoras do ciclo celular (Rossi *et al.*, 2007). Uma proliferação excessiva de células estaminais pode acelerar o esgotamento dos nichos de células estaminais. Observou-se ainda, a importância da quiescência de células estaminais para a funcionalidade a longo prazo das mesmas, num estudo realizado em *Drosophila*, em que se observou que a proliferação excessiva levou à exaustão das células estaminais e a um envelhecimento prematuro (López-Otín *et al.*, 2013; Rera *et al.*, 2011).

#### 1.1.9. Alterações na comunicação intercelular

O envelhecimento envolve alterações ao nível da comunicação intercelular, as quais podem ser de nível endócrino, neuroendócrino ou neuronal (Russell and Kahn, 2007). A inflamação apresenta um papel central nestas alterações que se relacionam com a idade, contribuindo para um fenótipo predominantemente pró-inflamatório, conhecido como “*inflammaging*” em inglês (Salminen *et al.*, 2012). A inflamação pode resultar de diversas causas, como por exemplo, a acumulação de danos nos tecidos pró-inflamatórios, a falha de sistemas imunológicos, a ativação do fator de transcrição NF-kB, entre outros (López-Otín *et al.*, 2013). Contudo, a inflamação também se encontra envolvida na patogénese da obesidade e da diabetes tipo II, condições que contribuem e se correlacionam com o processo de envelhecimento. Uma potencial ligação entre a inflamação e o processo global de envelhecimento deriva da resposta ao stress pela ativação de NF-kB no hipotálamo, que conduz a um declínio na hormona libertadora de gonadotrofinas, a GnRH, que pode contribuir para diversas alterações relacionadas com o envelhecimento, como a fragilidade óssea, a fraqueza muscular, atrofia da pele e a

neurogênese reduzida. Em murganhos, observou-se que o tratamento de GnRH previne alterações na neurogênese provocadas pelo envelhecimento, e desacelera o processo de envelhecimento (Zhang *et al.*, 2013; López-Otín *et al.*, 2013).

## 1.2. Alterações no ritmo circadiano provocadas pelo envelhecimento

O processo de envelhecimento e as suas principais características são tópicos que têm vindo a ser alvo de vários estudos, onde a capacidade cognitiva e a degenerescência das funções mentais são fatores bastante importantes, uma vez que estão fortemente associados à qualidade de vida (Hodges, *et al.*, 2019). No entanto, existem condições que contribuem para o declínio do desempenho cognitivo com a idade, dos quais é importante ressaltar a perda de sinapses neuronais, a inflamação crónica e o stress oxidativo (Ekdhal *et al.*, 2009; Mariani *et al.*, 2005).

O ritmo circadiano é o conjunto de processos biológicos que permitem a adaptação do organismo às alterações durante um dia. O ritmo circadiano funciona assim como o nosso relógio biológico, com duração de 24h, o qual é afetado pela alteração da luz e da temperatura ambiente entre a noite e o dia, aos quais se dá o nome de *zeitgebers* (doadores de tempo) (Aschoff, *et al.*, 1965). Diversos estudos têm sugerido que alterações no ritmo circadiano ligadas à idade provocam transtornos ao nível do sono, na atividade locomotora circadiana e temperatura corporal (Hood and Amir, 2017; Aschoff *et al.*, 1965). O funcionamento deste relógio biológico é dinâmico ao longo da vida e as atividades rítmicas como o sono/vigília, alteram-se com o envelhecimento (Hood and Amir, 2017). A perturbação do sono é um dos principais sintomas do envelhecimento, uma vez que se altera ao longo da vida, deteriorando-se a sua qualidade com a idade (Hodges, *et al.*, 2019; Hood and Amir, 2017). Para além do sono, foram também analisadas, em murganhos, a temperatura e a locomoção, que se encontram diminuídas com a idade (Satinof, 1998; Valentinuzzi *et al.*, 1997).

Portanto, alterações do ritmo circadiano podem representar um importante biomarcador do envelhecimento, as quais por sua vez, ao serem restabelecidas ou conservadas em indivíduos idosos podem tornar-se benéficas, nomeadamente na proteção ao desenvolvimento de patologias associadas à idade (Hodges *et al.*, 2019).

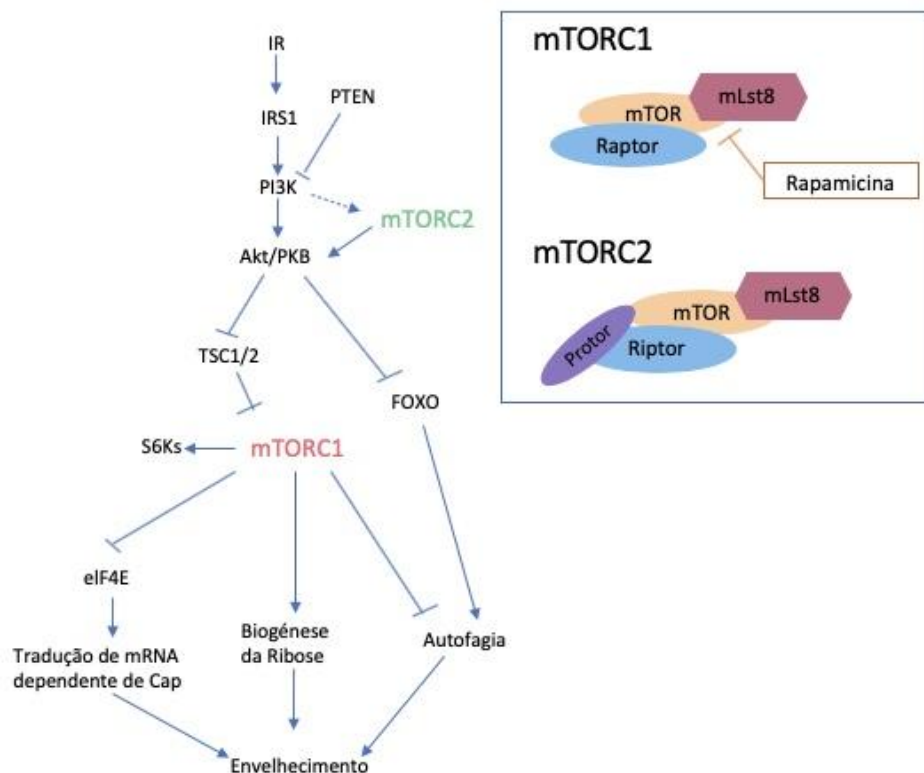
### 1.3. Importância da via de sinalização mTOR no processo de envelhecimento

O nome TOR (alvo da rapamicina) deriva do inibidor da rapamicina, que foi isolado inicialmente em meados do ano de 1970 a partir de uma bactéria em Rapa Nuin (Wheichhart, 2017). O mTOR pertence à família relacionada com o fosfoinosite cinase e é uma enzima funcional que se encontra presente em dois complexos distintos: mTOR complexo 1 (mTORC1) e mTOR complexo 2 (mTORC2); que se distinguem por apresentarem diferentes interações proteicas e substratos específicos (Laplante and Sabatini, 2013). O complexo mTORC1 é sensível à rapamicina e apresenta a proteína associada Raptor. mTORC1 é ativado por fatores de crescimento através da família do fosfoinositol-3-cinase (PI3) e sinalização da via AKT. O mTORC1 é ainda ativado por nutrientes, como aminoácidos e fosfatos, e reprimido por proteínas cinase ativadas por AMPK. Este complexo encontra-se envolvido no crescimento celular, proliferação, sobrevivência, autofagia e síntese proteica (Stallone *et al.*, 2019; Laplante and Sabatini, 2013). O complexo mTORC2 não é sensível à rapamicina e apresenta a proteína associada, Raptor. Este complexo controla o número, tamanho e morfologia de células neuronais participando desse modo, na regulação do balanço energético pelo hipotálamo. Este, desempenha ainda um papel central no controlo metabólico e na regulação do citoesqueleto de actina (figura 2) (Stallone *et al.*, 2019; Kim *et al.* 2018; Hands *et al.*, 2009).

A via de sinalização da rapamicina (mTOR) tem como alvo uma cinase serina-treonina, que assinala e agrega uma variedade de sinais ambientais e intracelulares, entre os quais estão incluídos os fatores de crescimento. A via mTOR desempenha um papel importante na proliferação e crescimento celular, em processos biológicos como o envelhecimento, na senescência celular e no tempo de vida útil, em processos relacionados com a sobrevivência celular, na autofagia, na produção de energia e conservação do equilíbrio do metabolismo celular (Wheichhart, 2017). A ativação da via de sinalização mTOR (figura 2) é aceleradora do envelhecimento, regulando algumas das características chave deste processo (Kim *et al.*, 2018; Weicchart, 2017; Hands *et al.*, 2009).

A ativação da autofagia é um dos processos chave regulado pela via de sinalização mTOR, mais especificamente pelo complexo mTORC1. A ativação do complexo mTORC1 promove a síntese proteica e inibe a autofagia. O processo de autofagia sofre

uma redução gradual com a idade, o que propicia a acumulação de organelos e proteínas deterioradas, bem como o aumento do stress oxidativo e consequente aumento de danos nos tecidos (Stallone *et al.*, 2019; Ilha *et al.*, 2018). A autofagia é um mecanismo de degradação celular que desempenha um importante papel na produção de energia e na preservação do equilíbrio metabólico, que como já foi referido anteriormente, divide-se em três formas: macroautofagia; autofagia mediada por chaperonas; e microautofagia, sendo que as que mais sofrem alterações com o processo de envelhecimento são as duas primeiras (Stallone *et al.*, 2019; Aveleira *et al.*, 2015). Um estudo demonstrou que o hipotálamo é uma área do cérebro fundamental no envelhecimento, e que a sobre-expressão de molécula endógena produzida pelo mesmo, o neuropeptídeo Y (NPY), estimula a autofagia no hipotálamo de murganhos (Aveleira *et al.*, 2015). Os investigadores observaram uma diminuição tanto na autofagia hipotalâmica, como nos níveis de NPY com o decorrer da idade, indicando deste modo que a autofagia neuronal hipotalâmica pelo NPY pode fornecer novas estratégias terapêuticas para melhorar as deteriorações relacionadas com o envelhecimento (Aveleira *et al.*, 2015).



**Figura 2 - Via de sinalização que correlaciona o complexo mTORC1 e mTORC2 ao processo de envelhecimento.**

O complexo mTORC1 é sensível à rapamicina e apresenta uma proteína Raptor enquanto que o complexo mTORC2 não é sensível à rapamicina e apresenta uma proteína Riptor. O mTORC1 é o principal regulador de muitas características do envelhecimento. Este regula positivamente a tradução de mRNA, no entanto prejudica a autofagia. Adaptado de Hands *et al.*, 2009.

#### 1.4. Tradução de proteínas e o envelhecimento

O envelhecimento é caracterizado pela acumulação de danos e alterações que levam à perda de funcionalidade e aptidão física. Nesta linha, a síntese de proteínas é um processo biológico importante e que também sofre alterações com o envelhecimento (Anisimova *et al.*, 2018; Gonskikh and Polacek, 2017).

Várias são as vias que se encontram correlacionadas com o processo de envelhecimento, no entanto, a via de sinalização mTOR, o fator de crescimento da insulina com a via da insulina 1 (Ins- IGF-1) e a via da proteína cinase mitogenativa p38 (MAPK) são as que se destacam, uma vez que se encontram diretamente associadas à tradução de proteínas. A via mTOR promove o início da tradução por meio da fosforilação da proteína de ligação 4E, que causa a dissociação da formação do complexo eIF4E e eIF4F. A ativação da via mTOR promove ainda a fosforilação e desativação da quinase eEF2. Conjuntamente com a mTOR, a via de sinalização Ins-IGF-1 estimula a cinase S6 (S6K), através da ativação da cinase 1 e 2, reguladas pelo sinal extracelular (ERK1 e ERK2), que fosforilam as pequenas proteínas da subunidade ribossômica S6 e eIF4B, que por sua vez promovem a iniciação da tradução. Com a ativação de MAPK, a cinase MnK1 promove a fosforilação de eIF4E de modo a estimular a iniciação da tradução (Gonskikh and Polacek, 2017).

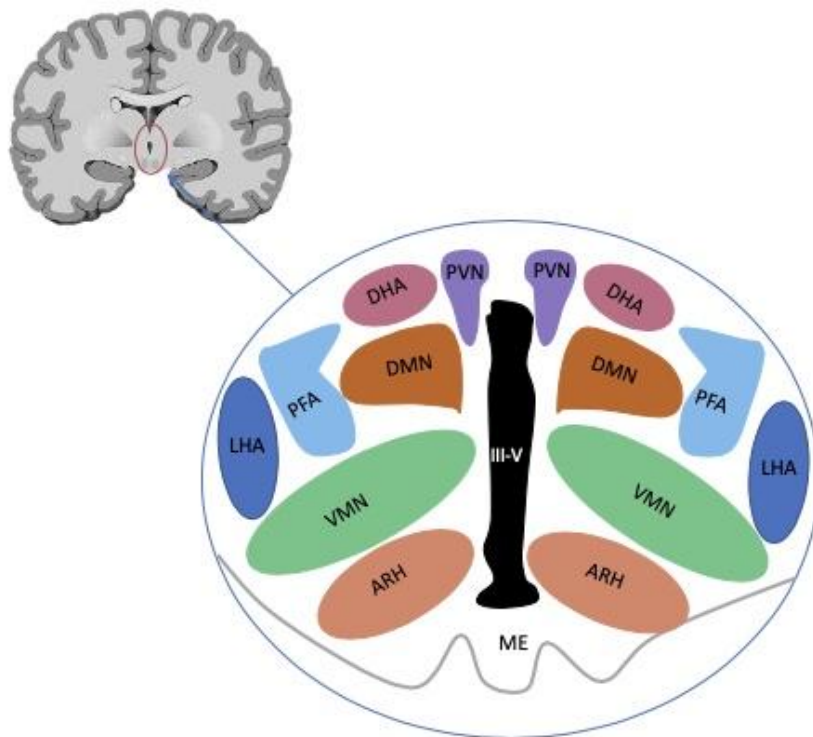
Durante a segunda metade do séculoXX, alguns estudos demonstraram que o nível global de síntese proteica é reduzido com a idade em vários invertebrados, murganhos e seres vivos. Estes estudos demonstraram uma redução na abundância ribossomal, na atenuação da atividade e uma redução na taxa de síntese das proteínas mitocondriais em função da idade (Anisimova *et al.*, 2018; Gonskikh and Polacek, 2017; Rattan, 1996). O envelhecimento pode não afetar só a abundância de componentes da maquinaria da tradução de proteínas, mas pode também alterar a capacidade de controlo e distribuição intracelular de proteínas recentemente sintetizadas. Por exemplo, uma diminuição na disponibilidade do complexo nascente associado a polipeptidos (NAC), devido à sua agregação parcial durante o envelhecimento, pode resultar na desorientação das proteínas mitocondriais importantes para a co-tradução no retículo endoplasmático (Muñoz *et al.*, 2018; Anisimova *et al.*, 2018; Kristie-Miles *et al.*, 2013).

## 2. Importância do hipotálamo no envelhecimento

A perda gradual e global das funções fisiológicas é uma das principais características do processo de envelhecimento, a maioria das quais, são controladas pelo hipotálamo (Zhang *et al.*, 2013).

O hipotálamo é uma pequena parte do cérebro, mais concretamente do diencéfalo, que se encontra localizado abaixo do tálamo e acima da hipófise. Tem como principais funções controlar o metabolismo corporal, a temperatura corporal, o crescimento, o ritmo circadiano, a resposta ao stress e a reprodução. Todas estas funções são afetadas pelo envelhecimento, o que coloca o hipotálamo como o principal coordenador do equilíbrio corporal e portanto um importante regulador do envelhecimento (Kim *et al.*, 2018). O hipotálamo divide-se em três regiões (figura 3): i) a região peiventricular, constituída por uma área perióptica (POA), por núcleos supraciasmáticos (SCN) e por núcleos paraventriculares (PVN); ii) a região medial, formada pelos núcleos pós-óptico medial (PON), pelos núcleos hipotalâmicos anteriores (AHN), pelos núcleos ventromediais (VMN), pelo núcleos dorsomediais (DMN) e pelos núcleos pré-mamilares; iii) a região hipotalâmica lateral (LHA), constituída pelo núcleo pré-óptico lateral, pelo núcleo hipotalâmico lateral e pelo núcleo supraóptico ( Elizando-Veja *et al.*, 2015).

Para além das funções descritas, o hipotálamo tem a capacidade de integrar sinais da periferia, como hormonas ou fatores inflamatórios. Na ocorrência de inflamação sistémica (como acontece no envelhecimento), as células da microglia hipotalâmicas desencadeiam resposta inflamatória, produzindo moléculas como o fator nuclear kB (NF-kB ) (Patel *et al* 2015). Zahng e colaboradores demonstraram que bloquear a via de sinalização NF-kB no hipotálamo de murganho conduz a um processo de envelhecimento desacelerado e ao aumento da longevidade em quase 20%, em comparação com os controlos ( Zhang *et al.*, 2013). Com isto, a via NF-kB pode tornar-se assim um alvo terapeutico de modo a combater o envelhecimento sistémico ( Patel *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2013).



**Figura 3 - Localização do hipotálamo no cérebro humano, e representação esquemática das suas regiões constituintes.**

DHA: área hipotalâmica dorsal; DMN: núcleo dorsomedial; LHA: área hipotalâmica lateral; PFA: área perifornical; PVN: núcleo periventricular; VMN: núcleo ventromedial; ARH: núcleo arqueado; ME: eminência mediana. Adaptado de Elizondo-Vegas *et al.*, 2015.

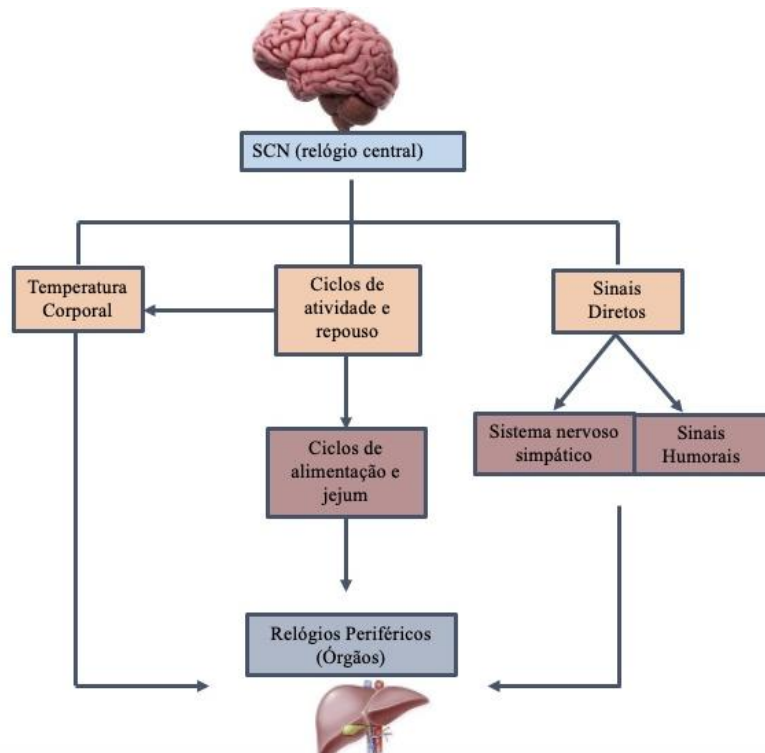
### 2.1. Funções hipotalâmicas

Tal como referido, o hipotálamo é responsável pela regulação de importantes funções corporais, como por exemplo o balanço hídrico, a temperatura, o ritmo circadiano, a homeostasia energética e a homeostasia da glucose (Kim *et al.*, 2018; Elizondo-Vegas *et al.*, 2015; Mayer *et al.*, 2009). Para além destas funções, o hipotálamo é também responsável pela regulação do sistema endócrino, o qual inclui, através da glândula pituitária, a regulação do stress, do crescimento, do metabolismo e da reprodução (Mayer *et al.*, 2009). O hipotálamo é ainda responsável pela regulação do sistema nervoso autónomo (ANS), o qual regula a pressão sanguínea, a motilidade intestinal e a respiração. Estas funções centrais do hipotálamo no equilíbrio corporal, traduzem-se no facto de que, qualquer desequilíbrio na sua função pode conduzir ao desenvolvimento de patologias (Kim *et al.*, 2018; Mayer *et al.*, 2009).

No processo de envelhecimento, funções desempenhadas pelo hipotálamo sofrem alterações, como por exemplo, o controlo do ritmo circadiano, a resposta ao stress e a regulação do balanço energético, que por sua vez potenciam a aceleração do processo de envelhecimento e o desenvolvimento de patologias associadas ao mesmo.

#### 2.1.1. Resposta hipotalâmica ao ritmo circadiano

É no hipotálamo que se encontra presente o núcleo supraquiasmático (SCN), o principal local de integração circadiana, que recebe informações da retina através da transmissão sináptica pelos axónios do trato retino-hipotalâmico, a qual por sua vez, é transformada em informação química que modifica a expressão dos genes do relógio, num subconjunto de neurónios SCN (Dibner *et al.*, 2010). Esta informação é transmitida a todos os neurónios do SCN e é depois o SCN que transmite a informação rítmica para células noutras regiões cerebrais e para os órgãos periféricos por meio de conexões neuronais indiretas, sinais endócrinos e ritmos de temperatura corporal (figura 4) (Hodges *et al.*, 2019; Dibner *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 1997). A temperatura corporal é uma das funções fisiológicas que exhibe ritmo circadiano, que lhe permite determinar o período exato do ritmo de cada célula em tecidos periféricos. Como o SCN é responsável pelo ritmo da temperatura corporal, este apresenta um potencial mecanismo que lhe permite regular os relógios nos tecidos periféricos (Hodge *et al.*, 2019). Uma das características deste sistema é a capacidade de sincronização do relógio circadiano individual de órgãos, tecidos e células. No entanto, o cérebro não é igual ao resto dos órgãos periféricos uma vez que é rodeado pela barreira hematoencefálica, o que faz com que a sincronização de relógios centrais e periféricos e a sincronização de relógios de células cerebrais afetem a duração, a fisiologia e o comportamento circadiano (Dibner *et al.*, 2010). O declínio da função circadiana com a idade encontra-se não só associado a alterações do volume no SCN, mas também a uma alteração funcional do SCN, relacionada com a diminuição no número de neurónios vasopressina (AVP) e polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), populações neuronais do SCN (Tsukahara *et al.*, 2005; Roozendaal *et al.*, 1987). Como tal, ritmos circadianos alterados poderão ser um possível biomarcador do envelhecimento.



**Figura 4 – Regulação da fisiologia dos órgãos periféricos pelo ritmo circadiano.**

Alterações provocadas pelo envelhecimento mediada pelo SCN em processos que envolvem ritmo circadiano provocada por oscilações que posteriormente vão originar alterações nos órgãos periféricos.

#### 2.1.2. Controlo hipotalâmico da resposta ao stress

Diariamente o organismo necessita de condições fisiológicas apropriadas, para o seu bem-estar, e que se ajustam em resposta a alterações ambientais e homeostáticas. O stress pode ser definido como uma interrupção da homeostasia corporal. A resposta fisiológica ao stress envolve um conjunto de sistemas interligados de modo a restabelecer a homeostasia fisiológica. Esta resposta, envolve o sistema nervoso autónomo (SNA), produzindo alterações imediatas no estado fisiológico de diversos órgãos na resposta ao stress (Zannas *et al.*, 2016). No entanto, para além do SNA, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical (HPA) também está envolvido na resposta ao stress, nomeadamente através de um aumento da circulação de glucocorticoides (Ulrich-Lai and Herman, 2009). Existem diferentes tipos de stress, por exemplo, sabe-se que o stress excessivo e crónico encontra-se associado ao envelhecimento celular mediado pelo encurtamento dos telómeros, aumentando assim o risco de aparecimento de

doenças relacionadas com o envelhecimento (Zannas *et al.*, 2016; Epel *et al.*, 2004). Relativamente aos mecanismos que correlacionam o envelhecimento e o stress, são as alterações epigenéticas e, no caso do ser humano, as metilações do DNA que mais se destacam. Alterações nos níveis de metilação de determinados locais do DNA correlacionam-se com a idade, tornando-os possíveis biomarcadores para doenças associadas ao envelhecimento (Zannas *et al.*, 2015).

### 2.1.3. Importância do hipotálamo na regulação do balanço energético

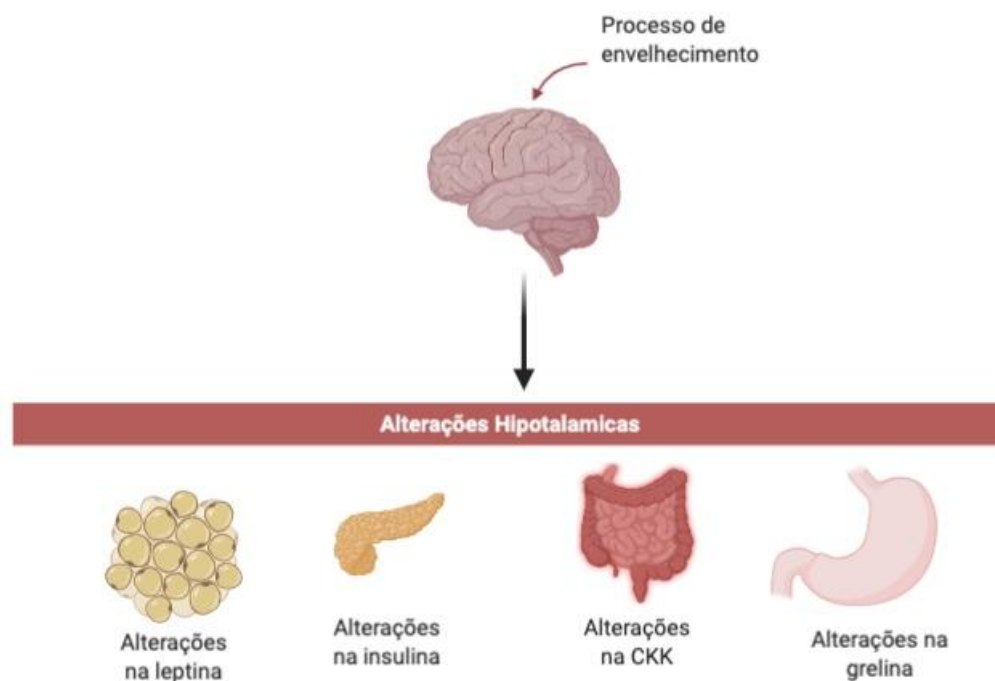
De modo a garantir a sobrevivência, o organismo necessita de manter um equilíbrio na regulação do balanço energético, o qual envolve a interação entre mecanismos reguladores do peso corporal e da temperatura corporal. Este equilíbrio depende principalmente de funções hipotalâmicas, bem como os núcleos do trato solitário (NTS) do tronco cerebral, o tálamo paraventricular (PBN), entre outros. Estes recebem diversos sinais, incluindo neuropéptidos centrais e também péptidos periféricos, derivados principalmente dos tecidos adiposos e do trato gastrointestinal (Tabela 1) (Wasterson and Horvath, 2015; Petervari *et al.*, 2011).

**Tabela 1** - Alterações provocadas pelo processo de envelhecimento nos péptidos e neuropeptídeos nos diferentes órgãos e tecidos. Adaptado de Petervari et al., 2011.

		Localização	Alterações sofridas no processo de envelhecimento
Péptidos  Catabólicos	Leptina	Tecido Adiposo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ativação da expressão de POMC;</li> <li>• Supressão da atividade do NPY/AgRP.</li> </ul>
	Insulina	Pâncreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resistência à insulina;</li> <li>• Diabetes.</li> </ul>
	Colescistocinina	Intestino	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Redução na ingestão de alimentos;</li> <li>• Sensação de saciedade;</li> <li>• Anorexia.</li> </ul>
	Adiponectina	Tecido Adiposo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resistência à insulina;</li> <li>• Melhora a expressão hipotalâmica dos fatores de libertação de corticotropina catabólica (CRF).</li> </ul>
Péptido Anabólico	Grelina	Estômago	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Potenciadora da atividade do NPY;</li> <li>• Inibe o POMC.</li> <li>• Hiperglicemia induzida pela insulina aumenta a secreção de Grelina.</li> </ul>
Neuropeptídeos	NPY	Núcleo arqueado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obesidade provocada pela resistência à Grelina nos neurónios NPY/AgRP;</li> <li>• Expressão hipotalâmica é reduzida.</li> </ul>
	AgRP	Núcleo arqueado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipermetabolismo; Hiperfagia.</li> </ul>

Do desequilíbrio no balanço energético, pode ocorrer um desvio positivo - caracterizado pela acumulação de reservas de energia principalmente na forma de substâncias químicas, e um desvio negativo - caracterizado pela diminuição da quantidade de conteúdo energético, na forma calórica, por meio de processos catabólicos (Petervari *et al.*, 2011).

No envelhecimento o balanço energético altera-se, por meio de alterações nos processos anabólicos e catabólicos (tais como alterações na via do mTOR). No estado inicial de crescimento de um organismo, destaca-se o balanço energético positivo, onde os processos anabólicos excedem os catabólicos, decorrente de uma elevada ingestão de alimentos; com o decorrer da idade este balanço é contrariado e como tal os processos catabólicos prevalecem, podendo levar a uma anorexia do envelhecimento. Este desequilíbrio no balanço energético ligado à idade pode ser explicado por alterações nos neuropeptídeos centrais e nos peptídeos periféricos. Alterações estas que incluem por exemplo, o aumento dos níveis plasmáticos de leptina e colecistocinina (CKK), diminuição dos níveis de grelina e desenvolvimento de resistência à insulina (Figura 5) (Petervari *et al.*, 2011).



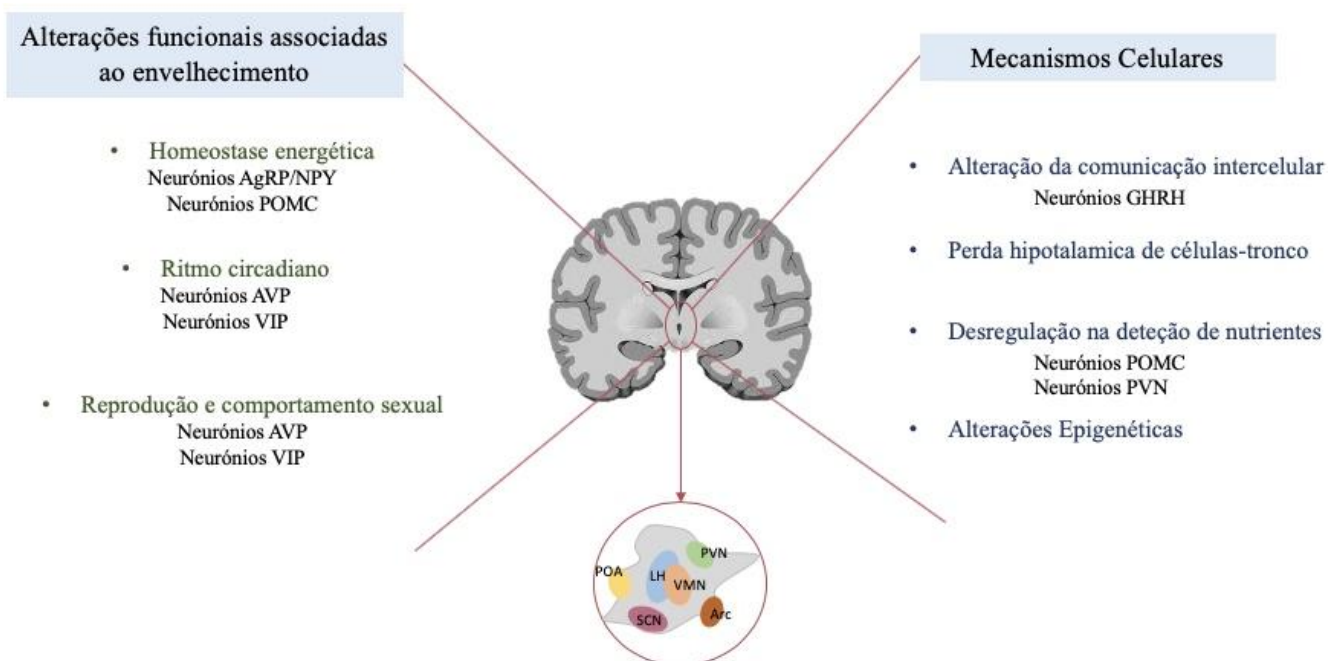
**Figura 5 - O envelhecimento, a partir do hipotálamo provoca diversas desregulações nas funções dos órgãos e tecidos.**

Por exemplo, no tecido adiposo é observado um aumento dos níveis de leptina. No pâncreas é desenvolvida uma resistência à insulina. No intestino observa-se um aumento de CKK. No estômago observa-se a diminuição dos níveis de grelina.

## 2.2. Alterações neuronais provocadas pelo processo de envelhecimento

Como referido, o hipotálamo é o principal regulador de diversos mecanismos implicados no processo de envelhecimento. No hipotálamo encontram-se diversos tipos de neurónios que, ao sofrerem alterações no seu funcionamento, contribuem para o declínio fisiológico relacionado à idade. Destes, destacam-se os neurónios neuropeptídeos Y (AgRP/NPY), os neurónios *po-opiomelanocortin* (POMC), *amphetamine-regulated transcript* (CART), *growth hormone-releasing hormone* (GHRH), os neurónios *vasopressin-secreting* (AVP) e neurónios *kisspeptin/neurokinin B and dynorphin* – KNDy, em inglês (Kim *et al.*, 2018; Waterson and Horvath, 2015). Estes neurónios são fundamentais nos mecanismos moleculares ligados ao envelhecimento, como a comunicação intracelular, a desregulação da deteção de nutrientes, a perda de proteostase e alterações epigenéticas ( Figura 6) (Kim *et al.*, 2018). No caso da homeostasia energética, são os neurónios AgRP/NPY e POMC que se destacam, uma vez que, alterações nestes neurónios como resultado da idade, conduzem a um desequilíbrio na homeostase energética ( Yang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2005). No caso do ritmo circadiano são os neurónios AVP e VIP, do SCN, que se destacam, formando uma rede neuronal sincronizada de modo a manter uma oscilação do metabolismo e do ritmo hormonal de 24 horas. No entanto, em ratos idosos observou-se uma diminuição na quantidade de neurónios AVP, o que promove uma alteração na oscilação circadiana levando a distúrbios no ciclo do sono ( Kim *et al.*, 2018; Hood e Amir 2017; Roozendaal *et al.*, 1987). Também a reprodução e o comportamento sexual apresentam um declínio associado ao envelhecimento, demonstrado pela diminuição da GnRH e no número de neurónios KNDy (Kim *et al.*, 2018; Kunimura *et al.*, 2017). Estas alterações fisiológicas, traduzem modificações nos mecanismos celulares associados ao envelhecimento, em populações neuronais específicas e ligadas a cada uma destas funções. Por exemplo, na comunicação intracelular o aumento da ativação da microglia ocorre em resposta à inflamação que é provocada pelo envelhecimento, inflamação esta que se correlaciona com um declínio na expressão de GnRH (Kim *et al.*, 2018; Zang *et al.*, 2013). Na desregulação das vias de deteção de nutrientes observou-se um aumento da atividade de mTOR nos neurónios POMC em murganhos envelhecidos e uma diminuição na projeção de neurites para o

PVN, o que contribuiu para a obesidade associada à idade (Yang *et al.*, 2012). Por fim, no caso da perda de proteostasia, os níveis de autofagia estão diminuídos em murganhos envelhecidos, o que conduz a um aumento dos níveis hipotalâmicos de POMC, que estão na base de algumas complicações metabólicas frequentemente observadas no envelhecimento (Kaushik *et al.*, 2012; Cuervo, 2008).



**Figura 6 - O hipotálamo controla diversos aspetos do envelhecimento sistémico.**

Os neurónios AgRP/NPY, neurónios GHRH, neurónios AVP, neurónios VIP e neurónios POMC são os que mais se destacam pelas alterações que sofrem e pelos danos que provocam a determinadas funções e mecanismos celulares que podem promover o processo de envelhecimento. Os neurónios AgRP/NPY destacam-se por provocar alterações a nível da homeostasia energética que se relaciona com o peso e a temperatura corporal. Os neurónios POMC correlacionam-se com a homeostasia energética e com a desregulação na deteção de nutrientes que representa uma marca molecular do envelhecimento. Já os neurónios AVP e VIP sofrem alterações no ritmo circadiano, originando alterações no sono, e na reprodução e comportamento sexual. Os neurónios GHRH e PVN destacam-se por sofrerem alterações a nível da alteração da comunicação intracelular e na desregulação na deteção de nutrientes, respetivamente. Adaptado de Kim *et al.*, 2018.

### 2.3. Notas finais acerca do hipotálamo

Muitas são as hipóteses que tentam descrever e explicar o processo de envelhecimento, bem como vários são os mecanismos moleculares associado a este. Mas, um dos pontos mais consensuais na comunidade científica, é que o hipotálamo, como principal regulador da homeostasia corporal, é fundamental no processo de envelhecimento. O hipotálamo regula diversas funções essenciais à sobrevivência de um organismo, como o controlo do ritmo circadiano, a resposta ao stress, a fertilidade e reprodução, a regulação do balanço energético, entre outros. Aliás, a teoria neuroendócrina do envelhecimento postula que o declínio funcional do hipotálamo está na base deste, e é causado por uma diminuição na sua sensibilidade, bem como no controlo do seu feedback (Chen *et al.*, 2015; Dilman, 1971). Desta forma, o hipotálamo constitui um alvo fundamental no desenho e investigação de futuras estratégias anti-envelhecimento.

### 3. Ataxina-2

O gene da ataxina-2 (*ATXN2*), encontra-se localizado no cromossoma 12q23 – 12q24.1 e mutações nestes estão associadas ao desenvolvimento da doença *Spinocerebellar ataxia type 2 – Ataxia Espinocerebelosa tipo 2 (SCA2)* (Carmo-Silva *et al.*, 2017; Lastres-Becker *et al.*, 2016; Maganã *et al.*, 2013; Pulst *et al.*, 1996). A SCA2 é uma doença neurodegenerativa causada pela expansão de uma repetição de trinucleótidos *CAG* localizada na região codificadora do gene *ATXN2* (Lastres-Becker *et al.*, 2016; Huynh *et al.*, 1999). A ataxina-2 é uma proteína cujas funções principais estão ligadas ao metabolismo do RNA, à formação dos grânulos de stress, e à reorganização do citoesqueleto, entre outras.

#### 3.1. Doenças de Poliglutaminas

Existem inúmeras doenças, neurológicas e neuromusculares, causadas por uma expansão de trinucleótidos. Estas doenças são chamadas de distúrbios de repetição do trinucleótido (TRDs). No caso do codão *CAG*, que codifica a glutamina (Q), quando anormalmente repetido resulta numa expansão anormal do segmento de poliglutamina (polyQ) na proteína traduzida (Adegbuyiro *et al.*, 2017; Burdworth and McMurray,

2013). Neste caso, os TRDs são referidos como doenças de poliglutamina (polyQ), nas quais cada proteína mutante está subjacente a uma doença, como por exemplo, a doença de Huntington (HD), a ataxia espinocerebelosa do tipo 2 (SCA2) e a ataxia espinocerebelosa do tipo 3 (SCA3) também conhecida como a doença de Machado-Joseph, entre outras (Tabela 2) (Adegbuyiro *et al.*, 2017; Nóbrega *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2014).

A SCA 2 é uma ataxia autossômica dominante causada pela expansão repetida de CAG no exão 1 do gene *ATXN2*, que confere à proteína um ganho de função tóxica que desencadeia o aparecimento do fenótipo da doença (Alves-Cruzeiro *et al.*; 2016; Lastre-Becker *et al.*, 2008; Plust *et al.*, 2005). Os sintomas característicos da doença são, ataxia e disartria progressiva da marcha, movimentos lentos, distúrbios do sono, deficiência cognitiva e disfunções psicológicas (Alves-Cruzeiro *et al.*, 2016; Laster-Becker *et al.*, 2008).

**Tabela 2** - Número de repetições e respetiva proteína de doenças de poliglutamina. Adaptado de Adegbuyiro *et al.*, 2017.

Doenças	Proteína	Número de Repetições CAG
Doença de Huntington	Huntingtin	36-100
Ataxia espinocerebelosa tipo 1	Ataxina-1	39-88
Ataxia espinocerebelosa tipo 2	Ataxina-2	31-77
Ataxia espinocerebelosa tipo 3	Ataxina-3	55-86
Ataxia espinocerebelosa tipo 6	Ataxina-6	21-33
Ataxia espinocerebelosa tipo 7	Ataxina-7	38-120
Ataxia espinocerebelosa tipo 12	Ataxina-12	66-78
Ataxia espinocerebelosa tipo 17	Ataxina-17	47-63
Doença de Kennedy	Receptor Androgénico	38-65

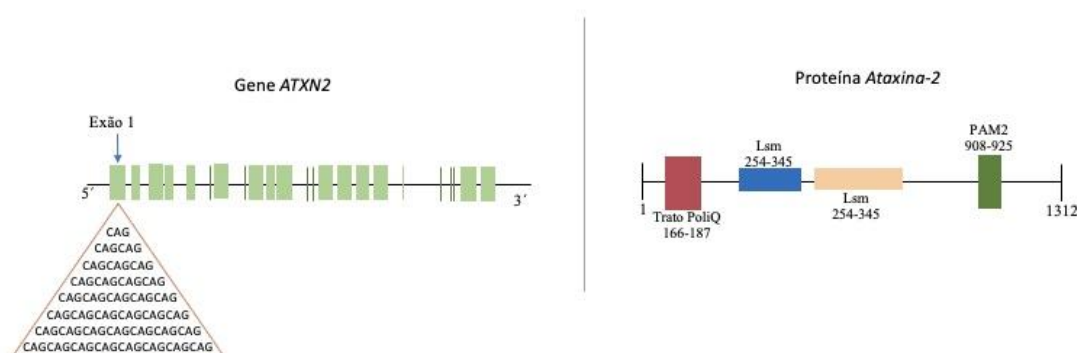
### 3.2. Gene *ATXN2* e proteína Ataxina-2

O gene *ATXN2* contém 25 exões com ~130kb de DNA genômico, no qual o exão 1 contém o segmento de *CAG* (Figura 7). Em indivíduos normais, os alelos do gene têm entre 13 e 31 repetições *CAG* (Maganã *et al.*, 2013; Huynh *et al.*, 1999), enquanto que os doentes de SCA2 apresentam alelos com mais de 31 repetições *CAG* (Maganã *et al.*, 2013; Sahaba *et al.*, 1998).

A ataxina-2 é uma proteína básica com uma massa molecular de ~140 KDa que contém 1312 aminoácidos na sua forma canônica, a qual não apresenta qualquer semelhança de sequência ou função com as outras proteínas causadoras de outras doenças de poliglutaminas (Carmo-Silva *et al.*, 2017; Maganã *et al.*, 2013). Contém ainda uma região ácida de 456 aminoácidos, codificada pelos exões 2 a 7, que originam um domínio Like Sm (domínio Lsm, 254-345 aminoácidos) e um domínio associado ao Lsm (LsmAD, 353-475 aminoácidos) (Figura 7). O domínio Lsm contém um motivo Sm1 e um Sm2, bem como um elevado número de prolina (14%), de serina (13,4%) e de glutamina (7,7%). Os motivos Sm1 e Sm2 são importantes no processo de splicing de RNA, indicando que a ataxina-2 pode funcionar como um componente do splicing de RNA (Huynh *et al.*, 1999). O domínio LsmAD contém um sinal trans-Golgi mediado por clatrina e um sinal de saída do retículo endoplasmático (Neuwald *et al.*, 1998; Shibata *et al.*, 2000). Para além destes dois domínios, no N-terminal da proteína encontra-se uma extensão poliglutamina (PolyQ) e no C-terminal encontra-se um domínio denominado de PAM2, que é responsável pela ligação ao PABP, que é uma proteína envolvida no metabolismo do RNA e na tradução do mRNA (Maganã *et al.*, 2013; Neuwald *et al.*, 1998).

A ataxina-2 encontra-se expressa quer em tecidos embrionários, quer em tecidos adultos, destacando-se predominantemente no cérebro (Carmo-Silva *et al.*, 2017; Huynh *et al.*, 1999). No cérebro, é nas células cerebrais de Purkinje que ataxina-2 tem os maiores níveis de expressão, sendo também estas células o principal local de neurodegenerescência observado na SCA2. No entanto, a expressão da ataxina-2 no cérebro é ubíqua (Huynh *et al.*, 1999; Nechiporuk *et al.*, 1998). Em termos de localização subcelular, a ataxina-2 é considerada uma proteína citoplasmática, que se encontra no aparelho de Golgi, bem como associada a polissomas no retículo endoplasmático rugoso (ER).

Em condições de stress celular a ataxina-2 é recrutada para os grânulos de stress (Carmo-Silva *et al.*,2017).



**Figura 7 - Estrutura do gene *ATXN2* humano no cromossoma 12 e da proteína da ataxina-2.**

À esquerda, a estrutura do gene humano *ATXN2* representado por 25 exões que codificam a proteína ataxina-2 com um número superior a 31 repetições CAG no exão 1 que produzem as manifestações clínicas de SCA2. À direita a estrutura da ataxina-2, onde o segmento polyQ se encontra na região N-terminal, os dois domínios Lsm e LsmAD, bem como o domínio PAM2 na região C-terminal. Adaptado de (Magaña *et al.*, 2013).

### 3.3. Homólogos, Ortólogos e Parólogos da Ataxina-2

Genes homólogos e ortólogos da *ATXN2* apresentam papéis importantes no metabolismo do RNA uma vez que conservam os domínios Lsm e LsmAD, bem como sequências que se assemelham ao domínio PAM2, contudo os mesmos não codificam para o segmento de poliglutamina (Carmo-Silva, 2016; Kozlov *et al.*, 2001; Nechiporuck *et al.*, 1998). Já genes parólogos da *ATXN2* nem sempre partilham a mesma função. Estudos demonstraram a existência de proteínas homólogas com a ataxina-2, a A2RP (proteína relacionada com a ataxina-2) e A2D (proteína com domínio para a ataxina-2) (Carmo-Silva, 2016; Figueroa and Pulst, 2003; Meunier *et al.*, 2002). Proteínas da família de A2RP e A2D são conhecidas como *Ataxin-2 Like* (*ATXN2L*) que apresentam motivos conservados como, os domínios Lsm e LsmAD, o sinal trans-Golgi mediado pela clatrina, o sinal de saída do retículo endoplasmático rugoso e o motivo PAM2 (Kaehler *et al.*, 2012). Contudo *ATXN2L* encontra-se ainda envolvido no metabolismo de RNA, na regulação da resposta ao stress, a partir da formação de grânulos de stress (Kaehler *et al.*, 2012).

### 3.4. Funções da Ataxina-2

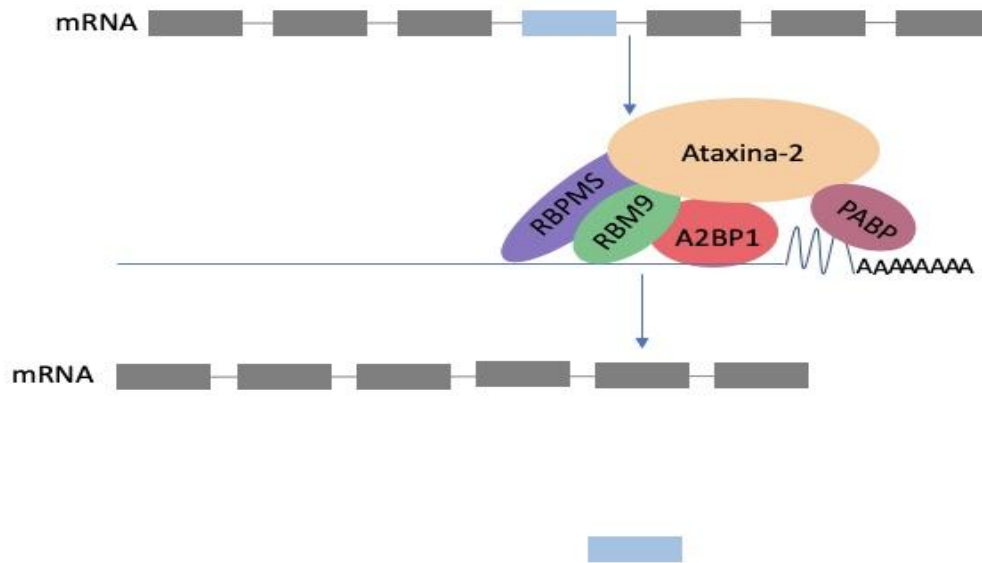
A ataxina-2 apresenta funções moleculares, celulares e fisiológicas, das quais se destacam o seu papel no metabolismo do RNA, na regulação da tradução, na formação de grânulos de stress, na reorganização do citoesqueleto, na endocitose, e ainda na mediação da sinalização de cálcio (figura 10) .

#### 3.4.1. Metabolismo do RNA e tradução

A ataxina-2 é uma proteína de ligação ao RNA (*RNA Binding Protein – RBP* em inglês), função que ficou esclarecida pela ligação da ataxina-2 a mRNAs alvo, de forma independente do PABP (Ostrowski *et al.*, 2017; Yokoshi *et al.*, 2014). A ataxina-2 liga-se a elementos ricos em uridina da região 3'UTR do mRNA alvo através do seu domínio Lsm, de modo a estabilizar os mesmos e aumentar a abundância de proteínas e assim a sua tradução, que é em parte mediada por PABP. A exclusão do PAM2 diminui a estabilidade do mRNA, assim como também o segmento polyQ (Yokoshi *et al.*, 2014). Também os ortólogos da ataxina-2 (Pbp1) promovem a estabilização do mRNA via modulação da poliadenilação do RNA ( Figura 8) (Ostrowski *et al.*, 2017).

Relativamente ao splicing, a ataxina-2 liga-se aos seus fatores através dos motivos de reconhecimento de RNA (RRMs) (Lim *et al.*, 2006).

Um estudo demonstrou que a ataxina-2 humana e o seu ortólogo em *Drosophila* (dATX2) interagem diretamente com a maquinaria de tradução por meio de poliribossomas mediados pelos domínios Lsm, LsmAD e PAM2. Por exemplo, o domínio PAM2 é necessário para a ligação de dATXN2 ao dPABP1 promovendo ou impedindo a interação entre dPABP e o complexo de iniciação de tradução (Ostrowski *et al.*, 2017; Fitschen *et al.*, 2015). O PABP atua durante a tradução onde se liga, simultaneamente, à cauda poli(A) da extremidade 3' dos mRNAs e ao fator de tradução associado à extremidade 5' eIF4G de modo a promover a circulação de mRNAs como um passo essencial na iniciação da tradução ( Fitschen *et al.*, 2015; Nóbrega *et al.*, 2015).



**Figura 8 - Interação da ataxina-2 com proteínas envolvidas no mRNA.**

A ataxina-2 liga-se a elementos ricos em uridina na região 3'UTR do mRNA a partir do seu domínio Lsm. Ou seja, liga-se ao PABP, A2BP1, RBM9, RBPMS, fatores envolvidos no splicing de mRNA, desenvolvendo um papel da ataxina-2 nas modificações pós-transcrição. A proteína é também capaz de se ligar diretamente ao mRNA. Adaptado de (Magaña et al., 2013).

#### 3.4.2. Formação de Grânulos de Stress

Quando as células são sujeitas a condições de stress, muitos dos seus processos são alterados de modo a que as mesmas se adaptem e mantenham a integridade celular. Um dos processos mais afetado com o stress celular é a tradução de proteínas, uma vez que é frequentemente parada, originando os grânulos de stress (SGs) e corpos de processamento (P-bodies) (Ostrowski *et al.*, 2017).

Os SGs são constituídos por ribonucleoproteínas que se formam quando as células eucariotas são expostas a determinados estímulos, como por exemplo, o stress do retículo endoplasmático, o choque térmico, a hipoxia, a infeção viral, entre outros (Nunes *et al.*, 2019; Carmo-Silva *et al.*, 2017). A formação de grânulos de stress é essencial para a sobrevivência celular, uma vez que estes inibem a apoptose através da redução de ROS, do sequestro de moléculas de sinalização e estabilização de mRNAs de fatores anti-apoptóticos. Em condições de stress, a tradução global é reduzida, e pensa-se que os SGs desempenham função na triagem dos mRNAs reprimidos, permitindo uma tradução focada nas proteínas críticas para superar o stress (Nunes *et al.*, 2019; Anderson and Kedersha, 2006). *Pbp1*, o ortólogo da levedura da ataxina-2

tem sido descrito como um componente dos SGs, com a capacidade de os induzir, mesmo na ausência de stress (Carmo-Silva *et al.*, 2017; Swisher and Parker, 2010). Diversos estudos demonstraram que o *knockdown* do gene *ATXN2* humano diminui o número e o tamanho dos grânulos de stress, e na mesma linha o *knockout* do *Pbp1* (levedura) diminui a formação dos mesmo, sob privação da glucose (Buchan *et al.*, 2008; Nonhoff *et al* 2007). Desta forma, estes estudos evidenciam que a *ATXN2* e os seus ortólogos são mediadores da resposta celular ao stress, promovendo a formação de SGs (Ostrowski *et al.*, 2017).

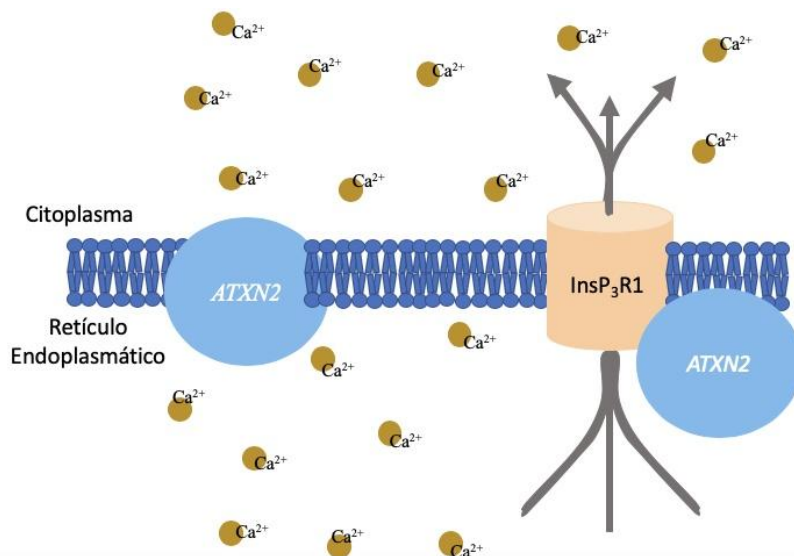
#### 3.4.3. Reorganização do citoesqueleto e endocitose

A associação da ataxina-2 com o retículo endoplasmático e a sua participação na formação dos grânulos de stress sugeriu que a proteína poderia interagir com a membrana plasmática. O mesmo foi sugerido a partir da interação da ataxina-2 com as endofilinas A1 e A3, proteínas implicadas na formação da curvatura da membrana plasmáticas em sítios endocitóticos, através da ativação de um complexo proteico regulado pela ubiquitinação, associada a filamentos de actina (Swisher and Parker, 2010). Um estudo em leveduras mostrou que a *Pbp1* associa-se aos filamentos de actina, para interagir com a  $\alpha$ -actina 1 e  $\alpha$ -actina e ainda para associar-se a Profilin 1 (Figley *et al.*, 2014). Estudos em *C. elegans* permitiram confirmar o envolvimento da ataxina-2 na dinâmica de micrutúbulos durante o ciclo celular (Gnazzo *et al.*, 2016; Lewellyn *et al.*, 2011). Estes estudos indicam que a reorganização do citoesqueleto é uma importante função celular da ataxina-2 e que a mesma desempenha um papel importante no processo de citocinese, uma vez que se localiza em torno de estruturas mitóticas, estabilizando as mesmas e permitindo uma divisão celular correta (Gnazzo *et al.*, 2016; Lewellyn *et al.*, 2011).

A endocitose é o processo responsável pela internalização de moléculas, macromoléculas, partículas e fluídos em vesículas formadas por uma fração da membrana celular. Estas vesículas podem ser direcionadas para os lisossomas para que o seu conteúdo seja degradado ou então este pode ser reciclado e regressar à membrana celular. Diversos estudos demonstraram que a sobre-expressão da ataxina-2 diminui a internalização do receptor do fator de crescimento epidémico (EGFR) na membrana celular, enquanto que a sua ausência promove um aumento da internalização do EGFR (Nonis *et al.*, 2008; Wiley e Burke *et al.*, 2001). Os resultados de todos estes estudos sugerem então que a ataxina-2 encontra-se envolvida na reorganização do citoesqueleto e na endocitose

#### 3.4.4. Sinalização de Cálcio

Os íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) são moléculas que regulam importantes funções das células eucarióticas, tais como a diferenciação, proliferação, sobrevivência, apoptose, entre outros (Pchitsakaya *et al.*, 2017; Capiod, 2016). O  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha um papel central nas células neuronais, onde medeia múltiplos processos vitais (Berridge, 1998). Por exemplo, a perturbação na sinalização intracelular de cálcio nas células Purkinje é considerada um mecanismo chave na patogênese da doença de SCA2 (Shimobayashi and Kapfhammer, 2018). A presença da ataxina-2 no retículo endoplasmático sugere que esta pode participar na sinalização celular mediada pelo cálcio ( Figura 9). Num estudo com murganhos *ATXN2* KO e murganhos *ATXN2*-CAG42-KI, resultantes da desregulamentação de ITPR1, um transportador de cálcio, observou-se que os animais *ATXN2*-CAG42-KI sofreram alterações nas células Purkinje, demonstrando deste modo que *ATXN2* é reconhecido na homeostase de cálcio (Halbach *et al.*, 2017; Ostrowski *et al.*, 2017). Já estudos com murganhos transgênicos (SCA2-58Q) demonstraram que, a ataxina-2 expandida interage com a região C-Terminal do ITPR1 do canal de cálcio, sugerindo que a expansão anormal de poliglutaminas pode prejudicar a homeostasia do cálcio (Ostrowski *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2009). Estudos como estes que demonstram que a ataxina-2 apresenta um papel determinante na homeostasia do cálcio.



**Figura 9 - A ataxina-2 medeia a sinalização de cálcio.**

A ataxina-2 localiza-se no retículo endoplasmático, onde interage com o receptor de inositol (1, 4, 5)- trifosfato do canal de cálcio do tipo 1  $\text{InsP}_3\text{R1}$  permitindo-lhe desta forma modular a sinalização de celular. Adaptado de (Magaña *et al.*, 2013).

### 3.5. Funções fisiológicas da ataxina-2

A ataxina-2 é também importante em diversos processos fisiológicos, dos quais se destacam o desenvolvimento embrionário, o ritmo circadiano e a sinalização da insulina (Figura 10) (Ostrowski *et al.*, 2017).

#### 3.5.1. Alvos da Rapamicina

O mTOR, é o alvo da rapamicina que se divide em dois complexos distintos, o TORC1 é sensível à rapamicina, desempenhando um papel central no crescimento, regulação de tradução, no transporte de nutrientes e na autofagia. Já o complexo TORC2, que pelo contrário não é sensível à rapamicina, é responsável pela polarização dependente do ciclo celular do citoesqueleto de actina (Kim *et al.*, 2013). Um estudo em leveduras revelou que a sobreexpressão de Pbp1, promove o sequestro de TORC1 para os grânulos de stress (Ostrowski *et al.*, 2017; Takanahara and Maeda, 2012). As leveduras que expressam TORC1 hiperativo são resistentes aos inibidores de TORC1, rapamicina e cafeína, no entanto, a sobreexpressão de Pbp1 restaura a sensibilidade de TORC1 com ambos os inibidores. Esta sobre-expressão de Pbp1 não altera o conjunto TORC1, sugerindo que Pbp1 pode inibir a sua ativação e não a expressão. Observou-se ainda, que tanto a sobre-expressão de Pbp1 como o stress térmico promovem o sequestro da TORC1 nos grânulos de stress (Takanahara and Maeda, 2012; Ostrowski *et al.*, 2017). Este estudo sugere que o papel da ataxina-2 na regulação do metabolismo celular, bem como na resposta ao stress, depende do controlo dos grânulos de stress e da sinalização mTOR (Ostrowski *et al.*, 2017).

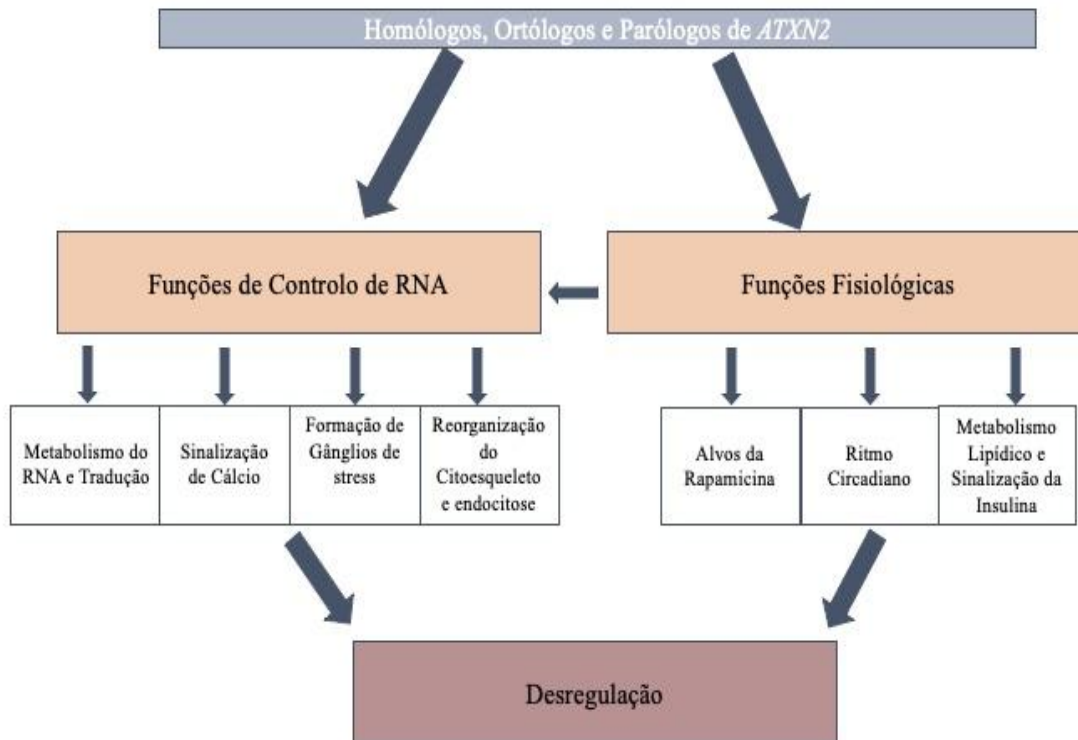
#### 3.5.2. Ritmo Circadiano

A ataxina-2 parece desempenhar um papel importante na função do relógio circadiano. Estudos realizados em *Drosophila*, cujo componente crítico do ritmo circadiano é a proteína PERIOD (dPER), regulada em vários passos da transcrição e das modificações pós-tradução, observaram que a diminuição de dATXN2 reduzia os níveis de dPER originando dessa forma um aumento do período de escuridão (Ostrowski *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2013; Lim and Allada, 2013; Yu and Hardin, 2006). No caso dos

mamíferos, esta regulação é mais complexa, uma vez que existem 3 proteínas PERIOD (PER1-3) ligadas ao ritmo circadiano. O papel da ataxina-2 no ritmo circadiano de mamíferos é ainda desconhecido e requer mais estudos neste sentido. No entanto, doentes com SCA2 demonstram perturbações no sono e movimentos rápidos dos olhos, processos regulados pelo relógio circadiano e que podem sugerir um papel da ataxina-2 na regulação do ritmo (Tuin *et al.*, 2006).

### 3.5.3. Sinalização da insulina

A resistência à insulina é uma das condições observadas na síndrome metabólica e responsável pelo agravamento da disfunção metabólica, na obesidade e no envelhecimento. Vários mecanismos podem estar associados a este processo, como danos nos receptores de insulina (IRs), na regulação negativa da expressão de IR pela ocorrência de hiperglicemia, lipotoxicidade, inflamação, disfunção mitocondrial e reação de formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Boucher *et al.*, 2014). Um estudo demonstrou que os murganhos KO *ATXN2* apresentam resistência à insulina, tendo um aumento de insulina no sangue, bem como de células  $\beta$  pancreáticas. Este estudo verificou ainda uma diminuição nos níveis de proteína InsR no fígado e no cérebro (apesar de detectarem um aumento no mRNA InsR), o que pode explicar a resistência à insulina na ausência de ataxina-2 (Lasters-Becker *et al.*, 2008). Outro estudo demonstrou que a ausência da ataxina-2 nos murganhos *ATXN2* KO induz a hiperativação de elementos da via de sinalização mTOR, que inibe a sinalização de insulina, que em condições normais, estimula PI3K promovendo a fosforilação e ativação de Akt, de modo a originar a ativação de mTOR. A sobreativação de mTOR pode bloquear a via de sinalização da insulina e promover a resistência à mesma (Lasters-Becker *et al.*, 2016; Um *et al.*, 2004; Yoon e Chol, 2016).



**Figura 10 - Funções da Ataxina-2.**

A Ataxina-2 desempenha funções multifacetadas de modo a regular várias fases de processamento do RNA, com papéis em percursos fisiológicos. Funções que incluem a promoção da estabilidade e tradução do mRNA, bem como a formação de grânulos de stress, funções estas que vão contribuir para o controlo de vias metabólicas como a mTOR e a ritmicidade circadiana. A desregulação destes processos pode dar origem a disfunções celulares que por sua vez promovem determinadas doenças como a SCA2, a doença de Machado-Joseph, entre outras. Adaptado de (Ostrowski *et al.*,2017).

### 3.6. Ataxina-2 e o cancro

O cancro é uma doença que afeta uma grande parte da população a nível mundial, desde crianças a idosos. No entanto, a idade é um dos principais factores de risco para o seu desenvolvimento. Existem estudos que relacionam a ataxina-2 com esta doença. Cerca de 10% dos neuroblastomas regredem espontaneamente, provavelmente por apoptose, enquanto que 20% resulta da amplificação do gene *MYCN*. Num estudo para identificar

os genes associados à morte celular no neuroblastoma, encontrou-se o gene da *ATXN2* (Wiedemeyer *et al.*, 2003). Neste estudo, os autores sugerem que a expressão forçada da ataxina-2 wild-type promove a apoptose em células de neuroblastoma humano. Observou-se que a transcrição elevada de ataxina-2 coincidia com o aparecimento de células apoptóticas. Além disto, verificaram que níveis elevados de ataxina-2 foram detetados em tumores de estadio 4, que por sua vez regrediram espontâneamente após uma fase progressiva, em contraste os tumores com *MYCN*, que por norma são resistentes à quimioterapia e seguem maus prognósticos, que contêm significativamente menos ataxina-2 (Berthold e Hero, 2000; Wiedemeyer *et al.*, 2003). De modo geral, sugeriu-se a necessidade das células do neuroblastoma amplificadas com *MYCN* diminuirem a regulação da ataxina-2 endógena de modo a adquirir resistência à apoptose (Wiedemeyer *et al.*, 2003).

No caso das células de neuroblastoma, a expressão da ataxina-2 wild-type apresenta assim um papel importante, o que pode vir a significar, em estudos futuros, a possibilidade de se desenvolverem novos alvos terapeuticos que possam então reduzir os riscos desta doença (Wiedemeyer *et al.*, 2003).

## Objetivos

O hipotálamo desempenha um papel importante em várias funções fisiológicas que se encontram associados ao processo de envelhecimento. Na regulação destas funções hipotalâmicas encontram-se envolvidas vários mediadores, incluindo a ataxina-2 . Esta, é uma proteína que se relaciona molecularmente com a regulação do metabolismo de RNA e fisiologicamente com a obesidade e o envelhecimento. Por exemplo, foi observado um aumento de ataxina-2 nas células Purkinje em idosos e em doentes de SCA2, o que nos indica que é possível provocar alterações na ataxina-2 de modo a controlar o processo de envelhecimento, bem como na doença SCA2 ( Huynh et al.,1999). Como tal, este estudo tem como principal objetivo avaliar o impacto da sobre-expressão hipotalâmica da ataxina-2 *wild-type*, em características do envelhecimento molecular e fisiológico. Deste objetivo geral, delinearam-se diversos objetivos adicionais:

- Analisar o peso corporal e o comportamento;
- Analisar a sensibilidade à insulina e tolerância à glucose;
- Analisar possíveis alterações provocadas em tecidos e órgãos;
- Detetar alterações dos níveis de expressão de marcadores moleculares de envelhecimento.

## Materiais e Métodos

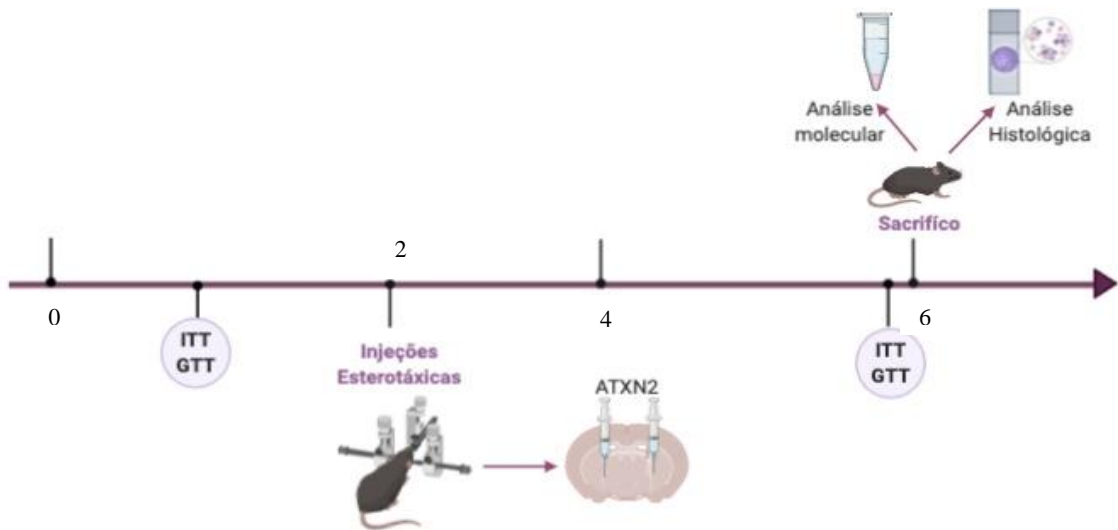
### 1. Estudos *in vivo*

#### 1.1. Animais

Nesta experiência foram utilizados 19 murganhos C57BL/6J adultos que foram obtidos por meio de criação interna e mantidos no biotério do Centro de Investigação Biomédica (CBMR) da Universidade do Algarve. Murganhos com 18 meses de idade, com um peso corporal médio de 20-25g, foram alojados em grupos de 2 animais por gaiola, numa sala com temperatura/humidade ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) controladas, em ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, tendo os mesmos acesso livre a comida e água.

Após a injeção estereotáxica com vectores lentivirais estes animais foram divididos aleatoriamente nos três grupos experimentais do estudo: 6 animais injetados com a ataxina-2 *wild-type* (forma humana), 5 animais injetados com o GFP e 5 animais não injetados (Figura 11).

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 *ALBUM*, referência 421/2019).



**Figura 11 - Desenho experimental.**

O estudo iniciou-se no décimo segundo mês de idade dos animais com as pesagens, análises comportamentais e os testes de intolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT). No segundo mês de estudo realizou-se a injeção esterotáxica que nos permitiu dividir os animais em três grupos experimentais diferentes. O sacrifício realizou-se 4 meses após a injeção, e recolheu-se o fígado, o pâncreas, o intestino, o tecido adiposo branco (white adipose tissue – WAT, em inglês), o tecido adiposo castanho (brown adipose tissue – BAT, em inglês), a pele, a perna, o músculo e o baço para análise histológica. Já para análise molecular recolheu-se o cérebro, o hipotálamo, o músculo, o fígado, o pâncreas e o tecido adiposo branco (WAT).

## 1.2. Vectores virais

Os vetores lentivirais foram produzidos a partir de cDNA codificante para a *ATXN2* humana com 23 repetições CAG e por cDNA que codifica para o GFP, ambos sob o controlo do promotor fosfoglicerato quinase 1 (PGK1). Os cDNAs foram clonados em vetores lentivirais inativos e produzidos de acordo com métodos anteriormente descritos pela Viral Vector (Coimbra, Portugal) (de Almeida *et al.*, 2002). As amostras virais foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem usadas.

### 1.3. Injeção esterotáxica

No segundo mês após o início do estudo, foram realizadas as injeções estereotáxicas nos animais com os vetores lentivirais codificando para a *ATXN2* e para o GFP. Para tal, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina (100 mg/ml, Dechar) e medetomidina (1 mg/ml, Esteve) (50-75 mg/kg +1-10 mg/kg IP) e foram então colocados numa estrutura estereotáxica (Stoelting Company, USA); com as orelhas e os dentes incisivos superiores apoiados nas barras de suporte de modo a imobilizar o crânio dos animais permitindo assim a identificação do ponto de bregma, o qual é utilizado como um ponto de referência para a origem das coordenadas. Estas coordenadas hipotalâmicas foram definidas utilizando o The Paxinos and Franklin's Mouse Brain Atlas. A injeção foi realizada bilateralmente, visando ambos os lados do núcleo arqueado do hipotálamo: 0,5 mm lateral à linha média (em cada lado do cérebro), 1,65 mm posterior ao bregma e -5,8 mm ventral à superfície do cérebro: (AP= -1,65; DL= +/-0,5; VM= -5,8) (Franklin e Paxinos 2019). Para perfurar o crânio foi utilizada uma broca cirúrgica e os animais receberam 400 ng/p24 dos respetivos vetores em cada lado do hipotálamo. Esta injeção foi realizada numa taxa de 0,2 µl/min usando uma seringa de 10 mL (Hamilton) acoplada a um injetor estereotáxico Quintessencial (QSI™) (Stoelting Company). No fim da administração a agulha permaneceu no local por 5 min de modo a minimizar o refluxo (Aveleira et al., 2015). Por fim os animais foram suturados e foi administrado um reversor de anestesia; Atipamezole (5 mg/ml, Esteve) (1-2,5 mg/kg IM ou SC). Todos os cuidados pós-injeção foram realizados e o animal foi monitorizado cuidadosamente nos dias seguintes à cirurgia estereotáxica.

### 1.4. Monitorização do Peso Corporal

O peso corporal de cada animal foi registado uma vez por semana, iniciando-se um mês antes da injeção estereotáxica até ao dia do sacrifício. Na análise do peso corporal foram realizados cálculos de modo a calcular o ganho de peso corporal total (g) e o ganho de peso corporal cumulativo (g) .

### 1.5. Estudos Comportamentais

Para analisar a atividade locomotora e o comportamento dos animais foram realizados testes de campo aberto (*open-field tests*). Esta avaliação foi realizada uma vez por mês, iniciando-se três semanas antes da injeção estereotáxica e finalizando-se uma semana antes do sacrifício dos murganhos. Nestes estudos foram analisados 9 animais, 3 por cada grupo experimental. Os animais foram colocados numa caixa quadrada de 40x40 cm e 40 cm de altura de paredes, numa sala com controlo de atenuação acústica, iluminada por luz branca durante o teste. Toda a caixa é transparente e o seu piso foi dividido por linhas de modo a formar nove quadrados de iguais dimensões, sendo que foi definido um quadrado como zona central e os restantes oito quadrados, ao longo das paredes, como zonas periféricas. Os murganhos foram colocados, de forma cuidadosa, na zona central e a sua atividade e comportamento registados por 10 min, a partir de uma câmara GoPro Hero (GoPro Inc., EUA). Posteriormente, diversos parâmetros foram medidos usando um software de rastreamento comportamental (ANY-maze) (Stoelting Company, Europa): distância total, velocidade média, o tempo que passam imóveis, número de cruzamentos de linha, número de entradas e tempo no centro. Estes parâmetros foram obtidos por meio das gravações de vídeo, de forma a permitir a análise posterior. Devido a problemas no disco rígido onde se encontravam os vídeos, a maioria deste ficaram danificadas não sendo possível fazer uma análise de modo a obter qualquer tipo de resultados.

### 1.6. Testes de tolerância à glucose

O GTT (*glucose tolerance test*) realizou-se no 1º mês da experiência, previamente à injeção estereotáxica, em 6 animais e após a injeção, anteriormente ao sacrifício, em 8 animais. Aos animais dos três grupos experimentais, foram retiradas a comida e a cama por um período de 12-16 horas (período noturno), no entanto a água permaneceu disponível. Os níveis de glucose foram determinados por meio de amostras de sangue, obtidas a partir de um corte na ponta da cauda, iniciando-se a sua medição ao tempo zero, isto é, quando os animais se encontravam em jejum. Posteriormente os animais foram injetados intraperitonealmente com uma solução de glucose a 20% (Fisher Chemical-G/0500/60), dissolvida numa solução salina, NaCl 0,9% e o volume da solução foi calculado por meio da fórmula: Peso corporal (PC) (g) X 10µl de solução de

glucose a 20% (Andrikopoulos et al., 2008). Os níveis de glucose foram depois medidos aos 5, 15, 30, 60, 90, e 120 min após a injeção. Para a medição dos níveis de glucose no sangue utilizou-se o *FreeStyle Precision Neon glucometer e o FreeStyle Precision strips (Abbot)*. Com os resultados obtidos foi possível calcular a *area under the curve* (AUC) convertendo-se os resultados de glucose no sangue num logaritmo natural (Ln) e a área total do pico foi calculada usando a análise xy. Calculou-se então a AUC total dos 0 aos 120 min. Com os resultados foi também possível analisar e comparar os grupos utilizando o one-away (ANOVA), com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

#### 1.7. Teste de tolerância à insulina

De forma idêntica ao que ocorreu no GTT, o ITT (*insulin tolerance test*) também foi realizado ao 1º mês de estudo ( $n=6$ ) e no 6º mês ( $n=8$ ). Para a realização deste teste, os animais ficaram sem comida por um período de 4-6 horas. Foi de novo cortada a ponta da cauda e o sangue obtido foi utilizado para medir os níveis de glucose em jejum (tempo 0). Neste teste, os animais foram injetados intraperitonealmente com uma solução de insulina humana a 4 mg/ml (Gibco™) dissolvido numa solução salina tamponizante com fosfato (PBS X1), o volume da solução foi calculado pela fórmula:  $PC (g) \times 7,5 \mu l$  de solução de insulina a 4 mg/ml. Os níveis de glucose foram medidos aos 5, 15, 30, 60, 90, e 120 min após a injeção de insulina. Para a medição dos níveis de glucose no sangue utilizouse o *FreeStyle Precision Neon glucometer e o FreeStyle Precision strips (Abbot)*. No final dos 120 min, os animais foram injetados com 20% de uma solução de glucose de modo a reverter o efeito da insulina e prevenir uma eventual morte do animal. Com os resultados obtidos foi possível calcular a *area under the curve* (AUC) convertendo-se os resultados de glucose no sangue num logaritmo natural (Ln) e a área total do pico foi calculada usando a análise xy. Calculou-se então a AUC total dos 5 aos 30 min, no caso do ITT é comum analisar-se os primeiros 30 min de teste sendo que posteriormente tende a haver uma estabilização. Com os resultados foi ainda possível analisar e realizar as comparações entre os 3 grupos, utilizando-se o two-away (ANOVA), com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

## 1.8. Recolha do sangue e de tecidos

Quatro meses após a injeção estereotáxica os animais foram sacrificados por decapitação, sendo o sangue recolhido. A partir deste, o soro foi obtido por meio de uma centrifugação a 2000g por 15 min, a 4°C, e após este tempo o soro foi armazenado a -80°C para posterior análise. De seguida, foi removido o cérebro e o hipotálamo foi dissecado, o cérebro foi reservado a -80°C, já o hipotálamo foi conservado também a -80°C mas para análise molecular. Posteriormente foi recolhido o fígado, baço, tecido adiposo branco (*white adipose tissue* – *WAT*, em inglês) e o tecido adiposo castanho (*brown adipose tissue* – *BAT*, em inglês), os quais foram pesados. O fígado e o WAT foram divididos; metade foi preservado em tampão formalina para análise histológica e a outra metade foi conservada a -80°C para análise molecular. O baço foi apenas reservado para análise histológica, enquanto que o BAT foi reservado apenas para análise molecular. Para além destes órgãos, foi ainda retirado o intestino, a pele, o osso e o músculo para posterior análise histológica.

### 1. Análise Histológica

#### 1.1. Preparação dos cortes de parafina

Os órgãos e tecidos foram previamente fixados numa solução de formaldeído e divididos em fragmentos de menores dimensões para serem colocados em cassetes de processamento/ incorporação de tecidos. Os tecidos foram posteriormente desidratados numa solução de etanol a 70% (v/v) (diluição de Fisher Chemical) durante 1 hora, durante 45 min em etanol a 95% (v/v), durante 40 min a etanol a 95% (v/v) e por fim em duas séries de etanol a 100% (v/v) durante 1 hora cada, seguindo-se uma limpeza em duas séries de xileno (Fisher Chemical) por 1 hora cada e uma infiltração em duas séries de parafina (Luso Palex) na incubadora a 56°C por 1 hora. As cassetes de processamento/incorporação de tecido (Labor Spirit) foram removidas da incubadora. Os órgãos e as amostras de tecidos foram incorporados em moldes (Tebu-bio) na orientação desejada e preenchidos com parafina líquida a 56°C. As cassetes com os tecidos foram colocadas para cima e o bloco foi resfriado e endurecido. Por fim o bloco

foi removido do molde e armazenado à temperatura ambiente num local seco até ser utilizado.

## 1.2. Secções

Os blocos de parafina foram divididos em secções de parafina a partir de um micrótomo rotativo HM 325 (Thermo Fisher Scientific) à temperatura ambiente. Os blocos de parafina contendo o tecido adiposo branco e castanho foram divididos em secções de parafina de 4 a 5  $\mu\text{m}$  de espessura. Os restantes órgãos foram divididos em cortes de parafina com 3 a 4  $\mu\text{m}$  de espessura. As secções foram então colocadas em lâminas de microscopia e armazenadas à temperatura ambiente.

## 1.3. Coloração hematoxilina-eosina

Para a coloração hematoxilina-eosina foram seguidas as diretrizes do fabricante (Merck Milipore). De modo geral, as secções de parafina foram colocadas em porta-lâminas de microscopia e desparafinizadas com duas lavagens de xileno durante 2 e 3 min e foram reidratadas com etanol a 100% (v/v), etanol a 95% (v/v) durante 4 e 2 min, respetivamente, e por fim foram feitas duas lavagens em água destilada por 30 segundos cada. Foram corados os cortes com a solução hematoxilina modificada de acordo com Gill III (Merck Milipore), durante 30 segundos, de seguida lavou-se 2 vezes em água destilada durante 2 e 1 minuto, contrastando com a solução aquosa de eosina Y a 0,5% por 1 minuto e lavado novamente em duas séries de água destilada por 1 min cada. Para desidratar e limpar, os cortes foram submetidos a etanol a 95% (v/v) durante 1 min cada e a duas lavagens em xileno durante 2 min. As secções foram deixadas a secar e de seguida montadas com meio de montagem Richard-Allan Scientific (HM325, Thermo Fisher Scientific) em lâminas de microscopia. Após a coloração com hematoxilina-eosina, os núcleos das células ficaram corados com roxos escuros e o citoplasma das células coraram de rosa (citoplasma acidofílico) ou roxo claro (citoplasma basofílico).

### 1.3.1. Microscopia

Através da lâminas com coloração hematoxilina-eosina do fígado, do pâncreas, dos intestinos, do BAT e do WAT, foram recolhidas diferentes imagens no microscópio

Zeiss Axio Imager Z2, utilizando as objetivas de 10x, 20x e 40x; estas imagens foram capturadas por uma câmara AXIONCAM-ICC3 associada ao software AxionVision. As imagens do pâncreas e do WAT, obtidas com a objetiva de 10x, foram analisadas a partir do software de imagem J. No caso do pâncreas foi possível calcular o número e a área de ilhotas pancreáticas presentes, já no WAT as imagens permitiram calcular a área de adipócitos e respetiva média.

## 2. Análise Molecular

### 2.1. Extração de RNA e Proteína

Para a extração de RNA e proteína foram adicionados 1100 µl de QIAzol às amostras (hipotálamo), as quais foram homogeneizadas por 5 min. Posteriormente adicionaram-se 200 µl de d-cloroformio e deixou-se à temperatura ambiente por 2-3 min e após esse período as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, por 15 min a 4°C. Da centrifugação foi separada a fase aquosa (contendo o RNA), das restantes fases. Para a extração de RNA foi seguido o protocolo indicado pelo kit utilizado, *Nucleospin RNA kit - NZYtech*. A concentração e a pureza foram determinadas utilizando um Espectrofotómetro 1000 Nanodrop. Relativamente à proteína foi adicionado à interfase e à fase de fenol, 300 µl de etanol a 100% e incubou-se por 2-3 minutos para posteriormente se centrifugar a 2000g por 2 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi passado para tubos tipo Falcon de 15 ml. Aos tubos tipo Falcon foram adicionados 1,5 ml de isopropanol e após 15 seg o volume foi dividido para dois tubos do tipo eppendorf de 1,5 ml, ficando com as amostras duplicadas, ao que se seguiu uma incubação por 10 min. Depois centrifugaram-se as amostras a 12000g por 10 min a 4°C, de onde se descartou o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 1 ml de solução de guanidina-etanol ao pellet, fez-se um vortex e incubou-se por 20 minutos, para de seguida ser centrifugado a 7500g por 5 min à temperatura ambiente, após a qual se descartou o sobrenadante. Este processo, desde a centrifugação a 12000g, foi repetido por mais duas vezes. Após este processo, foi adicionado ao pellet 1 ml de etanol a 100% e deixou-se a incubar por 20 min, após os quais se centrifugou uma última vez a 7500g por 5 min à temperatura ambiente. De seguida removeu-se o sobrenadante e deixou-se secar o pellet por 10 min. Por fim adicionou-se 50 µl de uma solução de ureia/DTT,

previamente preparada, e juntaram-se os volumes duplicados, para se incubar à temperatura ambiente por 1 hora. Após este tempo incubaram-se as amostras a 95°C por 3 min, de seguida reservou-se em gelo.

## 2.2. PCR quantitativo (qPCR)

A partir da extração do RNA do hipotálamo sintetizou-se cDNA seguindo as instruções do kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad). No termociclador, são efetuados 30 a 40 ciclos que possuem três etapas, cada, as quais vão permitir a amplificação do cDNA a partir do RNA. Para o *real-time polymerase chain reaction* (PCR em tempo real) utilizou-se o kit SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), o qual segue o seguinte protocolo. Um ciclo inicial a 30s, um ciclo de 45 ciclos que se dividem em dois passos: inicialmente a 95° C por 5s e posteriormente a 55°C por 15s. Para a curva de calibração o protocolo inicia-se depois do PCR quantitativo, a 65°C numa duração de 5s que aumentam a cada passo 0,5°C até ser atingido os 95°C. As diluições correspondentes a cada primer utilizado são as aconselhadas para o tecido em estudo (Tabela 3). Por meio do software BioRadCFX (Bio-Rad) determinou-se os valores de limite mínimo de ciclos, as curvas padrão e a eficiência do PCR e dos primers.

**Tabela 3** - Primers e diluições utilizadas no qPCR. As respetivas diluições são as mais adequadas para o tipo de tecido a analisar, que neste caso era o hipotálamo. O primer GAPDH serviu de gene controlo interno nesta análise.

Primers	Diluições
GAPDH	1:10/1:20
ATAXN2	1:10
LC3	1:20
POMC	1:20
p62	1:20
Beclina	1:20
AgRP	1:20
TNF- $\alpha$	1:10
PABC1	1:10
mTOR	1:10

## 1.1. Análise Estatística

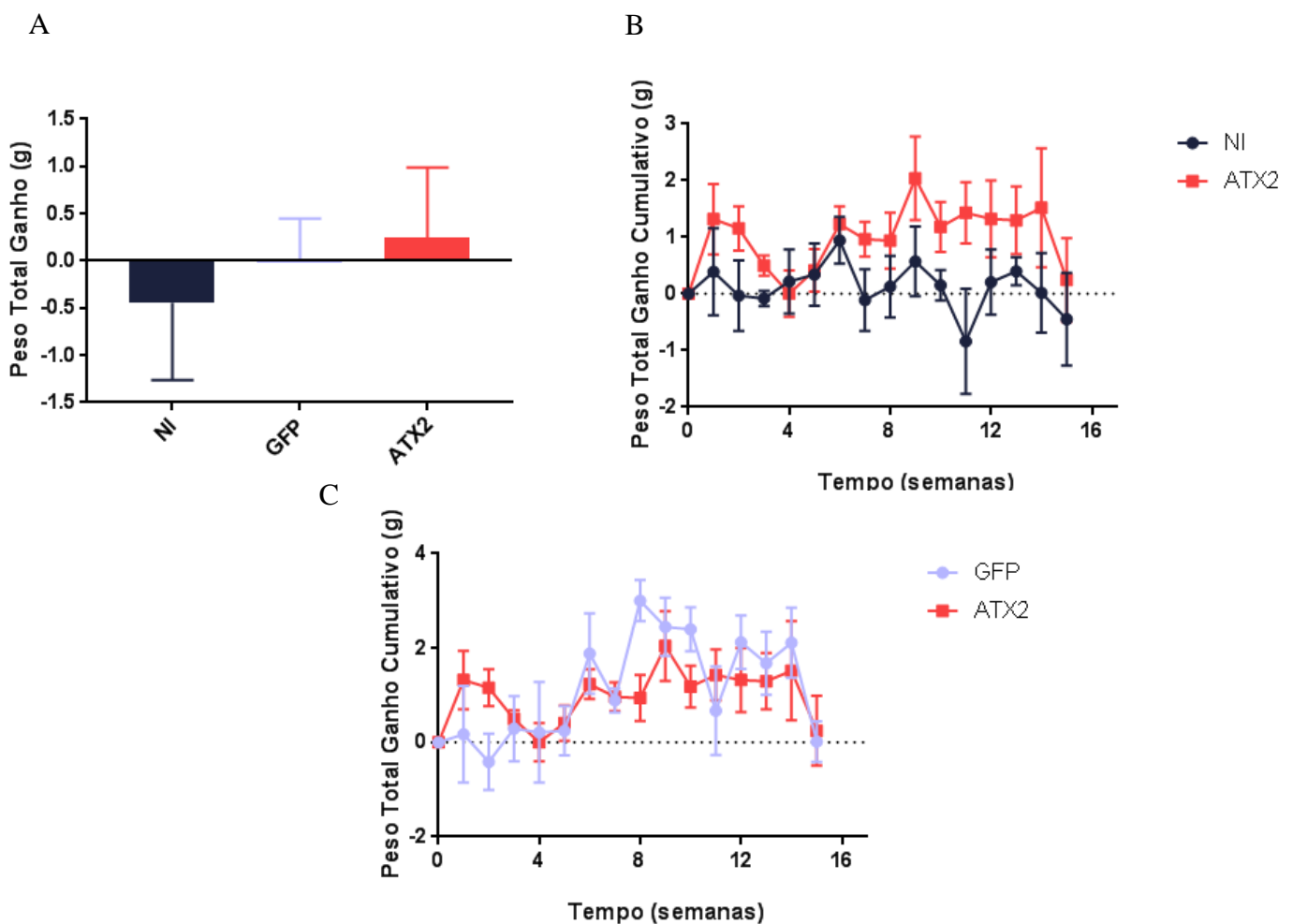
A análise estatística e os gráficos obtiveram-se através do GraphPad Prism 6 (GraphPad software Prism). Os resultados são expressos em valores médio mais ou menos o erro padrão médio. Para a comparação entre dois grupos utilizou-se o Unpaired t-test e para a comparação dos três grupos utilizou-se one-away (ANOVA), com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni. A significância estatística foi definida para *P-value* < 0,05.

## Resultados

### 1. Monitorização do peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo da experiência.

Com o processo de envelhecimento são várias as alterações que ocorrem a nível corporal e metabólico. Em murganhos, estas alterações, podem refletir-se por exemplo, no peso corporal dos animais que inicialmente aumenta com a idade, diminuindo em idades mais avançadas (Stebbing et al., 2016; Goodrik et al., 1990). Neste estudo, os animais dos diferentes grupos experimentais ( $n=19$ ), encontravam-se alojados em grupos de 2 animais por gaiola, tendo os mesmos, acesso livre a comida e a água até ao dia do sacrifício. Os animais foram pesados uma vez por semana durante as 15 semanas de estudo. O ganho de peso corporal total e cumulativo foi analisado, permitindo investigar as possíveis alterações de peso com o passar da idade e com a expressão da ataxina-2 (ATXN2) mediada por vectores lentivirais no hipotálamo (Figura 12). Desta forma, observou-se um ligeiro aumento no peso corporal total ganho do grupo injetado com a ataxina-2 (embora sem significância estatística), comparativamente com os grupos de animais não injetados (NI) e dos animais injetados com GFP [NI ( $n=5$ ) versus ATX2 ( $n=6$ );  $P$ -value=0,5448; GFP ( $n=4$ ) versus ATX2 ( $n=6$ );  $P$ -value=0,8217–*Unpaired Student's t-test* ] (Figura 12 – A). Relativamente ao ganho peso corporal total cumulativo, observaram-se variações semelhantes nos pesos de todos os grupos experimentais, os quais não apresentaram qualquer aumento ou diminuição contínua. Ao longo do tempo os animais injetados com ATX2 apresentam pesos semelhantes aos animais injetados com GFP ( Figura 12 - C)[GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) - 0 semanas  $P$ -value >0,9999; 1 semana:  $P$ -value >0,9999; 2 semanas:  $P$ -value >0,9999; 3 semanas:  $P$ -value >0,9999; 4 semanas:  $P$ -value >0,9999; 5semanas:  $P$ -value >0,9999; 6semanas:  $P$ -value >0,9999; 7 semanas:  $P$ -value >0,9999; . 8 semanas :  $P$ -value = 0,3053; 9 semanas:  $P$ -value >0,9999; 10 semanas :  $P$ -value >0,9999; 11 semanas:  $P$ -value >0,9999; 12 semanas:  $P$ -value>0,9999; 13 semanas:  $P$ -value >0,9999; 14 semanas:  $P$ -value >0,9999; 15 semanas:  $P$ -value >0,9999 – *Unpaired Student's t-test* e Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni's]. De um modo geral, o grupo dos animais NI apresenta uma diminuição de peso comparativamente aos animais ATX2 (Figura 12 - B) [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ )- 0 semanas:  $P$ -value >0,9999; 1 semana:  $P$ -value >0,9999; 2 semanas:  $P$ -value >0,9999; 3semanas:  $P$ -value >0,9999; 4 semanas:  $P$ -value >0,9999; 5 semanas:  $P$ -value >0,9999; 6 semanas:  $P$ -value >0,9999; 7 semanas:  $P$ -value >0,9999;

8 semanas:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 9 semanas:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 10 semanas:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 11 semanas:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 12 semanas:  $P$ -value  $=0,0825$ ; 13 semanas:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 14 semanas:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 15 semanas:  $P$ -value  $>0,9999$  – *Unpaired Student's t-test* e Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni's]. Observou-se ainda que na última semana do estudo, todos os animais apresentaram uma diminuição drástica no peso (Figura 12 B/C). De forma uma geral, apesar dos animais injetados com a ataxina-2 terem apresentado um ligeiro aumento de peso em relação aos grupos controlo, este não foi significativo.



**Figura 12 - Monitorização do peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo da experiência.**

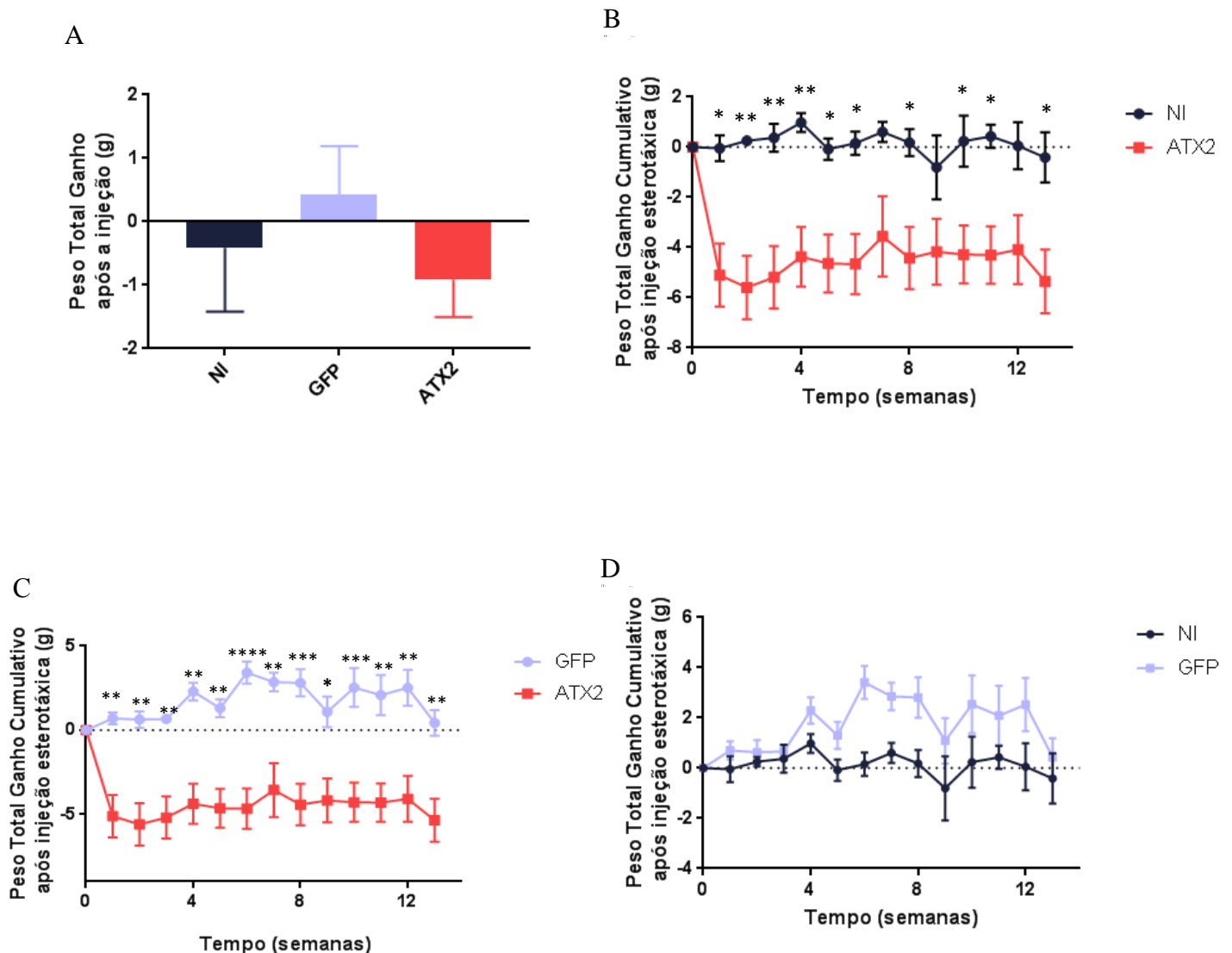
**A)** Os animais injetados com a ATX2 apresentaram um aumento não significativo no ganho de peso total em relação aos animais NI e aos GFP (NI  $n=5$  versus ATX2  $n=6$ ;  $p$ -value= $0,5448$ ; GFP  $n=4$  versus ATX2  $n=6$ ;  $p$ -value= $0,8217$ ). **B)** De modo geral, os animais NI apresentam uma perda de peso com o passar das semanas relativamente aos animais injetados com a ATX2

[NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ )]. C) Inicialmente o grupo injetado com GFP mostraram um aumento de peso semelhante aos animais do grupo ATX2 [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ )] – *Unpaired Student's t-test* e Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni's.

2. A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo conduz a uma diminuição do peso corporal.

Um estudo anterior mostrou que o knockout total da expressão da ataxina-2 em murganhos conduz a um aumento de peso corporal e ao desenvolvimento de obesidade abdominal e esteatose hepática (Lastres-Becker et al., 2008). Da mesma forma foi demonstrado, que o silenciamento específico da ataxina-2 no hipotálamo conduz a um aumento do peso corporal e da ingestão de comida (Carmo-Silva et al., 2021 *submitted*). Assim, em seguida quisemos analisar o impacto da sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo no contexto do envelhecimento. Passados 2 meses do início do estudo, os murganhos foram submetidos a uma injeção esterotáxica bilateral no hipotálamo de vectores lentivirais que codificam para a ataxina-2 *wild-type* (Q23), e como controlo um grupo de animais foi injetado com vectores lentivirais que codificavam para o GFP. Adicionalmente, constituímos um grupo de animais não injetados, constituindo assim três grupos experimentais. O grupo dos NI ( $n=5$ ) constituído por 4 fêmeas e 1 macho. O grupo do GFP ( $n=5$ ) com 4 fêmeas e 1 macho. E por fim o grupo da ATX2 ( $n=6$ ) com 4 fêmeas e 2 machos. É importante referir que uma fêmea do grupo GFP morreu após a injeção esterotáxica, devido a problemas provocados pela idade avançada do animal. De modo a observar o impacto da ataxina-2 no peso corporal dos animais e de modo a demonstrar que as injeções esterotáxicas do gene de controlo (GFP) não interferem com as funções do hipotálamo, foram analisados o peso corporal ganho e o peso corporal ganho cumulativo (Figura 13). Assim, observou-se que os murganhos injetados com a ataxina-2 apresentaram uma diminuição do peso corporal comparativamente a grupo de murganhos GFP, no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 13 – A). Relativamente ao ganho de peso corporal total cumulativo, observou-se que os animais do grupo ATX2, após a injeção, demonstraram uma diminuição de peso significativa comparativamente aos animais NI (Figura 13 – B) [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ )- 0 semanas:  $P\text{-value} > 0,9999$ ; 1 semana:  $P\text{-value} = 0,0122$ ; 2 semanas:  $P\text{-value} = 0,0018$ ; 3 semanas:  $P\text{-value} = 0,0037$ ; 4 semanas:  $P\text{-value} = 0,0062$ ; 5 semanas:  $P\text{-value} = 0,0361$ ; 6 semanas:  $P\text{-value} = 0,0205$ ; 7 semanas:  $P\text{-value} = 0,0801$ ; 8 semanas:  $P\text{-value} = 0,0328$ ; 9 semanas:  $P\text{-value} = 0,3472$ ; 10 semanas:  $P\text{-value} = 0,0390$ ; 11

semanas:  $P\text{-value} = 0,0249$ ; 12 semanas:  $P\text{-value} = 0,00848$ ; 13 semanas:  $P\text{-value} = 0,0157$  – Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni's ]]. O grupo dos animais GFP continua a apresentar um aumento significativo de peso ao longo das semanas comparativamente aos animais injetados com a ataxina-2, que apresentaram uma diminuição de peso após a injeção (Figura 13 – C) [GFP (n=4) vs ATX2 (n=6) – 0 semanas:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 1 semana:  $P\text{-value} = 0,0078$ ; 2 semanas:  $P\text{-value} = 0,0032$ ; 3 semanas:  $P\text{-value} = 0,0072$ ; 4 semanas:  $P\text{-value} = 0,0012$ ; 5 semanas:  $P\text{-value} = 0,0059$ ; 6 semanas:  $P\text{-value} <0,0001$ ; 7 semanas:  $P\text{-value} = 0,0021$ ; 8 semanas:  $P\text{-value} = 0,0003$ ; 9 semanas:  $P\text{-value} = 0,0239$ ; 10 semanas:  $P\text{-value} = 0,0009$ ; 11 semanas:  $P\text{-value} = 0,0022$ ; 12 semanas:  $P\text{-value} = 0,0014$ ; 13 semanas:  $P\text{-value} = 0,0082$  –Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni's ]. Foi feita ainda uma comparação entre os grupos NI e GFP, observando-se que os animais GFP apresentam um aumento de peso a partir da quarta semana sendo que se observa uma diferença significativa na sexta semana (Figura 13 – D) [NI (n=5) vs GFP (n=4) – 0 semanas:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 1 semana:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 2 semanas:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 3 semanas:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 4 semanas:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 5 semanas:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 6 semanas:  $P\text{-value} = 0,0229$ ; 7 semanas:  $P\text{-value} = 0,3836$ ; 8 semanas:  $P\text{-value} = 0,1451$ ; 9 semanas:  $P\text{-value} = 0,8817$ ; 10 semanas:  $P\text{-value} = 0,3446$ ; 11 semanas:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 12 semanas:  $P\text{-value} = 0,2193$ ; 13 semanas:  $P\text{-value} >0,9999$ –Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni's ].



**Figura 13- A sobre-expressão de ataxina-2 no hipotálamo conduz a uma diminuição do peso corporal em relação aos grupos controlo.**

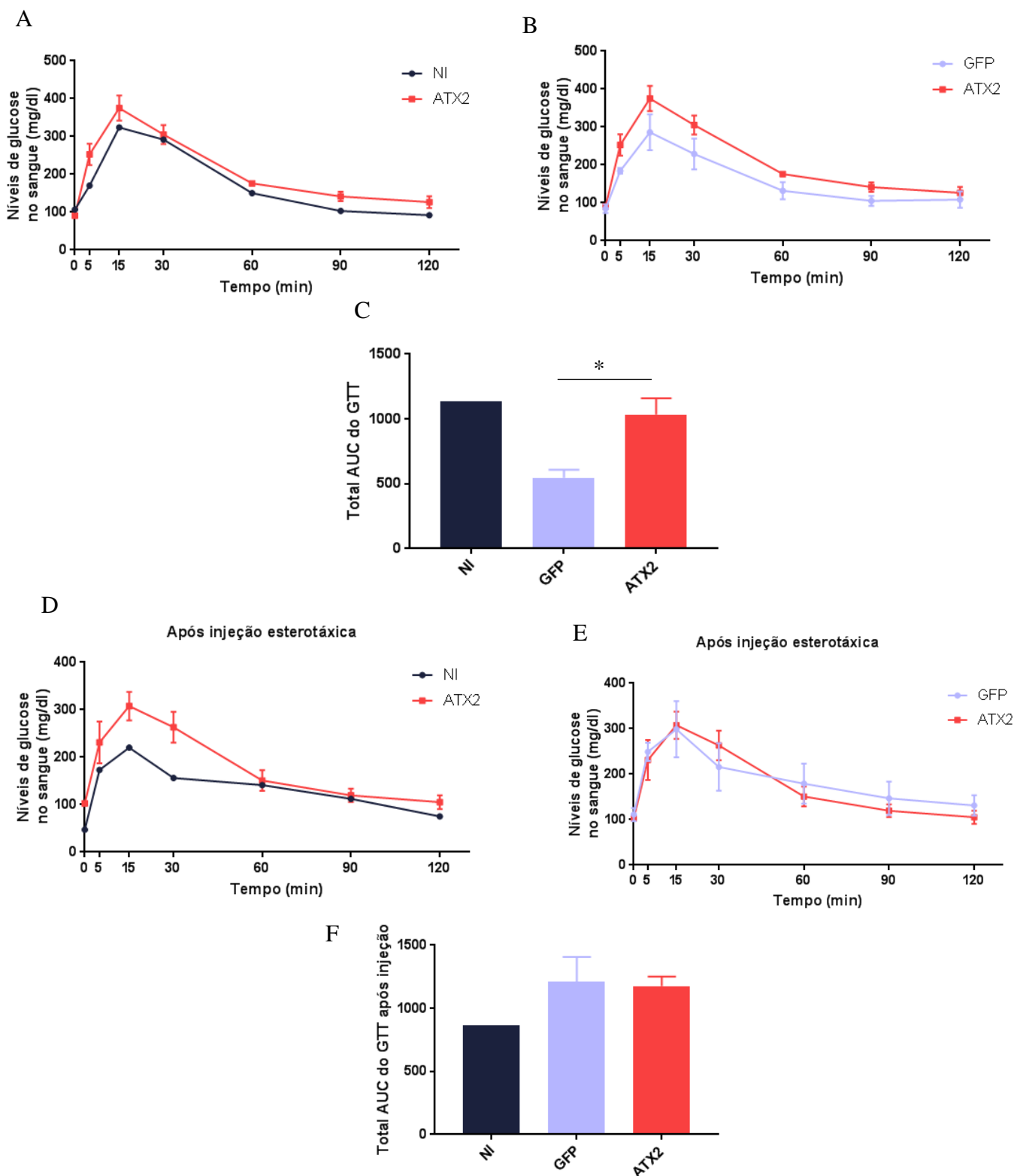
Após a injeção analisou-se o peso dos animais de modo a perceber o impacto da expressão da ataxina-2 no hipotálamo. **A)** Os murganços do grupo ATX2 apresentaram um decréscimo no peso corporal total ganho comparativamente ao grupo dos animais GFP, embora sem significância estatística (NI  $n=5$  versus ATX2  $n=6$  -  $p\text{-value}=0,6680$ ; GFP  $n=4$  versus ATX2  $n=6$  -  $p\text{-value}=0,1977$  - *Unpaired Student's t-test*). **B)** A partir da segunda semana após a injeção observou-se uma diminuição do peso dos animais do grupo ATX2 comparativamente ao grupo dos NI ( NI  $n=5$  versus ATX2  $n=6$ ). **C)** A partir da segunda semana após a injeção observou-se uma diminuição do peso dos animais do grupo comparativamente aos murganços injetados com GFP. **D)** Após a injeção a diferença entre o grupo NI e GFP não são significativas há excepção da sexta semana onde se observou significancia ( NI  $n=5$  versus GFP  $n=4$ ) [ $P$ -

*value* < 0,05 (\*), *P-value* <0,01 (\*\*), *P-value* < 0,001 (\*\*\*), *P-value* < 0,0001 (\*\*\*\*) – Unpaired Student's t-test: A e Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni's: B-D]

3. A sobre-expressão de ataxina-2 no hipotálamo promove o aumento da sensibilidade à insulina.

A resistência à insulina é uma das condições responsáveis pelo agravamento de condições metabólicas patológicas, como a diabetes tipo 2 e a obesidade (Boucher *et al.*, 2014). Com o processo de envelhecimento há uma diminuição na sensibilidade à insulina, que induz hiperglicemia, que por sua vez promove disfunção metabólica (Frazier *et al.*, 2019). Um estudo evidenciou que o aumento de ataxina-2 no hipotálamo promove um aumento de sensibilidade à insulina (Carmo-Silva *et al.*, 2021 *submitted*). Assim, para estudar o impacto da ataxina-2 neste processo no contexto do envelhecimento, foram realizados testes de tolerância à glucose (GTT) e de tolerância à insulina (ITT), no primeiro e no último mês de estudo (Figuras 14 e 15). Para o teste de GTT, os murganhos foram submetidos a um jejum de 12-16 horas. Após esse tempo, mediram-se os níveis de glucose no sangue (t 0h). De seguida, os murganhos foram injetados intraperitonealmente com uma solução de 20% de glucose e os níveis de glucose foram registados aos 5, 15, 30, 60, 90 e 120 min após a injeção. Não foram verificadas diferenças entre grupos experimentais nos níveis de glucose (Figura 14 – A/B) [NI (*n*=1) vs ATX2 (*n*=2)- 0 min: *P-value* >0,9999; 5 min: *P-value* = 0,3714; 15 min: *P-value* >0,9999; 30 min: *P-value* >0,9999; 60 min: *P-value* >0,9999; 90 min: *P-value* >0,9999; 120 min: *P-value* >0,9999 – Unpaired Student's t-test]; [GFP (*n*=3) vs ATX2 (*n*=2)- 0 min: *P-value* >0,9999; 5 min: *P-value* = 0,6316; 15 min: *P-value* = 0,2140; 30 min: *P-value* = 0,4266; 60 min: *P-value* >0,9999; 90 min: *P-value* >0,9999; 120 min: *P-value* >0,9999 –Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni's ]. Os níveis de glucose no sangue serviram também para calcular a área sob a curva (AUC) observando-se um aumento estatisticamente significativo dos animais ATX2 comparativamente ao grupo controlo GFP, sendo que uma maior AUC se encontra associada a uma menor tolerância à glucose [GFP (*n*=3) vs ATX2 (*n*=4) - *P-value* = 0,0258 – Unpaired Student's t-test] (Figura 14 – C). Após a injeção estereotáxica, foi novamente realizado este teste (Figura 14 – D/E). Neste, observou-se que os murganhos dos grupo ATX2 registaram valores ligeiramente mais elevados de glucose,

em relação aos demais grupos experimentais, no entanto estas diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 14 – C/D) [NI ( $n=1$ ) vs ATX2 ( $n=4$ )- 0 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 5 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 15 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 30 min:  $P$ -value = 0,5850; 60 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 90 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 120 min:  $P$ -value  $>0,9999$  –Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni`s ]; [GFP ( $n=3$ ) vs ATX2 ( $n=4$ )- 0 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 5 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 15 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 30 min:  $P$ -value $>0,9999$ ; 60 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 90 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 120 min:  $P$ -value  $>0,9999$  –Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni`s]. Calculou-se também a AUC após as injeções e observou-se um aumento da AUC nos animais GFP, apesar das diferenças não serem significativas [GFP ( $n=3$ ) vs ATX2 ( $n=2$ ) -  $P$ -value = 0,8618 – *Unpaired Student`s t-test*] (Figura 14 – F). Estes resultados permitiram verificar que antes da injeção estereotáxica, os animais dos diferentes grupos experimentais apresentaram tolerância à glucose semelhante. A tolerância à glucose, demonstrada pela semelhante clearance da glucose no sangue após a administração da solução de glucose 20% entre grupos, não foi assim afetada pela injeção de ataxina-2 no hipotálamo de animais envelhecidos.



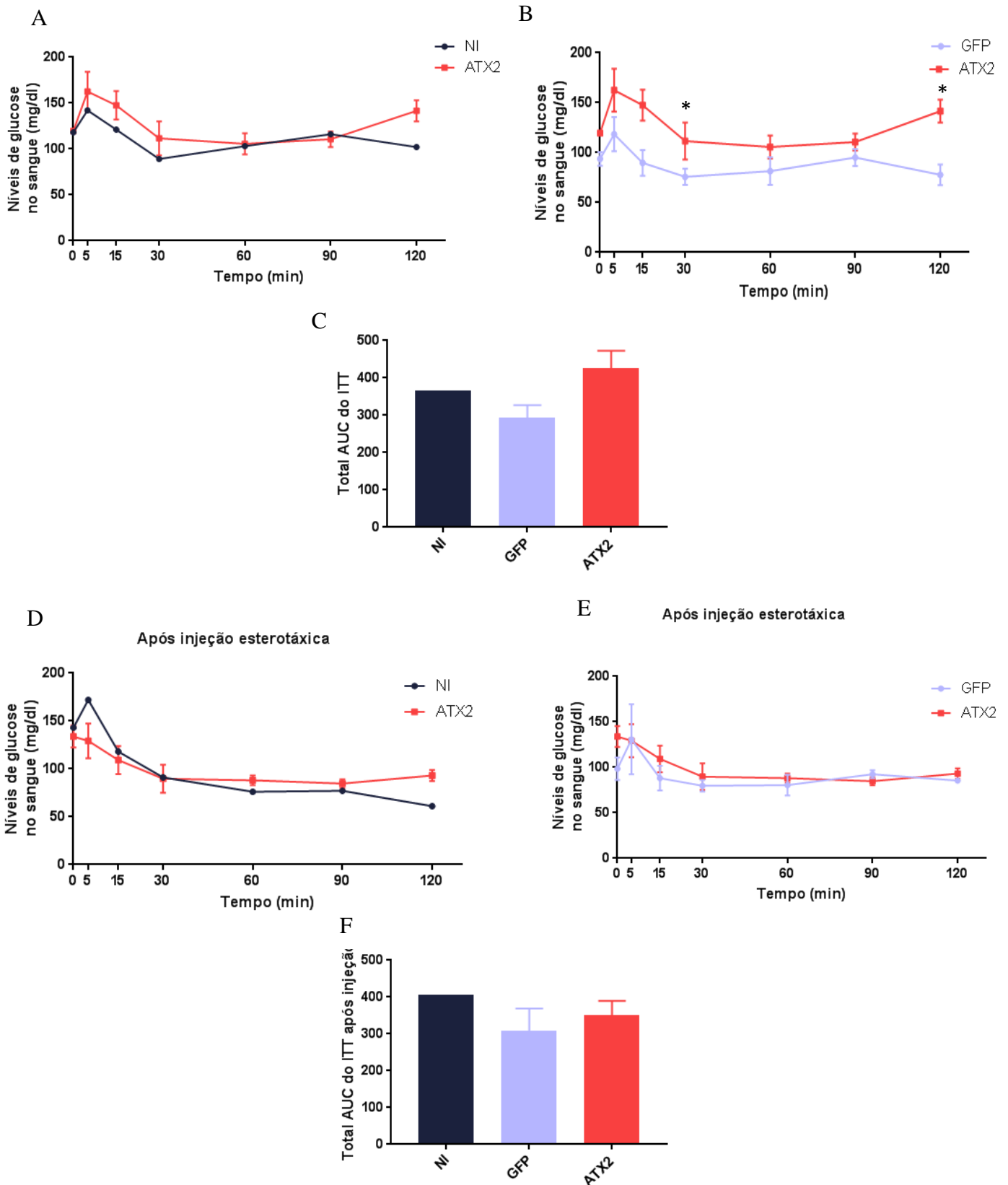
**Figura 14 - Níveis de glicose no sangue (teste GTT) nos diferentes grupos experimentais antes e depois da injeção estereotáxica.**

**A)** Comparativamente ao grupo dos NI ( $n=1$ ) os murganhos ATX2 ( $n=4$ ) apresentam níveis de glicose ligeiramente superiores. **B)** O grupo ATX2 ( $n=4$ ) apresenta níveis mais elevados de glicose relativamente aos murganhos GFP ( $n=3$ ) principalmente dos 15 aos 60 min. **C)** Os animais ATX2 ( $n=4$ ) apresentam um aumento estatisticamente significativo de AUC comparativamente ao grupo GFP ( $n=3$ ). **D)** Os murganhos NI ( $n=1$ ) apresentam níveis reduzidos de glicose em jejum e os murganhos ATX2 ( $n=4$ ) apresentam valores mais elevados,

comparativamente aos NI, entre os 15 e os 30 min. E) Após a injeção, não existem diferenças nos níveis de glucose entre o grupo GFP ( $n=3$ ) e o grupo ATX2 ( $n=4$ ) –Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni`s]. F) Observou-se um aumento de AUC nos animais GFP, no entanto não se observaram diferenças significativas.

De modo a avaliar o impacto da sobre-expressão da ataxina-2 na sensibilidade à insulina foi realizado o teste do ITT, antes e após a injeção estereotáxica (Figura 15). Para este teste os murganhos foram submetidos a um jejum de 4 horas e após esse tempo foram medidos os níveis de glucose no sangue em jejum ( $t= 0h$ ). Em seguida, foi injetada intraperitonealmente uma solução de insulina de 4 mg/ml e foram medidos os níveis de glucose aos 5, 15, 30, 60, 90 e 120 min após a injeção. Assim, antes da injeção não se observaram diferenças significativas entre os animais do grupo ATX2 em relação aos animais do grupo NI (Figura 15-A) [NI ( $n=1$ ) vs ATX2 ( $n=2$ )- 0 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 5 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 15 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 30 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 60 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 90 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 120 min:  $P$ -value  $>0,9999$  – Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni`s]. Já na comparação com os murganhos injetados com GFP, verificou-se que estes apresentaram níveis mais reduzidos de glucose no sangue comparativamente aos animais do grupo ATX2, sendo esta diferença significativa aos 30 e 120 minutos (Figura 15 – B) [GFP ( $n=3$ ) vs ATX2 ( $n=2$ )- 0 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 5 min:  $P$ -value = 0,1775; 15 min:  $P$ -value = 0,0337; 30 min:  $P$ -value = 0,4499; 60 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 90 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 120 min:  $P$ -value = 0,0157 – Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni`s]. Foi ainda calculada a AUC, analisando-se os primeiros 30 min de teste. Como tal observou-se que antes da injeção estereotáxica os animais ATX2 apresentavam maiores valores de AUC o que significaria uma menor sensibilidade à insulina [GFP ( $n=3$ ) vs ATX2 ( $n=2$ ) -  $P$ -value = 0,1006 – *Unpaired Student`s t-test*] (Figura 15- C). Após 3 meses da injeção estereotáxica o teste foi novamente realizado (Figura 15 – D/E). Assim, não se observaram diferenças nos níveis de glucose após a injeção de insulina entre os diferentes grupos experimentais. Mesmo entre os animais do grupo ATX2 e do grupo GFP, as diferenças que existiam antes da injeção estereotáxica não foram observadas (Figura 15 – C/D) [NI ( $n=1$ ) vs ATX2 ( $n=4$ )- 0 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 5 min:  $P$ -value = 0,8393; 15 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 30 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 60 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 90 min:  $P$ -value  $>0,9999$ ; 120 min:  $P$ -value  $>0,9999$  – *Unpaired Student`s*

*t-test* e Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni's]; [GFP ( $n=3$ ) vs ATX2 ( $n=4$ )- 0 min:  $P\text{-value} = 0,5915$ ; 5 min:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 15 min:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 30 min:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 60 min:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 90 min:  $P\text{-value} >0,9999$ ; 120 min:  $P\text{-value} >0,9999$  – Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni's]. Foi também calculada a AUC após a injeção estereotáxica observando-se um aumento nos animais NI e uma diminuição nos animais injetados com a ataxina-2 ainda que não se observem diferenças estatisticamente significativas [GFP ( $n=3$ ) vs ATX2 ( $n=4$ ) -  $P\text{-value} = 0,5673$  – *Unpaired Student's t-test*] (Figura 15 – F). Estes resultados permitiram verificar que após a injeção observou-se uma diminuição na AUC total nos animais injetados com ataxina-2 o que significa um aumento na sensibilidade à insulina.



**Figura 15 - A sobre-expressão de ataxina-2 não altera a sensibilidade à insulina.**

**A)** Os animais injetados com a ataxina-2 ( $n=2$ ) apresentam níveis de glicose ligeiramente superiores aos animais do grupo NI ( $n=1$ ). **B)** Os animais do grupo GFP ( $n=3$ ) apresentam

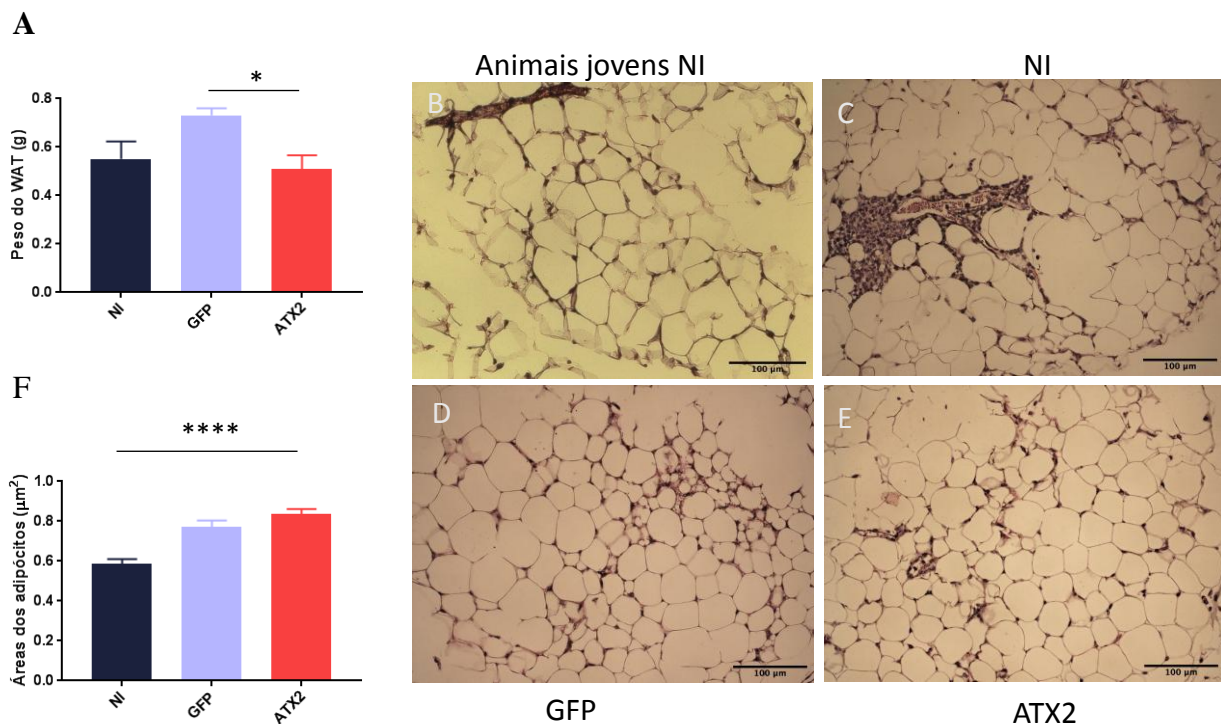
níveis de glucose no sangue ligeiramente inferiores aos murganhos ATX2 ( $n=2$ ). No entanto, as diferenças observadas entre os diferentes grupos experimentais não foram estatisticamente significativas. **C)** Os animais ATX2 ( $n=2$ ) são os que apresentam maior AUC total, **D)** Após a injeção estereotáxica, também não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de glucose entre os animais do grupo ATX2 e NI. **D)** Após a injeção esterotáxica, também não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de glucose entre os animais do grupo ATX2 e do grupo GFP. **F)** Após a injeção observa-se uma diminuição nos valores de AUC nos animais ATX2 ( $n=2$ ) e um aumento de valores no animais não injetado ( $n=1$ ), apesar de não se observarem diferenças significativas. [ $P$ -value < 0,05 (\*),  $P$ -value < 0,01 (\*\*),  $P$ -value < 0,001 (\*\*\*),  $P$ -value < 0,0001 (\*\*\*\*) –Two-way ANOVA com testes de múltiplas comparações com Bonferroni`s: A-B-D-E].

4. A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo promove uma diminuição no peso do tecido adiposo branco e aumento na área dos adipócitos.

Com o processo de envelhecimento origina-se um desequilíbrio no balanço energético, por meio de alterações nos processos anabólicos e catabólicos. Com o avançar da idade os processos catabólicos prevalecem sobre os anabólicos, havendo uma menor ingestão de alimentos, o que irá provocar uma desregulação nas funções de diversos órgãos (Petevari et al., 2011). No entanto, foi demonstrado que a expressão da ataxina-2 promove um equilíbrio nas funções do hipotálamo, melhorando deste modo o equilíbrio energético (Carmo-Silva et al., 2021 *submitted*). Assim, em seguida analisámos mais pormenorizadamente alguns órgãos e tecidos que desempenham papéis importantes no metabolismo, dos quais se destacam o tecido adiposo branco (WAT), o fígado, o pâncreas, o tecido adiposo castanho (BAT) e o intestino (Figura 16, 17 e 18) (Anexo1 e 2).

Em relação ao WAT, com o envelhecimento, este apresenta um declínio de funções associados a mudanças na deposição de lípidos, ocorrendo um aumento na acumulação de lípidos ectópicos e inflamação, que contribuem para a inibição da diferenciação de pré-adipócitos, a acumulação de células senescentes (Stout et al., 2014; Roger et al., 2012). Na avaliação do WAT efetuou-se a pesagem do tecido no dia do sacrifício dos animais e posterior análise histológica (Figura 16). Na comparação do peso do WAT entre os animais do grupo do NI com o grupo ATX2 não se registaram diferenças significativas [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,6566 – *Unpaired Student`s t-test*]. No entanto, observou-se uma diferença de pesos estatisticamente significativa entre o grupo de animais injetados com GFP, comparativamente aos animais injetados com ATX2, sendo que estes últimos apresentavam um WAT com menos peso [GFP ( $n=4$ ) vs

ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,0349 – *Unpaired Student's t-test*] (Figura 16 – A). Na análise histológica das secções coradas com hematoxilina-eosina, foram obtidas imagens de microscopia, observando-se diferenças nos tecidos dos murganhos do grupo NI, comparativamente aos animais do grupo ATX2 (Figura 16 – B/C/D//E). Realizou-se também uma análise da área dos adipócitos, observando-se uma maior área nos adipócitos dos animais injetados com ataxina-2 relativamente aos animais do grupo NI [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value < 0,0001; GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,1243 – *Unpaired Student's t-test*] (Figura 16 – F).



**Figura 16 - A sobre-expressão de ataxina-2 reduz o peso do tecido WAT e promove um aumento na área dos adipócitos.**

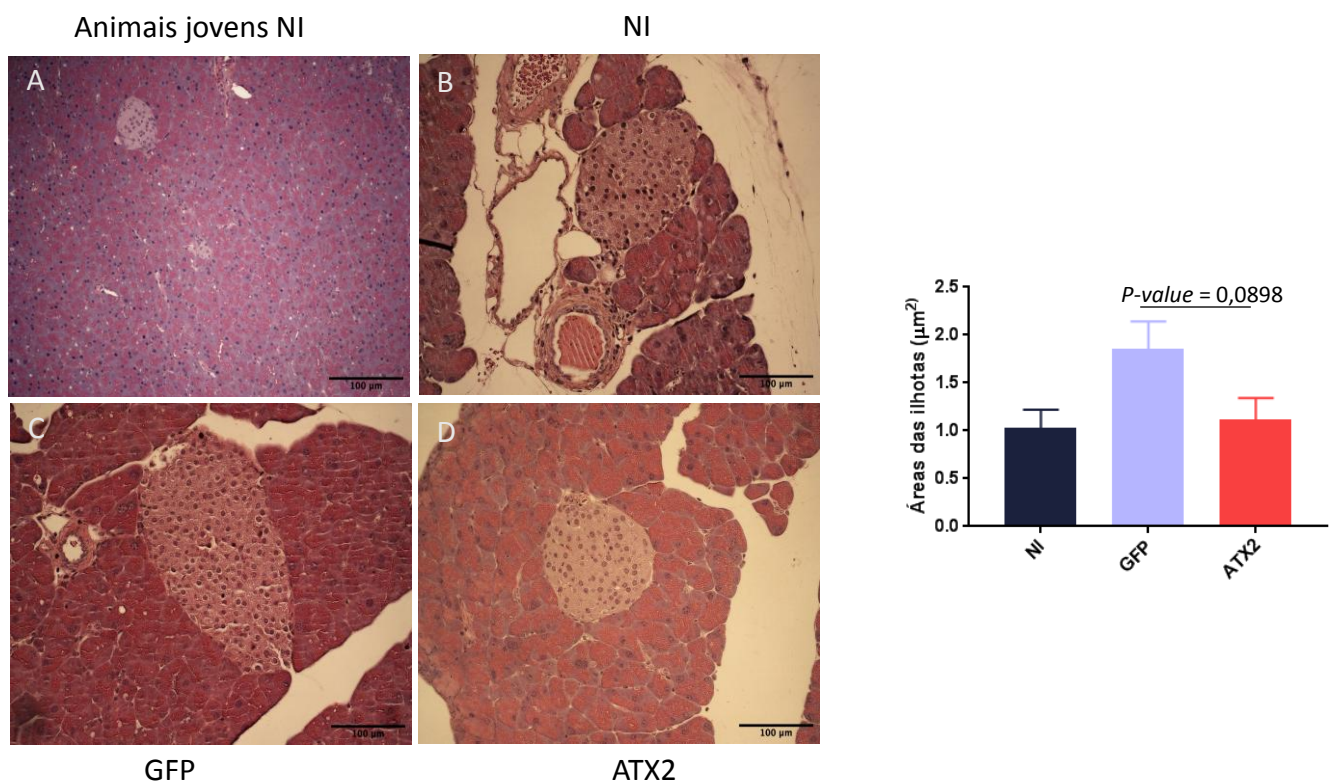
**A)** O grupo de animais injetados com GFP ( $n=4$ ) apresenta um peso de WAT mais elevado em relação ao grupo de animais ATX2 ( $n=6$ ), o qual não apresenta grandes variações de peso do WAT comparativamente ao grupo dos NI ( $n=5$ ). **B)** Imagem representativa do tecido de animais jovens NI, obtidas de um outro estudo, onde se observa um tamanho normal dos adipócitos. **C)** O grupo NI ( $n=5$ ) apresenta uma ligeira descoloração comparativamente os restantes grupos, observa-se também a presença de células inflamatórias. **D e E)** O grupo de animais GFP ( $n= 4$ ) e dos animais do grupo ATX2 ( $n= 4$ ) apresentam adipócitos de maiores dimensões, idênticos aos dos animais jovens NI. **F)** O grupo de animais GFP ( $n= 4$ ) e animais ATX2 ( $n=4$ ) apresentam adipócitos com maiores áreas, sendo que no caso dos animais injetados com a ataxina-2 apresentam um aumento estatisticamente significativo comparativamente ao grupo NI ( $n= 5$ ). [ $P$ -value < 0,05 (\*),  $P$ -value <0,01 (\*\*),  $P$ -value < 0,001 (\*\*\*),  $P$ -value < 0,0001 (\*\*\*\*) – *Unpaired Student's t-test*: A e F].

## 5. A ataxina-2 diminui anomalias histológicas associadas à idade no fígado.

O fígado é um órgão metabólico essencial para a homeostasia corporal, nomeadamente através da regulação do metabolismo energético, depuração xenobiótica e endobiótica e biossíntese molecular (Hyun et al., 2016). Molecularmente, o processo de envelhecimento promove alterações no genoma e epigenoma, contribuindo para uma desregulação da função mitocondrial e das vias de deteção de nutrientes, o que pode conduzir à senescência celular, inflamação e alterações no fígado, que por sua vez podem provocar doenças, como é o caso da fibrose biliar e da fibrose hepática (Hunt et al., 2019; Hyun et al., 2016; Kim et al., 2016). De modo a observar possíveis alterações no equilíbrio energético mediadas por alterações hepáticas, no dia do sacrifício, o fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais foi pesado e recolhido para posterior análise. Observou-se que os animais do grupo ATX2 apresentavam um maior peso do fígado comparativamente aos animais do grupo NI e do grupo GFP, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa (Figura 17 – A) [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,5796 – *Unpaired Student's t-test*] [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,3255– *Unpaired Student's t-test*]. Em seguida, de modo a observar alterações histológicas no fígado, foram obtidas imagens microscópicas de secções coradas com hematoxilina-eosina. Da análise destas imagens, observou-se que os animais injetados com GFP e os animais NI apresentavam hepatócitos entumecidos ou mortos, e infiltrações de células do sistema imunitário entre os hepatócitos danificados. Já os animais do grupo ATX2 não apresentam este tipo de alterações, assemelhando-se, de certo modo à histologia de animais jovens (Figura 16 – B/C/D/E). Observou-se ainda que os animais do grupo ATX2 apresentam um score histológico de lesão significativamente menor que os animais dos grupos GFP e NI (Figura 16 – F) [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,0032 – *Unpaired Student's t-test*] [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,0242 – *Unpaired Student's t-test*] (Asgharpour et al., 2016).



observam-se também alterações nos ilhotas de Langerhans, como por exemplo, inflamação e até uma redução do seu número (Westacott et al., 2017; Aguayo-Mazzucato et al., 2017). Por tal, em seguida, efetuou-se uma análise histológica de secções do pâncreas (Figura 18 – A/B/C/D/E). O pâncreas dos murganhos GFP apresentam de uma forma geral um menor número de ilhotas comparativamente aos murganhos ATX2 (Anexo 5). Observaram-se também sinais de inflamação das células  $\beta$  nos murganhos do grupo NI (Figura 18 – A/B/C/D). Das imagens de microscopia obtidas, efetuou-se uma quantificação da área dos ilhotas nos diferentes grupos experimentais. Assim, observou-se que os animais injetados com a ataxina-2 apresentam ilhotas com uma menor área, comparativamente aos animais do grupo GFP, embora a diferença não seja estatisticamente significativa. Não se observaram diferenças entre os animais do grupo ATX2 e NI em termos de área dos ilhotas [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,7990 – *Unpaired Student's t-test*] [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,0898 – *Unpaired Student's t-test*] (Figura 18 – E).



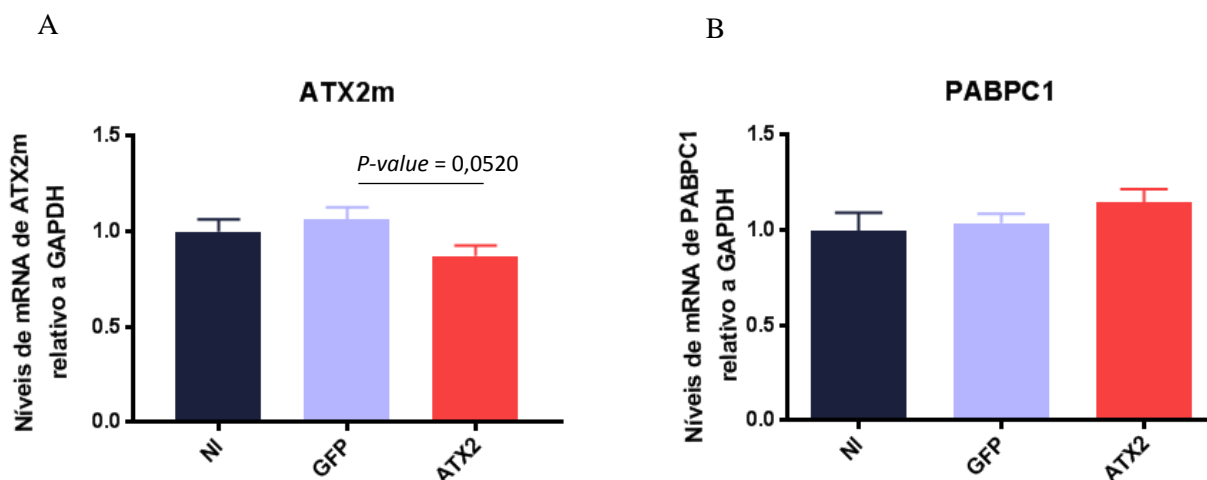
**Figura 18 – A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo não reverte as anomalias no pâncreas associadas com o envelhecimento.**

**A)** Imagens de animais jovens NI, onde se observa um corte histológico de um pâncreas normal. **B e C)** Observou-se que os animais do grupo NI ( $n= 5$ ) e do grupo GFP ( $n= 4$ ) apresentam um menor número de ilhotas e apresentam também sinais inflamação celular. **D)** Os murganhos ATX2 ( $n= 6$ ) apresentam um maior número de ilhotas e um aspecto histológico idêntico ao tecido dos murganhos jovens. **E)** Foram calculadas as áreas das ilhotas e como tal foi possível

observar que o grupo GFP ( $n= 4$ ) apresenta ilhotas de maiores áreas, comparativamente ao grupo ATX2 ( $n= 4$ ), sendo o grupo NI ( $n= 5$ ) o que apresentou menores áreas . [ $P$ -value  $< 0,05$  (\*),  $P$ -value  $<0,01$  (\*\*),  $P$ -value  $< 0,001$  (\*\*\*),  $P$ -value  $< 0,0001$  (\*\*\*\*) – *Unpaired Student`s t-test*: E].

7. A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo promove alterações em diversos marcadores moleculares associados ao envelhecimento.

Como referido anteriormente, o processo de envelhecimento é um fenómeno natural que se caracteriza pela acumulação progressiva de defeitos degenerativos que afetam os processos moleculares, biológicos e fisiológicos. As alterações nestes processos conduzem por sua vez, a alterações e a danos que comprometem a função das células e tecidos, aumentando o risco de desenvolvimento de patologias associadas ao envelhecimento (Kim *et al.*, 2019; Pinto da Costa *et al.*, 2016). Assim, de seguida investigaram-se os níveis de RNA de alguns marcadores moleculares (homeostasia energética, desregulação das vias de deteção de nutrientes, inflamação, autofagia) associados ao processo de envelhecimento. Iniciou-se este estudo com a análise, no hipotálamo, dos níveis de mRNA da ataxina-2 endógena de murganho (ATX2m) e do PABPC1, um interactor conhecido da ataxina-2 (Figura 19 – A/B). Relativamente à ATX2m, observou-se que os animais do grupo NI e do grupo GFP são os que apresentam níveis mais elevados de ATX2m, comparativamente aos animais do grupo ATX2 [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,1569 – *Unpaired Student`s t-test*] [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,0520 – *Unpaired Student`s t-test*] (Figura 19 – A). Em relação aos níveis PABPC1, não se observaram diferenças entre os diferentes grupos experimentais [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,2349 – *Unpaired Student`s t-test*] [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,3004 – *Unpaired Student`s t-test*] (Figura 19 – B).



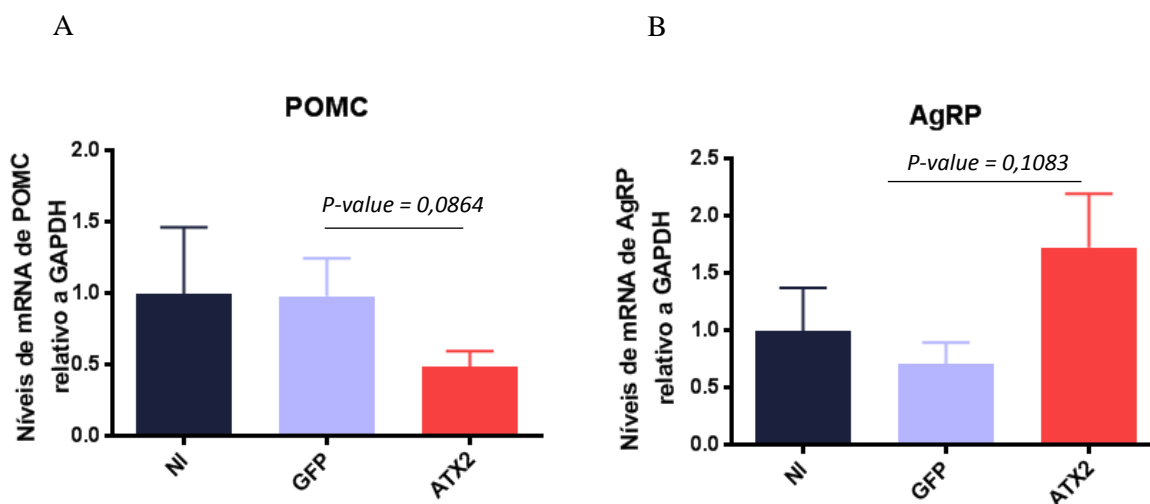
**Figura 19 - A sobre-expressão de ataxina-2 no hipotálamo não altera os níveis de expressão da ataxina-2 endógena e do PABPC1.**

**A)** Observou-se que os animais do grupo ATX2 ( $n=6$ ) são os que apresentam níveis mais reduzidos de ataxina-2 endógena. **B)** Não se observaram diferenças nos níveis de expressão do PABPC1 entre os diferentes grupos experimentais [ $P$ -value  $< 0,05$  (\*),  $P$ -value  $< 0,01$  (\*\*),  $P$ -value  $< 0,001$  (\*\*\*),  $P$ -value  $< 0,0001$  (\*\*\*\*) – *Unpaired Student's t-test*: A e B].

#### 7.1.A sobre-expressão de ataxina-2 no hipotálamo promove uma diminuição dos níveis de POMC e um aumento nos níveis de AgRP.

Como referido, o hipotálamo é responsável por controlar diversos mecanismos associados ao envelhecimento. É nesta estrutura que se encontram diversos tipos de neurónios especializados, que estão também sujeitos a alterações relacionadas com o envelhecimento (Kim *et al.*, 2019). Destes neurónios hipotalâmicos, destacam-se aqueles relacionados com a homeostasia energética, nomeadamente os neurónios POMC e AgRP (Kim *et al.*, 2019). Por tal, em seguida analisaram-se os níveis de mRNA destes dois neuropeptídeos nos três grupos experimentais (Figura 20 – A/B). Assim, observou-se que os animais do grupo ATX2 apresentam valores mais reduzidos de POMC, comparativamente aos dois grupos controlo [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,2710 – *Unpaired Student's t-test*] [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,0864 – *Unpaired Student's t-test*] (Figura 20 – A). Em sentido contrário, os níveis AgRP estão aumentados nos animais do grupo ATX2, comparativamente aos animais dos grupos controlo,

embora esta diferença não seja estatisticamente significativa [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,1083 – *Unpaired Student's t-test*] [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,2574 – *Unpaired Student's t-test*] (Figura 20 – B).



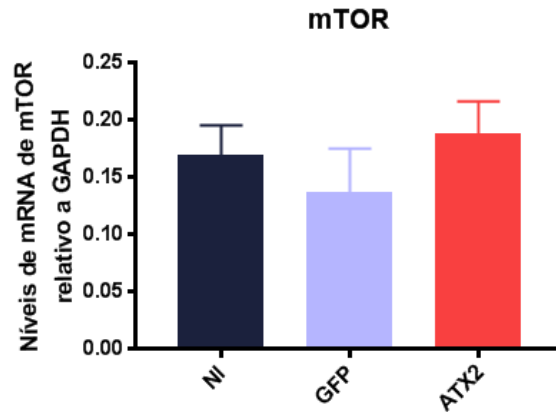
**Figura 20 - A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo conduziu a uma diminuição nos níveis de POMC e a um aumento nos níveis de AgRP.**

**A)** Observou-se que os animais ATX2 ( $n = 6$ ) foram os que apresentaram níveis mais diminuídos de mRNA e o grupo GFP ( $n = 4$ ) apresenta um aumento perto do significativo comparativamente ao grupo ATX2, o grupo dos NI ( $n = 5$ ) apresentam valores semelhantes aos do GFP ( $n = 4$ ). **B)** Observou-se que relativamente aos níveis de mRNA do AgRP, os animais ATX2 ( $n = 6$ ) demonstram níveis mais elevados, embora não estatisticamente significativo, comparativamente ao grupo GFP ( $n = 4$ ), sendo os animais NI ( $n = 5$ ) os que apresentaram níveis mais reduzidos de mRNA – *Unpaired Student's t-test*.

#### 7.2.A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo não promove alterações nos níveis de mTOR.

A desregulação nas vias de deteção de nutrientes é uma das nove características moleculares do processo de envelhecimento (López-Otín *et al.*, 2013). Esta desregulação encontra-se associada a importantes vias de sinalização como a via mTOR, Akt e a via de sinalização da insulina. A via de sinalização mTOR, destaca-se por ser conhecida como a via que acelera o processo de envelhecimento, uma vez que, é responsável por regular várias características do mesmo (Kim *et al.*, 2019; Brazilia *et al.*, 2012). Como tal, foram avaliados os níveis de mRNA de mTOR, no hipotálamo dos animais dos diferentes grupos experimentais. No entanto, não se observaram diferenças

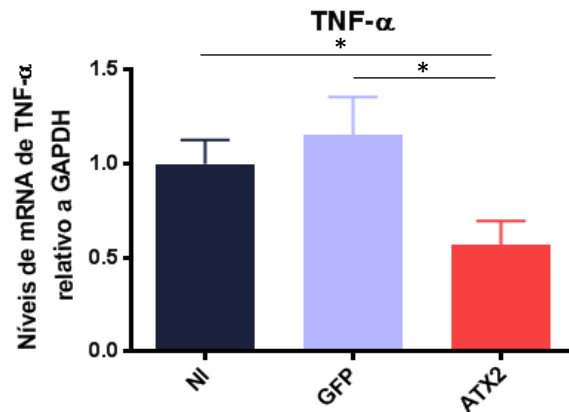
nos níveis de mTOR nos animais dos diferentes grupos experimentais [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,6667 – *Unpaired Student's t-test*] [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,3064 – *Unpaired Student's t-test*] (Figura 21).



**Figura 21 - A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo não altera os níveis de mTOR.** Observou-se que os murganhos ATX2 ( $n = 6$ ) e NI ( $n = 5$ ), apresentam uma tendência para níveis mais elevados de mRNA de mTOR comparativamente aos animais GFP ( $n = 4$ ), não existindo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais – *Unpaired Student's t-test*.

### 7.3.A sobre-expressão da ataxina-2 promove a diminuição dos níveis de um marcador de inflamação.

A inflamação desempenha um papel importante em algumas das alterações ocorridas com o processo de envelhecimento, contribuindo para um fenótipo predominantemente pró-inflamatório. Esta inflamação pode estar associada a diversas causas, como por exemplo, a acumulação de danos nos tecidos pró-inflamatórios, a falha do sistema imunológico, a sobre-ativação do fator de transcrição NF-kB, entre outros (López-Otín *et al.*, 2013; Salminen *et al.*, 2012). Assim, analisaram-se em seguida os níveis de TNF- $\alpha$  no hipotálamo dos animais dos diferentes grupos experimentais. A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo conduz a uma diminuição significativa dos níveis de TNF- $\alpha$ , comparativamente a ambos os grupos controlo [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,0408 – *Unpaired Student's t-test*] [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,0371 – *Unpaired Student's t-test*] (Figura 22).

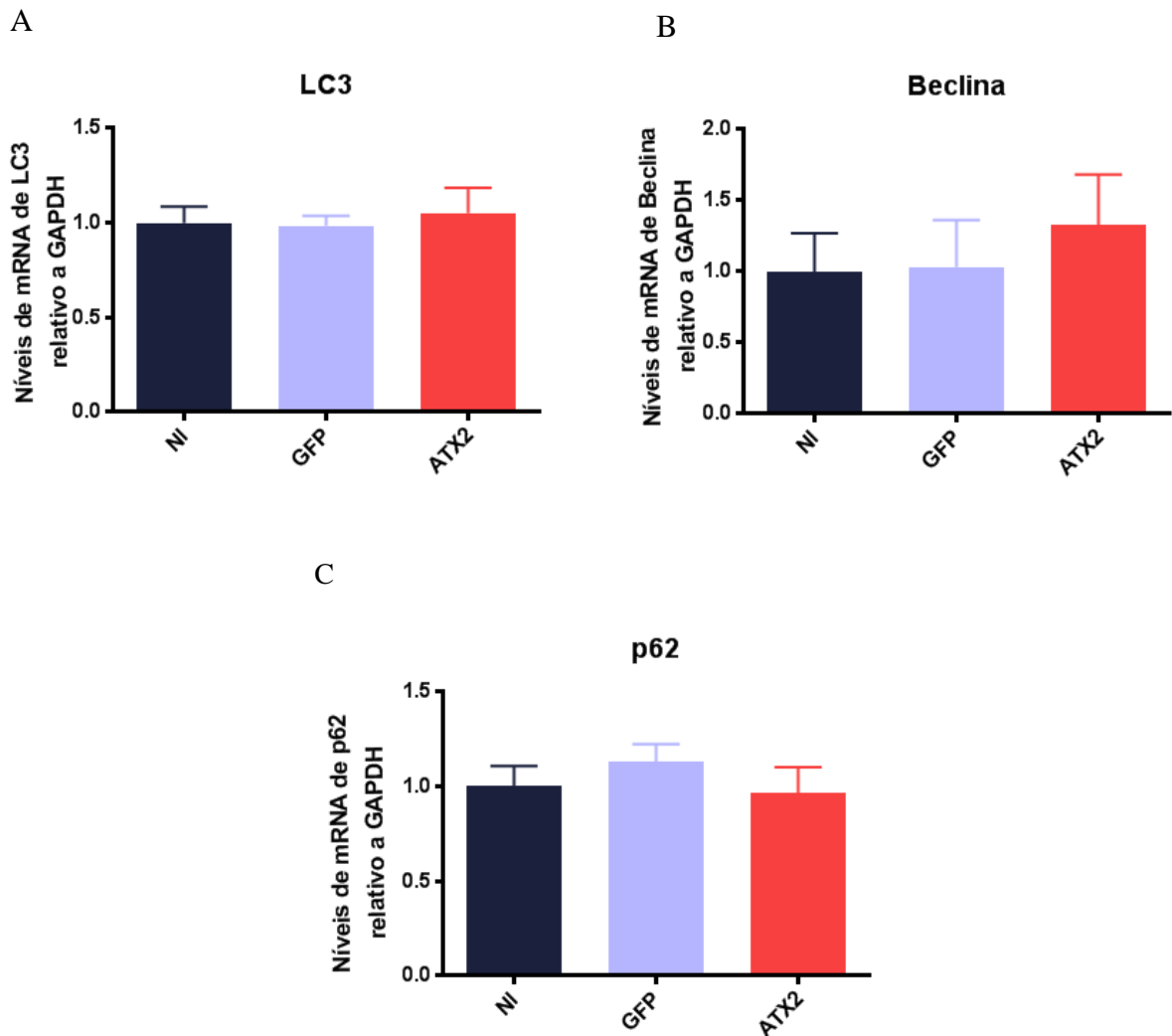


**Figura 22 - A sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo reduz a expressão de TNF- $\alpha$ .** Observou-se que os murganhos ATX2 apresentam valores diminuídos de TNF- $\alpha$  comparativamente aos restantes grupos GFP ( $n = 4$ ) e NI ( $n = 5$ ), ambos os animais apresentam um aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  estatisticamente significativos comparativamente ao grupo dos murganhos ATX2 ( $n = 6$ ). [ $P$ -value < 0,05 (\*),  $P$ -value < 0,01 (\*\*),  $P$ -value < 0,001 (\*\*\*),  $P$ -value < 0,0001 (\*\*\*\*) – Unpaired Student's  $t$ -test].

#### 7.4.A sobre-expressão da ataxina-2 não altera os níveis de marcadores da autofagia.

A autofagia é um mecanismo de degradação celular, importante na preservação do equilíbrio metabólico. A sua ativação é um dos processos chave regulado pelo complexo mTORC1 (Stallone *et al.*, 2019; Ilha *et al.*, 2018). Com o envelhecimento os níveis de autofagia tendem a diminuir (Aveleira *et al.*, 2015). Por tal, analisaram-se, no hipotálamo, os níveis LC3, Beclina e p62, três proteínas determinantes para a autofagia (Figura 23 – A/B/C). Não se observaram diferenças entre os diferentes grupos experimentais nos níveis de mRNA de LC3 [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,7653] [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,7103] (Figura 23 - A). Relativamente aos níveis de mRNA de Beclina também não se observaram diferenças entre os grupos experimentais [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,4983 – Unpaired Student's  $t$ -test] [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,5867– Unpaired Student's  $t$ -test] (Figura 23 - B). O mesmo foi observado para os níveis de mRNA de p62, sem

diferenças significativas entre os diferentes grupos estudados [NI ( $n=5$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,8423 – *Unpaired Student's t-test*] [GFP ( $n=4$ ) vs ATX2 ( $n=6$ ) -  $P$ -value = 0,4068 – *Unpaired Student's t-test*] (Figura 23 - C).



**Figura 23 – A sobre-expressão de ataxina-2 no hipotálamo não modifica os níveis de mRNA de genes envolvidos na autofagia.**

**A)** Observou-se que os murganhos ATX2 ( $n = 6$ ) apresentam níveis semelhantes de mRNA de LC3 comparativamente aos grupos controlo NI ( $n= 5$ ) e GFP ( $n=4$ ). **B) e C)** Os níveis de beclina e de p62, também diferem entre os três grupos em estudo.

## Discussão

O processo de envelhecimento é um fenómeno caracterizado pela acumulação gradual de defeitos degenerativos que afetam processos moleculares, biológicos e fisiológicos. Este conjunto de alterações geram danos que comprometem a função de células e tecidos, originando risco para doenças como Alzheimer, Parkinson, diabetes tipo II e cancro (Kim et al., 2019; Pinto da Costa et al., 2016).

A instabilidade genómica, a redução no tamanho dos telómeros, alterações epigenéticas, a perda de proteostase, a desregulação das vias de deteção de nutrientes, a disfunção mitocondrial, a senescência celular, a exaustão das células estaminais e a alteração da comunicação intracelular, são fenómenos associados ao processo de envelhecimento (*Hallmarks of aging*) e são marcadores úteis para estudar os mecanismos celulares e moleculares deste processo (López-Otín *et al.*, 2013).

O hipotálamo desempenha várias funções que sofrem diversas alterações provocados pelo processo de envelhecimento, como é o caso do ritmo circadiano, a resposta ao stress e a regulação do balanço energético. Estas alterações podem acelerar o processo de envelhecimento e contribuir para o desenvolvimento de patologias associadas ao envelhecimento (Mayer *et al.*, 2009).

No contexto do estudo do envelhecimento, surge a ataxina-2, uma proteína com funções no metabolismo do RNA e tradução, a formação de grânulos de stress, a reorganização do citoesqueleto e endocitose e a sinalização de cálcio. Evidências sugerem ainda que ataxina-2 está envolvida na regulação da vida do mTOR, na sinalização da insulina, homeostase metabólica e peso corporal (Carmo-Silva et al., 2016; Ostrowski *et al.*, 2017). Estes fenómenos, estão comprometidos no envelhecimento. Deste modo, com este trabalho estudámos o impacto da sobre-expressão hipotalâmica de ataxina-2 no processo de envelhecimento.

Com o passar da idade, o peso corporal tende a diminuir tal como se observou nos gráficos de peso corporal total ganho e peso total ganho cumulativo, no entanto, e contrariamente ao que se sucedeu com os animais controlo envelhecidos, os animais injetados com a ataxina-2 demonstraram um aumento de peso. Estes resultados sugerem que a ataxina-2 previne a perda de peso corporal associada ao envelhecimento.

Com o desequilíbrio na regulação do balanço energético não é apenas o peso corporal que se altera, também a sensibilidade à insulina sofre alterações com o envelhecimento (Petervari *et al.*, 2011). No entanto, e contrariamente ao que ocorre com o processo de

envelhecimento, estudos envolvendo a ataxina-2 demonstraram que a ausência desta proteína promove o aumento de resistência à insulina (Boucher *et al.*, 2014; Laster-Becker *et al.*, 2008). No nosso estudo foi possível constatar este facto, observando-se que com o envelhecimento existe uma resistência à insulina, no entanto, nos animais injetados com a ataxina-2 observou-se um aumento da sensibilidade à insulina.

O envelhecimento, por meio do hipotálamo, provoca diversas desregulações nas funções dos órgãos e tecidos envolvidos no metabolismo, como é o caso do WAT, do BAT, do fígado, do pâncreas e do intestino. Estes vão sofrer alterações moleculares, como a senescência celular, o aparecimento de inflamação, entre outros (Petervari *et al.*, 2011). A ataxina-2 no hipotálamo, parece contrariar algumas características moleculares do processo de envelhecimento, uma vez que a expressão da mesma fornece um equilíbrio nas funções hipotalâmicas, não permitindo deste modo a desregulação nas funções dos órgãos e tecidos.

O WAT foi o órgão estudado que apresentou maiores diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais. O WAT é um tecido que tem por base o armazenamento de lípidos, com depósitos sob a pele e em redor de órgãos internos (Roger *et al.*, 2012). Com o envelhecimento existe deposição de lípidos, inflamação de baixo grau, a diminuição de mecanismos de replicação de pré-adipócitos e a acumulação de células senescentes (Stout *et al.*, 2014; Roger *et al.*, 2012). Neste estudo foi possível observar que os animais injetados com a ataxina-2 apresentaram um menor peso deste tecido comparativamente aos grupos controlo. Observou-se ainda que o tecido dos animais injetados com ataxina-2 se diferencia muito dos do grupo controlo, assemelhando-se ao de animais jovens. Já o grupo dos animais não injetados apresentam a presença de sinais inflamação. Estudos anteriores associaram a inflamação e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no WAT ao processo de envelhecimento (B. Stout *et al.*, 2014). Da análise da área dos adipócitos observou-se ainda que, os animais injetados com ataxina-2 apresentam maiores áreas comparativamente aos animais controlo.

O fígado é um órgão metabólico determinante para o equilíbrio energético. O fígado dos animais não injetados e injetados com o GFP apresentaram hepatócitos de forma alterada ou mortos, e ainda a infiltração de células imunitárias. No entanto, o fígado dos animais injetados com a ataxina-2 não apresentaram alterações celulares, assemelhando-se ao tecido dos animais jovens. Após uma análise ao score histológico de lesões ao fígado, observou-se que o grupo injetado com ataxina-2 apresenta um score

significativamente menor, comparativamente aos animais dos grupos controlo, o que sugere uma melhor homeostasia hepática destes animais.

O envelhecimento encontra-se ainda associado ao aumento do risco de diabetes do tipo 2, que resulta da diminuição da sensibilidade à insulina. Esta diminuição pode resultar da redução da capacidade proliferativa e/ou da redução da função das ilhotas pancreáticas (Westacott et al. 2017). As ilhotas de Langerhans são constituídas por diversas células, incluindo as células  $\beta$ , que produzem insulina. Com o envelhecimento, estas células tendem a demonstrar sinais de inflamação (Janjuha et al. 2018). No pâncreas a ataxina-2 não reverte os danos causados pelo envelhecimento. Por meio da análise histológica foi possível observar que os animais NI apresentaram sinais de inflamação nas células  $\beta$ .

Fisiologicamente, a inflamação é essencial para a homeostasia corporal, pois ajuda a combater a invasão de microrganismos e na reparação e manutenção dos órgãos. No entanto, quando a inflamação se torna prolongada ou quando a causa que provocou a inflamação não é removida, esta inflamação persistente pode levar à acumulação de danos, que acabam por levar ao aparecimento de patologias (Bektas et al., 2017). O envelhecimento pode ser então caracterizado pelo desenvolvimento de um estado pró-inflamatório leve (Bektas et al., 2017; Morrisette-Thomas et al., 2014). Não foram, no entanto, encontrados estudos que associem a ataxina-2 com a regulação de processos inflamatórios. Aqui mostramos que a sobre-expressão de ataxina-2 no hipotálamo consegue diminuir a expressão de TNF- $\alpha$ , sugerindo uma diminuição da inflamação. A prevenção da inflamação no hipotálamo, pode ser responsável pelos efeitos benéficos observados nos tecidos periféricos.

Foram ainda analisados outros marcadores moleculares associados ao envelhecimento, nomeadamente relativos à homeostasia energética, desregulação da deteção de nutrientes, e autofagia. No entanto, estudos anteriores observaram que, no caso da perda de proteostasia, os níveis de autofagia encontravam-se diminuídos em animais envelhecidos, o que favorecia um aumento dos níveis hipotalâmicos de POMC (Kaushik *et al.*, 2012; Cuervo, 2008). No entanto, no nosso estudo estas diferenças não foram verificadas. Os níveis de POMC, AgRP, mTOR, LC3, Beclina e p62 não apresentaram resultados significativos. Como tal, conclui-se que a sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo não promove alterações na homeostasia energética, na autofagia e na desregulação das vias de deteção de nutriente.

De um modo geral, foi possível observar que a sobre-expressão da ataxina-2 no hipotálamo reverte parcialmente algumas características do envelhecimento. A sobre-expressão de ataxina-2 no hipotálamo teve efeitos benéficos ao nível do peso corporal, na prevenção da perda de peso associado à idade. Mas também na diminuição de marcadores pró-inflamatórios do hipotálamo e na manutenção da integridade de tecidos periféricos (fígado, WAT e pâncreas).

## Conclusão

Este estudo realizou-se tendo como principal objetivo avaliar o impacto da expressão local da ataxina-2 *wild-type* em características do envelhecimento molecular e fisiológico. Como tal foi-nos possível concluir que a ataxina-2 retarda parcialmente o processo de envelhecimento, uma vez que: i) a nível histológico foram notórias as diferenças entre os animais não injetados, que apresentaram inúmeros danos associados ao processo de envelhecimento, enquanto os animais injetados com ataxina-2 que não apresentaram a mesma extensão de danos, com uma histologia semelhante à de animais jovens; ii) a análise molecular permitiu-nos concluir que a ataxina-2 promove a diminuição de inflamação no hipotálamo, o que por si só pode prevenir a acumulação de danos que dão origem a patologias associadas ao envelhecimento.

De modo a completar o estudo, no futuro seria interessante:

- Analisar outros marcadores moleculares de envelhecimento, a partir da análise da expressão génica pela técnica de RT-qPCR;
- Realizar mais análises histológicas e fazer a quantificação de outros órgãos metabólicos (ex. músculo);
- Efetuar uma análise molecular e histológica detalhada de animais jovens, para comparação com os murganhos injetados com ataxina-2;
- Efetuar uma análise de níveis proteicos de mediadores metabólicos pela técnica de Western Blot.

## Referências

- Adegbuyiro, Adewale, Faezeh Sedighi, Albert W. Pilkington, Sharon Groover, e Justin Legleiter. 2017. «Proteins Containing Expanded Polyglutamine Tracts and Neurodegenerative Disease». *Biochemistry* 56(9):1199–1217. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00936.
- Aguayo-Mazzucato, Cristina, Mark van Haaren, Magdalena Mruk, Terence B. Lee, Caitlin Crawford, Jennifer Hollister-Lock, Brooke A. Sullivan, James W. Johnson, Aref Ebrahimi, Jonathan M. Dreyfuss, Jan Van Deursen, Gordon C. Weir, e Susan Bonner-Weir. 2017. « $\beta$  Cell Aging Markers Have Heterogeneous Distribution and Are Induced by Insulin Resistance». *Cell Metabolism* 25(4):898-910.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2017.03.015.
- Alexandre Rebelo-Marques<sup>1,2,3\*</sup>, Adriana De Sousa Lages<sup>1,4</sup>, Renato Andrade<sup>2,3,5</sup>, Carlos Fontes Ribeiro<sup>1</sup>, Anabela Mota-Pinto<sup>1</sup>, Francisco Carrilho<sup>4</sup> and e João Espregueira-Mendes<sup>2,3,6,7,8</sup>. 2018. «Aging Hallmarks: The Benefits of Physical exercise».
- de Almeida, Luis Pereira, Christopher A. Ross, Diana Zala, Patrick Aebischer, e 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(9):3473–83. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-09-03473.2002.
- Alves-Cruzeiro, João M. Da Conceição, Liliana Mendonça, Luís Pereira de Almeida, e Clévio Nóbrega. 2016. «Motor Dysfunctions and Neuropathology in Mouse Models of Spinocerebellar Ataxia Type 2: A Comprehensive Review». *Frontiers in Neuroscience* 10. doi: 10.3389/fnins.2016.00572.
- Amy Tsurumi<sup>1</sup> e and Willis X. Li. 2012. «Global heterochromatin loss A unifying theory of aging? »
- Anderson, Paul, e Nancy Kedersha. 2006. «RNA Granules». *Journal of Cell Biology* 172(6):803–8. doi: 10.1083/jcb.200512082.
- Andrikopoulos, Sofianos, Amy R. Blair, Nadia Deluca, Barbara C. Fam, e Joseph Proietto. 2008. «Evaluating the Glucose Tolerance Test in Mice». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295(6):E1323–32. doi: 10.1152/ajpendo.90617.2008.
- Anisimova, Aleksandra S., Alexander I. Alexandrov, Nadezhda E. Makarova, Vadim N. Gladyshev, e Sergey E. Dmitriev. 2018. «Protein Synthesis and Quality Control in Aging».

*Aging* 10(12):4269–88. doi: 10.18632/aging.101721.

Aschoff, J. 1965. «Circadian Rhythms in Man: A Self-Sustained Oscillator with an Inherent Frequency Underlies Human 24-Hour Periodicity». *Science* 148(3676):1427–32. doi: 10.1126/science.148.3676.1427.

Asgharpour, Amon, Sophie C. Cazanave, Tommy Pacana, Mulugeta Seneshaw, Robert Vincent, Bubu A. Banini, Divya Prasanna Kumar, Kalyani Daita, Hae-Ki Min, Faridoddin Mirshahi, Pierre Bedossa, Xiaochen Sun, Yujin Hoshida, Srinivas V. Koduru, Daniel Contaifer, Urszula Osinska Warncke, Dayanjan S. Wijesinghe, e Arun J. Sanyal. 2016. «A Diet-Induced Animal Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Cancer». *Journal of Hepatology* 65(3):579–88. doi: 10.1016/j.jhep.2016.05.005.

Aveira, Célia A., Mariana Botelho, Sara Carmo-Silva, Jorge F. Pascoal, Marisa Ferreira-Marques, Clévio Nóbrega, Luísa Cortes, Jorge Valero, Lígia Sousa-Ferreira, Ana R. Álvaro, Magda Santana, Sebastian Kügler, Luís Pereira de Almeida, e Cláudia Cavadas. 2015. «Neuropeptide Y Stimulates Autophagy in Hypothalamic Neurons». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(13):E1642–51. doi: 10.1073/pnas.1416609112.

B. Stout, Michael. 2014. «Growth hormone action predicts age- related white adipose tissue dysfunction and senescent cell burden in mice».

Bektas, Arsun, Shepherd H. Schurman, Ranjan Sen, e Luigi Ferrucci. 2018. «Aging, Inflammation and the Environment». *Experimental Gerontology* 105:10–18. doi: 10.1016/j.exger.2017.12.015.

Berridge, Michael J. 1998. «Neuronal Calcium Signaling». *Neuron* 21(1):13–26. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80510-3.

Berthold, Frank, e Barbara Hero. 2000. «Neuroblastoma: Current Drug Therapy Recommendations as Part of the Total Treatment Approach». *Drugs* 59(6):1261–77. doi: 10.2165/00003495-200059060-00006.

Boucher, J., A. Kleinriders, e C. R. Kahn. 2014. «Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(1):a009191–a009191. doi: 10.1101/cshperspect.a009191.

- Buchan, J. Ross, Denise Muhlrads, e Roy Parker. 2008. «P Bodies Promote Stress Granule Assembly in *Saccharomyces Cerevisiae*». *Journal of Cell Biology* 183(3):441–55. doi: 10.1083/jcb.200807043.
- Budworth, Helen, e Cynthia T. McMurray. 2013. «A Brief History of Triplet Repeat Diseases». Pp. 3–17 em *Trinucleotide Repeat Protocols*. Vol. 1010, *Methods in Molecular Biology*, editado por Y. Kohwi e C. T. McMurray. Totowa, NJ: Humana Press.
- Campisi, Judith, e Fabrizio d’Adda di Fagagna. 2007. «Cellular Senescence: When Bad Things Happen to Good Cells». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(9):729–40. doi: 10.1038/nrm2233.
- Capiod, Thierry. 2016. «Extracellular Calcium Has Multiple Targets to Control Cell Proliferation». Pp. 133–56 em *Calcium Entry Pathways in Non-excitabile Cells*. Vol. 898, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, editado por J. A. Rosado. Cham: Springer International Publishing.
- Carmo-Silva, Sara, Clevio Nobrega, Luís Pereira de Almeida, e Claudia Cavadas. 2017. «Unraveling the Role of Ataxin-2 in Metabolism». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 28(4):309–18. doi: 10.1016/j.tem.2016.12.006.
- Cathy Slack, Maria E Giannakou, Andrea Foley, Martin Goss, e Linda Partridge. 2011. «dFOXO-independent effects of reduced insulin-like signaling in *Drosophila*». *Aging Cell* 10(5):735–48. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00707.x.
- Chen, Thomas T., Eugene I. Maevsky, e Mikhail L. Uchitel. 2015. «Maintenance of Homeostasis in the Aging Hypothalamus: The Central and Peripheral Roles of Succinate». *Frontiers in Endocrinology* 6. doi: 10.3389/fendo.2015.00007.
- Collado, Manuel, Maria A. Blasco, e Manuel Serrano. 2007. «Cellular Senescence in Cancer and Aging». *Cell* 130(2):223–33. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.003.
- Cuervo, Ana Maria. 2008. «Autophagy and Aging: Keeping That Old Broom Working». *Trends in Genetics* 24(12):604–12. doi: 10.1016/j.tig.2008.10.002.
- Cynthia J. Kenyon. 2010. «The genetics of ageing». 464:504–12.
- van Deursen, Jan M. 2014. «The Role of Senescent Cells in Ageing». *Nature* 509(7501):439–

46. doi: 10.1038/nature13193.

Dibner, Charna, Ueli Schibler, e Urs Albrecht. 2010. «The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks». *Annual Review of Physiology* 72(1):517–49. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135821.

Dilman, V. M. 1971. «AGE-ASSOCIATED ELEVATION OF HYPOTHALAMIC THRESHOLD TO FEEDBACK CONTROL, AND ITS ROLE IN DEVELOPMENT, AGEING, AND DISEASE». *The Lancet* 297(7711):1211–19. doi: 10.1016/S0140-6736(71)91721-1.

Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, e O. Pereira-Smith. 1995. «A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in Vivo.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(20):9363–67. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.

Dong, Licai, Hao Yan, Xuebing Huang, Xiaofeng Hu, Yongfeng Yang, Cuicui Ma, Bo Du, Tianlan Lu, Chao Jin, Lifang Wang, Hao Yu, Zheng Dong, Wenqiang Li, Yanyan Ruan, Hongyan Zhang, Hongxing Zhang, Weifeng Mi, Wenbin Ma, Keqing Li, Luxian Lv, Dai Zhang, e Weihua Yue. 2015. «A2BP1 Gene Polymorphisms Association with Olanzapine-Induced Weight Gain». *Pharmacological Research* 99:155–61. doi: 10.1016/j.phrs.2015.06.003.

E A Pollina & A Brunet. 2011. «Epigenetic regulation of aging stem cells».

Ekdahl, C. T., Z. Kokaia, e O. Lindvall. 2009. «Brain Inflammation and Adult Neurogenesis: The Dual Role of Microglia». *Neuroscience* 158(3):1021–29. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.052.

Elizondo- Vega, Roberto, Christian Cortes- Campos, Maria J. Barahona, Karina A. Oyarce, Claudio A. Carril, e Maria A. García- Robles. 2015. «The Role of Tanycytes in Hypothalamic Glucosensing». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19(7):1471–82. doi: 10.1111/jcmm.12590.

Epel, E. S., E. H. Blackburn, J. Lin, F. S. Dhabhar, N. E. Adler, J. D. Morrow, e R. M. Cawthon. 2004. «Accelerated Telomere Shortening in Response to Life Stress». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(49):17312–15. doi: 10.1073/pnas.0407162101.

Evan T Powers 1, Richard I Morimoto, Andrew Dillin, Jeffery W Kelly, William E Balch.

2009. «Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency». 78. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.114844.

Figley, M. D., G. Bieri, R. M. Kolaitis, J. P. Taylor, e A. D. Gitler. 2014. «Profilin 1 Associates with Stress Granules and ALS-Linked Mutations Alter Stress Granule Dynamics». *Journal of Neuroscience* 34(24):8083–97. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0543-14.2014.

Figueroa, Karla P., e Stefan M. Pulst. 2003. «Identification and Expression of the Gene for Human Ataxin-2-Related Protein on Chromosome 16». *Experimental Neurology* 184(2):669–78. doi: 10.1016/S0014-4886(03)00287-5.

Fittschen, M., I. Lastres-Becker, M. V. Halbach, E. Damrath, S. Gispert, M. Azizov, M. Walter, S. Müller, e G. Auburger. 2015. «Genetic Ablation of Ataxin-2 Increases Several Global Translation Factors in Their Transcript Abundance but Decreases Translation Rate». *Neurogenetics* 16(3):181–92. doi: 10.1007/s10048-015-0441-5.

Frazier, Hilaree N., Adam O. Ghoweri, Katie L. Anderson, Rwei-Lung Lin, Nada M. Porter, e Olivier Thibault. 2019. «Broadening the Definition of Brain Insulin Resistance in Aging and Alzheimer's Disease». *Experimental Neurology* 313:79–87. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.12.007.

George Paxinos e Keith B.J. Franklin. 2019. *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact: The Coronal Plates and Diagrams*.

Gnazzo, Megan M., Eva-Maria E. Uhlemann, Alex R. Villarreal, Masaki Shirayama, Eddie G. Dominguez, e Ahna R. Skop. 2016. «The RNA-Binding Protein ATX-2 Regulates Cytokinesis through PAR-5 and ZEN-4» editado por S. Strome. *Molecular Biology of the Cell* 27(20):3052–64. doi: 10.1091/mbc.e16-04-0219.

Gonskikh, Yulia, e Norbert Polacek. 2017. «Alterations of the Translation Apparatus during Aging and Stress Response». *Mechanisms of Ageing and Development* 168:30–36. doi: 10.1016/j.mad.2017.04.003.

Goodrick, C. L., D. K. Ingram, M. A. Reynolds, J. R. Freeman, e N. Cider. 1990. «Effects of Intermittent Feeding upon Body Weight and Lifespan in Inbred Mice: Interaction of Genotype and Age». *Mechanisms of Ageing and Development* 55(1):69–87. doi: 10.1016/0047-6374(90)90107-Q.

Halbach, Melanie Vanessa, Suzana Gispert, Tanja Stehning, Ewa Damrath, Michael Walter, e

Georg Auburger. 2017. «Atxn2 Knockout and CAG42-Knock-in Cerebellum Shows Similarly Dysregulated Expression in Calcium Homeostasis Pathway». *The Cerebellum* 16(1):68–81. doi: 10.1007/s12311-016-0762-4.

Hands, Sarah L., Christopher G. Proud, e Andreas Wytenbach. 2009. «MTOR's Role in Ageing: Protein Synthesis or Autophagy?» *Aging* 1(7):586–97. doi: 10.18632/aging.100070.

Hodges, Erik L., e Nicole M. Ashpole. 2019. «Aging Circadian Rhythms and Cannabinoids». *Neurobiology of Aging* 79:110–18. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.03.008.

Hood, Suzanne, e Shimon Amir. 2017. «The Aging Clock: Circadian Rhythms and Later Life». *Journal of Clinical Investigation* 127(2):437–46. doi: 10.1172/JCI90328.

Hunt, Nicholas J., Sun Woo (Sophie) Kang, Glen P. Lockwood, David G. Le Couteur, e Victoria C. Cogger. 2019. «Hallmarks of Aging in the Liver». *Computational and Structural Biotechnology Journal* 17:1151–61. doi: 10.1016/j.csbj.2019.07.021.

Huynh, D. P., M. R. Del Bigio, D. H. Ho, e S. 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(2):232–41. doi: 10.1002/1531-8249(199902)45:2<232::aid-ana14>3.0.co;2-7.

Hyun, Jeongeun, Jungwook Park, Sihyung Wang, Jieun Kim, Hyun-Hee Lee, Young-Su Seo, e Youngmi Jung. 2016. «MicroRNA Expression Profiling in CCl4-Induced Liver Fibrosis of Musculus». *International Journal of Molecular Sciences* 17(6):961. doi: 10.3390/ijms17060961.

Ilha, Jocemar, Caroline Cunha do Espírito-Santo, e Gabriel Ribeiro de Freitas. 2018. «mTOR Signaling Pathway and Protein Synthesis: From Training to Aging and Muscle Autophagy». Pp. 139–51 em *Muscle Atrophy*. Vol. 1088, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, editado por J. Xiao. Singapore: Springer Singapore.

Janjuha, Sharan, Sumeet Pal Singh, Anastasia Tsakmaki, S. Neda Mousavy Gharavy, Priyanka Murawala, Judith Konantz, Sarah Birke, David J. Hodson, Guy A. Rutter, Gavin A. Bewick, e Nikolay Ninov. 2018. «Age-Related Islet Inflammation Marks the Proliferative Decline of Pancreatic Beta-Cells in Zebrafish». *ELife* 7:e32965. doi: 10.7554/eLife.32965.

Jaskelioff, Mariela, Florian L. Muller, Ji-Hye Paik, Emily Thomas, Shan Jiang, Andrew C. Adams, Ergun Sahin, Maria Kost-Alimova, Alexei Protopopov, Juan Cadiñanos, James W.

Horner, Eleftheria Maratos-Flier, e Ronald A. DePinho. 2011. «Telomerase Reactivation Reverses Tissue Degeneration in Aged Telomerase-Deficient Mice». *Nature* 469(7328):102–6. doi: 10.1038/nature09603.

João Pinto da Costaa, Rui Vitorinob,c, , Gustavo M. Silvad, Christine Vogeld, Armando C., e Duartea, and Teresa Rocha-Santosa. 2016. «A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects».

Juhyun Oh, Yang David Lee, e Amy J Wagers. 2014. «Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities». *NATURE MEDICINE* 20(8):870–80.

Jun Ren<sup>1,2</sup> and Yingmei Zhang<sup>1,2</sup>. 2018. «Targeting Autophagy in Aging and Aging-Related Cardiovascular Diseases».

Kaehler, Christian, Jörg Isensee, Ute Nonhoff, Markus Terrey, Tim Hucho, Hans Lehrach, e Sylvia Krobitsch. 2012. «Ataxin-2-Like Is a Regulator of Stress Granules and Processing Bodies» editado por J. Ma. *PLoS ONE* 7(11):e50134. doi: 10.1371/journal.pone.0050134.

Kaushik, Susmita, Esperanza Arias, Hyokjoon Kwon, Nuria Martinez Lopez, Diana Athonvarangkul, Srabani Sahu, Gary J. Schwartz, Jeffrey E. Pessin, e Rajat Singh. 2012. «Loss of Autophagy in Hypothalamic POMC Neurons Impairs Lipolysis». *EMBO Reports* 13(3):258–65. doi: 10.1038/embor.2011.260.

Kerstin Boengle, Maik Kosiol, Manuel Mayr, Rainer Schulz, e Susanne Rohrbach. 2016. «Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue». *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*.

Kim, In Hee, Jun Xu, Xiao Liu, Yukinori Koyama, Hsiao-Yen Ma, Karin Diggel, Young-Hyun You, Jan M. Schilling, Dilip Jeste, Kumar Sharma, David A. Brenner, e Tatiana Kisseleva. 2016. «Aging Increases the Susceptibility of Hepatic Inflammation, Liver Fibrosis and Aging in Response to High-Fat Diet in Mice». *AGE* 38(4):291–302. doi: 10.1007/s11357-016-9938-6.

Kim, Jung-Yeon, Hyun-Jin An, Woon-Hae Kim, Yoon-Yub Park, Kyung Duck Park, e Kwan-Kyu Park. 2017. «Apamin Suppresses Biliary Fibrosis and Activation of Hepatic Stellate Cells». *International Journal of Molecular Medicine* 39(5):1188–94. doi: 10.3892/ijmm.2017.2922.

Kim, Keetae, e Han Kyoung Choe. 2019. «Role of Hypothalamus in Aging and Its Underlying Cellular Mechanisms». *Mechanisms of Ageing and Development* 177:74–79. doi:

10.1016/j.mad.2018.04.008.

Kim, Sang Gyun, Gwen R. Buel, e John Blenis. 2013. «Nutrient Regulation of the MTOR Complex 1 Signaling Pathway». *Molecules and Cells* 35(6):463–73. doi: 10.1007/s10059-013-0138-2.

Kirstein-Miles, Janine, Annika Scior, Elke Deuerling, e Richard I. Morimoto. 2013. «The nascent polypeptide-associated complex is a key regulator of proteostasis». *The EMBO Journal* 32(10):1451–68. doi: 10.1038/emboj.2013.87.

Kozlov, G., J. F. Trempe, K. Khaleghpour, A. Kahvejian, I. Ekiel, e K. Gehring. 2001. «Structure and Function of the C-Terminal PABC Domain of Human Poly(A)-Binding Protein». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(8):4409–13. doi: 10.1073/pnas.071024998.

Kunimura, Yuyu, Kinuyo Iwata, Akihito Ishigami, e Hitoshi Ozawa. 2017. «Age-Related Alterations in Hypothalamic Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin Neurons and in Pulsatile LH Release in Female and Male Rats». *Neurobiology of Aging* 50:30–38. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.10.018.

Laplante, Mathieu, e David M. Sabatini. 2012. «MTOR Signaling in Growth Control and Disease». *Cell* 149(2):274–93. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017.

Lastres-Becker, Isabel, David Nonis, Florian Eich, Michael Klinkenberg, Myriam Gorospe, Peter Kötter, Fabrice A. C. Klein, Nancy Kedersha, e Georg Auburger. 2016. «Mammalian Ataxin-2 Modulates Translation Control at the Pre-Initiation Complex via PI3K/MTOR and Is Induced by Starvation». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1862(9):1558–69. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.05.017.

Lastres-Becker, Isabel, Udo Rüb, e Georg Auburger. 2008. «Spinocerebellar Ataxia 2 (SCA2)». *The Cerebellum* 7(2):115–24. doi: 10.1007/s12311-008-0019-y.

Lewellyn, Lindsay, Ana Carvalho, Arshad Desai, Amy S. Maddox, e Karen Oegema. 2011. «The Chromosomal Passenger Complex and Centralspindlin Independently Contribute to Contractile Ring Assembly». *Journal of Cell Biology* 193(1):155–69. doi: 10.1083/jcb.201008138.

Li, G., Y. Zhang, J. T. Wilsey, e P. J. Scarpace. 2005. «Hypothalamic Pro-Opiomelanocortin Gene Delivery Ameliorates Obesity and Glucose Intolerance in Aged Rats». *Diabetologia*

48(11):2376–85. doi: 10.1007/s00125-005-1943-8.

Lim, C., e R. Allada. 2013. «ATAXIN-2 Activates PERIOD Translation to Sustain Circadian Rhythms in *Drosophila*». *Science* 340(6134):875–79. doi: 10.1126/science.1234785.

Lim, Janghoo, Tong Hao, Chad Shaw, Akash J. Patel, Gábor Szabó, Jean-François Rual, C. Joseph Fisk, Ning Li, Alex Smolyar, David E. Hill, Albert-László Barabási, Marc Vidal, e Huda Y. Zoghbi. 2006. «A Protein–Protein Interaction Network for Human Inherited Ataxias and Disorders of Purkinje Cell Degeneration». *Cell* 125(4):801–14. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.032.

Liu, Chen, Jian M. Ding, Lia E. Faiman, e Martha U. Gillette. 1997. «Coupling of Muscarinic Cholinergic Receptors and CGMP in Nocturnal Regulation of the Suprachiasmatic Circadian Clock». *The Journal of Neuroscience* 17(2):659–66. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-02-00659.1997.

Liu, J., T. S. Tang, H. Tu, O. Nelson, E. Herndon, D. P. Huynh, S. M. Pulst, e I. Bezprozvanny. 2009. «Deranged Calcium Signaling and Neurodegeneration in Spinocerebellar Ataxia Type 2». *Journal of Neuroscience* 29(29):9148–62. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0660-09.2009.

López-Otín, Carlos, Maria A. Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, e Guido Kroemer. 2013. «The Hallmarks of Aging». *Cell* 153(6):1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.

Louis R Lapierre, Caroline Kumsta, Marco Sandri, Andrea Ballabio, e Malene Hansen. 2015. «Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging».

Luigi Fontana, Linda Partridge, e Valter D. Longo. 2010. «Extending Healthy Life Span—From Yeast to Humans». 328:321–26.

Magaña, J. J., L. Velázquez-Pérez, e B. Cisneros. 2013. «Spinocerebellar Ataxia Type 2: Clinical Presentation, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Perspectives». *Molecular Neurobiology* 47(1):90–104. doi: 10.1007/s12035-012-8348-8.

Mariani, E., M. C. Polidori, A. Cherubini, e P. Mecocci. 2005. «Oxidative Stress in Brain Aging, Neurodegenerative and Vascular Diseases: An Overview». *Journal of Chromatography B* 827(1):65–75. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.04.023.

Mayer, Christopher M., Laura J. Fick, Sarah Gingerich, e Denise D. Belsham. 2009. «Hypothalamic Cell Lines to Investigate Neuroendocrine Control Mechanisms». *Frontiers in Neuroendocrinology* 30(3):405–23. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.03.005.

Michael Ristow e Sebastian Schmeisser. 2011. «Extending life span by increasing oxidative stress». 51(2):327–36. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.010.

Morrisette-Thomas, Vincent, Alan A. Cohen, Tamàs Fülöp, Éléonor Riesco, Véronique Legault, Qing Li, Emmanuel Milot, Francis Dusseault-Bélanger, e Luigi Ferrucci. 2014. «Inflamm-Aging Does Not Simply Reflect Increases in pro-Inflammatory Markers». *Mechanisms of Ageing and Development* 139:49–57. doi: 10.1016/j.mad.2014.06.005.

Muñoz, Mario F., Sandro Argüelles, Mercedes Cano, Francesco Marotta, e Antonio Ayala. 2017. «Aging and Oxidative Stress Decrease Pineal Elongation Factor 2: In Vivo Protective Effect of Melatonin in Young Rats Treated With Cumene Hydroperoxide: P INEAL EEf-2 P ROTECTION BY M ELATONIN». *Journal of Cellular Biochemistry* 118(1):182–90. doi: 10.1002/jcb.25624.

Nechiporuk, T. 1998. «The mouse SCA2 gene: cDNA sequence, alternative splicing and protein expression». *Human Molecular Genetics* 7(8):1301–9. doi: 10.1093/hmg/7.8.1301.

Neuwald, Andrew F., e Eugene V. Koonin. 1997. «Ataxin-2, global regulators and bacterial gene expression, and spliceosomal snRNP proteins share a conserved domain». *Journal of Molecular Medicine* 76(1):3–5. doi: 10.1007/s001090050184.

Nicholas J. Hunt, Sun Woo (Sophie) Kang, Glen P. Lockwood, David G. Le Couteur, e Victoria C. Cogger. 2019. «Hallmarks of Aging in the Liver». *Computational and Structural Biotechnology Journal* 17 (1151–1161).

Nir Barzilai, Derek M. Huffman, Radhika H. Muzumdar, e Andrzej Bartke. 2012. «The Critical Role of Metabolic Pathways in Aging». doi: 10.2337/db11-1300.

Nóbrega, Clévio, Sara Carmo-Silva, David Albuquerque, Ana Vasconcelos-Ferreira, Udaya-Geetha Vijayakumar, Liliana Mendonça, Hirokazu Hirai, e Luís Pereira de Almeida. 2015. «Re-Establishing Ataxin-2 Downregulates Translation of Mutant Ataxin-3 and Alleviates Machado–Joseph Disease». *Brain* 138(12):3537–54. doi: 10.1093/brain/awv298.

Nonhoff, Ute, Markus Ralser, Franziska Welzel, Ilaria Piccini, Daniela Balzereit, Marie-Laure Yaspo, Hans Lehrach, e Sylvia Krobitsch. 2007. «Ataxin-2 Interacts with the DEAD/H-Box RNA Helicase DDX6 and Interferes with P-Bodies and Stress Granules» editado por J. Weissman. *Molecular Biology of the Cell* 18(4):1385–96. doi: 10.1091/mbc.e06-12-1120.

Nonis, David, Mirko H. H. Schmidt, Simone van de Loo, Florian Eich, Ivan Dikic, Joachim

- Nowock, e Georg Auburger. 2008. «Ataxin-2 Associates with the Endocytosis Complex and Affects EGF Receptor Trafficking». *Cellular Signalling* 20(10):1725–39. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.05.018.
- Nunes, Catarina, Isa Mestre, Adriana Marcelo, Rebekah Koppenol, Carlos A. Matos, e Clévio Nóbrega. 2019. «MSGP: The First Database of the Protein Components of the Mammalian Stress Granules». *Database* 2019. doi: 10.1093/database/baz031.
- Ostrowski, Lauren, Amanda Hall, e Karim Mekhail. 2017. «Ataxin-2: From RNA Control to Human Health and Disease». *Genes* 8(6):157. doi: 10.3390/genes8060157.
- Pal, Sangita, e Jessica K. Tyler. 2016. «Epigenetics and Aging». *Science Advances* 2(7):e1600584. doi: 10.1126/sciadv.1600584.
- Patel, Avinash, Hyun O. Lee, Louise Jawerth, Shovamayee Maharana, Marcus Jahnel, Marco Y. Hein, Stoyno Stoynov, Julia Mahamid, Shambaditya Saha, Titus M. Franzmann, Andrej Pozniakovski, Ina Poser, Nicola Maghelli, Loic A. Royer, Martin Weigert, Eugene W. Myers, Stephan Grill, David Drechsel, Anthony A. Hyman, e Simon Alberti. 2015. «A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation». *Cell* 162(5):1066–77. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.047.
- Pchitskaya, Ekaterina, Elena Popugaeva, e Ilya Bezprozvanny. 2018. «Calcium Signaling and Molecular Mechanisms Underlying Neurodegenerative Diseases». *Cell Calcium* 70:87–94. doi: 10.1016/j.ceca.2017.06.008.
- Petervari, E., S. Soos, M. Szekely, e M. Balasko. 2011. «Alterations in the Peptidergic Regulation of Energy Balance in the Course of Aging». *Current Protein & Peptide Science* 12(4):316–24. doi: 10.2174/138920311795906709.
- Pulst, Stefan-M., Alex Nechiporuk, Tamilla Nechiporuk, Suzana Gispert, Xiao-Ning Chen, Iscia Lopes-Cendes, Susan Pearlman, Sidney Starkman, Guillermo Orozco-Diaz, Astrid Lunkes, Pieter DeJong, Guy A. Rouleau, Georg Auburger, Julie R. Korenberg, Carla Figueroa, e Soodabeh Sahba. 1996. «Moderate Expansion of a Normally Biallelic Trinucleotide Repeat in Spinocerebellar Ataxia Type 2». *Nature Genetics* 14(3):269–76. doi: 10.1038/ng1196-269.
- Pulst, Stefan-M., Nieves Santos, Dai Wang, Huiying Yang, Duong Huynh, Luis Velazquez, e K. Pattie Figueroa. 2005. «Spinocerebellar Ataxia Type 2: PolyQ Repeat Variation in the CACNA1A Calcium Channel Modifies Age of Onset». *Brain* 128(10):2297–2303. doi: 10.1093/brain/awh586.

- Rattan, Suresh I. S. 1996. «Synthesis, Modifications, and Turnover of Proteins during Aging». *Experimental Gerontology* 31(1–2):33–47. doi: 10.1016/0531-5565(95)02022-5.
- Rera, Michael, Sepehr Bahadorani, Jaehyoung Cho, Christopher L. Koehler, Matthew Ulgherait, Jae H. Hur, William S. Ansari, Thomas Lo, D. Leanne Jones, e David W. Walker. 2011. «Modulation of Longevity and Tissue Homeostasis by the Drosophila PGC-1 Homolog». *Cell Metabolism* 14(5):623–34. doi: 10.1016/j.cmet.2011.09.013.
- Rogers, Nicole H., Alejandro Landa, Seongjoon Park, e Roy G. Smith. 2012. «Aging Leads to a Programmed Loss of Brown Adipocytes in Murine Subcutaneous White Adipose Tissue». *Aging Cell* 11(6):1074–83. doi: 10.1111/accel.12010.
- Roosendaal, B., W. A. van Gool, D. F. Swaab, J. E. Hoogendijk, e M. Mirmiran. 1987. «Changes in Vasopressin Cells of the Rat Suprachiasmatic Nucleus with Aging». *Brain Research* 409(2):259–64. doi: 10.1016/0006-8993(87)90710-4.
- Rossi, Derrick J., David Bryder, Jun Seita, Andre Nussenzweig, Jan Hoeijmakers, e Irving L. Weissman. 2007. «Deficiencies in DNA Damage Repair Limit the Function of Haematopoietic Stem Cells with Age». *Nature* 447(7145):725–29. doi: 10.1038/nature05862.
- Russell, Steven J., e C. Ronald Kahn. 2007. «Endocrine Regulation of Ageing». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(9):681–91. doi: 10.1038/nrm2234.
- Sadagurski, Marianna, Gillian Cady, e Richard A. Miller. 2017. «Anti-Aging Drugs Reduce Hypothalamic Inflammation in a Sex-Specific Manner». *Aging Cell* 16(4):652–60. doi: 10.1111/accel.12590.
- Sahba, Soodabeh, Alex Nechiporuk, Karla P. Figueroa, Tamilla Nechiporuk, e Stefan-M. Pulst. 1998. «Genomic Structure of the Human Gene for Spinocerebellar Ataxia Type 2 (SCA2) on Chromosome 12q24.1». *Genomics* 47(3):359–64. doi: 10.1006/geno.1997.5131.
- Salminen, Antero, Kai Kaarniranta, e Anu Kauppinen. 2012. «Inflammaging: Disturbed Interplay between Autophagy and Inflammasomes». *Aging* 4(3):166–75. doi: 10.18632/aging.100444.
- Sara Carmo-Silva. 2016. «Unravelling the role of ataxin-2 in the hypothalamus: a new player in metabolism». Coimbra.
- Satinoff, Evelyn. 1998. «PATTERNS OF CIRCADIAN BODY TEMPERATURE RHYTHMS

- IN AGED RATS». *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 25(2):135–40. doi: 10.1111/j.1440-1681.1998.tb02192.x.
- Shibata, H. 2000. «A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2». *Human Molecular Genetics* 9(9):1303–13. doi: 10.1093/hmg/9.9.1303.
- Shimobayashi, Etsuko, e Josef P. Kapfhammer. 2018. «Calcium Signaling, PKC Gamma, IP3R1 and CAR8 Link Spinocerebellar Ataxias and Purkinje Cell Dendritic Development». *Current Neuropharmacology* 16(2). doi: 10.2174/1570159X15666170529104000.
- Spiekerman, A. M., M. E. Hetherly, e F. F. Hall. 1975. «Improved High-Resolution High-Voltage Paper Electrophoresis System for Use in Screening for Aminoacidopathies». *Clinical Chemistry* 21(13):1981–82.
- Stallone, Giovanni, Barbara Infante, Concetta Prisciandaro, e Giuseppe Grandaliano. 2019. «MTOR and Aging: An Old Fashioned Dress». *International Journal of Molecular Sciences* 20(11):2774. doi: 10.3390/ijms20112774.
- Stebbins, Kevin A., Hyun W. Choi, Aditya Ravindra, e Daniel Adolfo Llano. 2016. «The Impact of Aging, Hearing Loss, and Body Weight on Mouse Hippocampal Redox State, Measured in Brain Slices Using Fluorescence Imaging». *Neurobiology of Aging* 42:101–9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.03.006.
- Swisher, Kylie D., e Roy Parker. 2010. «Localization to, and Effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on Stress Granules in *Saccharomyces Cerevisiae*» editado por T. Preiss. *PLoS ONE* 5(4):e10006. doi: 10.1371/journal.pone.0010006.
- Takahara, Terunao, e Tatsuya Maeda. 2012. «Transient Sequestration of TORC1 into Stress Granules during Heat Stress». *Molecular Cell* 47(2):242–52. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.019.
- Tsukahara, S., S. Tanaka, K. Ishida, N. Hoshi, e H. Kitagawa. 2005. «Age-Related Change and Its Sex Differences in Histoarchitecture of the Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus of F344/N Rats». *Experimental Gerontology* 40(3):147–55. doi: 10.1016/j.exger.2004.10.003.
- Tuin, I., U. Voss, J. S. Kang, K. Kessler, U. Rub, D. Nolte, H. Lochmuller, S. Tinschert, D. Claus, K. Krakow, B. Pflug, H. Steinmetz, e G. Auburger. 2006. «Stages of Sleep Pathology in Spinocerebellar Ataxia Type 2 (SCA2)». *Neurology* 67(11):1966–72. doi: 10.1212/01.wnl.0000247054.90322.14.

- Ulrich-Lai, Yvonne M., e James P. Herman. 2009. «Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses». *Nature Reviews Neuroscience* 10(6):397–409. doi: 10.1038/nrn2647.
- Um, Sung Hee, Francesca Frigerio, Mitsuhiro Watanabe, Frédéric Picard, Manel Joaquin, Melanie Sticker, Stefano Fumagalli, Peter R. Allegrini, Sara C. Kozma, Johan Auwerx, e George Thomas. 2004. «Absence of S6K1 Protects against Age- and Diet-Induced Obesity While Enhancing Insulin Sensitivity». *Nature* 431(7005):200–205. doi: 10.1038/nature02866.
- Valentinuzzi, Verónica S., Kathryn Scarbrough, Joseph S. Takahashi, e Fred W. Turek. 1997. «Effects of Aging on the Circadian Rhythm of Wheel-Running Activity in C57BL/6 Mice». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 273(6):R1957–64. doi: 10.1152/ajpregu.1997.273.6.R1957.
- Waterson, Michael J., e Tamas L. Horvath. 2015. «Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding». *Cell Metabolism* 22(6):962–70. doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.026.
- Weber, Jonasz Jeremiasz, Anna Sergeevna Sowa, Tina Binder, e Jeannette Hübener. 2014. «From Pathways to Targets: Understanding the Mechanisms behind Polyglutamine Disease». *BioMed Research International* 2014:1–22. doi: 10.1155/2014/701758.
- Weichhart, Thomas. 2018. «MTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review». *Gerontology* 64(2):127–34. doi: 10.1159/000484629.
- Westacott, Matthew J., Nikki L. Farnsworth, Joshua R. St. Clair, Greg Poffenberger, Audrey Heintz, Nurin W. Ludin, Nathaniel J. Hart, Alvin C. Powers, e Richard K. P. Benninger. 2017. «Age-Dependent Decline in the Coordinated [Ca<sup>2+</sup>] and Insulin Secretory Dynamics in Human Pancreatic Islets». *Diabetes* 66(9):2436–45. doi: 10.2337/db17-0137.
- Wiedemeyer, Ruprecht, Frank Westermann, Isabel Wittke, Joachim Nowock, e Manfred Schwab. 2003. «Ataxin-2 Promotes Apoptosis of Human Neuroblastoma Cells». *Oncogene* 22(3):401–11. doi: 10.1038/sj.onc.1206150.
- Wiley, H. Steven, e Patrick M. Burke. 2001. «Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling by Endocytic Trafficking». *Traffic* 2(1):12–18. doi: 10.1034/j.1600-0854.2001.020103.x.
- Williams, Robert. 2016. *Williams Textbook of Endocrinology*. 13th edition. editado por S.

Melmed, K. S. Polonsky, P. R. Larsen, e H. Kronenberg. Philadelphia, PA: Elsevier.

Yang, Shi-Bing, An-Chi Tien, Gayatri Boddupalli, Allison W. Xu, Yuh Nung Jan, e Lily Yeh Jan. 2012. «Rapamycin Ameliorates Age-Dependent Obesity Associated with Increased MTOR Signaling in Hypothalamic POMC Neurons». *Neuron* 75(3):425–36. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.043.

Yokoshi, Moe, Quan Li, Munetaka Yamamoto, Hitomi Okada, Yutaka Suzuki, e Yukio Kawahara. 2014. «Direct Binding of Ataxin-2 to Distinct Elements in 3' UTRs Promotes mRNA Stability and Protein Expression». *Molecular Cell* 55(2):186–98. doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.022.

Yoon, Mee-Sup, e Cheol Soo Choi. 2016. «The Role of Amino Acid-Induced Mammalian Target of Rapamycin Complex 1(MTORC1) Signaling in Insulin Resistance». *Experimental & Molecular Medicine* 48(1):e201–e201. doi: 10.1038/emm.2015.93.

Yu, Wangjie, e Paul E. Hardin. 2006. «Circadian Oscillators of *Drosophila* and Mammals». *Journal of Cell Science* 119(23):4793–95. doi: 10.1242/jcs.03174.

Zannas, Anthony S. 2016. «Editorial Perspective: Psychological Stress and Epigenetic Aging – What Can We Learn and How Can We Prevent?» *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 57(6):674–75. doi: 10.1111/jcpp.12535.

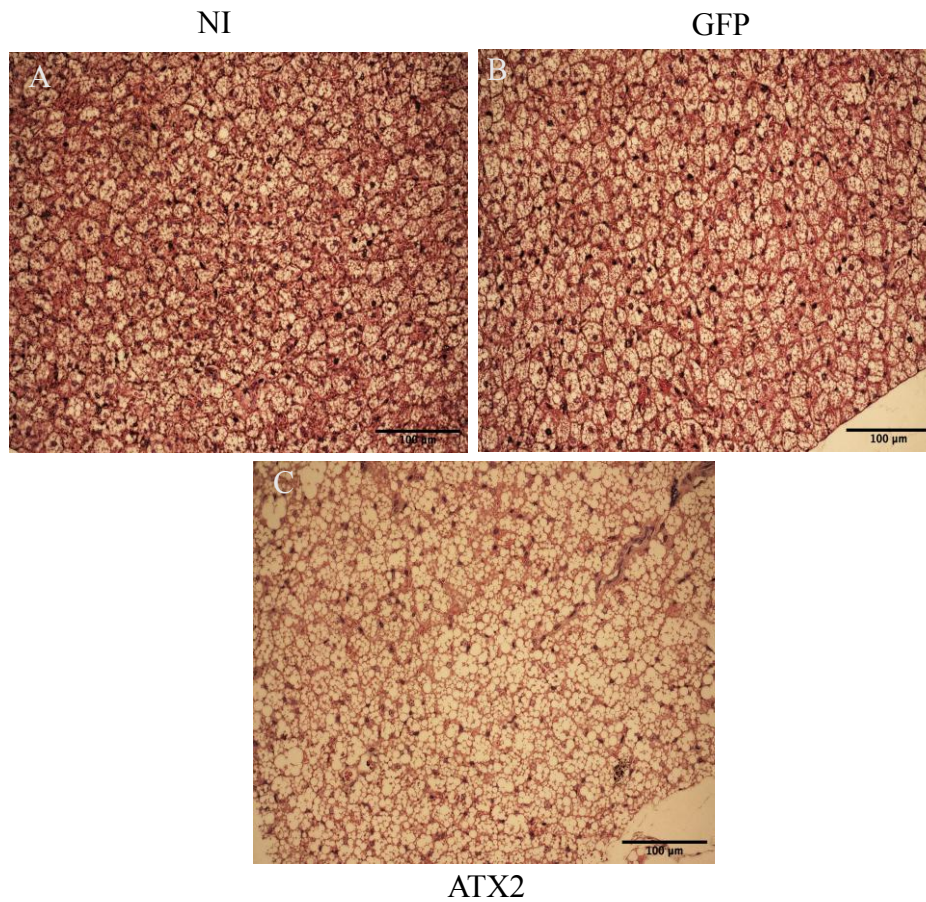
Zannas, Anthony S., Janine Arloth, Tania Carrillo-Roa, Stella Iurato, Simone Röh, Kerry J. Ressler, Charles B. Nemeroff, Alicia K. Smith, Bekh Bradley, Christine Heim, Andreas Menke, Jennifer F. Lange, Tanja Brückl, Marcus Ising, Naomi R. Wray, Angelika Erhardt, Elisabeth B. Binder, e Divya Mehta. 2015. «Lifetime Stress Accelerates Epigenetic Aging in an Urban, African American Cohort: Relevance of Glucocorticoid Signaling». *Genome Biology* 16(1):266. doi: 10.1186/s13059-015-0828-5.

Zhang, Guo, Juxue Li, Sudarshana Purkayastha, Yizhe Tang, Hai Zhang, Ye Yin, Bo Li, Gang Liu, e Dongsheng Cai. 2013. «Hypothalamic Programming of Systemic Ageing Involving IKK- $\beta$ , NF-KB and GnRH». *Nature* 497(7448):211–16. doi: 10.1038/nature12143.

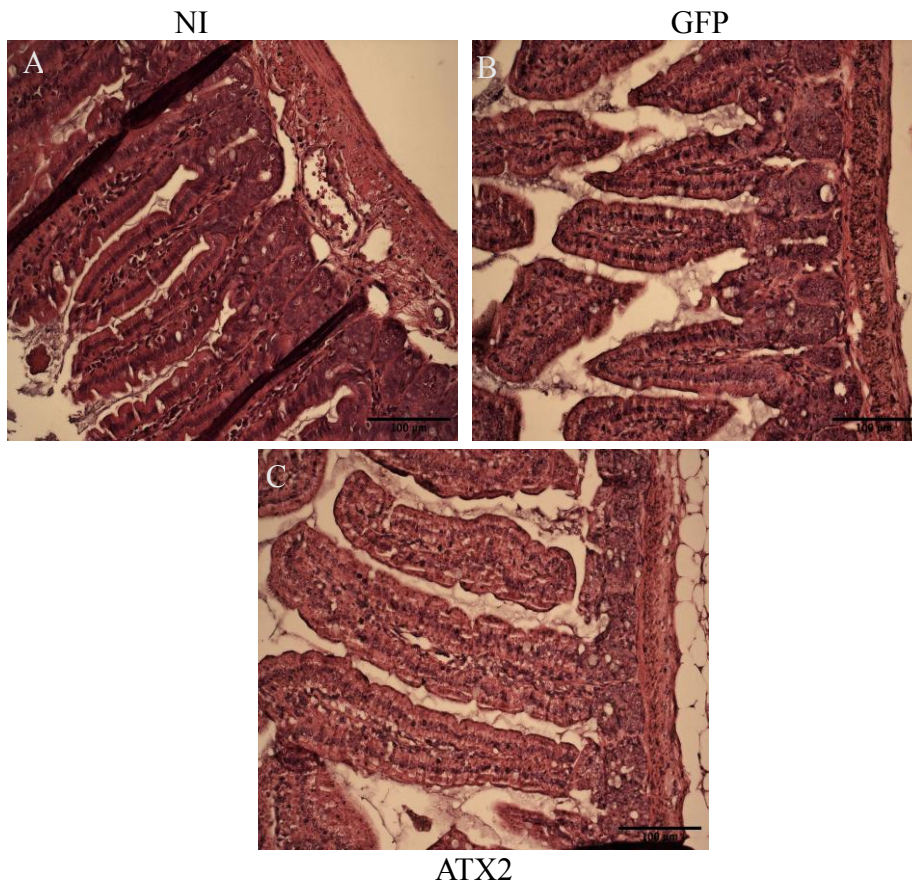
Zhang, Ke, J. Gavin Daigle, Kathleen M. Cunningham, Alyssa N. Coyne, Kai Ruan, Jonathan C. Grima, Kelly E. Bowen, Harsh Wadhwa, Peiguo Yang, Frank Rigo, J. Paul Taylor, Aaron D. Gitler, Jeffrey D. Rothstein, e Thomas E. Lloyd. 2018. «Stress Granule Assembly Disrupts Nucleocytoplasmic Transport». *Cell* 173(4):958-971.e17. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.025.

Zhang, Y., J. Ling, C. Yuan, R. Dubruille, e P. Emery. 2013. «A Role for Drosophila ATX2 in Activation of PER Translation and Circadian Behavior». *Science* 340(6134):879–82. doi: 10.1126/science.1234746.

## Anexos



**Anexo 1 - Não se observaram alterações no BAT entre os diferentes grupos experimentais.**  
**A)** BAT de animais não injetados. **B)** BAT de animais injetados com GFP. **C)** BAT de animais injetados com ataxina-2 onde não se observa diferenças comparativamente aos grupos controle.

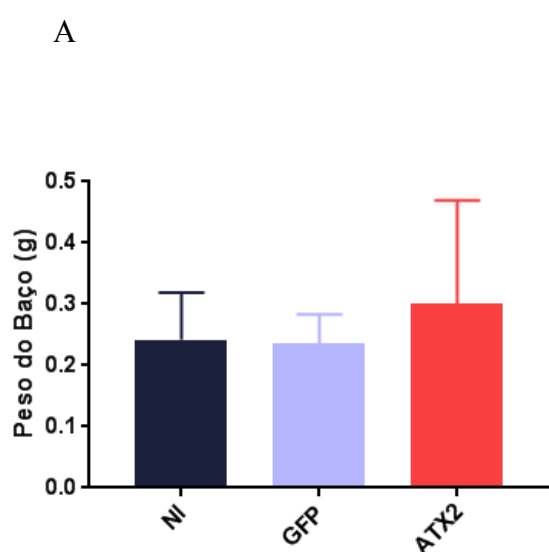


**Anexo 2 - Não se observaram alterações no GUT entre os grupos experimentais em estudo.**

**A)** GUT de animais não injetados. **B)** GUT de animais injetados com GFP. **C)** GUT de animais injetados com ataxina-2 onde não foram observadas diferenças significativas comparativamente aos grupos NI e GFP.

**Anexo 3 - Sequências dos diferentes primers utilizados neste estudo.**

Primers	Sequências
<b>GAPDH</b>	GGGTCCCAGCTTAGGTTTCATC
<b>LC3</b>	Rev- TGGAGTCTTACACAGCCATTGC Fwd- GACGGCTTCCTGTACATGGTTT
<b>POMC</b>	Rev-CGTA CTTC CGGGGGTTTCA Fwd-CAACCTGCTGGCTTGCATC
<b>p62</b>	Rev-GGTGGAGGGTGCTTTGAATA Fwd-ATGCTGTCCATGGGTTTCTC
<b>Beclina</b>	Rev-GCTTTTGTCCACTGCTCCTC Fwd-TTTTCTGGACTGTGTGCAGC
<b>AgRP</b>	Rev-CGCGGTTCTGTGGATCTAGC Fwd-TCCCAGAGTTCCCAGGTCTAA
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	CTGAGGTCAATCTGCCCAAGTAC
<b>PABC1</b>	Rev-GAATATGCCCGGTGCTATCCG Fwd-ACTCGTGGAACCTGTGAGGAA
<b>mTOR</b>	Rev-TGTGCTCCAGCTCTGTCAGGA Fwd-TCCTGCGCAAGATGCTCATC

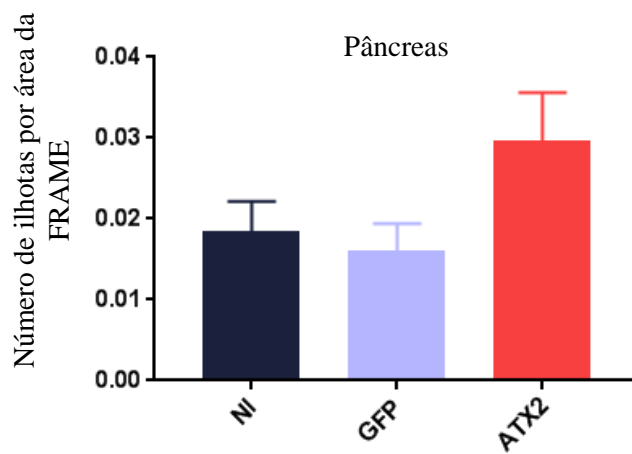


**B**



**Anexo 4 - Animais injetados com ataxina-2 apresentam baços mais pesados.**

**A)** Apesar das diferenças não serem significativas observou-se que os animais injetados com ataxina-2 apresentaram baços mais pesados que os dos grupos de controlo. **B)** Imagem do baço de um animal ATX2 comparativamente a um baço de um animal controlo (dentro do tubo).



**Anexo 5 - Os animais injetados com ataxina-2 apresentam maior número de ilhotas.**  
Apesar das diferenças não serem significativas, os animais ATX2 apresentam um maior número de ilhotas comparativamente aos grupos controlo.