

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto
Instituto Politécnico do Porto

Sara Alexandra Pires Pousa Carvalho

**Identificação de compostos que
modulam a patogénese da doença de
Machado-Joseph em *C. elegans*: autofagia
como alvo terapêutico**

Identification of small compounds that
modulate pathogenesis of Machado-Joseph
disease in a *C. elegans* model: targeting
autophagy

Dissertação de Mestrado em
Tecnologia Bioquímica em Saúde

Dezembro de 2012

Sara Alexandra Pires Pousa Carvalho

**Identificação de compostos que modulam a patogénese da
doença de Machado-Joseph em *C. elegans*: autofagia como alvo
terapêutico**

Identification of small compounds that modulate pathogenesis of
Machado-Joseph disease in a *C. elegans* model: targeting autophagy

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia e Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Patrícia Maciel, Professora Auxiliar da Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho e Investigadora no Domínio de Neurociências da Escola Ciências da Saúde da Universidade do Minho, sob co-orientação científica da Doutora Andreia Castro, Investigadora no Domínio de Neurociências da Escola Ciências da Saúde da Universidade do Minho e sob co-orientação institucional de Professora Doutora Cristina Prudêncio, Professora Coordenadora com Agregação da área técnico-científica do Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde.

Dezembro de 2012

*Aos meus pais, por todo o apoio e porque vos amo; ao André, por estar sempre presente;
à minha tia Mira, que me faz muita falta...*

Agradecimentos

À Professora Doutora Patrícia Maciel que me acolheu no seu grupo de investigação. Estou muito grata pela sua grande disponibilidade nas correções rápidas, pelas ideias e pelo seu rigor. Pelos encontros no Porto em cima hora. Muito obrigada!

À Professora Doutora Cristina Prudêncio, por me ter aceite como aluna de Mestrado e assim me ter dado a possibilidade de integrar neste grupo e de realizar este trabalho. Obrigada pela disponibilidade... Muito obrigada!

Ao Professor Doutor Rúben Fernandes, pela sua energia e alegria, pela enorme disponibilidade para todos os seus alunos e por TUDO! Obrigada!

A toda a equipa de docentes do Mestrado, pela dinâmica, disponibilidade e compreensão.

À Andreia Castro pela tua grande dedicação, pela amizade, por me transmitires o teu fascínio pelos *C.elegans*, por estares sempre presente, por acreditares nas minhas capacidades e por nunca teres desistido de mim. OBRIGADA POR TUDO!

À Adriana Miranda, por iniciarmos juntas o gosto pelas neurociências, por partilharmos quase tudo inclusive as refeições, Gostava muito das tuas bolachas! Pelas longas conversas na hora de almoço, pela tua luta e persistência e por deixares saudades... Obrigada!

À Ana Jalles, por nos teres ensinado tudo que sabias e por nunca te importares de repetir se não entendêssemos. E pelas conversas quando íamos “lá em cima”. Obrigada!

À dupla Sara Silva e Andreia Carvalho, vocês são super divertidas aprendi muito convosco. Obrigada por me transmitirem o gosto que têm pela investigação e pelos *ratinhos* mas eu prefiro os *C. elegans*!

Ao Doutor Carlos Bessa, pela excelente arguência e pela grande ajuda e disponibilidade no aperfeiçoamento da tese após a minha defesa. Obrigada mais uma vez!!

À Patrícia pelas nossas longas conversas na cozinha e por teres sido o meu apoio e companhia em Braga. Adoro-te!

Aos restantes colegas das Neurociências, pelas discussões científicas das terças-feiras. E a todas as pessoas que contribuem para o bom funcionamento do ICVS.

Pessoal do Mestrado principalmente ao grupinho de amigas Filipa Ferreira, Cátia Vieira e Sara Costa, por estudarmos juntas, pelas longas horas de trabalho, mas eficientes. Levo-vos comigo!

Aos meus amigos e colegas da equipa CODE Porto Plaza por nos completarmos tão bem, pela nossa união esforço e dedicação. Por não entenderem lá muito bem aquilo que eu estava a escrever, mas pelo apoio moral por me perguntarem como ia a tese, pela preocupação pelo companheirismo, pela humildade e acima de tudo pela amizade. Não tenho palavras! Aprendo todos os dias convosco! Muito Obrigada por tudo! NUNCA PODEMOS DESISTIR!!! ADORO-VOS!

Ao André pelo apoio, dedicação, companheirismo e por seres a pessoa que eu sempre esperei que fosses. E por seres aquele que me dá na cabeça quando estou errada, às vezes não gosto, mas continua assim ... E porque TE AMO MUITO! É tão bom ter-te ao meu lado!

À Família Barros, Maria José, António, Inês, Avó Rosalina, por todo o apoio, carinho e dedicação.

Aos meus PAIS, Fernanda e Manuel, porque vos amo, por todos os sacrifícios que fizeram, por estarem sempre ao meu lado e por serem os meus melhores amigos! **MUITO OBRIGADA MEUS PAIS!**

À minha FAMÍLIA, avó, tios e tias, primos e primas e padrinhos... que de algum modo contribuíram para a realização do presente trabalho o meu obrigado! E por acreditarem em mim! Obrigada!

À minha Família de AMIGOS que mantenho do Porto, da 'Toquinha', de Paranhos, da Filipa de Vilhena, da Catequese e da Faculdade e do Curso de Anatomia Patológica. Que durante estes anos crescemos, aprendemos e evoluímos juntos. **VOÇES** contribuíram para o meu crescimento pessoal. Adoro-vos! Obrigada por continuarem comigo!!

Resumo

A doença de Machado-Joseph (DMJ) ou ataxia espinocerebelosa do tipo 3 (SCA3), conhecida por ser a mais comum das ataxias hereditárias dominantes em todo o mundo, é uma doença neurodegenerativa autossômica dominante que leva a uma grande incapacidade motora, embora sem alterar o intelecto, culminando com a morte do doente. Atualmente não existe nenhum tratamento eficaz para esta doença.

A DMJ é resultado de uma alteração genética causada pela expansão de uma sequência poliglutâmica (poliQ), na região C-terminal do gene que codifica a proteína ataxina-3 (ATXN3). Os mecanismos celulares das doenças de poliglutaminas que provocam toxicidade, bem como a função da ATXN3, não são ainda totalmente conhecidos.

Neste trabalho, usamos, pela sua simplicidade e potencial genético, um pequeno animal invertebrado, o nemátode *C. elegans*, com o objetivo de identificar fármacos eficazes para o combate contra a patogênese da DMJ, analisando simultaneamente o seu efeito na agregação da ATXN3 mutante nas células neuronais *in vivo* e o seu impacto no comportamento motor dos animais. Este pequeno invertebrado proporciona grandes vantagens no estudo dos efeitos tóxicos de proteínas poliQ nos neurónios, uma vez que a transparência das suas 959 células (das quais 302 são neurónios) facilita a deteção de proteínas fluorescentes *in vivo*. Para além disso, esta espécie tem um ciclo de vida curto, é económica e de fácil manutenção.

Neste trabalho testámos no nosso modelo transgénico da DMJ com 130Qs em *C. elegans* dois compostos potencialmente moduladores da agregação da ATXN3 mutante e da resultante disfunção neurológica, atuando pela via da autofagia. De modo a validar a possível importância terapêutica da ativação da autofagia os compostos candidatos escolhidos foram o Litíio e o análogo da Rapamicina CCI-779, testados independentemente e em combinação. A neuroproteção conferida pelo Litíio e pelo CCI-779 independentemente sugere que o uso destes fármacos possa ser considerado uma boa estratégia como terapia para a DMJ, a testar em organismos evolutivamente mais próximos do humano. A manipulação da autofagia, segundo vários autores, parece ser benéfica e pode ser a chave para o desenvolvimento de novos tratamentos para várias doenças relacionadas com a agregação proteica e o envelhecimento.

Palavras-Chave

Ataxia; ataxia espinocerebelosa; doença de Machado-Joseph; ataxina-3; ATXN3.

Abstract

Machado-Joseph disease (MJD), or spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3), known to be the most dominant common of the hereditary ataxias worldwide, is an autosomal dominant neurodegenerative disease that leads to a marked motor disability, although never changing the intellect, culminating in the death of the patient. Currently there is no effective treatment for this disease.

MJD is a result of a genetic change caused by the expansion of polyglutamine (polyQ) sequence in the C-terminal region of the gene that encodes the protein ataxin-3 (ATXN3). The cellular mechanisms of polyglutamine disease that cause toxicity and also the function of ATXN3 are not yet fully understood.

In this paper, we use, for its simplicity and genetic potential, a small invertebrate animal, the nematode *C. elegans*, with the goal of identifying effective drugs to combat the pathogenesis of MJD, simultaneously analyzing their effect on the aggregation of mutant ATXN3 in neuronal cells *in vivo* and their impact on, the locomotion behavior of these animals. This small invertebrate provides great advantages in studying the toxicity of polyQ proteins in neurons, because of its 959 transparent cells (of which 302 are neurons) which make the process of detection of fluorescent proteins *in vivo* easy. Furthermore, this species has a short life cycle, it is economic and easy to maintain.

In this work we have tested in our transgenic model of MJD 130Qs in *C.elegans* two compounds with the potential to modulate the aggregation of mutant ATXN3 and the results neurological dysfunction, through the autophagy pathway. In order to validate the possible therapeutic importance of activation of autophagy the candidate compounds chosen were lithium and the analog of Rapamycin CCI-779 tested independently and also in combination.

The neuroprotection conferred by lithium and CCI-779 independently suggests that the use of these drugs may be considered as a good strategy for therapy in MJD and worldwide to test in organisms evolutionarily closer to humans. Manipulation of autophagy, according to several authors, seems to be benefic and may be key to the development of new treatments for various protein aggregation and aging-related diseases.

Keywords

Ataxia; spinocerebellar ataxia; Machado-Joseph disease; ataxin-3; ATXN3.

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	1
Abstract	3
Índice.....	4
Índice de Abreviaturas	7
Índice de Quadros	9
Índice de Figuras	10
Capítulo I.....	11
Revisão Bibliográfica.....	11
1. Doenças Neurodegenerativas	12
2. Doenças de Poliglutaminas (PoliQ)	12
3. Doença de Machado-Joseph/Ataxia Espinocerebelosa Tipo 3.....	15
i. Definição	16
ii. Sintomas Clínicos da DMJ.....	16
iii. Características da Patologia na DMJ.....	17
iv. Genética e Diagnóstico da DMJ.....	18
4. A DMJ e a Ataxina-3	19
5. Envelhecimento.....	21
6. <i>Misfolding</i> e agregação.....	21
7. Alvos Terapêuticos.....	23
i. Chaperones Moleculares (CM)	23
ii. Sistema Ubiquitina-proteossoma (UPS).....	23
iii. Autofagia.....	25
8. Autofagia como alvo terapêutico	26
i. Autofagia mediada por chaperones (AMC)	27

ii.	Microautofagia	28
iii.	Macroautofagia.....	28
9.	Modelos Animais da DMJ.....	29
10.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	30
i.	Modelo Transgênico.....	32
11.	Biblioteca de fármacos	33
12.	Compostos identificados	34
13.	Compostos que ativam a Autofagia.....	34
i.	Rapamicina.....	34
ii.	Cloreto de Lítio	35
iii.	Combinação de LiCl com Rapamicina.....	35
	Capítulo II	37
	Objetivos	37
	Capítulo III.....	39
	Material & Métodos	39
1.	Materiais.....	40
i.	Compostos.....	40
ii.	Modelos de <i>C. elegans</i>	40
2.	Métodos.....	41
i.	Manutenção e crescimento	42
ii.	Técnica de sincronização dos animais.....	42
iii.	Verificação da toxicidade dos fármacos em meio líquido.....	42
iv.	Ensaio comportamentais: fenótipo motor	43
v.	Ensaio do fenótipo de agregação.....	43
vi.	Estatística	44
	Capítulo IV.....	45
	Resultados	45

Capítulo V	56
Discussão dos Resultados.....	56
Capítulo VI.....	61
Conclusão & Perspetivas Futuras.....	61
Capítulo VII	64
Referências Bibliográfica.....	64
Capítulo VIII	71
Anexos.....	71

Índice de Abreviaturas

AR – *Androgen Receptor*

AMC – Autofagia mediada por chaperones

ATXN3 - ataxina-3

AT3q130 – ataxina-3 mutada contendo um segmento de 130 pliglutaminas

C. elegans - *Caenorhabditis elegans*

C14 - cisteína

CCI-779 – Inibidor do ciclo celular - 779

CM – Chaperones moleculares

CNV – Cordão nervoso ventral

CND – Cordão nervoso dorsal

DH - Doença de Huntington

DMJ - Doença de Machado-Joseph

DO – Densidade ótica

DP - Doença de Parkinson

DRPLA: Atrofia dentatorubropalidoluisiana

E1- Enzima ativadora da ubiquitina

E2- Enzima conjugadora

E3- Ubiquitina ligase

ELA - Esclerose lateral amiotrófica

FRAP – *Fluorescence recovery after photobleaching*

GSK-3 β - Glicogénio sintase cinase-3 β

H119 - Histidina

Htt - Huntingtina

HSPs – Proteínas de choque térmico

ICVS: Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde

IMPase - Inositol monofosfatase

IN – Inclusões nucleares

mtDNA - DNA mitocondrial

mTOR - Alvo da rapamicina em mamíferos

NGM - *Nematode growth medium*

poliQ - Poliglutamína

RPM - Rotações por minuto

SBMA - Atrofia muscular espinobulbar

SCA1- *Spinocerebellar ataxia type 1*

SCA2 - *Spinocerebellar ataxia type 2*

SCA3 - *Spinocerebellar ataxia type 3*

SCA6 - *Spinocerebellar ataxia type 6*

SCA7 - *Spinocerebellar ataxia type 7*

SCA17- *Spinocerebellar ataxia type 17*

UIM - *Ubiquitin interacting motif*

UPS – *Ubiquitin proteasome system*

VCP/p97 - *Valosin-containing protein/p97*

YFP - *Yellow fluorescent protein*

WT – Wild- type

Índice de Quadros

Tabela I - Doenças de poliglutaminas: características moleculares.	13
---	----

Índice de Figuras

Figura I - Doenças neurodegenerativas associadas à expansão de repetições de CAG	14
Figura II – Regiões do cérebro afetadas na DMJ	18
Figura III - Esquema representativo da estrutura da proteína Atx3.	20
Figura IV - Sistemas celulares de controlo de qualidade das proteínas.	25
Figura V – Mecanismo da Autofagia. Adaptado de (Noboru Mizushima et al. 2008)	27
Figura VI – Ciclo de vida do nemátode <i>C. elegans</i>	31
Figura VII- Anatomia do nematode <i>C. elegans</i>	32
Figura VIII- Representação esquemática indução da autofagia por diferentes compostos / vias dos compostos que facilitam a remoção de huntingtina mutante em vários modelos de DH.	36
Figura IX – Desenho experimental para o <i>screening</i> de compostos potencialmente terapêuticos para a patogénese da DMJ em <i>C. elegans</i>	41
Figura X - Verificação da toxicidade dos fármacos.	47
Figura XI - Animais AT3q130 tratados com os compostos indutores da via da autofagia.....	49
Figura XII - Animais AT3q130 tratados com LiCl,	53
Figura XIII - Animais AT3q130 tratados com CCI-779 para fenótipo de agregação.	54
Figura XIV- Tratamento farmacológico dos animais da ATXN3 mutante com LiCl, CCI-779.....	55

Capítulo I

Revisão Bibliográfica

1. Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são geralmente progressivas, de início tardio, e envolvem perda seletiva de células neuronais, axónios e dendrites e / ou sinapses com degenerescência em regiões específicas do cérebro, e depósitos anómalos de proteínas nos neurónios e noutras células (Taylor et al. 2002; Christopher A Ross & Poirier 2004).

Muitas destas doenças, como a doença de Parkinson (DP), a doença de Huntington (DH), a doença de Alzheimer (DA), a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), as doenças priónicas e as doenças de Poliglutaminas, são causadas por agregação de proteínas; estas doenças são conhecidas por “proteíopatias” (H L Paulson 1999). Estas doenças neurodegenerativas estão associadas a formações de agregados que parecem estar correlacionados com a toxicidade. Assim, é crucial entender os fatores que regulam os níveis de estado estacionário destas "toxinas", tanto nas etapas de síntese como na degradação (David C. Rubinsztein 2006).

Com os avanços recentes da genética molecular, os genes responsáveis por diversas doenças hereditárias foram identificados e caracterizados em detalhe. As doenças neurodegenerativas formam um grupo heterogéneo de patologias, compreendendo entidades causadas por uma série de mecanismos diferentes. Um desses mecanismos é a ocorrência de mutações dinâmicas. Essas mutações são caracterizadas por expansões de diferentes tipos de sequências de trinucleotídeos que são instáveis durante a transmissão genética (Li et al. 1993).

2. Doenças de Poliglutaminas (PoliQ)

A expansão instável de sequências de trinucleotídeos CAG na região codificante resulta na produção de poliglutaminas (poliQ) expandidas. A primeira doença ligada à expansão de uma repetição de CAGs e que causa degenerescência progressiva nos neurónios motores foi a atrofia muscular espino-bulbar (doença de Kennedy ou SBMA)(Spada et al. 1991).

Atualmente são nove as doenças neurodegenerativas que se sabe estarem relacionadas com a expansão de sequências de poliglutamina: a doença de Huntington (HD), a atrofia muscular espino-bulbar (doença de Kennedy ou SBMA), a atrofia

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

dentatorubropalidoluisiana (DRPLA), e as ataxias espinocerebelosas (SCAs) do tipo 1, 2, 3 (doença de Machado-Joseph), 6, 7 e 17 (Huda Y. Zoghbi & Harry T. Orr 2000) (Tabela I).

Tabela I - Doenças de poliglutaminas: características moleculares. Adaptado de (Gusella & MacDonald 2000; R L Margolis & C A Ross 2001; Bauer & Nobuyuki Nukina 2009)

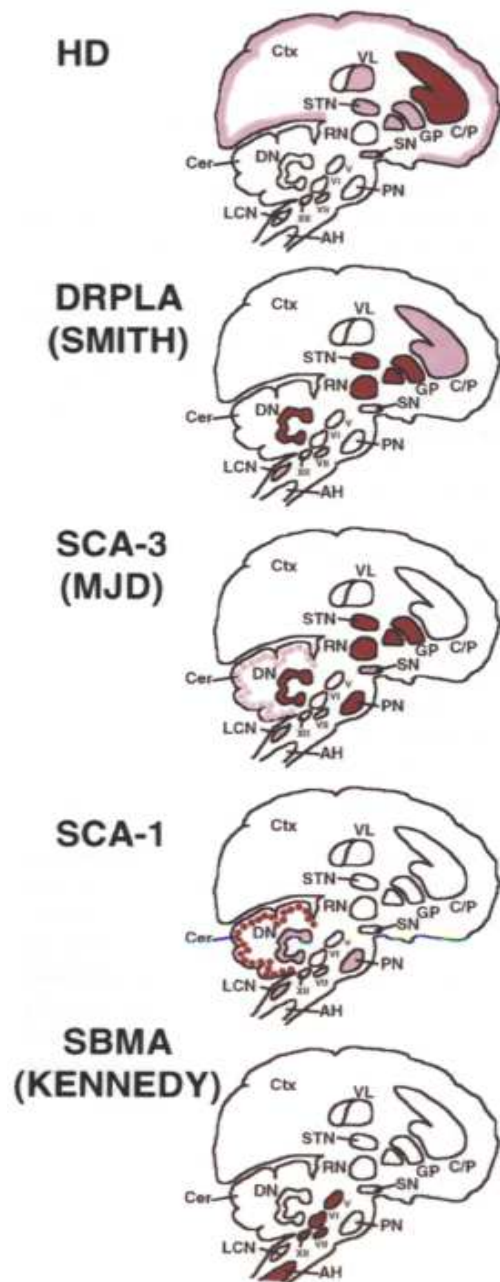
Doença	Gene	Gene Mutado	Locus	Função da Proteína	Normal (CAG)n	Expandida (CAG)n
Doença de Huntington (HD)	Huntingtina	HD	4p16.3	Sinalização, Transporte e Transcrição	6-35	36-121
Ataxia Espinocerebelosa tipo-1 (SCA1)	Ataxina-1	ATXN1	6p23	Transcrição	6-39	39-83
Ataxia Espinocerebelosa tipo-2 (SCA2)	Ataxina-2	ATXN2	12q24	Metabolismo do RNA	14-31	32-200
Ataxia Espinocerebelosa tipo-3 (SCA3; Doença de Machado-Joseph)	Ataxina-3	ATXN3	14q21	Atividade de Desubiquitilação Regulação da transcrição	12-44	52-86
Ataxia Espinocerebelosa tipo-6 (SCA6)	CACNA1A	CACNA1A	19p13	α 1A- voltagem dependente de canal de cálcio	4-20	20-30
Ataxia Espinocerebelosa tipo-7 (SCA7)	Ataxina-7	ATXN7	3p21.1-p12	Transcrição	4-35	37-306
Ataxia Espinocerebelosa tipo-17 (SCA17)	TBP	TBP	6q27	Fator de Transcrição	25-42	47-63
Atrofia Dentatorubropalidoluisiana (DRPLA)	Atrophina-1	DRPLA	12p13.31	Regulador Transcricional	3-35	49-88
Atrofia muscular espino-bulbar (Doença de Kennedy ou SBMA)	Recetor de Androgénios	AR	Xq11-12	Recetor de Hormonas esteróides	9-36	38-62

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

Todas estas doenças são causadas pela expansão de uma repetição de CAGs e caracterizam-se por uma disfunção neuronal progressiva, que ocorre tipicamente na meia-idade, e resulta em neurodegenerescência. A maioria das doenças de poliglutaminas afeta populações muito específicas de neurónios, característicos de cada uma das doenças (Figura I) (Huda Y. Zoghbi & Harry T. Orr 2000).

Figura I - Doenças neurodegenerativas associadas à expansão de repetições de CAG

Este esquema identifica os principais locais de perda neuronal em cada doença. Vermelho escuro indica grave ou perda neuronal seletiva; rosa indica perda moderada ou perda variável de células. Os círculos no córtex cerebeloso representam células de Purkinje. AH, corno anterior; Cer, córtex cerebeloso; C / P, caudado / putamen; Ctx, córtex cerebral; DN, núcleo denteado; GP, globus pallidus; LCN, núcleo cuneado lateral; PN, núcleos pânticos; RN, núcleo vermelho; SN, substância nigra; STN, núcleo subtalâmico; VL, núcleo ventrolateral do tálamo; V, VI, VII e XII, núcleos cranianos motores. Figura adaptada de (C A Ross 1995).



Com exceção da SBMA, todas as outras doenças são transmitidas de modo autossômico dominante. O diagnóstico molecular conclusivo é realizado através da determinação do número de repetições anormais presente no gene associado à doença. Em relação às ataxias espinocerebelosas, o uso de ferramentas moleculares possibilita também a diferenciação entre as diversas formas, tendo em vista que o diagnóstico realizado somente com base clínica se torna muito difícil em virtude da sobreposição dos sinais clínicos.

Não foi, até à data, esclarecido o mecanismo patogénico subjacente às doenças causadas por expansão da sequência de poliglutamina. Diversos estudos em modelos celulares e animais revelaram que estas doenças são causadas por um mecanismo de ganho de função, e que a expansão do segmento de glutaminas está na base da patogénese a elas associadas (Huda Y. Zoghbi & Harry T. Orr 2000).

Várias características comuns das doenças de poliQ indicam um efeito comum tóxico relacionados à expansão poliQ. Todas estas doenças são contínuas e progressivas. Quer as proteínas normais quer as anormais são geralmente expressas em níveis semelhantes nos tecidos. Além disso, não existe uma relação clara entre o padrão de expressão e os locais da patologia, exceto na SCA6, em que o producto do gene é expresso predominantemente nas células de Purkinje (Ishikawa et al. 1999). Embora a maioria das proteínas associadas a doenças de poliQ seja expressa de forma sistémica, a citotoxicidade parece restrita a certos subtipos neuronais no sistema nervoso central. Isto sugere que, provavelmente, existem nos neurónios vulneráveis certas condições celulares que podem causar a citotoxicidade selectiva pelos produtos dos seus genes (Bauer & Nobuyuki Nukina 2009).

Na maioria destas doenças ocorre uma relação linear inversa entre o número de repetições e a idade de manifestação dos sintomas da doença, muitas vezes associada ao fenómeno de antecipação genética, que consiste na manifestação mais grave e precoce da doença com o passar de gerações (H L Paulson 1999).

3. Doença de Machado-Joseph/Ataxia Espinocerebelosa Tipo 3

A doença de Machado-Joseph (DMJ), também conhecida como ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3), é uma doença neurodegenerativa autossómica dominante que leva a uma grande incapacidade motora (sem nunca alterar o intelecto) e culmina com a morte do doente. É resultado de uma alteração genética causada pela expansão de uma sequência poliglutamínica (poliQ), na região C-terminal da proteína ataxina-3 (ATXN3) (Takiyama et al, 1994).

i. Definição

A doença de Machado-Joseph foi inicialmente descrita em famílias emigrantes de origem açoriana a viver nos Estados Unidos, sendo mais tarde encontrada nos Açores e em Portugal Continental e posteriormente em famílias sem ascendência portuguesa. Esta doença foi reportada pela primeira vez em 1972 por Nakano e seus colaboradores, que a descreveram como uma forma de ataxia autossômica dominante nos descendentes de William Machado, à qual deram o nome de “doença de Machado” (Nakano et al. 1972). No mesmo ano, a família Thomas foi descrita por Woods e colaboradores, apresentando características idênticas às descritas por Nakano, porém com algumas particularidades. Esta doença foi designada por degenerescência nigro-espino-dentada com oftalmoplegia (Woods & Schaumburg 1972). Em 1976, foi efetuada uma terceira descrição na família de Antone Joseph, tendo sido apresentada como uma nova ataxia hereditária, à qual foi dada a designação de “doença de Joseph” (Roger N. Rosenberg et al. 1976). Coutinho e Andrade demonstraram, que, após estudarem diversas famílias açorianas, se encontrava em membros de uma mesma família características clínicas correspondentes às três descrições iniciais (P Coutinho & Andrade 1978). Em 1980, Lima e Coutinho propõem o nome de doença de Machado-Joseph para a unificação das entidades clínicas descritas anteriormente (L. Lima & P Coutinho 1980).

Esta doença passou a ser assim referida na literatura por doença de Machado-Joseph (DMJ), também como ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3), sabendo-se agora ser a mais comum das ataxias hereditárias dominantes em todo o mundo (entre 15% a 45% de todas as ataxias) (Russell L Margolis 2002).

ii. Sintomas Clínicos da DMJ

Clinicamente, esta doença neurodegenerativa de início tardio manifesta-se em média por volta dos 40 anos, no entanto existe uma grande variabilidade em termos de idades de início, estando descritos casos com início entre os 5 e os 73 anos (J Sequeiros & P Coutinho 1993).

A DMJ é caracterizada por oftalmoplegia, sinais piramidais, e em alguns casos sinais extrapiramidais, principalmente distonia, e sinais periféricos, que podem ir desde a mera ausência de reflexos, até a atrofia muscular mais ou menos pronunciadas.

Os sintomas clínicos incluem ataxia cerebelosa, que se manifesta progressivamente por alterações do equilíbrio durante a marcha, dificuldades de articulação verbal e

descoordenação dos membros superiores; oftalmoplegia externa progressiva, que se inicia por uma limitação do olhar vertical para cima, seguindo-se uma limitação da convergência e do olhar lateral, podendo ocorrer retração palpebral e, finalmente, sinais piramidais, que incluem hiperreflexia osteotendinosa, sinal de Babinski e espasticidade (P Coutinho & Andrade 1978). Os doentes têm uma sobrevivência média de 21 anos, durante a qual mantêm geralmente a capacidade intelectual bem preservada, a sua morte ocorrendo devido a complicações associadas à imobilidade prolongada.

No entanto, devido à grande variabilidade de sintomas clínicos, houve a necessidade de organizar uma classificação por subtipos distintos, tendo em conta a idade de início e os principais sintomas (L. Lima & P Coutinho 1980). A DMJ tipo I apresenta uma idade de início menor (10-30 anos), com um rápido e mais grave percurso da doença que associa a ataxia cerebelosa e a oftalmoplegia com sinais piramidais graves e extrapiramidais (distonia). A DMJ tipo II é a forma mais frequente, e corresponde a um estado intermédio em termos de gravidade e idade de início (20-50 anos), caracterizando-se pelos tradicionais sintomas de ataxia cerebelosa e oftalmoplegia, espasticidade (contrações musculares incontrolláveis), espasmos e respostas reflexas exageradas. A DMJ tipo III é uma forma de início mais tardio, com uma progressão lenta (40-70 anos), apresentando ataxia cerebelosa e oftalmoplegia, associadas a sinais periféricos mais marcados, nomeadamente alguns espasmos musculares, atrofia muscular e sensações desagradáveis tais como dormência, formigamento, câibras e dor nas mãos, pés e pernas.

Quase todos os pacientes com DMJ têm problemas de visão, incluindo visão dupla (diplopia) e visão turva, perda da capacidade de distinguir cores e/ou o contraste e a incapacidade de controlar os movimentos dos olhos.

Em 1983, foi descrito por Roger Rosenberg um tipo IV, mais raro, que corresponde a doentes com a doença de Machado-Joseph associada a parkinsonismo (Rosenberg 1983; Russell L Margolis 2002).

iii. Características da Patologia na DMJ

Em 1992, foram propostos por P. Coutinho os critérios patológicos da DMJ. Os doentes com gliose e perda neuronal dos núcleos espinocerebelosos, dentados, ponticos e vestibulares, bem como de estruturas extrapiramidais, como a substância nigra, locus coeruleus e complexo palidolusiano (Figura II). Há redução da densidade neuronal nos

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

núcleos dos nervos cranianos motores, dos cornos anteriores da medula, nos gânglios raquidianos e cordões posteriores (P Coutinho & Andrade 1978; do Carmo Costa et al. 2004; Rosenberg 1992).

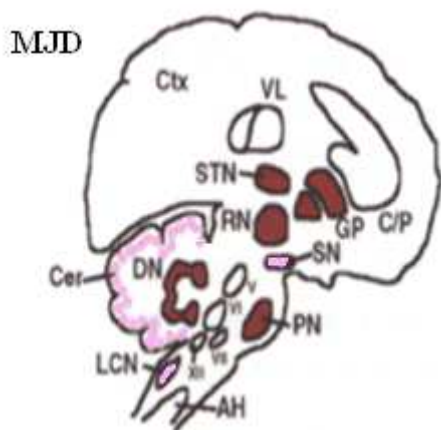


Figura II – Regiões do cérebro afetadas na DMJ

A coloração vermelho escuro indica perda neuronal grave seletiva; a rosa indica perda moderada ou variável de células. **STN**, núcleo subtalâmico; **GP**, globo pálido, **RN**, núcleo vermelho, **SN**: substância nigra, **PN**: núcleo pontino, **DN**: núcleo denteado, **LCN**: núcleo cuneado lateral, **Cer**: córtex cerebelar. Figura adaptada de (C A Ross 1995).

Anatomopatologicamente, a maioria dos cérebros de pacientes com DMJ com mais de 15 anos de duração da doença, mostrava um menor peso do que os de indivíduos sem historial médico de doenças neurológicas ou psiquiátricas (Iwabuchi et al. 1999).

Em contraste com estudos neuropatológicos convencionais anteriores, recentemente foi realizado um estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico não convencional, com cortes seriados de tecido com 100µm de espessura e cortes de 10µm de espessura para controlo histológico de cérebros de sete pacientes diagnosticados clinicamente e geneticamente com SCA3, o que revelou generalizadamente a presença de agregados de ATXN3 nos feixes de fibras axonais destes doentes. (Seidel et al. 2010).

Apesar de há muito se tentar estabelecer uma relação entre o tamanho da repetição CAG e o grau de atingimento e atrofia cerebral, os estudos realizados não têm conseguido demonstrar tal associação (Wedekind D, et al. 1998).

iv. Genética e Diagnóstico da DMJ

DMJ é causada por uma mutação no gene MJD1/ATXN3. Em 1992 foi mapeado em famílias japonesas, o gene no braço longo do cromossoma 14 (14q24.3-q32). O gene é composto por 11 exões, abrangendo uma região do genoma de cerca de 48 kb, com a sequência de (CAG)*n* localizada no exão 10 (Takiyama et al. 1993).

Relativamente a esta doença, os indivíduos normais apresentam alelos com 12 a 44 CAGs, enquanto que indivíduos doentes apresentam um segmento de 52 a 86 CAGs, o que se traduz na presença de um segmento expandido de poliglutaminas na proteína ATXN3 (Kawaguchi et al. 1994; Maciel et al. 2001). Indivíduos com repetição intermédia do segmento CAG (45-51) podem ou não manifestar a doença (Srivastava et al. 2005).

Como foi referido anteriormente, a DMJ é transmitida de forma autossómica dominante, ou seja, basta que um dos progenitores (independentemente do sexo) seja portador da mutação para existir um risco de 50% de os seus filhos (as) serem afetados. A antecipação é uma característica da DMJ, devido à correlação inversa entre o tamanho da repetição e a idade de início da doença, e a tendência para uma expansão maior da repetição patogénica em gerações sucessivas (H L Paulson 1999).

4. A DMJ e a Ataxina-3

O gene da *ATXN3* codifica uma proteína evolutivamente conservada designada ataxina-3 (*ATXN3*), uma pequena proteína com um peso molecular de 42kDa em indivíduos normais. Esta proteína apresenta um segmento de poliglutaminas, de tamanho variável, na região C-terminal, cuja expansão está associada a esta patologia (Kawaguchi et al. 1994; Goto et al. 1997).

Expressão e localização: A *ATXN3* normal, tal como a mutada, apresenta uma expressão ubíqua. Sabe-se igualmente que ambas as formas são expressas em níveis semelhantes em linhas celulares linfoblastóides (Wang et al. 1997), e em tecidos de doentes DMJ (H L Paulson et al. 1997). A localização subcelular desta proteína tem sido alvo de alguma controvérsia. Certos estudos determinaram a localização citoplasmática da *ATXN3* (H L Paulson et al. 1997; Schmidt et al. 1998). No entanto, outro estudo admitiu que a sua localização seria igualmente nuclear (Schmidt et al. 1998; Wang et al. 1997).

Domínios: A *ATXN3* contém um domínio Josefina, no seu N-terminal, contendo a hipotética tríade catalítica de aminoácidos cisteína (C14), histidina (H119) e asparagina (N134). Seguido por dois ou três domínios UIM (*ubiquitin interacting motif*) nas diferentes

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

variantes da ATXN3, localizados antes do segmento de glutaminas, e um outro localizado após o segmento de glutaminas apenas presente nas variantes 1 e 4 (Hofmann & Falquet 2001; Donaldson et al. 2003). Os domínios UIMs estão conservados nos vários homólogos da ATXN3, o que sugere a sua relevância na função normal da proteína. Pensa-se que este motivo pode ser importante na patogênese da DMJ, uma vez que parece ser necessário para o recrutamento da ATXN3 normal para os agregados (Donaldson et al. 2003).

Estrutura: A estrutura tridimensional da ATXN3 continua por determinar experimentalmente, devido às dificuldades de expressão e purificação *in vitro* de proteínas que contêm repetições de glutaminas. A revelação da sua estrutura é de extrema importância, uma vez que a descoberta da conformação correcta da proteína pode contribuir para a determinação do mecanismo pelo qual a alteração conformacional da ATXN3 leva à formação de agregados nucleares (Bevivino & Loll 2001).

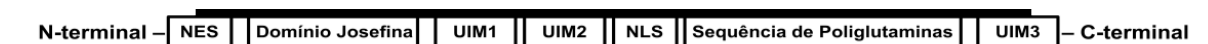


Figura III - Esquema representativo da estrutura da proteína Atx3. Sinal de exportação nuclear (NES), domínio Josefina, domínios de interação de ubiquitina (UIM1, UIM2 e UIM3) e sinal de importação nuclear (NLS) (Adaptado de Nicastro *et al.*, 2001; Breuer *et al.*, 2010 e Albrecht *et al.*, 2004) (Albrecht *et al.*, 2004; Breuer *et al.*, 2010; Nicastro *et al.*, 2010).

Função: Os mecanismos celulares das doenças de poliglutaminas que provocam toxicidade, bem como a função da ATXN3, não são ainda totalmente conhecidos. Mesmo assim, pensa-se que a diminuição desta proteína deverá ser sempre menos prejudicial do que a sua acumulação (Xiao et al. 2010; F. M Menzies et al. 2010). A proteína parece estar associada à via da ubiquitinação, pois possui dois ou três domínios para interação com a ubiquitina (Donaldson et al., 2003), e interage com proteínas envolvidas na via proteolítica tais como subunidades do proteossoma, hHR23 e a VCP/p97 (*valosin-containing protein/p97*) (Doss-Pepe et al., 2003).

Também no citoesqueleto, a ATXN3 parece ter um papel preponderante, pois a sua perda parcial de funções, no contexto da doença, pode afetar marcadamente a estrutura do citoesqueleto (Costa et al., 2010).

5. Envelhecimento

As mudanças associadas ao envelhecimento são o resultado de fatores genéticos pré-determinados, influências ambientais, e de certas doenças. (Sohal et al. 1994).

A DMJ é uma doença hereditária em que o gene é o principal fator de risco. Porém um dos maiores fatores de risco nas doenças neurodegenerativas é o envelhecimento. Mutações no DNA mitocondrial, bem como o stress oxidativo, contribuem para o envelhecimento. O envelhecimento é um elemento essencial, fisiológico e inevitável fenómeno caracterizado pela acumulação de alterações desfavoráveis nas células e tecidos durante a deterioração na pós-maturação, diminuindo a capacidade de sobrevivência e aumentando o risco de morte (Harman 2001).

O mecanismo molecular preciso do envelhecimento ainda não está totalmente esclarecido, mas elementos que são responsáveis por danos oxidativos e eliminação imprópria de moléculas danificadas são consideradas as principais causas. Estes dois fatores desempenham um papel fundamental na sobrevivência celular (Terman 2001).

6. *Misfolding* e agregação

A expansão de poliQ está associada a uma alteração de conformação das proteínas (*misfolding*), com consequente formação de agregados, disfunção neuronal e morte celular (S. W. Davies et al. 1997). As proteínas com conformações alteradas são agora reconhecidas como uma característica central de várias doenças neurodegenerativas. Temos como hipótese que as doenças de poliQ são o resultado de um ganho tóxico de função que ocorre ao nível da proteína mutada. Uma característica patológica proeminente na maioria dessas doenças é a acumulação intranuclear e citoplasmática de agregados de proteínas poliQ dentro dos neurónios (DiFiglia et al. 1997; S. W. Davies et al. 1997).

O papel da agregação na patogênese da doença é controverso. Não é completamente claro se a toxicidade da expansão de proteínas poliQ resulta da presença de agregados visíveis ou de pequenas espécies intermediárias geradas durante o processo de agregação. Os agregados podem simplesmente representar os produtos finais do evento tóxico. Alguns estudos sugerem que as inclusões poderão ter um papel protetor (Saudou et al. 1998).

As inclusões nucleares (IN) foram descritas pela primeira vez em 1997 em ratinhos transgénicos na DH (S. W. Davies et al. 1997) e desde logo, esta descoberta serviu de base a diversos estudos *in vivo* e *in vitro* que permitiram concluir que estas estruturas seriam mais um factor unificador deste grupo de doenças. As IN foram detectadas em todas as patologias de glutaminas, excepto na SCA6, em que se observaram apenas inclusões citoplasmáticas (DiFiglia et al. 1997; H L Paulson et al. 1997).

Foi demonstrado que as proteínas componentes das IN são ubiquitinadas (H L Paulson et al. 1997) e, que estas quando presentes no núcleo, recrutam subunidades do proteassoma para os agregados (Cummings et al. 1998; Chai et al. 1999). Este facto indicia o envolvimento do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) no processo patogénico, provavelmente na tentativa de degradar as proteínas mal conformadas.

i. Estratégias terapêuticas

Até agora, a DMJ e todas as outras doenças de poliQ não têm cura, embora alguns sintomas possam ser controlados com tratamentos específicos. Doentes com distonia de início recente, podem ser aliviados pelo tratamento dopaminérgico e a espasticidade que surge na DMJ pode ser aliviada com antiespasmódicos (Paulson 2007). Um estudo realizado por Takei e col. revelou que a tandospirona melhora sintomas como depressão, insónia e dores musculares (Takei 2004). A terapia não farmacológica é também importante nos doentes com DMJ. A disartria e a disfagia devem ser avaliadas por um terapeuta, estando a terapia de reabilitação da deglutição recomendada a todos os doentes com disfagia neurológica (Neumann et. al 1995).

Apesar dos tratamentos sintomáticos constituírem a base da terapia usada na prática clínica, vários tratamentos neuroprotetores têm vindo a ser testados em ensaios pré-clínicos e clínicos. Os potenciais tratamentos para as doenças de poliQ podem ser divididos em duas classes: as que visam as proteínas mutantes, direta ou indiretamente; e aquelas que estão voltadas para a limitação da deterioração celular causada pelas proteínas mutantes:

a) **Terapias voltadas para as proteínas poliQ** incluem: silenciamento do gene; inibição da clivagem; tentativas de melhoria da degradação proteica e inibição e prevenção da agregação.

b) **Terapias que modificam o efeito das proteínas poliQ mutantes** incluem: a modulação da transcrição; estabilização mitocondrial e redução do stress oxidativo; bloqueio da excitotoxicidade e inibição da apoptose (Bauer & Nobuyuki Nukina 2009).

7. Alvos Terapêuticos

A degradação proteica é um fenómeno celular essencial para prevenir a acumulação de proteínas com anomalias estruturais, incapazes de executar a sua função corretamente. As células possuem três principais mecanismos de defesa, interligados, contra o “misfolding”: **as chaperones**, que consiste numa maquinaria molecular que acompanha e auxilia o “refolding” (enrolamento) de proteínas; a **via de ubiquitina-proteossoma (UPS)**, que degrada proteínas deformadas, e a **autofagia**, através da qual as células reciclam os seus próprios organelos e proteínas (Yao 2010; Paulson 2007).

i. Chaperones Moleculares (CM)

Chaperones moleculares (CM) são proteínas ubíquas que auxiliam e desempenham um papel importante na manutenção da homeostase e no “*refolding*” de proteínas, prevenindo a sua agregação, entre outras importantes funções intracelulares. O grupo das chaperones moleculares é composto por várias famílias de proteínas altamente conservadas e não relacionadas, embora a maioria deles pertença à família de proteínas de choque térmico (HSPs), que são induzidas em caso de stress por calor, mas também em resposta a outros fatores. Entre as várias famílias de chaperones, destacam-se as Hsp70, que recebem e distribuem substratos de/para outras chaperones moleculares, como as Hsp90 (Fink 1999).

ii. Sistema Ubiquitina-proteossoma (UPS)

O sistema ubiquitina-proteossoma (UPS) desempenha um papel fundamental na degradação de proteínas *misfolded* (Tianhong Pan et al. 2008). A ubiquitina é uma proteína encontrada nas células eucariotas, constituída por 76 aminoácidos, e que desempenha uma função importante na regulação dos níveis de proteínas. Ela marca proteínas indesejadas para que sejam degradadas por compostos macromoleculares com atividade proteolítica designados de proteossomas (Glickman & Ciechanover 2002). Estudos demonstram que a

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

degradação pelo UPS parece afetar praticamente todos os processos celulares. Ao contrário de outras vias proteolíticas, a via da ubiquitina envolve consumo de ATP e não libertação de energia (David C. Rubinsztein 2006). A degradação proteica é feita numa série de etapas que resultam na poliubiquitilação da proteína a ser destruída, esse processo permite que a célula elimine proteínas de modo bastante específico.

Três enzimas são necessárias para a ubiquitilação: a **E1**, enzima ativadora da ubiquitina; a **E2**, enzima conjugadora; e a **E3**, ubiquitina ligase. A enzima E1 recorre à energia libertada pela hidrólise de ATP, une-se à ubiquitina através da sua extremidade carboxilo; a enzima E2 toma o lugar da enzima E1; a enzima E3 permite que a enzima E2 unida à ubiquitina seja substituída pela proteína a degradar, estabelecendo-se uma ligação entre a extremidade carboxilo da ubiquitina e um grupo amina de um resíduo de lisina da proteína alvo (Hoppe 2005).

Após este processo, a proteína ubiquitilada segue, finalmente, para o proteossoma 26S. Estes proteossomas localizam-se no citosol e são constituídos por três subcomplexos: no centro o subcomplexo 20S e nas extremidades superior e inferior o subcomplexo 19S (regulador). É num destes subcomplexos 19S que a proteína ubiquitilada começa a desenrolar-se. Por fim, a proteína desenrolada é processada no subcomplexo 20S por ação de proteases presentes em cada três das sete subunidades β , que constituem a unidade central do proteossoma (Bennett et al. 2005).

iii. Autofagia

Autofagia é o processo pelo qual as proteínas intracelulares ou organelos são degradados através da formação de estruturas de membrana dupla, a designados de autofagossomas. Estes fundem-se aos lisossomas primários, onde o seu conteúdo é degradado, sendo posteriormente descartado ou reciclado para uso celular (X. Jiang 2010).

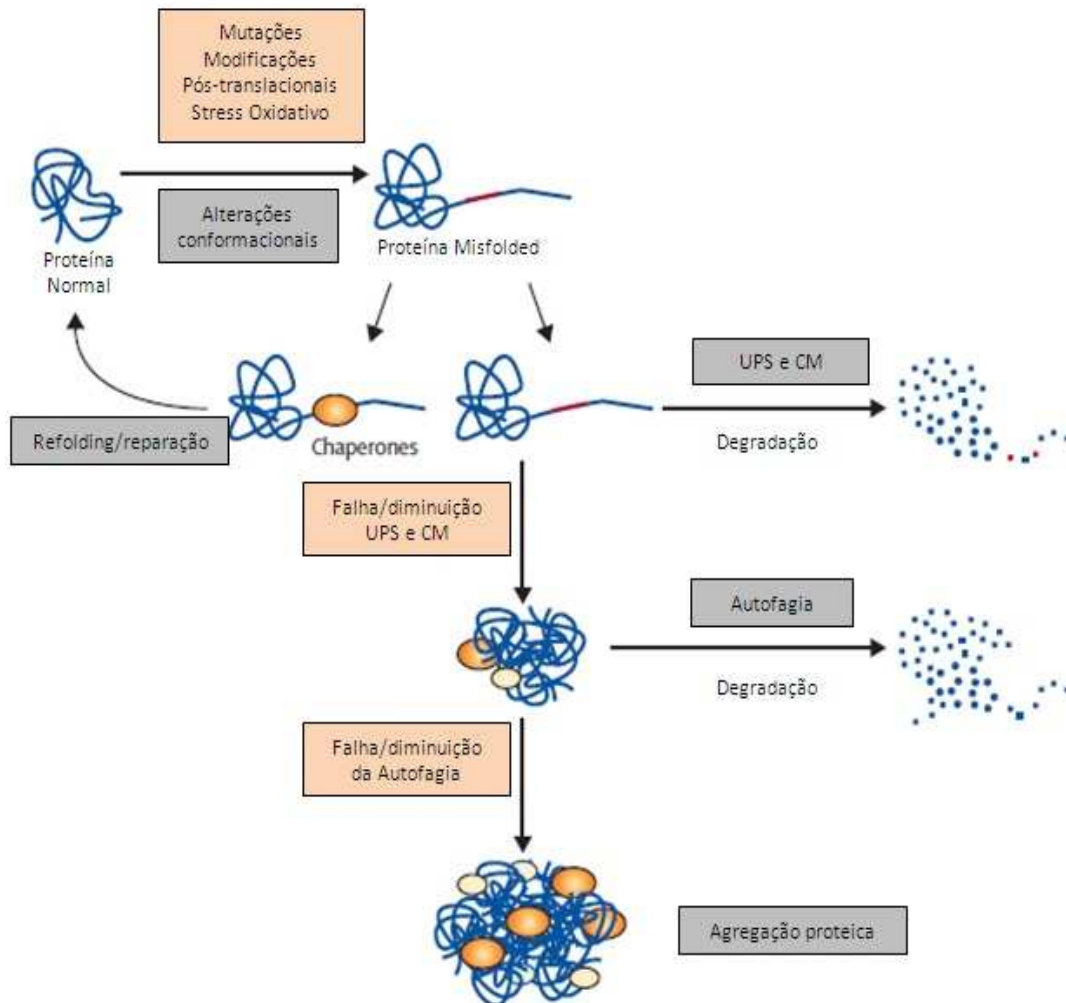


Figura IV - Sistemas celulares de controlo de qualidade das proteínas. A proteína alterada é geralmente reconhecida por chaperones moleculares (CM), que são proteínas que permitem a reparação da conformação da proteína ou "refolding". Se as CM não conseguirem reparar, elas enviam a proteína alterada para degradação - geralmente via sistema ubiquitina proteossoma (UPS). No entanto, se a atividade deste sistema falha, e a proteína fica organizada em estruturas insolúveis complexas (fibras ou oligómeros), a autofagia é o único sistema que é capaz de remover esses complexos tóxicos. Em condições que a autofagia não consegue remover as proteínas alteradas, estes agregados continuam a funcionar dentro proteínas interferindo com o normal funcionamento celular. Adaptado de (M. Martinez-Vicente & A. M Cuervo 2007).

Ainda não está completamente esclarecido como e quando as proteínas são degradadas pelo UPS ou por autofagia. No entanto, segundo vários autores, a via da autofagia é provavelmente o principal mecanismo envolvido na degradação de proteínas de longa duração, e de proteínas estáveis, e é o único mecanismo pelo qual organelos inteiros, como as mitocôndrias, são reciclados. Grandes proteínas de membrana e complexos proteicos (incluindo oligômeros e agregados) que não passem pela barreira do proteossoma, podem ser degradados pela autofagia (Beth Levine & Klionsky 2004; Marta Martinez-Vicente & Ana Maria Cuervo 2007; T. Pan et al. 2008). Segundo Pandey, a autofagia é também um mecanismo compensatório em situações de insuficiência do proteossoma (Pandey et al. 2007).

As proteínas podem ser alteradas por mutações, modificações pós-traducionais, ou por agressões, intracelulares ou extracelulares (como o stress oxidativo, radiação ultravioleta e compostos tóxicos), que muitas vezes induzem uma mudança na sua conformação (Figura IV) (Markossian & Kurganov 2004).

A falha das funções proteossoma/autofagia e a redução dos CM disponíveis no ambiente celular pode comprometer a degradação e *folding* de proteínas que desempenham papéis importantes nas células. Curiosamente, ATXN3 humana é uma ubiquitina hidrolase *in vitro* e liga-se a ubiquitina e a substratos ubiquitilados, sugerindo um papel na degradação proteica através da via ubiquitina-proteossoma (UPP). A ausência de uma proteína processadora como a ATXN3 pode perturbar a homeostasia celular pelo que é interessante investigar se para além do efeito de ganho de função tóxica da expansão de poliQ, há alguma perda de função da ATXN3 na DMJ.

8. Autofagia como alvo terapêutico

O termo autofagia é usado para definir um processo catabólico que conduz à degradação de componentes da própria célula, através da maquinaria lisossomal. É um processo essencial para a sobrevivência e longevidade do organismo, pois intervém e mantém um equilíbrio entre a síntese, degradação, e posterior reciclagem de produtos celulares (X. Jiang 2010).

Em células como os neurónios, hepatócitos e células musculares cardíacas, a autofagia inadequada leva a que os fagolisossomas não completem a digestão total do organelo, sendo

convertidos em corpos residuais. Com o avanço da idade, esses corpos formam pigmentos de inclusão que se acumulam no citosol (Khan et al. 2008).

Estudos recentes em *C. elegans* evidenciam geneticamente que o processo autofágico protege contra doenças causadas por proteínas agregadas, associado a doenças neurodegenerativas (Meléndez & B. Levine 2009; Voisine et al. 2007). A manipulação da autofagia, segundo vários autores, parece ser benéfica e pode ser a chave para o desenvolvimento de novos tratamentos para várias doenças, como a DMJ.

Existem 3 tipos de autofagia: autofagia mediada por chaperones (AMC), microautofagia e macroautofagia (Figura V).

Os diferentes tipos de autofagia partilham um ponto terminal, os lisossomas, mas diferem nos substratos-alvo, na sua regulação, e nas condições em que cada um deles é preferencialmente ativado (Cuervo 2007).

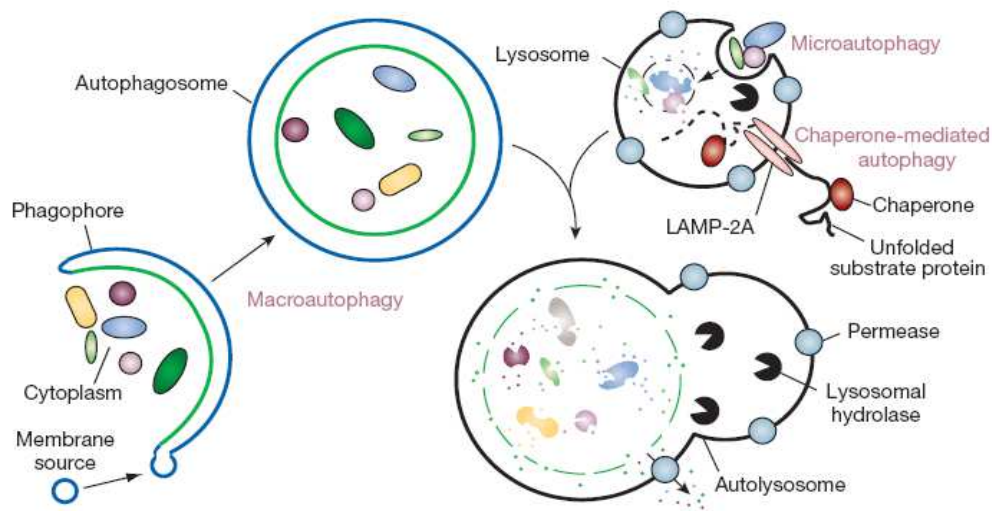


Figura V – Mecanismo da Autofagia. Adaptado de (Noboru Mizushima et al. 2008)

i. Autofagia mediada por chaperones (AMC)

A **autofagia mediada por chaperones** é um mecanismo que envolve a translocação direta de proteínas através da membrana do lisossoma. Esta translocação é mediada pela ação de chaperones citosólicas e lisossômicas com a intervenção do transportador LAMP-2A¹.

¹ Lysosome-Associated Membrane Protein type 2A

Uma vez dentro do lisossoma a proteína é degradada por ação de hidrolases (Wyss-Coray 2009; Noboru Mizushima et al. 2008).

ii. Microautofagia

Na **microautofagia**, o material citoplasmático é diretamente lançado para a superfície do lisossoma pela septação ou invaginação da membrana limitante (Noboru Mizushima et al. 2008b).

iii. Macroautofagia

Na **macroautofagia** os organelos envelhecidos são envolvidos por um mecanismo que inclui a formação de vesículas com o auxílio do retículo endoplasmático liso: o material citoplasmático é envolvido por uma vesícula de dupla membrana designada por autofagossoma. Posteriormente, o autofagossoma, funde-se com um endossoma secundário, recebendo enzimas hidrolíticas do complexo de golgi. É, deste modo, transformado em autofagolisossoma. O processo culmina com a degradação do organelo pela ação enzimática (Meléndez & B. Levine 2009).

A autofagia pode ser estimulada em determinadas situações, como, por exemplo, em pequenos períodos de carência de nutrientes, sendo que aparecem numerosos autofagossomas nos hepatócitos com o objetivo de converter os componentes da célula em alimento para prolongar a sobrevivência do organismo. A AMC pode ser induzida após a privação prolongada de nutrientes, enquanto que a microautofagia não é ativada pela deficiência nutricional ou em situações de stress.

A disfunção da autofagia pode ocorrer em várias etapas, na falha da formação do autofagossoma ou na fusão deste com os lisossomas, na deficiência de enzimas nos lisossomas e disfunção das charperones moleculares ou do receptor lisossomal de membrana, uma destas disfunções pode, conseqüentemente, causar a agregação indesejada de proteínas levando à morte celular (T. Pan et al. 2008).

Atualmente, conhecem-se pelo menos 27 genes relacionados com a autofagia na levedura, estando descritas as suas funções. Originalmente esses genes foram chamados Aut, Apg, ou genes Cvt, mas entretanto foi alcançado um consenso, sendo todos os genes relacionados com autofagia descritos por um nome comum, Atg (Autofagia); a maioria já é

representada por ortólogos em mamíferos e em *C.elegans* (Meléndez & B. Levine 2009; Klionsky et al. 2003).

Neste projeto, daremos relevo à macroautofagia (autofagia propriamente dita), visto que todos os estudos em *C. elegans* e noutros modelos, se centraram sobre esta forma de autofagia, por ser um mecanismo intracelular potencialmente capaz de degradar grandes agregados proteicos ou organelos danificados e envelhecidos, e por ser o tipo de autofagia mais recorrente nos neurónios (Wyss-Coray 2009; David C. Rubinsztein 2006). É uma via evolutivamente conservada nos mamíferos e em modelos animais e a sua desregulação está presente em doenças como o cancro, cardiopatia e outras doenças neurodegenerativas (Samara et al. 2005). No presente caso, considera-se que este poderá ser um mecanismo que ativará a degradação da ATXN3 mutante (Rubinsztein 2006).

9. Modelos Animais da DMJ

Durante os últimos anos foram criados diversos modelos animais para as doenças causadas por expansão de poliglutaminas, com a finalidade de se compreender o mecanismo patogénico subjacente a estas, e porventura encontrar uma forma de o mitigar. Existem modelos de DMJ em cultura de células, *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*), *Drosophila melanogaster*, rato e ratinho (Rubinsztein 2006).

Um sistema modelo da doença é uma ferramenta essencial na compreensão patomecanismo da doença e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Por exemplo, a formação de agregados neuronais intranucleares foi observada pela primeira vez num modelo *ratinho* transgénico da DH (Davies et al. 1997) e essa descoberta levou à identificação de inclusões similares nos cérebros de pacientes com doenças poliQ.

As vantagens de modelos como a *Drosophila* e o nemátode *C. elegans* é que estas espécies são adequadas para os estudos em larga escala de triagem devido ao custo relativamente baixo e aos requisitos de tempo modestos (Gillian 2003; Olson 2001).

A tentativa de modelar doenças neurodegenerativas através da expressão de transgenes em *C. elegans* tem sido realizada com algum sucesso (Jia & Beth Levine 2010). A recapitulação das características chaves das doenças humanas a nível neuronal neste animal possibilita a manipulação genética, o estudo de vias metabólicas e a identificação de possíveis interatores e

genes modificadores. Em última instância, permite testar em grande escala potenciais agentes farmacológicos, o que seria impraticável utilizando modelos de mamíferos.

10. Caenorhabditis elegans

Caenorhabditis elegans (Caeno-recente; rhabditis-redondo; elegans-elegante) é um nemátode da família Rhabditidae que mede cerca de 1 milímetro de comprimento e vive normalmente no solo. Tornou-se um importante modelo para o estudo da biologia, especialmente a biologia do desenvolvimento, desde a década de 70 (Wood.1988).

É o ser vivo mais utilizado para estudos de biologia do desenvolvimento, genética, envelhecimento e de ecotoxicologia (Schierenberg & Wood 1985). Este animal é de fácil manipulação, cresce e é mantido em placas de Petri com meio NGM (*Nematode Growth Medium*) e alimenta-se de várias estirpes de bactéria *Escherichia coli* (OP50). Os *C. elegans* duram duas a três semanas, em condições de crescimento normais (~20 °C). Durante o desenvolvimento pós-embriônico passam por quatro fases larvares (L1-L4) até ao estágio adulto, dando origem a uma extensa descendência (>200) por autofecundação (Figura VI). A espécie possui dois sexos: os hermafroditas e os machos, estes últimos ocorrem numa frequência bastante inferior (Epstein Henry F. & Diane C. Shakes 1995).

A linhagem celular é completamente conhecida e sabe-se que a posição e número de células permanecem invariáveis entre indivíduos. A possibilidade de serem guardados vivos em azoto líquido ou a -80°C confere-lhe mais uma vantagem importante, comparativamente a outros animais modelo normalmente utilizados no laboratório (Epstein and Shakes, 1995).

A sua transparência proporciona também grandes vantagens, em particular no estudo dos efeitos tóxicos de proteínas poliQ nos neurónios, uma vez que a transparência das suas 959 células (das quais 302 são neurónios) facilita a deteção de proteínas fluorescentes *in vivo* (Castro, 2011). Para além disso, como esta espécie tem um ciclo de vida curto, torna-se económica e de fácil manutenção.

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

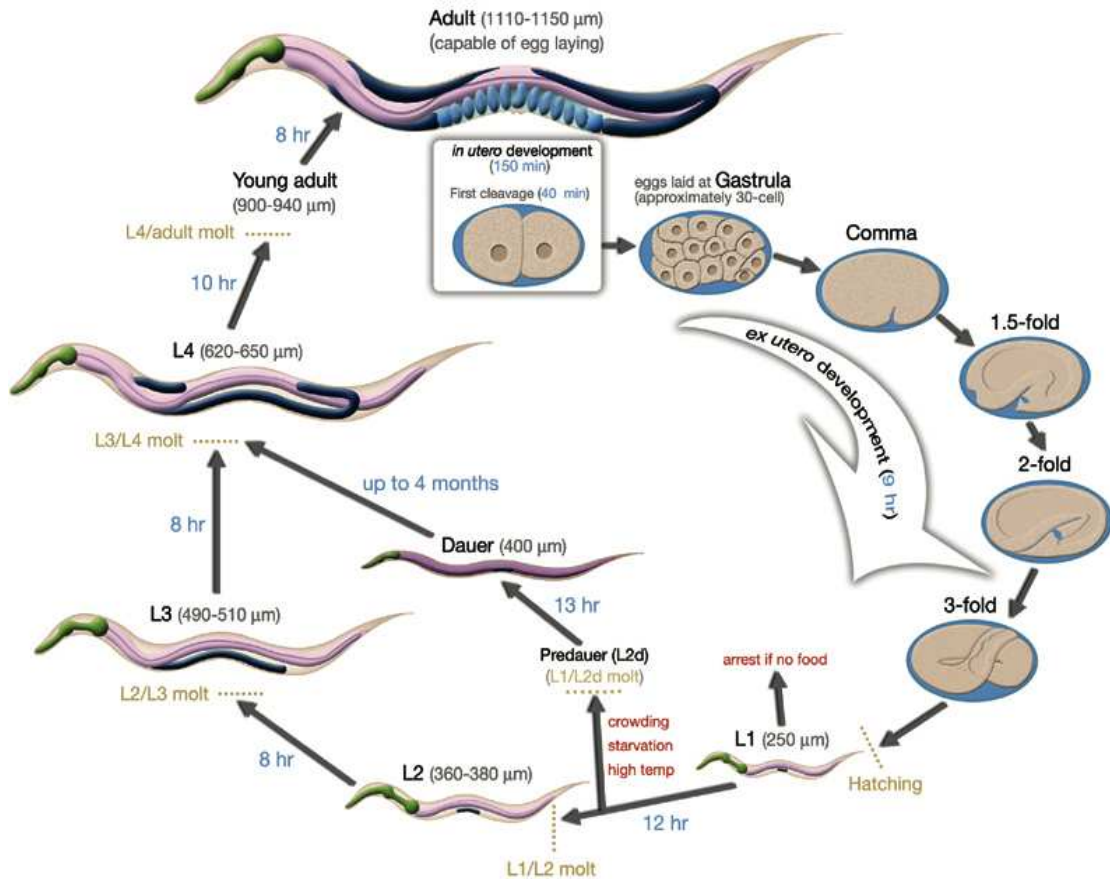


Figura VI – Ciclo de vida do nemátode *C. elegans*. Ciclo de vida completo, desde o ovo até a fase adulta reprodutiva, em cerca de dois dias e meio a 25 ° C. Os tempos indicados em azul são a duração de cada estágio de desenvolvimento. *C. elegans* pode entrar em etapa *Dauer*, ao entrar nesta fase, a expectativa de vida *C. elegans* é significativamente prolongada de semanas a meses. Figura adaptada de (Wormatlas, www.wormatlas.org/handbook/fig.s/IntroFIG6.jpg).

O sistema nervoso é o órgão mais complexo do *C. elegans* (Figura VII). É constituído por um anel nervoso, um cordão nervoso ventral e outro dorsal. O anel nervoso localiza-se na cabeça, uma região importante no contacto com o ambiente durante a locomoção, e contém praticamente todos os interneurónios, juntamente com axónios da maior parte dos neurónios sensoriais. O sistema nervoso, apesar do reduzido número de neurónios que o compõem, é responsável por uma grande variedade de comportamentos, tais como: o movimento do animal por propagação de ondas sinusóides através do seu corpo; o movimento exploratório da sua cabeça quando procura alimento; a resposta a diversos estímulos. Os cordões nervosos

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

ventrais e dorsais estendem-se posteriormente a partir do anel nervoso e terminam na cauda (Wood.1988).

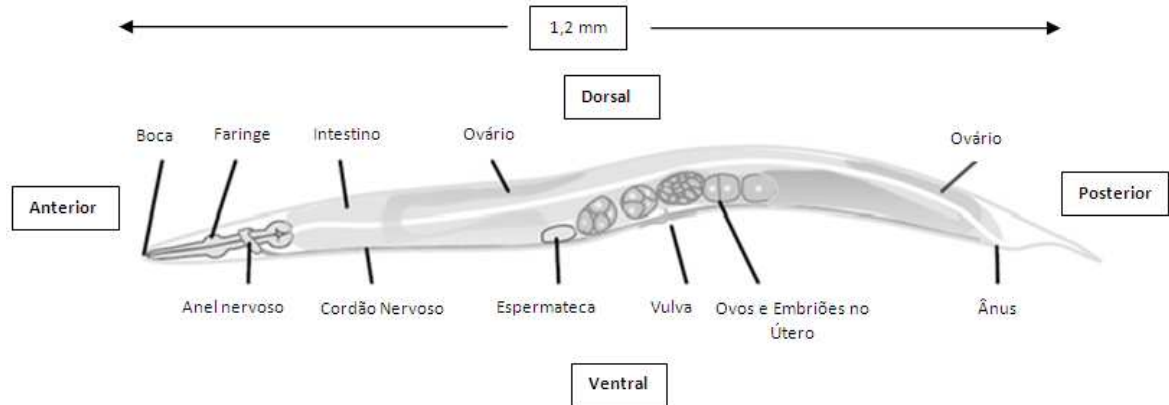


Figura VII- Anatomia do nematode *C. elegans*

As características do nemátode anteriormente mencionadas, bem como o facto do seu sistema nervoso ter sido totalmente caracterizado, tornaram-no um modelo excepcional no estudo de doenças neurodegenerativas.

As doenças de poliQ podem ser recriadas em *C. elegans* por microinjeção dos genes humanos contendo o segmento de glutaminas expandido (Castro et al 2011).

i. Modelo Transgênico

Foi desenvolvido no nosso laboratório, por Teixeira-Castro A e colaboradores, um modelo transgênico para o estudo do perfil de agregação e toxicidade da ATXN3 humana em *C. elegans*. Para tal, a sequência da ATXN3 com vários tamanhos de glutaminas foi clonada em fusão com a proteína fluorescente amarela (YFP) e microinjetada nas gónadas dos animais. A expressão da ATXN3::YFP foi dirigida para todas as células neuronais dos *C. elegans* recorrendo ao promotor F25B3.3. O perfil de agregação da ATXN3 humana foi avaliado pela técnica biofísica de *Fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP).

Verificou-se que a expressão da ATXN3 contendo um segmento de 130Qs (AT3q130) não causa a formação de agregados em todas as células neuronais dos *C. elegans*. Análise de neurónios específicos, revelou que o cordão nervoso ventral e o cordão nervoso dorsal (VNC e DNC) foram muito afetados. Ensaio de motilidade revelaram que estes animais apresentam deficits na locomoção motora. Aqui foi encontrada uma correlação entre a agregação e a

Identificação de compostos que modulam a patogénese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

disfunção dos neurónios motores. Verificou-se também que certos neurónios sensoriais da cabeça continham focos de agregados, em contraste com os corpos celulares de certos neurónios laterais que eram resistentes à agregação da ATXN3 mutada (Castro 2011).

Outros trabalhos permitiram demonstrar que o *C. elegans* pode ser uma boa plataforma para a descoberta de novos compostos bioativos e identificação de novos alvos (Voisine et al. 2007). Com base no estudo do modelo para a patogénese da DMJ em *C. elegans*, foi sugerido que a manipulação genética e farmacológica de vias que regulam a longevidade e envelhecimento dos organismos poderá conferir proteção contra o aparecimento dos primeiros sintomas de DMJ, bem como abrandar a rápida progressão muitas vezes associada a este tipo de doenças (Castro et al. 2011).

11. Biblioteca de fármacos

Este modelo transgénico da DMJ gerado por Teixeira-Castro A e colaboradores pode ser utilizado para levar a cabo um *screening* de compostos terapêuticos em grande escala, em que a identificação de fármacos eficazes pode ser conseguida analisando simultaneamente o efeito destes na agregação proteica em células neuronais *in vivo* e o seu impacto em comportamentos que dependem da função do sistema nervoso. Com isto em mente, o nosso grupo de investigação encontra-se a rastrear uma biblioteca de fármacos, na sua maioria aprovados pela FDA e fora de patente, avaliando a sua capacidade de prevenir ou atrasar a formação de agregados de ataxina-3 mutante e simultaneamente de diminuir a disfunção motora apresentada por estes animais, o que será feito através de uma análise automatizada de imagem. Deverá assim ser possível identificar um conjunto de compostos eficazes que poderão em seguida ser testados em organismos superiores, incluindo o nosso ratinho transgénico, para eventualmente depois serem avaliados do ponto de vista clínico.

12. Compostos identificados

Foram identificados no nosso laboratório dois compostos com um forte efeito neuroprotetor contra a expressão da ATXN3 mutada. Verificou-se que o ácido valpróico (VA), reduziu o fenótipo neurológico e locomotor dos animais afetados de forma muito significativa. Pensa-se que o VA poderá ativar o fator de transcrição DAF-16 (proteína envolvida na via de sinalização da insulina que regula o processo do envelhecimento). Outro fármaco testado foi o 17-DMAG (inibidor da Hsp90), que ativa de forma indireta a Hsp70 (proteína de *heat shock*). Neste caso, observou-se igualmente uma melhoria no fenótipo da agregação e uma melhoria na disfunção motora apresentada por estes animais (Castro 2011).

13. Compostos que ativam a Autofagia

Estudos recentes em *Caenorhabditis elegans*, nomeadamente na DH, que como referido acima, também é causada por uma expansão de poliQs, evidenciaram geneticamente que o processo autofágico protege contra doenças causadas por proteínas agregadas (Meléndez & B. Levine 2009; Voisine et al. 2007). A manipulação da autofagia, segundo vários autores, parece ser benéfica e pode ser a chave para o desenvolvimento de novos tratamentos para várias doenças neurodegenerativas, como a DMJ.

São vários os compostos indutores da autofagia atualmente em estudo e com efeitos protetores. Neste trabalho focámo-nos essencialmente no estudo de dois compostos terapêuticos que poderão ser eficazes na remoção da agregação proteica nas células neuronais *in vivo* e eficazes no comportamento motor do modelo em *C. elegans* de DMJ: CCI-779 e LiCL.

i. Rapamicina

Sirolimus, também conhecido como rapamicina, é uma droga imunossupressora usada para prevenir a rejeição em transplantes de órgãos, é especialmente útil em transplantes de rim, este composto é um indutor químico da autofagia via mTOR² (alvo da rapamicina em mamíferos). O seu análogo, a usar na nossa investigação, por ser menos tóxico, é designado

² mTor - é uma serina / treonina proteína cinase que regula o crescimento e proliferação celular (regulador negativo da autofagia)(Beth Levine & Klionsky 2004). Proteína que nos seres humanos é codificada pelo gene FRAP1.

por temsirolimus ou CCI-779 (Inibidor de Ciclo Celular - 779), inibe a via mTOR, e teve efeitos benéficos, reduzindo o número de agregados da proteína ATXN3 e atenuando a sua toxicidade (S. Sarkar, Krishna, et al. 2008; S. Sarkar, B. Ravikumar, et al. 2008).

Recentemente, foi demonstrado que a rapamicina atenua a toxicidade celular de fragmentos de huntingtin mutante (Berger et al. 2006), em modelos de *Drosophila* e em ratinhos transgênicos (E. F. Blommaert et al. 1995).

ii. Cloreto de Lítio

O Lítio tem sido usado durante décadas para tratamento de doenças crônicas, nomeadamente da perturbação bipolar, tem a capacidade de passar a barreira hematoencefálica e possui propriedades anti-apoptóticas (S. Sarkar, Krishna, et al. 2008).

Recentemente foi demonstrado, que o LiCl é um indutor químico da autofagia independente da via mTOR inibindo a inositol monofosfatase (IMPase) e reduzindo os níveis de IP3. A Glicogénio sintase cinase-3 β (GSK-3 β), outra enzima inibida pelo lítio, tem efeitos opostos. Em contraste com a inibição da IMPase, a inibição da GSK-3 β ativa a via mTOR (S. Sarkar, Krishna, et al. 2008).

iii. Combinação de LiCl com Rapamicina

A fim de neutralizar os efeitos inibitórios da autofagia da ativação mTOR, resultante do tratamento do lítio, alguns autores defendem a utilização da rapamicina (inibidor de mTOR) em combinação com lítio (Figura VIII). Segundo eles, essa combinação aumentava autofagia (Sovan Sarkar & David C Rubinsztein 2008). Portanto, considera-se que o uso de ambos os compostos e a sua combinação, a longo prazo poderá representar uma possível estratégia terapêutica para o tratamento da SCA3.

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

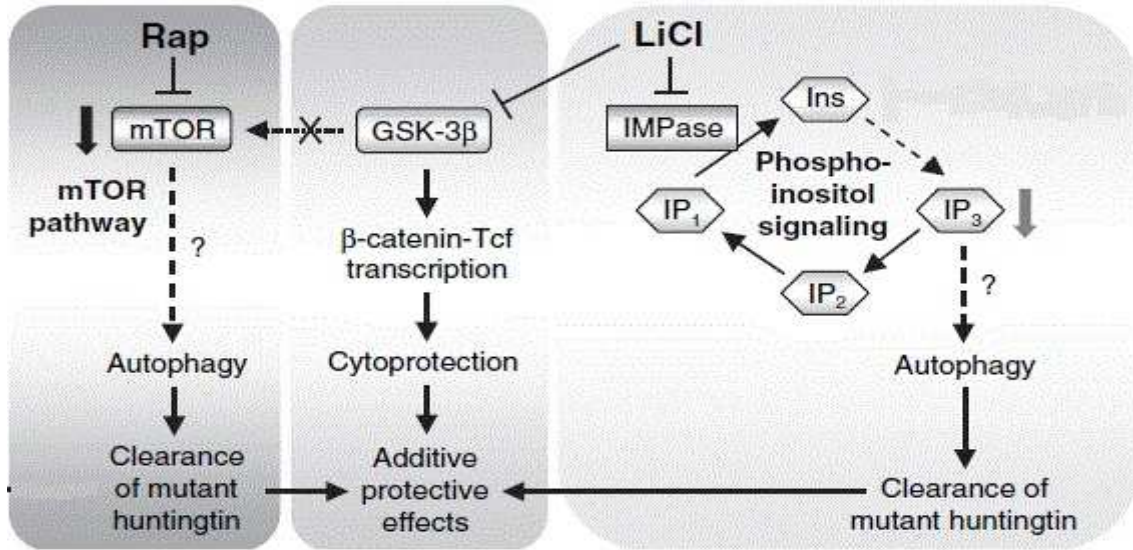


Figura VIII- Representação esquemática indução da autofagia por diferentes compostos / vias dos compostos que facilitam a remoção de huntingtina mutante em vários modelos de DH. A autofagia é induzida por tratamento com rapamicina (RAP), que inibe a via mTOR. A autofagia também pode ser induzida por fármacos que diminuem os níveis de IP₃ na via de sinalização do fosfoinositol, de forma independente da via mTOR, tal como o lítio (LiCl). A glicogênio sintase cinase-3β (GSK-3β) é outra enzima inibida pelo lítio, mas com tem efeitos opostos, já que esta ativa a via mTOR . O tratamento combinado com lítio e rapamicina alivia a inibição do processo autofágico pela GSK-3b e, portanto, aumenta de forma aditiva a autofagia. Além disso, a inibição de GSK-3b pelo lítio aumenta a b-catenina, que é citoprotetora e pode contribuir para efeitos adicionais de proteção. Adaptado de (Sovan Sarkar & David C Rubinsztein 2008).

Os mecanismos precisos de todos compostos indutores da autofagia ainda não totalmente esclarecidos (Sovan Sarkar & David C Rubinsztein 2008).

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

Capítulo II

Objetivos

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

Dado o impacto das doenças neurodegenerativas na população e com o fim de desenvolver estratégias terapêuticas para estas, na pesquisa especificamente de compostos que modulem a disfunção neurológica causada pela ATXN3 mutante na DMJ, esta investigação teve como objetivo geral a avaliação do efeito dos fármacos LiCl e CCI-779, num modelo na doença de Machado-Joseph em *Caenorhabditis elegans*.

Para tal, os objetivos específicos foram os seguintes:

1. Verificar a toxicidade e determinar a concentração terapêutica mais adequada dos fármacos LiCl e CCI-779 e dos seus solventes em *C. elegans wild-type*;
2. Verificar se os compostos LiCl e CCI-779, isoladamente ou em combinação, têm um efeito no défice locomotor no modelo transgênico da DMJ em *C. elegans* (AT3q130);
3. Verificar se as mesmas têm um efeito de redução da agregação da ataxina-3 mutante em *C. elegans* (At3q130).

Capítulo III

Material & Métodos

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

Neste trabalho usámos, pela sua simplicidade e potencial genético, um pequeno animal invertebrado, o nemátode *C. elegans*, com o objetivo de identificar fármacos eficazes para o combate contra a patogênese da DMJ, e analisámos simultaneamente o seu efeito na agregação da ATXN3 mutante nas células neuronais *in vivo* e no comportamento motor dos animais. A estratégia experimental aplicada durante este trabalho encontra-se esquematizada na figura IX.

1. Materiais

i. Compostos

A experiência foi organizada de forma que a autofagia fosse induzida através de duas vias distintas. Para tal, foram utilizados dois compostos aprovados pela FDA, o Cloreto de Lítio e o Temeirolimus, bem como a conjugação de ambos.

Soluções Stock:

- 200mM de Cloreto de Lítio (1.05679-0100, Merck) preparado em água,
- 48.5mM de Temeirolimus/CCI-779 (T8040, LC Laboratories) preparado em ETOH.

ii. Modelos de *C. elegans*

- *C. elegans* N2 Bristol (estirpe selvagem)
- AT3q130 (modelo da ATX3 mutada com 130 glutaminas);
Genótipo: *rmls263[p_{F25B3.3}::AT3^{v1-1q130}::yfp]*

2. Métodos

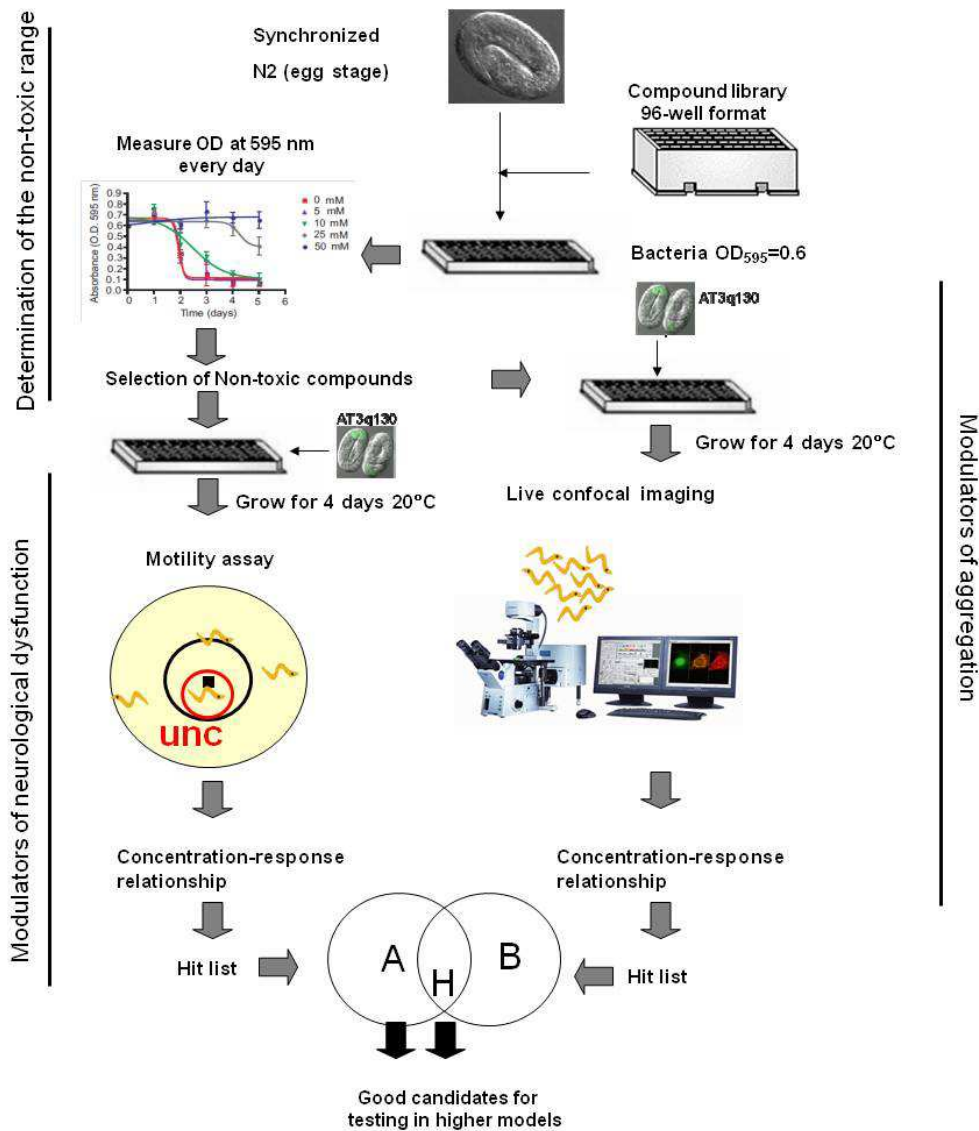


Figura IX – Desenho experimental para o screening de compostos potencialmente terapêuticos para a patogênese da DMJ em *C. elegans*. O primeiro passo foi determinar a gama de concentração segura para cada composto, utilizando o ensaio de medição da taxa de consumo do alimento (suspensão de bactérias OP50). A taxa à qual a fonte de alimento é consumida por animais WT é uma boa indicação da regularidade do crescimento, sobrevivência e fecundidade. Em seguida, os animais que expressavam a ATXN3 mutante cresceram em diferentes concentrações de cada composto. Efetuamos o ensaio para defeitos de locomoção e para o perfil de agregação. Os compostos que tiveram efeito na diminuição da disfunção motora e na redução da carga de agregação em animais AT3q130, são considerados bons candidatos para serem testados em organismos superiores.

i. Manutenção e crescimento

Conforme a descrição feita por Brenner (Brenner 1974), os animais foram mantidos a 20°C, e cresceram em placas NGM (*Nematode Growth Medium*) com *E. coli* (OP50) como fonte de alimento. Todos os ensaios foram efetuados em condições de esterilidade.

ii. Técnica de sincronização dos animais

Para o ensaio de drogas recorreremos a um protocolo de lixiviação dos animais que possibilitou a sincronização dos ovos (Voisine et al. 2007; Garcia et al. 2007):

Resumidamente, os animais foram removidos das placas NGM (*Nematode Growth Medium*) que continham adultos com ovos com aproximadamente 5 mL de M9 (*Meio 9*). Posteriormente as populações foram sincronizadas através do tratamento com 20 mL de solução de NaOH 1M por 7 min. A solução de lixiviação destruiu os animais, mas não os ovos que resistem devido à sua forte cutícula. Posteriormente, os ovos foram lavados e centrifugados duas vezes durante 2 min a 2000 rpm (velocidade de aceleração de 3, desaceleração de 1) com 20 mL de M9, e por fim lavados com *S-medium complete* (com/sem Antibióticos) (Voisine et al. 2007; Garcia et al. 2007).

iii. Verificação da toxicidade dos fármacos em meio líquido

Os ensaios para excluir os efeitos de toxicidade foram aplicados nos *C. elegans* do tipo N2, tendo todos os testes sido realizados à temperatura ambiente (~ 22 ° C). Cerca de 20-30 animais sincronizados (ovos), foram suspensos em meio líquido (M9) em placas de 96 poços de fundo raso com S-medium (com penicilina, estreptomicina e nistatina para minimizar contaminações indesejáveis) e *E.coli*. Esta suspensão no final resultou numa OD (densidade ótica) de 0.8 (a 595 nm) e os animais cresceram a 20 ° C a 180 rpm.

Foram testadas várias concentrações de compostos, e durante 8 dias a absorvância foi medida a OD de 595 nm com um leitor de placas de electroforese Bio-Rad Model 680, tendo sido elaborada uma curva das absorvâncias das amostras em estudo para comparar com a curva controlo (mesmo número de nematodes, numa suspensão bacteriana de igual densidade, mas sem fármaco).

Para avaliar o aspecto geral dos animais, os mesmos foram observados diariamente à lupa (Olympus (Japão) SZ x 7). Qualquer tratamento que diminuísse o crescimento dos *C. elegans*, bem como a sua sobrevivência ou fecundidade, era considerado tóxico (Voisine et al. 2007). Assim, continuámos o nosso estudo somente com as concentrações que preencheram os critérios de não-toxicidade.

iv. Ensaios comportamentais: fenótipo motor

O principal objetivo deste ensaio foi verificar se os compostos em estudo tinham efeito na disfunção neurológica motora dos animais que expressavam a ATXN3 mutante. Para isso, os ovos foram crescidos em meio líquido com OP50 a 20°C a 180 rpm, ao quarto dia de idade efetuaram-se os ensaios de motilidade.

Para tal, a lupa (Olympus (Japão) SZx7) foi utilizada para os ensaios de motilidade em placas NGM com OP50, em que se colocaram 5 animais simultaneamente dentro de um círculo de 1cm, e após 1 min os animais que não saíram do círculo, foram classificados como animais com um deficit motor. As experiências foram repetidas até um valor de n de pelo menos 150 animais em cada grupo (grupo controlo e animais tratados com os respetivos fármacos) (Gidalevitz et al. 2006).

v. Ensaio do fenótipo de agregação

Neste passo determinou-se se os compostos em estudo, modulavam a agregação da ATXN3. Os ovos foram crescidos em meio líquido durante quatro dias (a 20°C e a 180 rpm), sendo diariamente efetuados os ensaios de agregação.

Para observação da agregação, os animais foram imobilizados com levamisole 1.5 mM e montados em lâminas de microscopia com uma camada fina de agarose 3%. Após 1,5h, as lâminas foram observadas ao microscópio confocal Olympus (Alemanha) modelo FV1000 com laser YFP (515nm) para visualizar a AT3q130 marcada no modelo transgénico da DMJ em *C. elegans*. As fotos adquiridas e armazenadas foram posteriormente analisadas. No sentido de se efetuar a quantificação dos agregados e potencial alteração dos níveis de agregação após tratamento com os diferentes fármacos,

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

utilizou-se uma aplicação recentemente desenvolvida no nosso laboratório, com base na plataforma *MeVisLab* (Castro et al 2011).

vi. Estatística

A informação recolhida foi posteriormente informatizada e tratada em Excel 2007.

Após a colocação dos dados recolhidos e inseridos no software realizou-se a análise estatística. Para comparar vários grupos em termos do fenótipo motor em várias concentrações de compostos, usou-se o teste *ANOVA* para amostras independentes e o *Test T de Student*. Para quantificação dos agregados as imagens foram analisadas estatisticamente com base no *Origin software* (OriginLab), usou-se o teste *ANOVA* e o teste de *Bonferroni* para multiplas comparações. O nível de significância admitido foi de 0,05 ($p \leq 0,05$).

Capítulo IV

Resultados

4.1 Sreening de compostos terapêuticos para a doença de Machado-Joseph em *C. elegans*: autofagia como alvo

Neste trabalho, avaliamos o efeito de dois fármacos indutores de autofagia no modelo de *C. elegans* da DMJ. Para tal, analisámos simultaneamente o efeito dos fármacos, (1) cloreto de lítio (LiCl), (2) o análogo da rapamicina (CCI-779) e (3) a combinação de ambos, na agregação da ATXN3 mutante nas células neuronais *in vivo*, bem como no comportamento motor dos animais.

Os compostos candidatos além de terem sido testados pela nossa equipa, demonstraram previamente serem eficazes noutros sistemas modelos de várias doenças polyQ (David C. Rubinsztein 2006; King et al. 2008; Voisine et al. 2007).

4.1.1. Verificação da toxicidade dos compostos em *C. elegans*

Determinou-se a faixa de concentração não tóxica dos compostos candidatos e do solvente a testar, de modo a escolher as dosagens a usar no nosso modelo *C. elegans* da DMJ.

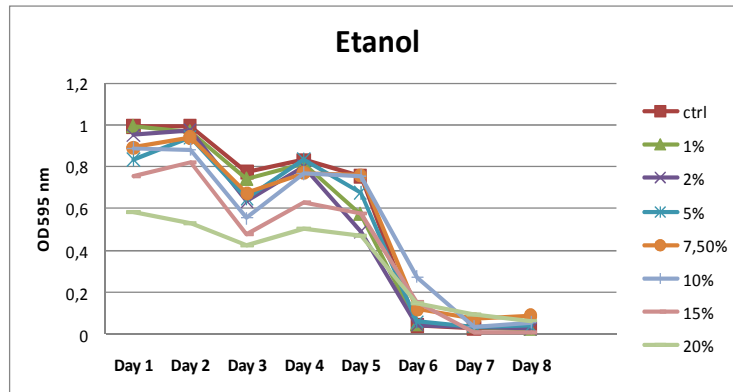
Como descrito anteriormente (ver metodologia no capítulo III), baseámo-nos num método sistemático proposto por Voisine e seus colaboradores (Voisine et al. 2007), para a seleção dos potenciais compostos terapêuticos, avaliação da sua toxicidade e determinação da dose ideal.

As várias concentrações de Etanol (Fig.X A), de LiCl (Fig. X B) e de CCI-779 (Fig. X C) foram testadas durante 8 dias, através da medição da taxa à qual o alimento (suspensão de bactérias OP50) foi consumido. A absorvância foi medida a um comprimento de onda de 595nm e foi elaborada uma curva das densidades óticas da amostra em estudo, para comparar com a curva controlo (mesmo número de nematodes, numa suspensão bacteriana de igual densidade, mas sem fármaco). O aspeto geral dos animais foi observado diariamente à lupa. Qualquer tratamento que diminuísse o crescimento dos *C. elegans*, bem como a sua sobrevivência, fecundidade, ou causasse anomalias visíveis, era considerado tóxico (Voisine et al. 2007).

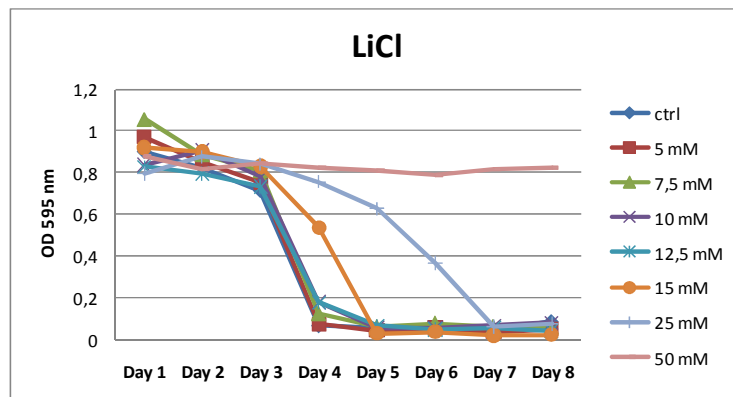
Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

As concentrações para a verificação da toxicidade foram avaliadas na estirpe selvagem *C. elegans* N2 (Figura X).

A



B



C

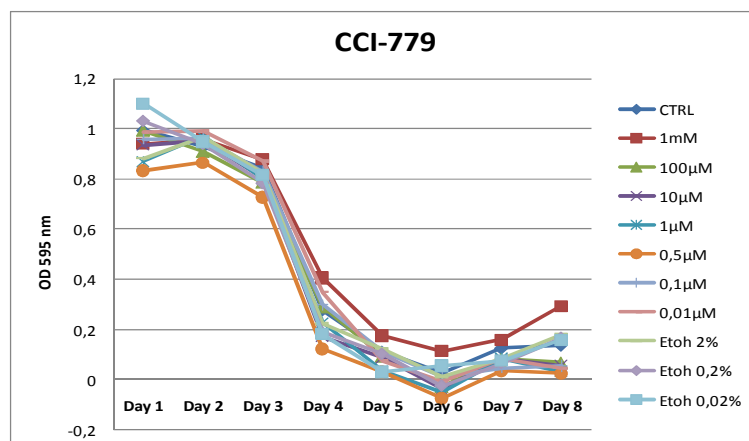


Figura X - Verificação da toxicidade dos fármacos. A toxicidade dos compostos foi monitorizada através da medição da taxa à qual o alimento (bactérias da estirpe OP50) foi consumido. A DO (densidade ótica) foi medida diariamente a 595 nm (DO595) para cada concentração de Etanol (A), LiCl (B) e CCI-779 (C). A 20 ° C, após o dia 4, a DO dos poços sem composto (CTRL) diminuiu significativamente. Uma menor taxa de redução da DO é sugestiva de toxicidade.

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

Para verificação da toxicidade efetuámos as experiências em duplicado para cada composto, tendo obtido resultados similares. As concentrações de segurança foram estabelecidas para cada composto: <12,5 mM para o LiCl; $\leq 100\mu\text{M}$ para o CCI-779 e $\leq 10\%$ para o solvente etanol.

Assim, procedemos com o nosso estudo somente com as concentrações que preencheram o critério de não-toxicidade.

4.1.2. Determinação do efeito dos compostos no fenótipo motor em *C. elegans*

Neste trabalho foi avaliada a eficácia dos compostos em estudo na diminuição da disfunção motora da DMJ em *C. elegans* (Figura XI).

A expressão da ATXN3 mutante (AT3q130) em todas as células neuronais em *C. elegans* resulta na formação de agregados proteicos em determinados tipos de neurónios, nomeadamente nas células do cordão ventral e dorsal, algumas das quais são neurónios motores. Este fenótipo de agregação correlaciona-se com o aparecimento de defeitos na locomoção destes animais, sugerindo que a ataxina-3 mutante causa toxicidade (Teixeira-Castro et al 2011).

Os animais AT3q130 foram cultivados em meio líquido com ou sem fármacos durante quatro dias, e foram testados para o fenótipo de locomoção, através de ensaios de motilidade. O tratamento com LiCl resultou na melhoria parcial do fenótipo motor destes mutantes (figura XI A), nas concentrações 5 e 7,5 mM, cuja percentagem de melhoria foi de 42% e 30% respetivamente (figura XID). No tratamento com o CCI-779 (figura XIB) obtivemos efeito apenas a $1\mu\text{M}$ com uma melhoria de 44% (figuraXID).

Em seguida, avaliámos o potencial dos efeitos da combinação de ambos os fármacos na disfunção motora, apenas se verificou um efeito superior na combinação de 5mM LiCl + $1\mu\text{M}$ CCI-779, porém não foi estatisticamente significativo (figura XIC e XID),sugerindo a ausência de sinergia na ação destes compostos

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

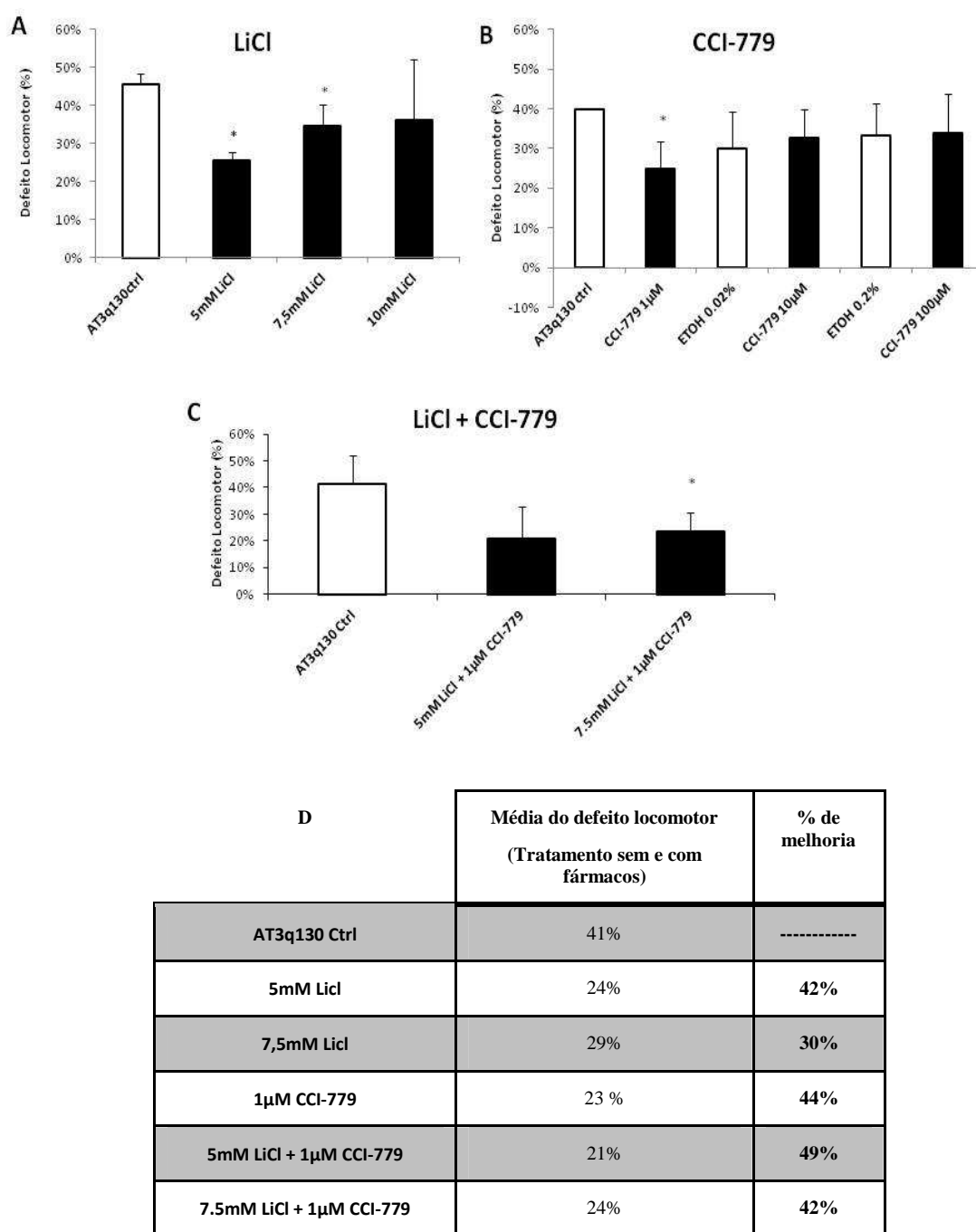


Figura XI - Animais AT3q130 tratados com os compostos indutores da via da autofagia apresentam melhoria parcial do defeito na locomoção. Nos animais tratados com 5 e 7,5 mM de LiCl houve uma redução significativa do comprometimento da motilidade dos animais AT3q130 (A). Com CCI-779 a 1 µM também observamos uma redução significativa no defeito locomotor (B). No entanto, com a combinação de ambos os fármacos, que potencialmente poderiam ativar autofagia através de alvos celulares distintos, verificou-se o aumento do efeito destes, mas não de forma aditiva ou sinérgica (C e D). Os dados são a média ± DP de pelo menos 150 animais por ponto de dados. Teste t Student, * $p \leq 0,05$.

4.1.3. Determinação o efeito dos compostos no fenótipo da agregação em *C. elegans*

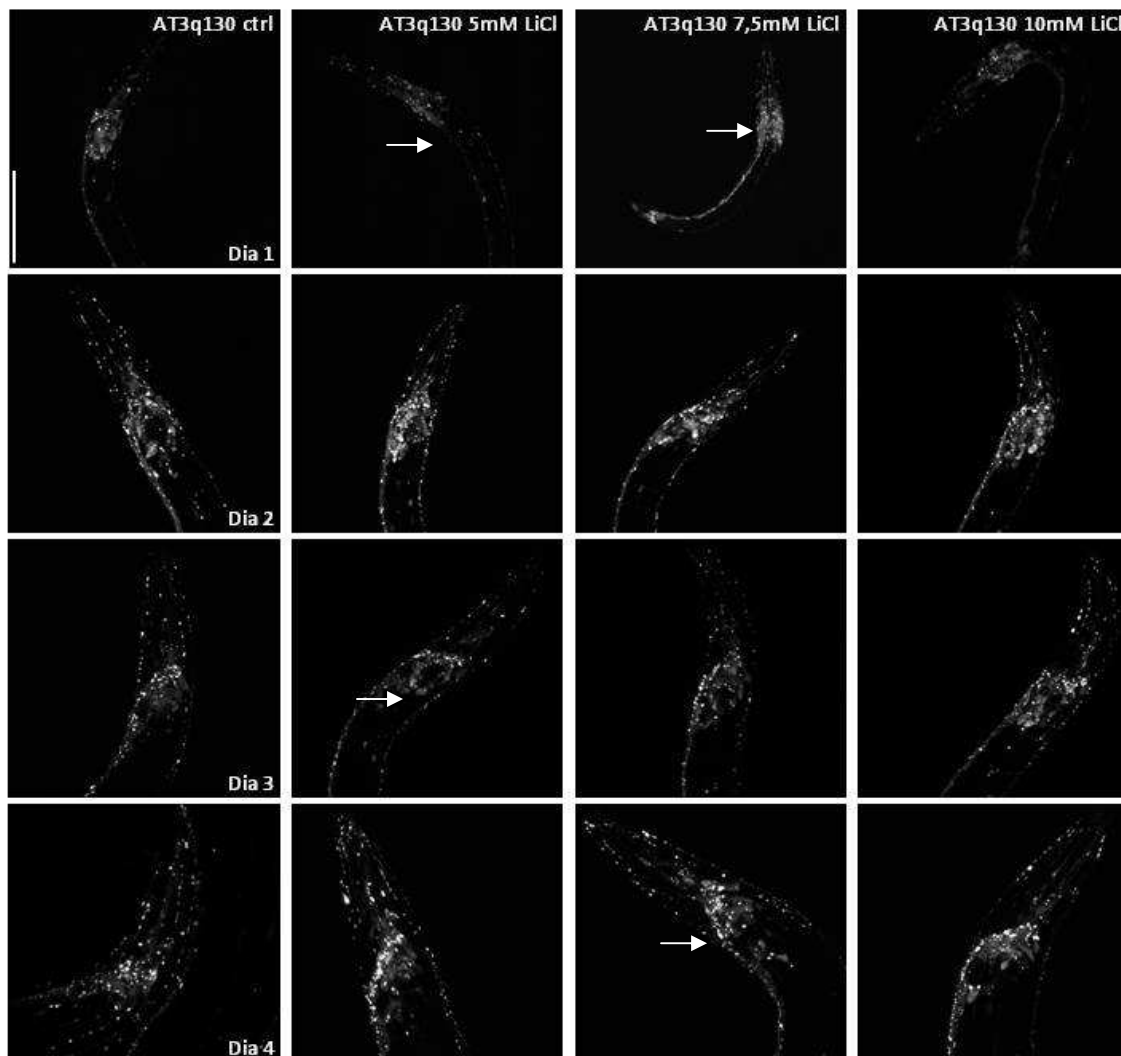
Com o objetivo de determinar se os efeitos dos compostos na disfunção motora dos animais AT3q130 seriam acompanhados por potenciais alterações no perfil de agregação destes animais, realizámos ensaios de microscopia confocal em animais ao 4º dia de vida (jovem adulto) tratados com o composto ou excipiente.

4.1.3.1. Tratamento com Cloreto de Lítio

Os ovos cresceram em meio líquido durante quatro dias e diariamente efetuámos os ensaios de agregação em imagem confocal dos animais tratados e não tratados com o composto LiCl (Figura XII). Para verificação do efeito do fenótipo de agregação com o tratamento com LiCl, efetuámos as experiências em triplicado para cada composto, tendo obtido resultados similares. Visualmente parece ter havido uma diminuição (setas) no fenótipo de agregação com do tratamento farmacológico com 5mM; 7,5mM de LiCL (Nota: As figuras XIIA, XIIB e XIIC identificam os 3 ensaios).

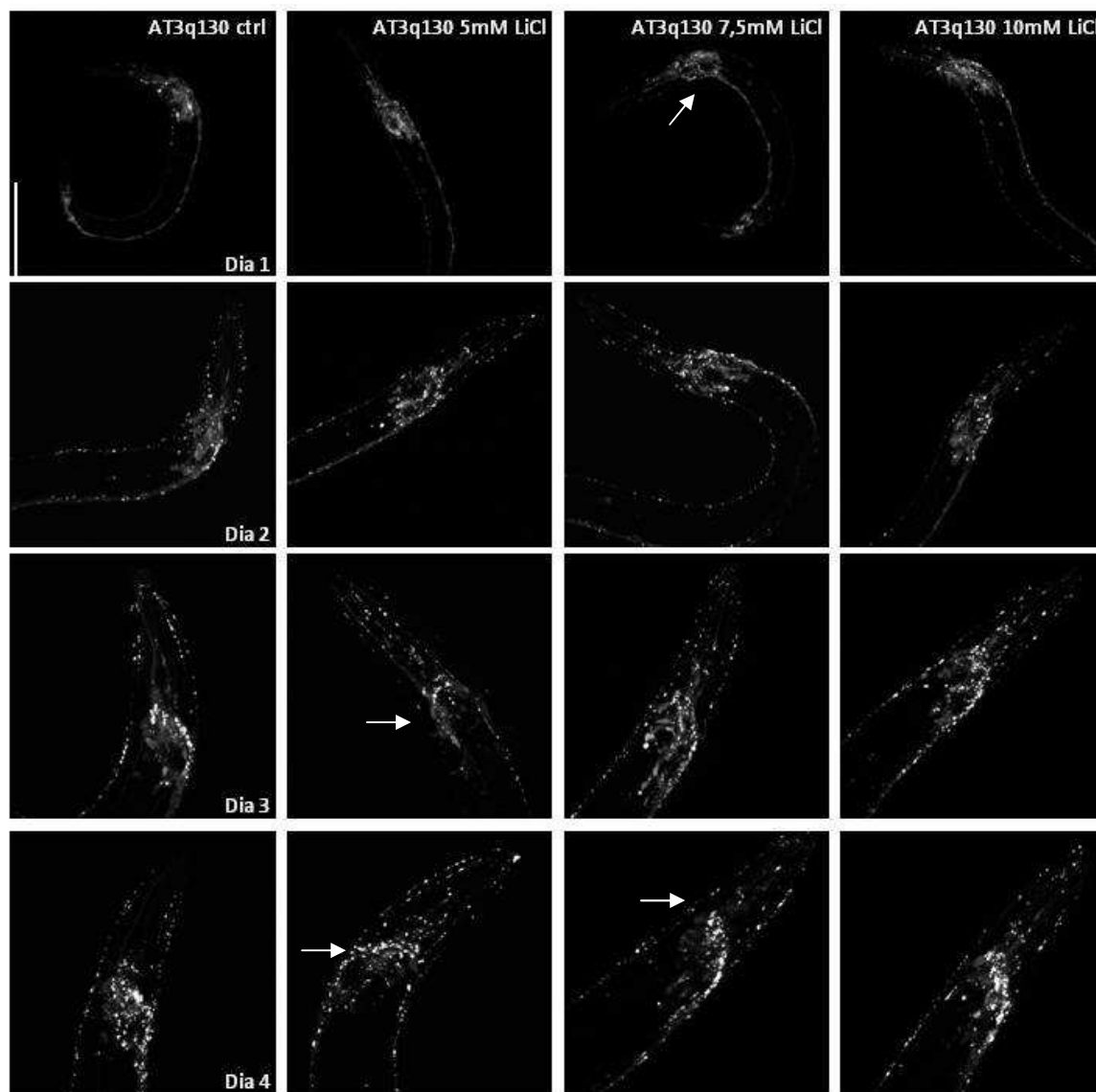
Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

XIII



Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

XIIB (Cont.)



XIIC (Cont.)

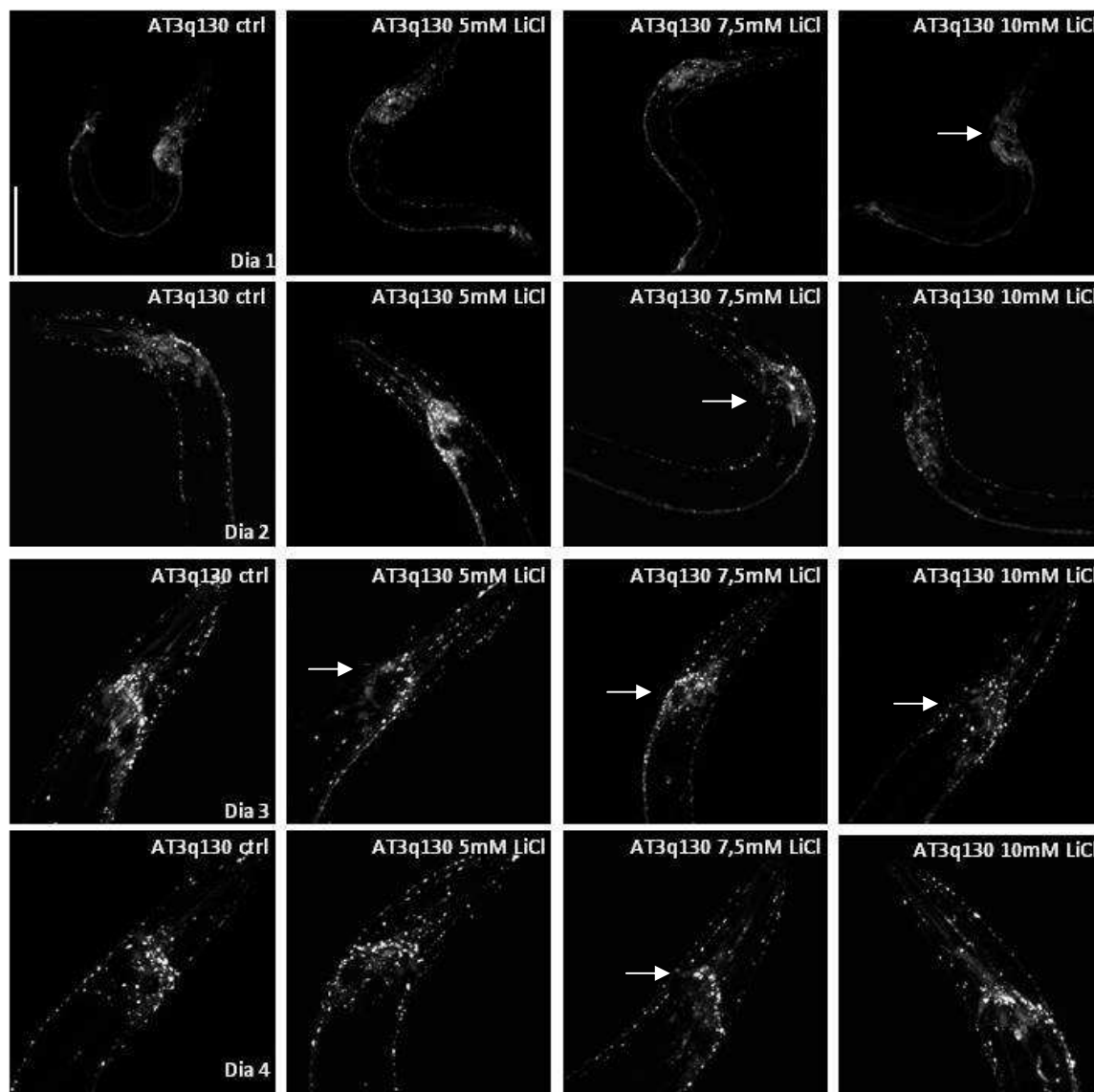


Figura XII - Animais AT3q130 tratados com LiCl, evidenciam uma redução do fenótipo de agregação. Resultados do tratamento farmacológico e 10mM de LiCl dos animais AT3q130 durante 4 dias em animais dia 1 a 4. Para observação da agregação, os animais foram analisados ao microscópio confocal com laser YFP (515nm) para visualizar a AT3q130 marcada. As figuras XIIA, XIIB e XIIC identificam os 3 ensaios. Visualmente parece ter havido uma diminuição no fenótipo de agregação principalmente nas concentrações com 5mM; 7,5mM de LiCl.

As fotos adquiridas foram armazenadas no sentido de se efetuar posteriormente a quantificação dos agregados.

4.1.1.1. Tratamento com CCI-779

Os ovos cresceram em meio líquido durante quatro dias e efetuámos o ensaio de agregação em imagem confocal do dia 4 dos animais tratados e não tratados com o composto CCI-779 (Figura XIII).

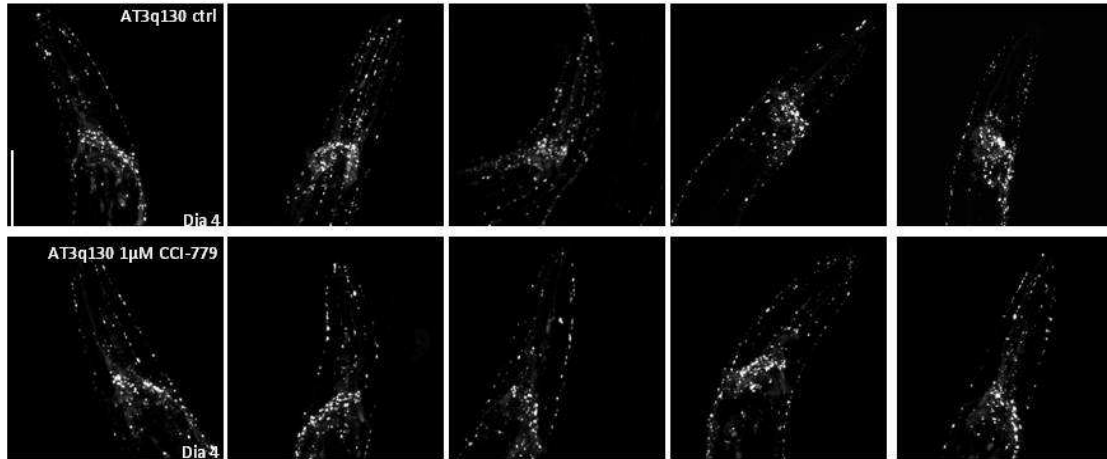


Figura XIII - Animais AT3q130 tratados com CCI-779 para fenótipo de agregação. O tratamento farmacológico com 1µM de CCI-779 dos animais AT3q130 durante 4 dias, o ensaio de agregação foi efetuado no dia 4, nos animais L4/adultos jovens. Para observação da agregação, os animais foram vistos ao microscópio confocal com laser YFP (515nm) para visualizar a AT3q130 marcada. As fotos adquiridas e armazenadas foram posteriormente analisadas no sentido de se efetuar a quantificação dos agregados observou-se uma diminuição no fenótipo de agregação.

4.1.4. Quantificação do efeito dos compostos no fenótipo de agregação

A quantificação dos agregados nos animais tratados com 5mM de LiCl e 1 μ M de CCI-779 revelou que ambos os compostos causaram uma redução ligeira no número de agregados por área de animal (Figura XIV), sendo mais marcado o efeito para o LiCl a 5mM.

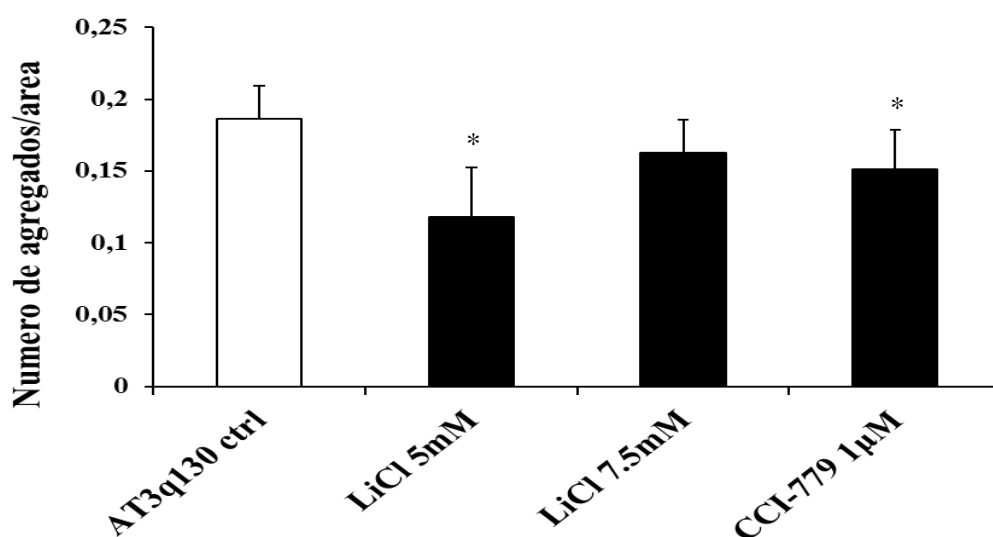


Figura XIV- Tratamento farmacológico dos animais da ATXN3 mutante com LiCl, CCI-779

Quantificação do número de agregados por área realizada utilizando um aplicativo de processamento de imagem para quantificação de agregados em *C.elegans* (Castro et al,2011) os valores são a média \pm DP de 6 ou mais animais por grupo. ANOVA, * $p \leq 0,05$. Verifica-se uma redução significativa do número de agregados por unidade de área. Nos animais AT3q130 tratados com 5mM de LiCl verificou-se uma redução no fenótipo de agregação no dia 4 (idade adulta jovem), mais significativa do que o efeito com o tratamento de 1 μ M de CCI-779.

Capítulo V

Discussão dos Resultados

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

As doenças neurodegenerativas tais como a DA, DP, DH, ELA, doenças priônicas e as doenças de poliglutaminas estão associadas a alterações de conformação de certas proteínas, com consequente formação de agregados, formação de corpos de inclusão e perda de células neuronais (Christopher A Ross & Poirier 2004).

Sabe-se até ao momento que a agregação da ATXN3 está associada com a disfunção motora, nomeadamente: descoordenação dos membros superiores e inferiores, dificuldades de articulação verbal e oftalmoplegia externa progressiva. Este fenótipo é observado em humanos e parcialmente refletido nos vários modelos animais desta doença de poliQ (L. Lima & P Coutinho 1980; Costa MC et al, 2012).

Neste trabalho, usámos o nemátode *C. elegans*, para validar fármacos eficazes para o combate contra a DMJ, e analisando simultaneamente o seu efeito na agregação da ATXN3 mutante nas células neuronais *in vivo* e o seu impacto no comportamento motor dos animais (ver métodos- figura IX).

Os métodos empregues tiraram proveito dos pontos fortes do *C. elegans* para a identificação de compostos, nomeadamente: (i) nenhum outro modelo animal apresenta, como este nemátode, um número de neurónios tão elevado relativamente ao número total das suas células (959 células, das quais 302 são neurónios), o que representa um aspeto importante quando se pretende estudar uma doença neurológica; (ii) este pequeno invertebrado pode ser cultivado em meio líquido, o que reduz significativamente a quantidade de composto necessário; (iii) é um animal transparente pelo que facilita a deteção de proteínas fluorescentes *in vivo*; (iv) foi previamente validado, tendo sido possível identificar um conjunto de compostos eficazes contra a patogênese da DMJ neste modelo (Castro et al, 2011). Os fármacos eficazes no modelo de *C. elegans* poderão em seguida ser testados em organismos superiores, incluindo ratinhos transgênicos, para eventualmente depois serem avaliados do ponto de vista clínico.

Este nosso modelo será usado tipicamente nas etapas iniciais da investigação, para dar respostas rápidas a problemas como a descoberta da função do gene *in vivo*, ou na pesquisa médica pioneira para identificar novos alvos terapêuticos, como é o caso deste no nosso trabalho. Alguns sintomas da DMJ, como, por exemplo as limitações do movimento ocular, que são muito importantes na diferenciação clínica da DMJ, são obviamente de difícil identificação no modelo em *C. elegans* (Castro 2011). Daí a necessidade de serem testados posteriormente em organismos superiores para eventualmente serem avaliados na clínica.

5.1 - Via da autofagia como estratégia terapêutica para DMJ

Tal como referido na Introdução, os potenciais tratamentos para as doenças de poliQ incluem o uso de substâncias que promovem a degradação da proteína mutada, impedindo e deste modo a sua acumulação, bem como a modulação da expressão do ATXN3 mutada e mesmo wild-type através do uso de RNA de interferência. Um estudo recente em ratos mostrou que a sobre-expressão da ATXN3 wild-type não protege contra a patologia MJD e da mesma forma, o seu silenciamento não agravou a patologia (Alves et al. 2010).

Sabemos que a expansão de poliQ altera a conformação normal das proteínas, que resulta na capacidade anómala destas proteínas se associarem, formando espécies de maior peso molecular (oligómeros) que, finalmente dão origem a agregados proteicos ou inclusões que se acumulam de forma estável na célula, e que são reconhecíveis em imunohistoquímica por anticorpos contra a proteína específica (Cuervo 2007). É ainda controverso no entanto se os efeitos das inclusões medeiam a disfunção neuronal ou se, pelo contrário, estas têm um efeito protetor. Num estudo em modelos celulares da DH, foi demonstrado, através de uma análise de sobrevivência, que os neurónios expostos à huntingtina mutante morreriam de forma independente do tempo, mas dependente da dose de huntingtina e expansão do tamanho da poliglutamínica; curiosamente, muitos neurónios morreriam sem formar um corpo de inclusão. Mais surpreendentemente ainda, a formação do corpo de inclusão melhorava a probabilidade de sobrevivência e levava à diminuição dos níveis de huntingtina mutante intranucleares dos neurónios (Arrasate et al. 2004).

Apesar do papel destas “formas” finais de agregação ser duvidoso, a formação de espécies agregadas de menor dimensão parece ter um efeito nocivo para as células, não sendo claro porque mecanismos. Os compostos candidatos para esta investigação tiveram como alvo uma das vias da degradação proteica, baseando-se na ideia de que a ativação da autofagia promete ser uma estratégia poderosa para a DMJ (Cuervo 2007), permitindo a remoção de agregados não elimináveis por outras vias, como a do proteassoma.

Testámos dois compostos que poderão proteger contra a patogênese da ATXN3 mutada. Os compostos avaliados foram o LiCl que é um indutor químico da autofagia, através de uma via independente do mTOR, e o CCI-779 que é um indutor da autofagia por uma via dependente do mTOR.

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

A solução stock de LiCl foi de 200mM, preparado em água, enquanto o CCI-779 foi preparado em etanol (EtOH) com solução stock de 48,5mM, sendo que o CCI-779 é menos solúvel em água, havendo a necessidade de o dissolver primeiro em EtOH. Surgiu a necessidade de estudar o efeito do solvente e o nosso trabalho demonstrou que os *C. elegans* só exibem alterações sugestivas de toxicidade a partir dos 100mM de EtOH (A. G. Davies et al. 2003; McIntire 2010) pelo que as concentrações de etanol usadas não terão afetado deste modo a nossa investigação.

Estudos reportam que o tratamento com rapamicina reduziu os níveis de huntingtina solúvel mutante e atenuou a toxicidade nas células, em modelos transgênicos da DH em *Drosophila* e em rato (Brinda Ravikumar et al. 2002; David C. Rubinsztein 2006). Foi também demonstrado que o análogo da rapamicina CCI-779 reduziu o número de agregados num modelo de rato transgênico que expressava a huntingtina mutante quando esta foi administrada 6 semanas antes do aparecimento dos sinais neurológicos (Brinda Ravikumar et al. 2004). Segundo Menzies e colaboradores, genes envolvidos na autofagia foram identificados como supressores de agregação mediada por fragmentos de ATXN3 mutada em *C.elegans* e o tratamento com CCI-779 reverteu o fenótipo de descoordenação motora de murganhos transgênicos para a DMJ (Menzies et al. 2010). Nos nossos animais AT3q130, com o tratamento de 1µM de CCI-779 também houve uma redução do defeito de motilidade e da agregação da ATXN3.

A propriedade de indução da autofagia pelo do LiCl foi recentemente sugerida como contribuição para o seu efeito neuroprotetor em ratos no modelo da esclerose lateral amiotrófica, em que o tratamento com o fármaco aumentou a sobrevivência e retardou a progressão da doença (Fornai et al. 2008). Num estudo em modelo de *ratinho* da SCA1 o LiCl melhorou a função neurológica e a arboização dendrítica (Watase et al., 2007).

Quando tratados com LiCl a 5mM e a 7,5 mM, os animais AT3q130, manifestaram uma redução do fenótipo motor e uma redução do fenótipo da agregação da ATXN3 a 5mM de LiCl. Observamos uma diminuição da disfunção motora e de agregação apresentada pelos animais AT3q130 a e 1µM de CCI-779 .

Estes resultados são de grande relevo, porque indicam que o fenótipo desta doença foi retardado ou mesmo revertido nestes animais. Porém, a combinação dos dois fármacos mostrou-se menos eficaz do que a soma de cada um deles isoladamente. Este resultado do co-tratamento foi surpreendente, já que alguns autores defendiam que, a fim de neutralizar os

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

efeitos inibitórios da autofagia por ativação mTOR, resultantes do tratamento do lítio, se deveria utilizar rapamicina (inibidor de mTOR) em combinação com lítio. Essa combinação aumentaria sinergisticamente a autofagia (Sovan Sarkar & David C Rubinsztein 2008), hipótese apenas parcialmente confirmada pelos nossos dados, já que se observou um efeito aumentado, mas menos eficiente do que a soma dos efeitos obtidos com o tratamento com os compostos isolados. Os resultados sugerem uma redução não-sinergística no fenótipo de agregação nos animais AT3q130 após o tratamento farmacológico com 5mM de LiCl e com 1 μ M de CCI-779 (estatisticamente não significativo).

Relativamente à quantificação dos agregados dos animais tratados com 5mM de LiCl e 1 μ M de CCI-779 verificou-se que ambos os compostos causaram uma redução ligeira no número de agregados por área de animal sendo mais marcado o efeito para o LiCl a 5mM. Isto sugere que a nível celular que, o mau funcionamento de sistemas de vigilância celulares, leva inevitavelmente à toxicidade celular e à doença. É intuitivo pensar que essas vias celulares de vigilância modulam a maioria das doenças que dependem de proteínas de agregação. Por conseguinte, tendo como alvo o sistema de autofagia, esta pode ser uma estratégia útil para o tratamento de muitos distúrbios neurodegenerativos (Teixera-Castro et al 2011) .

Com o objetivo terapêutico em mente, constatámos que os compostos ativadores do processo autofágico, LiCl e a Temsirolimus (CCI-779), têm capacidade de prevenir ou atrasar a formação de agregados de ATXN3 e simultaneamente de diminuir a disfunção motora apresentada por estes animais. Será útil confirmar estas observações em modelos da DMJ em *rato* ou *ratinho*, de modo a verificar a sua utilidade clínica.

Para além de confirmar o efeito terapêutico destes dois compostos, fomos capazes de validar o nosso modelo de *C. elegans* da DMJ como uma ferramenta útil para ser usado em testes de alto rendimento de pequenas moléculas terapêuticas, de modo a identificar compostos promissores para o tratamento da DMJ.

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

Capítulo VI

Conclusão & Perspetivas Futuras

Identificação de compostos que modulam a patogénese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

Atualmente, não existe ainda qualquer tratamento eficaz ou cura para a DMJ. E a falta de estratégias terapêuticas que previnam eficazmente a neurodegenerescência que ocorre nestes doentes, levou-nos a procurar compostos que modulem a disfunção neurológica causada pela ATXN3 mutante. A presença da ATXN3 expandida tem várias consequências patofisiológicas para os neurónios. Assim, uma possível estratégia para lidar com estas proteínas mutantes seria potenciar a sua degradação por autofagia, hipótese aqui testada. Os nossos resultados sugerem que a ativação da autofagia será uma estratégia terapêutica poderosa para a DMJ.

As principais conclusões deste trabalho são:

- ✓ Verificámos que os compostos a 5mM e a 7,5mM de LiCl e 1uM CCI-779, têm um efeito positivo no deficit locomotor no modelo transgénico da DMJ em *C. elegans* (AT3q130); porém com a combinação de ambos os fármacos não houve melhoria significativa do efeito comparativamente aos compostos isoladamente.
- ✓ Verificámos que 5mM de LiCl e 1uM CCI-779 têm um efeito positivo na diminuição da agregação da ataxina-3 mutante em *C. elegans* (AT3q130);
- ✓ Validámos o uso do LiCl e do CCI-779 como estratégia terapêutica para a DMJ em *C. elegans*; estes ativadores de autofagia, são bons candidatos para teste em modelos da DMJ em organismos superiores;
- ✓ Validamos adicionalmente a utilização do modelo de *C. elegans* AT3q130, que estabelecemos como uma ferramenta útil para a identificação de potenciais compostos terapêuticos para a DMJ.

Perspetivas Futuras

Esta investigação em *C. elegans* poderá contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos da patogénese da DMJ, uma vez que os alvos terapêuticos poderão fornecer pistas sobre os mecanismos celulares relevantes no processo da doença.

Dado que estes compostos tiveram um impacto positivo no perfil de agregação, e como a autofagia é uma via de degradação proteica, acredita-se que houve uma diminuição

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

nos níveis de proteína mutada em *C. elegans*. Seria importante confirmar esta hipótese por Western-blot.

Para verificar se realmente a autofagia foi ativada pelos fármacos e doses testadas nesta investigação, seria útil confirmar por Real-Time PCR a expressão dos genes envolvidas na autofagia, e confirmar por Western-blot a atividade autofágica, existem marcadores como por ex: LC3 e beclina, que deveriam estar aumentados e modificados pós traducionalmente, ambos estão envolvidos em passos diferentes do fluxo autofágico(Huang et al, 2000; Kabeya et al, 2000; Kirisako et al, 1999;Meléndez et al, 2003).

O futuro da DMJ passará necessariamente por um maior esclarecimento da sua etiopatogenia, melhor elucidação do verdadeiro papel da ATXN3 e desenvolvimento de tratamentos que possam impedir ou modular a evolução da doença. Finalmente, a estratégia montada pelo nosso grupo de investigação relativamente ao rastreamento de uma biblioteca de fármacos aprovados pela FDA abre caminho na busca de uma terapia mais adequada para esta doença.

Identificação de compostos que modulam a patogênese da doença de Machado-Joseph em *C. elegans*:
autofagia como alvo terapêutico

Capítulo VII

Referências Bibliográfica

- Alves, S. et al., 2010. Silencing Ataxin-3 Mitigates Degeneration in a Rat Model of Machado-Joseph Disease: No Role for Wild-Type Ataxin-3? *Human Molecular Genetics*. Available at: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/early/2010/03/22/hmg.ddq111> [Acedido Maio 20, 2012].
- Arrasate, M., S. Mitra, E. S. Schweitzer, M. R. Segal, and S. Finkbeiner. 2004. "Inclusion Body Formation Reduces Levels of Mutant Huntingtin and the Risk of Neuronal Death." *Nature* 431 (7010): 805–810.
- Bates, Gillian P & Hockly, E., 2003. Experimental therapeutics in Huntington's disease: are models useful for therapeutic trials? *Current Opinion in Neurology*, 16(4), pp.465-470.
- Bauer, P.O. & Nukina, Nobuyuki, 2009. The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *Journal of Neurochemistry*, 110(6), pp.1737-1765.
- Bennett, E.J. et al., 2005. Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Molecular Cell*, 17(3), pp.351-365.
- Berger, Z. et al., 2006. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Human Molecular Genetics*, 15(3), pp.433-442.
- Bevivino, A.E. & Loll, P.J., 2001. An expanded glutamine repeat destabilizes native ataxin-3 structure and mediates formation of parallel beta -fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), pp.11955-11960.
- Blommaert, E.F. et al., 1995. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(5), pp.2320-2326.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), p.71.
- do Carmo Costa, M. et al., 2004. Genomic structure, promoter activity, and developmental expression of the mouse homologue of the Machado-Joseph disease (MJD) gene. *Genomics*, 84(2), pp.361–373.
- Castro, A.C.T. de, 2011. Identification of modulators of ataxin-3 proteotoxicity in animal models of Machado-Joseph disease. Available at: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/14104> [Acedido Abril 29, 2012].
- Chai, Y. et al., 1999. Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro. *Human Molecular Genetics*, 8(4), pp.673-682.
- Coutinho, P & Andrade, C., 1978. Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology*, 28(7), pp.703-709.
- Costa, Maria do Carmo, and Henry L Paulson. 2012. "Toward Understanding Machado Joseph Disease." *Progress in Neurobiology* 97 (2) (May): 239–257. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.11.006.

- Cummings, C.J. et al., 1998. Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nature Genetics*, 19(2), pp.148-154.
- Davies, A.G. et al., 2003. A Central Role of the BK Potassium Channel in Behavioral Responses to Ethanol in *C. elegans*. *Cell*, 115(6), pp.655-666.
- Davies, S.W. et al., 1997. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, 90(3), pp.537-548.
- DiFiglia, M. et al., 1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5334), pp.1990-1993.
- Donaldson, K.M. et al., 2003. Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), pp.8892-8897.
- Epstein Henry F. & Diane C. Shakes, 1995. *Caenorhabditis elegans: Modern Biological Analysis of an Organism, Volume 48: Caenorhabditis Elegans: Modern Biological Analysis of an Organism (Methods in Cell Biology)* 1st ed., Academic Press.
- Fink, A.L., 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews*, 79(2), pp.425-449.
- Fornai, F. et al., 2008. Lithium Delays Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), pp.2052-2057.
- Garcia, S.M. et al., 2007. Neuronal signaling modulates protein homeostasis in *Caenorhabditis elegans* post-synaptic muscle cells. *Genes & Development*, 21(22), pp.3006-3016.
- Gidalevitz, T. et al., 2006. Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science*, 311(5766), p.1471.
- Glickman, M.H. & Ciechanover, A., 2002. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews*, 82(2), pp.373-428.
- Goto, J. et al., 1997. Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neuroscience Research*, 28(4), pp.373-377.
- Gusella, J.F. & MacDonald, M.E., 2000. Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 1(2), pp.109-115.
- Harman, D., 2001. Aging: overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, pp.1-21.
- Hofmann, K. & Falquet, L., 2001. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6), pp.347-350.
- Hoppe, T., 2005. Multiubiquitylation by E4 enzymes: «one size» doesn't fit all. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(4), pp.183-187.
- Hughes, R.E. & Olson, J.M., 2001. Therapeutic opportunities in polyglutamine disease. *Nature Medicine*, 7(4), pp.419-423.
- Ishikawa, K. et al., 1999. Abundant expression and cytoplasmic aggregations of [alpha]1A voltage-dependent calcium channel protein associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6. *Human Molecular Genetics*, 8(7), pp.1185-1193.

- Iwabuchi, K. et al., 1999. Autosomal dominant spinocerebellar degenerations. Clinical, pathological, and genetic correlations. *Revue Neurologique*, 155(4), pp.255-270.
- Jaeger, P.A. & Wyss-Coray, T., 2009. All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration and neuroprotection. *Molecular Neurodegeneration*, 4, p.16.
- Jia, K. & Levine, Beth, 2010. Autophagy and longevity: lessons from *C. elegans*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 694, pp.47-60.
- Jiang, X., 2010. Animal genes identification and mTOR signaling reactivation in autophagy. *Protein & Cell*, 1(8), pp.699-701.
- Júlio César Borges, Estudos dos sistemas chaperones moleculares HSP70 e HSP90 de parasitas. Available at: <http://www.bv.fapesp.br/pt/projetos-jovens-pesquisadores/4706/estudos-sistemas-chaperones-moleculares-hsp70/> [Acedido Agosto 3, 2011].
- Kawaguchi, Y. et al., 1994. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genetics*, 8(3), pp.221-228.
- King, M.A. et al., 2008. Rapamycin inhibits polyglutamine aggregation independently of autophagy by reducing protein synthesis. *Molecular Pharmacology*, 73(4), p.1052.
- Klionsky, D.J. et al., 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell*, 5(4), pp.539-545.
- Levine, Beth & Klionsky, D.J., 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*, 6(4), pp.463-477.
- Li, S.-H. et al., 1993. Novel Triplet Repeat Containing Genes in Human Brain: Cloning, Expression, and Length Polymorphisms. *Genomics*, 16(3), pp.572-579.
- Lima, L. & Coutinho, P, 1980. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorena Portuguese family. *Neurology*, 30(3), pp.319-322.
- Maciel, Patricia et al., 2001. Improvement in the Molecular Diagnosis of Machado-Joseph Disease. *Arch Neurol*, 58(11), pp.1821-1827.
- Margolis, R L & Ross, C A, 2001. Expansion explosion: new clues to the pathogenesis of repeat expansion neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 7(11), pp.479-482.
- Margolis, Russell L, 2002. The spinocerebellar ataxias: order emerges from chaos. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2(5), pp.447-456.
- Markossian, K.A. & Kurganov, B.I., 2004. Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggregates. *Biochemistry. Biokhimiia*, 69(9), pp.971-984.
- Martinez-Vicente, M. & Cuervo, A. M, 2007. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *The Lancet Neurology*, 6(4), pp.352-361.
- Martinez-Vicente, Marta & Cuervo, Ana Maria, 2007. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *The Lancet Neurology*, 6(4), pp.352-361.
- Meléndez, A. & Levine, B., 2009. Autophagy in *C. elegans*. *WormBook: the online review of C. elegans biology*, p.1.
- Menzies, F. M et al., 2010. Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Brain*, 133(1), p.93.

- Mizushima, Noboru et al., 2008a. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), pp.1069-1075.
- Mizushima, Noboru et al., 2008b. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), pp.1069-1075.
- Nakano, K.K., Dawson, D.M. & Spence, A., 1972. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, 22(1), pp.49-55.
- Pan, Tianhong et al., 2008. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 131(Pt 8), pp.1969-1978.
- Pan, T. et al., 2008. The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain*, 131(8), p.1969.
- Pandey, U.B. et al., 2007. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, 447(7146), pp.859-863.
- Paulson, H L et al., 1997. Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Annals of Neurology*, 41(4), pp.453-462.
- Paulson, H L, 1999. Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *American Journal of Human Genetics*, 64(2), pp.339-345.
- Ravikumar, Brinda et al., 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature genetics*, 36(6), pp.585-595.
- Ravikumar, Brinda, Duden, R. & Rubinsztein, David C., 2002. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Human Molecular Genetics*, 11(9), pp.1107 -1117.
- Rodrigues, A.J. et al., 2007. Functional genomics and biochemical characterization of the *C. elegans* orthologue of the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *The FASEB Journal*, 21(4), p.1126.
- Roger N. Rosenberg et al., 1976. Autosomal dominant striatonigral degeneration. *Neurology*, 26(8), p.703.
- Rosenberg, R.N., 1983. Dominant ataxias. *Research Publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease*, 60, pp.195-213.
- Rosenberg, R.N., 1992. Machado-Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 7(3), pp.193-203.
- Ross, C A, 1995. When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases. *Neuron*, 15(3), pp.493-496.
- Ross, Christopher A & Poirier, M.A., 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 10(7), pp.S10-S17.
- Rubinsztein, David C., 2006a. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, 443(7113), pp.780-786.
- Rubinsztein, David C., 2006b. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, 443(7113), pp.780-786.
- Samara, C. et al., 2005. Macroautophagy contributes to neurodegeneration in *C. elegans*.

Em *International Worm Meeting.* Available at: <http://www.wormbase.org/db/misc/paper?name=WBPaper00025861> [Acedido Dezembro 21, 2010].

Sarkar, S., Krishna, G., et al., 2008. A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Human molecular genetics*, 17(2), p.170.

Sarkar, S., Ravikumar, B., et al., 2008. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death & Differentiation*, 16(1), pp.46–56.

Sarkar, Sovan & Rubinsztein, David C, 2008. Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases. *Molecular bioSystems*, 4(9), pp.895-901.

Saudou, F. et al., 1998. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, 95(1), pp.55-66.

Schierenberg, E. & Wood, W.B., 1985. Control of cell-cycle timing in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 107(2), pp.337-354.

Schmidt, T. et al., 1998. An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 8(4), pp.669-679.

Seidel, K. et al., 2010. Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3. *Acta Neuropathologica*, 120(4), pp.449-460.

Sequeiros, J & Coutinho, P, 1993. Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. *Advances in Neurology*, 61, pp.139-153.

Sohal, R.S. et al., 1994. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mechanisms of Ageing and Development*, 74(1-2), pp.121-133.

Soong, B. & Paulson, Henry L, 2007. Spinocerebellar ataxias: an update. *Current Opinion in Neurology*, 20(4), pp.438-446.

Spada, A.R.L. et al., 1991. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 352(6330), pp.77-79.

Srivastava, A.K. et al., 2005. Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus. , 133B(1), pp.124-126.

Takiyama, Y. et al., 1993. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet*, 4(3), pp.300-304.

Taylor, J.P., Hardy, J. & Fischbeck, Kenneth H, 2002. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5575), pp.1991-1995.

Terman, A., 2001. Garbage catastrophe theory of aging: imperfect removal of oxidative damage? *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 6(1), pp.15-26.

Voisine, C. et al., 2007. Identification of Potential Therapeutic Drugs for Huntington's Disease using *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 2(6), p.e504.

Wang, G. et al., 1997. Machado-Joseph disease gene product identified in lymphocytes and brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 233(2), pp.476-479.

Watase, K., Gatchel, J. R., Sun, Y., Emamian, E., Atkinson, R., Richman, R., Mizusawa,

H., Orr, H. T., Shaw, C. and Zoghbi, H. Y. 2007. Lithium therapy improves neurological function and hippocampal dendritic arborization in a spinocerebellar ataxia type 1 mouse model. *PLoS Med.* 4, e182.

Woods, B.T. & Schaumburg, H.H., 1972. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *Journal of the Neurological Sciences*, 17(2), pp.149-166.

Xiao, H. et al., 2010. [Polyglutamine-expanded ataxin-3 is degraded by autophagy]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi = Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi = Chinese Journal of Medical Genetics*, 27(1), pp.23-28.

Yao, T.-P., 2010. The Role of Ubiquitin in Autophagy-Dependent Protein Aggregate Processing. *Genes & Cancer*, 1(7), pp.779 -786.

Zoghbi, Huda Y. & Orr, Harry T., 2000. Glutamine Repeats and Neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 23(1), pp.217-247.

Capítulo VIII

Anexos

Anexos

Defeito de Motilidade				
	Média Dos ensaio	Desvio Padrão	Ttest	%Melhoria
AT3q130 Ctrl	41%	0,110805134		
5mM LiCl + 1µM CCI-779	21%	0,11805792	0,053122	49%
7.5mM LiCl + 1µM CCI-779	24%	0,068960536	0,039025	42%
5mM LiCl	24%	0,074239543	0,050719	42%
7,5mM LiCl	29%	0,094682344	0,111415	30%
1µM CCI-779	23%	0,037586718	0,015369	44%

Anexo 1- Efeito dos compostos testados no fenótipo locomotor ao dia 4. Valores de defeito de motilidade (percentagem de animais que ficam num interior de um círculo de 1 cm ao fim de 5 min de observação), n=50 para cada réplica

	Percentagem da média de agregados/área	Stdev	Ttest
AT3q130 ctrl	0,186053803		
LiCl 5mM	0,117757874	0,034487751	0,001354795
LiCl 7.5mM	0,162438238	0,022905395	0,079013278
CCI-779 1µM	0,151291821	0,027585489	0,030881971

Anexo 2 - Quantificação dos agregados de ataxina-3 (n=6 ou mais animais por cada réplica)