

Estudo de alterações moleculares induzidas por agentes oxidantes e antioxidantes em modelo eucarionte

Andreia Duarte Allen Graça

Dissertação submetida à Escola Superior de Saúde para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde - Ramo de biotecnologia, realizada sob a orientação institucional e técnico-científica da Professora Doutora Mónica Vieira, Professora Adjunta da área técnico-científica das ciências Químicas e das Biomoléculas.

Abril 2019

Resumo

A disfunção mitocondrial e a agregação proteica são dois fenômenos que têm vindo a ser relacionados com as doenças neurodegenerativas e ambas estão interligadas com o *stress* oxidativo celular. A disfunção mitocondrial relaciona-se com o dano nos ácidos nucleicos e a agregação proteica com erros no *folding* proteico. No entanto, ainda não se definiu a agregação como uma causa ou consequência das doenças neurodegenerativas. Assim sendo, esta dissertação de mestrado teve como principais objetivos analisar a influência de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio, um agente oxidante produzido pelas nossas células, na agregação proteica e no material genético, bem como o papel da vitamina E na reversão do efeito do H₂O₂. Para isso, amostras celulares de *Saccharomyces cerevisiae* foram recolhidas a meio da fase exponencial de crescimento. A análise dos agregados insolúveis foi realizada através da técnica eletroforética SDS-PAGE seguida de lise proteica e a quebra do DNA foi analisada através de eletroforese de agarose 1,5% seguida de RAPD-PCR. A exposição ao agente oxidante ao longo do tempo potenciou a agregação proteica, nomeadamente da ovalbumina. No entanto, o agente antioxidante não demonstrou qualquer tipo de reversão do efeito oxidante, parecendo apresentar um efeito pró-oxidante. Apesar de se observarem diferenças na agregação proteica ao longo do tempo, não se observaram quebras no material genético.

Palavras-chave: Doenças neurodegenerativas, Danos do DNA, agregação proteica, Vitamina E, *Stress* oxidativo, Efeito antioxidante.

Abstract

Mitochondrial dysfunction and protein aggregation are two phenomena that have been correlated with neurodegenerative diseases and are both interlinked with cellular oxidative stress. Mitochondrial dysfunction is associated with nucleic acid damage and protein aggregation with mistakes in protein folding. However, aggregation has not yet been defined as a cause or consequence of neurodegenerative diseases. Therefore, this thesis' main objectives were to analyze the influence of different concentrations of hydrogen peroxide, an oxidant agent produced by our cells, in protein aggregation and genetic material as well as the role of vitamin E in reversing the effect of H₂O₂. For that purpose, *Saccharomyces cerevisiae* cellular samples were collected throughout the exponential growth phase. Analysis of insoluble aggregates was performed using the electrophoretic technique SDS-PAGE followed by protein lysis and DNA breakage bands through 1,5% agarose electrophoresis followed by RAPD-PCR. Exposure to the oxidizing agent over time has enhanced protein aggregation, namely ovalbumin. However, the anti-oxidant did not appear to reverse the oxidizing effect and seems to have a pro-oxidant effect. Although differences in protein aggregation were observed over time, there were no breaks in the genetic material.

Keywords: Neurodegenerative diseases, DNA damage, protein aggregation, vitamin E, oxidative stress, antioxidant effect.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que direta e indiretamente permitiram a concretização deste capítulo da minha vida acadêmica:

- À Professora Doutora Mónica Vieira pela sua orientação, incentivo e por todos os seus ensinamentos ao longo da elaboração deste projeto.
- À Sofia Cunha pela sua disponibilidade, pelos ensinamentos e pela sua incansável persistência.
- Ao Ricardo Celestino e à Clara Pereira pela ajuda, conselhos e disponibilidade.
- Aos meus pais pelos valores que me inculcaram, pelo apoio diário e por todo o carinho que sempre me deram.
- Aos meus amigos e ao meu namorado, pelo apoio incondicional, conselhos, paciência, carinho e otimismo.

A todos o meu sincero obrigada.

Aos meus pais.

Conteúdo

Resumo	i
Agradecimentos	v
1 Introdução	1
1.1 Motivação e Objetivos	1
1.2 Contribuições	2
1.3 Principais resultados	2
2 Fundamentação teórica	3
2.1 Doenças neurodegenerativas	3
2.2 Levedura como modelo de estudo de doenças neurodegenerativas	4
2.2.1 Aplicações das leveduras	5
2.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.3 <i>Stress</i> oxidativo na célula e doenças neurodegenerativas	7
2.3.1 A influência do <i>stress</i> oxidativo na mitocôndria	8
2.3.2 A influência do <i>stress</i> oxidativo no retículo endoplasmático	11
2.3.3 Adaptação da célula ao <i>stress</i> oxidativo induzido	12
2.3.4 Peróxido de hidrogénio e α -tocoferol	13
2.4 Agregação proteica	14
3 Metodologia	18
3.1 Levedura e condições de crescimento	18
3.2 Recolha da amostra	18
3.3 Tratamento com peróxido de hidrogénio e α -tocoferol	19

3.4	Análise do DNA	20
3.4.1	Extração do DNA	20
3.4.2	<i>Polymerase Chain Reaction- PCR</i>	20
3.4.3	Condições de eletroforese e captação de imagem	21
3.5	Análise bioquímica da agregação proteica	21
3.6	Implementação da técnica eletroforética para análise proteica	23
4	Resultados e discussão	24
4.1	Análise do DNA	24
4.2	Quantificação proteica	28
4.3	Análise proteica	29
4.4	Implementação da técnica eletroforética	33
5	Conclusão	34
5.1	Principais resultados	34
5.2	Prespetivas futuras	35
6	Anexos	36
7	Bibliografia	40

Lista de Tabelas

3.1	Diferentes condições de exposição da amostra durante a fase exponencial de crescimento. Avaliação da exposição isolada de <i>S. cerevisiae</i> ao H ₂ O ₂ que atuou como agente oxidante e ao α -tocoferol como agente antioxidante e ainda o seu efeito conjunto	19
3.2	Concentrações de agente oxidante (H ₂ O ₂) e antioxidante (α -tocoferol) utilizadas para o tratamento de <i>S. cerevisiae</i>	19
6.1	Concentração proteica de cada amostra através da absorvância a 750 nm . . .	37
6.2	Volumes de proteína e H ₂ O necessários para normalizar a proteína insolúvel/agregados proteicos para 850 μ g	38
6.3	Volumes de proteína e <i>sample buffer</i> necessários para normalizar a proteína total de cada amostra para 30 μ g	39

Lista de Figuras

2.1	Processos conservados entre leveduras e humanos.	6
2.2	Produção de ROS e ação antioxidante. Retirado de "Redox-fibrosis: Impact of TGFbeta1 on ROS generators, mediators and functional consequences"(Richter, Konzack, Pihlajaniemi, Heljasvaara, & Kietzmann, 2015	7
2.3	Efeito do <i>stress</i> oxidativo na mitocôndria	9
2.4	Vias de apoptose na mitocôndria	10
2.5	Adaptação das células ao <i>stress</i> oxidativo induzido	12
2.6	Estrutura de α -tocoferol obtida através de "ChemDraw JS."	14
2.7	Mecanismo de agregação proteica	16
3.1	Esquema do sistema de eletroforese vertical utilizado	23
4.1	Padrão de bandas de fragmentação de DNA com primer M13 com exposição a 3 mM de H ₂ O ₂	25
4.2	Padrão de bandas de fragmentação de DNA com primer M13 com exposição a 3 mM de H ₂ O ₂ e 11,25 mg/L de Vitamina E	26
4.3	Padrão de bandas de fragmentação de DNA com primer M13 com exposição a 5 mM de H ₂ O ₂	26
4.4	Padrão de bandas de fragmentação de DNA com primer M13 com exposição a 5 mM de H ₂ O ₂ e 11,25 mg/L de Vitamina E	27
4.5	Curva padrão de BSA pelo método de Lowry. A curva foi elaborada com padrões de BSA de 0 μ g/ μ L, 20 μ g/ μ L e 60 μ g/ μ L	28
4.6	Separação dos agregados insolúveis com exposição a 3 mM de H ₂ O ₂ e 11,25 mg/mL de Vitamina E através de SDS-PAGE	30

4.7	Separação dos agregados insolúveis com exposição a 5 mM de H ₂ O ₂ e 11,25 mg/L de Vitamina E através de SDS-PAGE	31
4.8	Gel 10% poliacrilamida representativo da proteína total com exposição a 3 mM de H ₂ O ₂ e 11,25 mg/L de Vitamina E	31
4.9	Gel 10% poliacrilamida representativo da proteína total com exposição a 5 mM de peróxido e 11,25 mg/L de Vitamina E	32

Lista de Abreviaturas

APP Proteína precursora amiloide

APS Persulfato de amónio

ATP Trifosfato de adenosina

BSA Albumina de soro de bovino

ETC Encefalopatia traumática crónica

GSH Glutathiona

GSSG Glutathiona dissulfeto

NADH Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADP Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida

PCR Reação da polimerase em cadeia

RAPD DNA polimórfico amplificado ao acaso

RNS Espécies reativas de azoto

ROS Espécies reativas de oxigénio

SDD *Semi-denaturing detergent*

SDS Dodecil sulfato de sódio

TAE Tris-Acetato-EDTA

TE Tris-EDTA

TEMED Tetrametiletenodiamina

UP Ultra-pura

YEPD Extrato de levedura, peptona e glucose (dextrose)

Capítulo 1

Introdução

1.1 Motivação e Objetivos

As doenças neurodegenerativas têm sido extensamente estudadas na tentativa de se compreender, evitar e reverter esta doença. Atualmente, a falha dos sistemas de reparação celular provenientes do envelhecimento e a agregação proteica estão relacionadas com este tipo de doenças. No entanto, após um século de estudos realizados nesta área, ainda não se consegue definir a agregação proteica como uma consequência ou como uma causa do processo neurodegenerativo. Desta forma, esta dissertação de Mestrado foi realizada no âmbito de verificar se a exposição ao peróxido de hidrogénio (agente oxidante produzido pelas nossas células) causa um aumento na agregação proteica bem como danos no DNA. Para esse propósito, as células de *Saccharomyces cerevisiae* foram expostas a diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio durante a fase exponencial de crescimento no qual a agregação proteica e o material genético foram avaliados. Para além disso, a implementação da técnica de separação de proteínas também foi um dos objetivos a concretizar.

1.2 Contribuições

Esta dissertação de Mestrado foi desenvolvida nos laboratórios da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto e do Instituto de investigação e inovação em Saúde (i3S). O grupo de investigação "Yeast Signalling Networks" do i3s apoiou a realização da análise proteica.

1.3 Principais resultados

O desenvolvimento deste trabalho permitiu:

- Verificar que uma proteína com peso molecular de cerca de 45 kDa estava altamente expressa em células expostas ao agente oxidante, fazendo com que se considere que esta é uma proteína induzida pelo *stress* oxidativo.
- Observar que a exposição à vitamina E não demonstrou reverter os efeitos causados pela exposição a um fator de *stress* oxidativo.
- Avaliar a ausência de alterações genéticas por influência de diferentes concentrações de H₂O₂.

Capítulo 2

Fundamentação teórica

2.1 Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela progressiva diminuição funcional e atrofia do cérebro (Volkman & Offen, 2017). Atualmente, considera-se que a diminuição funcional não está apenas relacionada com os neurónios, mas também com as células gliais, que por sua vez se encontram em maior quantidade no cérebro (Gitler, Dhillon, & Shorter, 2017).

A influência de fatores genéticos e ambientais pode ser a resposta à origem deste tipo de doença. No entanto, a idade também é um fator determinante uma vez que ao longo dos anos vão-se acumulando mutações que podem levar à metilação do DNA (Sanchez-Mut *et al.*, 2016). Para além disso, segundo a teoria de Leslie Orgel (1963), a falha dos sistemas de controlo das proteínas e de determinados componentes celulares está relacionada com o envelhecimento na qual a divisão celular é um dos processos afetados. Nesta etapa, alguns componentes são eliminados e sintetizados de novo, havendo a hipótese de eliminar erros. No entanto, com o avançar da idade, esta etapa fica comprometida, originando um aumento do dano celular, contribuindo para a origem de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (Currais, Fischer, Maher, & Schubert, 2017; Lodato *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2013).

Estudos recentes indicam que a acumulação de mutações pode não ser similar em diferentes zonas cerebrais sendo que o núcleo dentado é capaz de acumular um número mais elevado de mutações comparativamente ao córtex frontal, possivelmente pelo facto dos neurónios se conseguirem dividir nesse local (Lodato *et al.*, 2018).

A gravidade das doenças neurodegenerativas é estimada pelos sintomas que o doente apresenta. No entanto, existem características comuns às diferentes doenças neurodegenerativas, como a deposição proteica (verificada *post-mortem*, o que dificulta a identificação da mesma (Sanchez-Mut *et al.*, 2016; Volkman & Offen, 2017).

2.2 Levedura como modelo de estudo de doenças neurodegenerativas

Ao longo dos anos, os tipos de organismos de estudo utilizados para a pesquisa de doenças neurodegenerativas foram-se modificando. Atualmente, são utilizados desde modelos de ratinho, da mosca-da-fruta (*Drosophila spp.*), de levedura, primatas não humanos, cães ou mesmo sistemas celulares humanos pela indução de células pluripotentes a partir de células humanas diferenciadas (Fernández-Trapero *et al.*, 2017; Gitler *et al.*, 2017; Mandel *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2014).

As leveduras têm sido utilizadas como modelos de estudo de processos biológicos que ocorrem em organismos mais complexos. O facto de serem organismos eucariontes, a rapidez e as condições de crescimento menos exigentes e consequentemente, os aportes financeiros inferiores, são alguns dos fatores que têm motivado o uso prolongado destes organismos (Karathia, Vilaprinyo, Sorribas, & Alves, 2011).

O uso destes organismos ultrapassa as questões éticas envolvidas na manipulação animal para testes laboratoriais. Porém, os resultados obtidos através destes organismos não garantem a reprodutibilidade dos mesmos quando testados nos organismos mais complexos (Karathia *et al.*, 2011). No entanto, o mesmo acontece com os organismos mais complexos

que também não a garantem.

2.2.1 Aplicações das leveduras

Atualmente, as leveduras já têm sido utilizadas para diferentes aplicações nas mais diversas áreas nomeadamente, na área alimentar e da saúde, através da produção de amido (Pfister *et al.*, 2016) e penicilina (Awan *et al.*, 2017) bem como para estudos relacionados com o cancro (Nakazawa, Mehrotra, Arakawa, & Yaragida, 2016).

A produção de proteínas por parte destes seres vivos é um dos tópicos mais investigados na tentativa de se encontrar potenciais tratamentos não só para diferentes tipos de cancro, mas também para doenças neurodegenerativas. Recentemente, um estudo aprofundado sobre o metabolismo das leveduras concluiu que estes organismos são metabolicamente capazes de produzir proteínas recombinantes que mimetizam as do humano, podendo por isso ser utilizadas para terapias baseadas em proteínas. Para além disso, a sobre-expressão de proteínas específicas relacionadas com o Alzheimer, o Parkinson e a doença de Huntington permitem conhecer os mecanismos envolvidos na origem destas doenças (Huang *et al.*, 2017; Verbandt, Cammue, & Thevissen, 2016).

A eficiência da produção de proteínas recombinadas e o seu custo é um fator a ter em consideração e que ainda não foi totalmente avaliado. A sua utilização permitiria a substituição do uso animal, reduziria o preço e as questões éticas envolvidas no mesmo, o que consequentemente aumentaria a acessibilidade dos doentes ao tratamento (Huang, Bao, Hallstrom, Petranovic, & Nielson, 2017).

2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o modelo eucariótico mais estudado no estudo de doenças neurodegenerativas. Atualmente já se encontram descritos cerca de 60% de genes da levedura como conservados no humano, sendo que as leveduras possuem cerca de 5 300 -

5 400 genes comparativamente ao humano que possui cerca de 22 500 genes (Mackiewicz *et al.*, 2002; Pertea *et al.*, 2018). A homologia genética explica o facto de que diferentes processos biológicos que ocorrem nos humanos estejam conservados nas leveduras (Figura 2.1), permitindo o uso da levedura como modelo de estudo. Desta forma, a análise dos processos de morte celular pode ser relevante para o estudo da perda neuronal característica deste tipo de doenças. Para além disso, a excessiva ativação dos mecanismos do ciclo celular também podem levar à ativação da apoptose, pelo que o estudo destes mecanismos pode ser um contributo importante. Por sua vez, os sistemas proteicos permitem estudar os agregados proteicos insolúveis que têm vindo a ser considerados como uma característica das doenças neurodegenerativas. Para além disso, a capacidade de crescimento em meio fermentativo, que não é possível em células de mamífero, permite a análise de disfunções mitocondriais (Khurana & Lindquist, 2010).

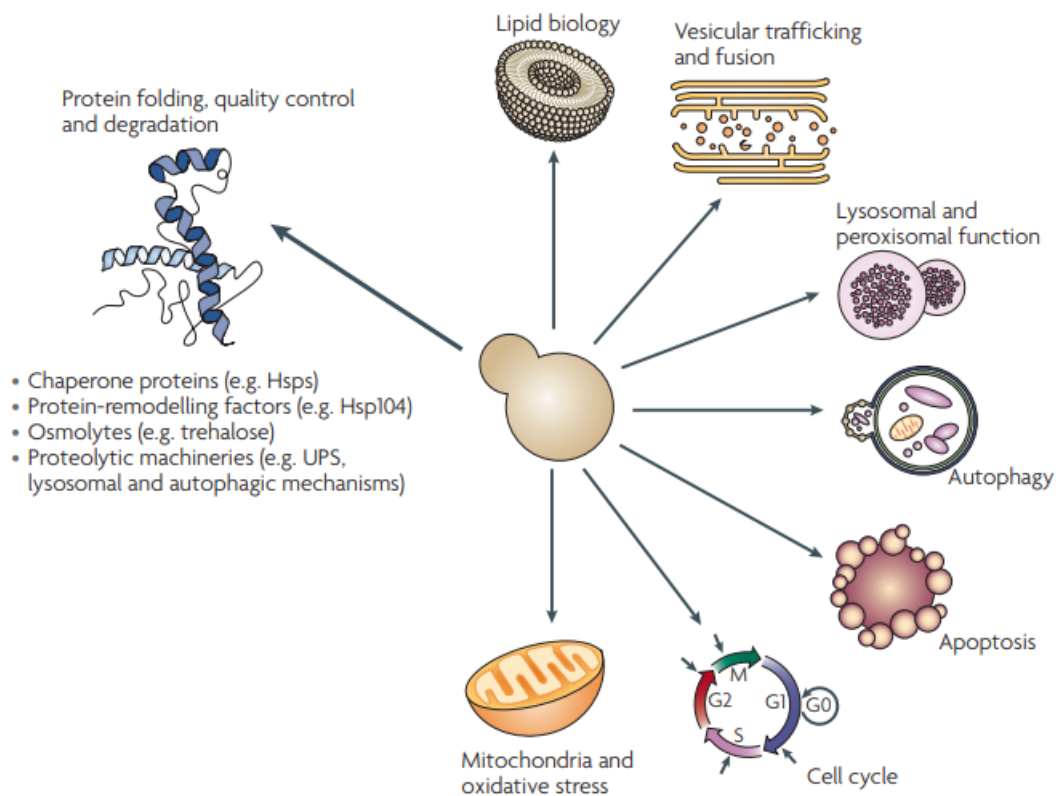


Figura 2.1: Processos conservados entre leveduras e humanos.

Retirado de "Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast?" (Khurana & Lindquist, 2010)

2.3 Stress oxidativo na célula e doenças neurodegenerativas

O oxigénio é essencial para a subsistência dos organismos eucariontes, sendo que cerca de 20% da totalidade desse composto é utilizado pelo sistema nervoso. No entanto, o oxigénio apresenta a dualidade de ser essencial e tóxico para o organismo em diferentes situações, dependendo da sua forma química. Assim, os radicais livres de oxigénio, também designados por ROS, são considerados como formas químicas instáveis e conseqüentemente, tóxicas para a célula (Gandhi & Abramov, 2012).

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxilo (HO^{\bullet}) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) são exemplos de ROS, cuja designação abrange não só radicais livres de oxigénio como não radicais que podem facilmente ser convertidos. Os radicais livres são produzidos pela oxidação do oxigénio molecular (Klaunig, Kamendulis, & Hocevar, 2010), conforme descrito na figura 2.2:

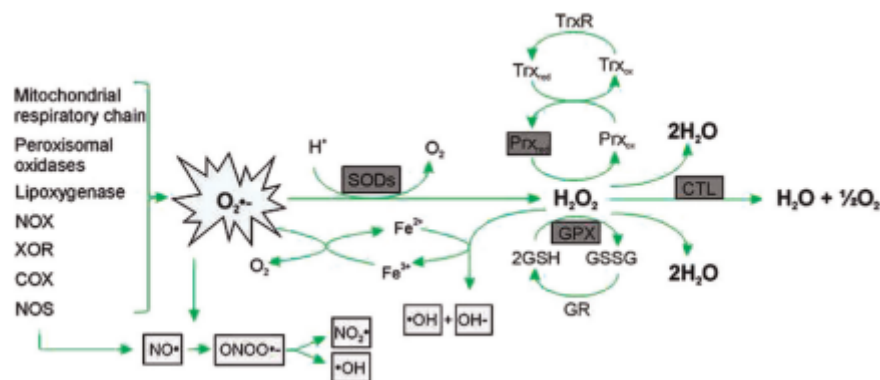


Figura 2.2: Produção de ROS e ação antioxidante. Retirado de "Redox-fibrosis: Impact of TGFbeta1 on ROS generators, mediators and functional consequences"(Richter, Konzack, Pihlajaniemi, Heljasvaara, & Kietzmann, 2015

Existem também radicais livres de azoto (RNS) como o óxido nítrico (NO), o anião peróxido ($ONOO^-$) e a 3-nitrosamina (Gandhi & Abramov, 2012; Kurutas & Ozturk, 2016; Niedzielska *et al.*, 2016). Estes compostos são considerados tóxicos devido ao facto de possuírem um eletrão desemparelhado e por isso, apresentarem elevada reatividade com outras moléculas como lípidos, proteínas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos. A necessidade de oxigénio por parte do cérebro e a presença de uma grande quantidade de lípidos na sua

constituição, fazem com que estes compostos sejam altamente tóxicos quando se encontram em concentrações elevadas (Kim, Kim, Rieh, & Yoon, 2015; Niedzielska *et al.*, 2016).

Estes compostos são maioritariamente originados como subprodutos associados a ações por parte das mitocôndrias na respiração, pelos macrófagos na resposta inflamatória ou pela radiação ionizante. No entanto, também podem ser gerados em resposta a fatores de crescimento de forma a servirem de mensageiros secundários em vias específicas e regularem a expressão genética pelo que a sua presença é essencial no organismo (Barzilai & Yamamoto, 2004). Porém, em elevados níveis estes são tóxicos. De forma a combater a sua toxicidade, existem sistemas enzimáticos e não enzimáticos de defesa antioxidante capazes de proceder à sua eliminação (Ferreira & Abreu, 2007; Raamsdonk, Vega & Brundin, 2017).

Para avaliar o *stress* oxidativo pode-se recorrer à medição da concentração de antioxidantes celulares, da atividade das enzimas com função antioxidante como a glutathione transferase e a peroxidase e ainda a medição da concentração de glutathione (GSH) (Khebbeb, Djeban, Saib, & Berrebah, 2015; Wang *et al.*, 2014).

2.3.1 A influência do *stress* oxidativo na mitocôndria

As mitocôndrias possuem como principal função produzir energia essencial para o funcionamento das células aeróbias, bem como metabolitos intermediários do Ciclo de Krebs, essenciais para a degradação de glicose em ATP (Martínez-Reyes *et al.*, 2016). Este organelo permite que as células do sistema nervoso obtenham uma grande quantidade de energia através da degradação da glicose, sendo esta a fonte de energia preferencial para os neurónios. Desta forma, o défice prolongado de acesso a este açúcar ou a inibição prolongada de enzimas responsáveis pela síntese de ATP podem levar à morte cerebral (Emerit, Edeas & Bricaire *et al.*, 2004; Martínez-Reyes *et al.*, 2016).

Durante a respiração aeróbia, o oxigénio que é utilizado pela mitocôndria pode ser transformado em ROS e água, através da doação de eletrões por parte de enzimas do Ciclo de Krebs. Apesar da existência de sistemas celulares de combate à toxicidade destes compostos,

quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de ROS e a atividade dos antioxidantes, o balanço redox não é restaurado. Os elevados níveis de ROS induzem a oxidação da GSH, formando GSSG. A redução nos níveis de GSH prejudica as defesas antioxidantes da célula. Assim, modificações irreversíveis são originadas nos componentes celulares como proteínas e lípidos bem como no DNA e RNA (El-Osta & Circu, 2016; Kim *et al.*, 2015). Por sua vez, a oxidação de proteínas e ácidos nucleicos e a peroxidação dos lípidos danificam a membrana mitocondrial (Kim *et al.*, 2015). A disfunção membranar origina a produção crônica de ROS que, por sua vez, danificarão mais a membrana, levando a um ciclo de acumulação de danos como descrito na Figura 2.3 (Bose & Beal, 2016; Niedzielska *et al.*, 2016). Conseqüentemente, o funcionamento das células piora e acumulam-se mais erros nos processos oxidativos. Assim, este ciclo pode explicar a teoria da relação de um pior funcionamento mitocondrial em organismos mais envelhecidos. Logo, uma disfunção das mitocôndrias pode iniciar o processo neurodegenerativo devido à elevada toxicidade dos radicais livres que levam à ativação dos recetores de morte presentes na mitocôndrias (Bose & Beal, 2016; Emerit *et al.*, 2004; Lin & Beal, 2006).

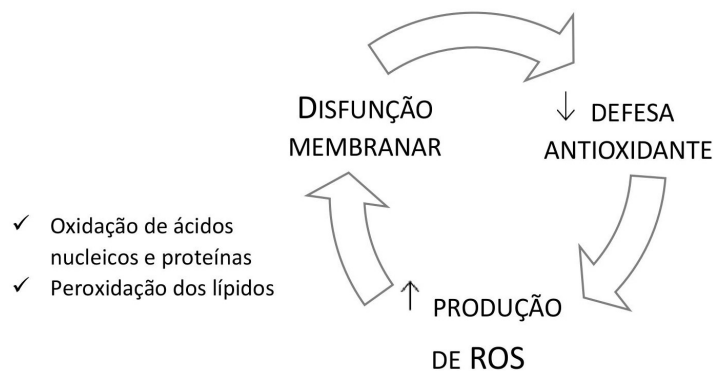


Figura 2.3: Efeito do *stress* oxidativo na mitocôndria

Adaptado de "Mitochondrial ROS and Apoptosis" e "Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death." (El-Osta e Circu, 2016; Le Bras, Clément, Pervaiz, & Brenner, 2005)

Antigamente, a teoria da disfunção mitocondrial era relacionada com a morte neuronal apenas quando a disfunção se devia a mutações somáticas em zonas não codificantes do DNA (zonas que não codificam proteínas). No entanto, um estudo de Yoon *et al.* (2017) retratou

que um gene codificante de proteína (*OGDHL*) e o chaperone NRD1, ativos na mitocôndria para o seu normal funcionamento, contribuíam para a origem de doenças neurodegenerativas quando se encontravam mutados e, conseqüentemente, com menor funcionamento. A falta de atividade de NRD1 origina a diminuição da autofagia, pelo que, a homeostasia celular é afetada, uma vez que os processos de morte celular programada são essenciais para a degradação e reciclagem dos componentes das células. Desta forma, uma autofagia reduzida leva a uma acumulação de erros que podem contribuir para a neurodegeneração (Yoon *et al.*, 2017).

A autofagia reduzida também está diretamente relacionada com a disfunção mitocondrial uma vez que este local é essencial para uma das etapas deste processo (Ghavami *et al.*, 2014). No entanto, uma elevada taxa de morte celular programada por apoptose também pode

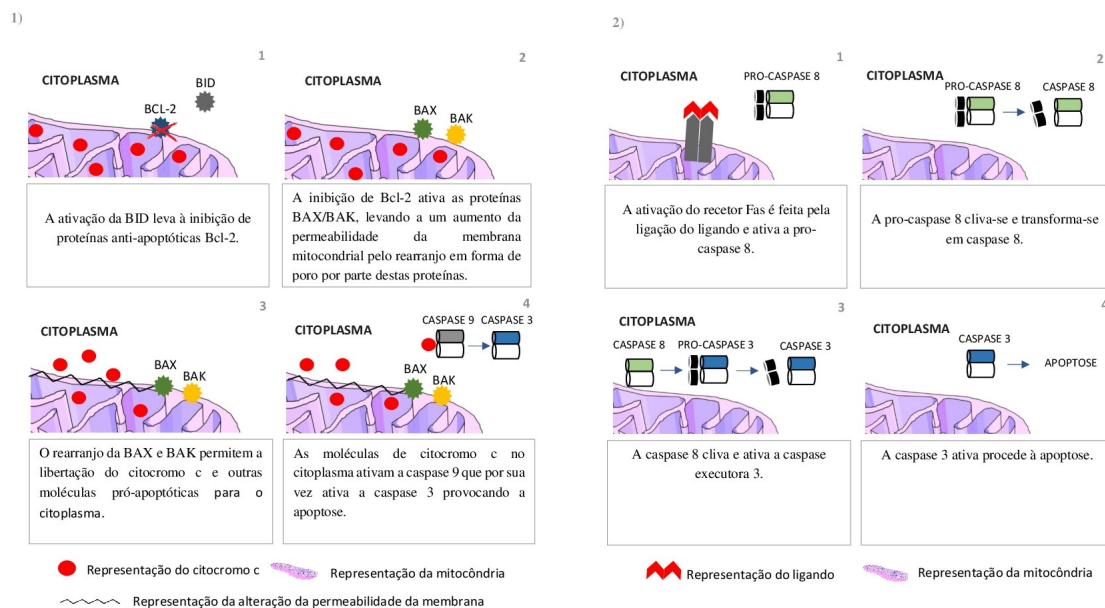


Figura 2.4: Vias de apoptose na mitocôndria

1) A produção de ROS leva à ativação da proteína promotora de apoptose BID originando a inibição de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 da membrana externa da mitocôndria. A inibição origina a ativação de proteínas pró-apoptóticas como a BAX/BAK, promovendo a morte celular (Khurana & Lindquist, 2010). Estas proteínas organizam-se em forma de poro permitindo a libertação de moléculas pró-apoptóticas e do citocromo c, uma molécula essencial à sobrevivência da mitocôndria. Por sua vez, o citocromo c ativa a caspase iniciadora 9 que conseqüentemente ativa a caspase executora 3, iniciando-se o processo de morte celular programada (El-Osta & Circu, 2016; O'Neill, Huang, Zhang, Chen, & Luo, 2016; Westphal, Dewson, Czabotas, & Kluck, 2011). 2) O receptor Fas é ativado pela ligação da proteína ou ligando que conseqüentemente ativam a pro-caspase 8. Por sua vez, a pro-caspase 8 ativa-se induzindo a sua clivagem e desta forma ativa a caspase executora 3 para que haja clivagem proteica e apoptose (Ghavami *et al.*, 2014).

contribuir para as doenças neurodegenerativas pela morte celular precoce. A perda da assimetria da membrana plasmática, a condensação da cromatina e a quebra do DNA são alguns dos marcadores citológicos deste fenómeno (Ligr *et al.*, 2001). A apoptose celular pode ser induzida intrínseca ou extrinsecamente, como descrito na Figura 2.4-1 e 2.4-2.

A alteração do metabolismo do cálcio também pode contribuir para a perda de proteção neuronal, uma vez que o aumento dos níveis intracelulares de cálcio ativam enzimas que estão implicadas em processos de morte celular, como a necrose e a apoptose. Esse aumento pode despoletar a despolarização da membrana e, conseqüentemente, a abertura dos canais dependentes de voltagem, causando um aumento na produção de ROS e conseqüente morte celular (Wu *et al.*, 2016; Zarrouk *et al.*, 2015).

2.3.2 A influência do *stress oxidativo* no retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é responsável por manter a homeostasia lipídica da célula, sendo responsável pelo *foldi*ng das proteínas e pela síntese de compostos lipídicos estruturais e de reserva bem como os esteróis (Jung, Michalak, & Agellon, 2017; Kim *et al.*, 2015).

Os ROS são produzidos como compostos secundários durante a atividade deste organelo sendo que a produção aumenta quando ocorrem erros no *foldi*ng proteico devidos à ausência da Glutathiona peroxidase, enzima pertencente a um dos sistemas responsáveis pelo equilíbrio do estado oxidação-redução da célula. A incorreta dobragem das proteínas leva à exposição de domínios hidrofóbicos de aminoácidos, levando à agregação de proteínas. Conseqüentemente, o *stress oxidativo* causado pela acumulação dos radicais livres formados induz a sobre-expressão de enzimas produtoras de ROS no RE: ERO-1 (Endoplasmic reticulum oxidation) e PDI (Protein disulfide isomerase) (Bhandary, Marahatta, Kim, & Chae, 2013; Jung *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2015; Zito, 2015).

As enzimas ERO-1 e PDI são expressas no RE de organismos eucariotas com a funcionalidade de originar pontes dissulfito, aumentando a estabilidade proteica. As PDIs são responsáveis por estabilizar as ligações dissulfito, através da oxidação, redução ou isomerização

das proteínas que entram no RE. Por sua vez, a oxirredutase ERO-1 atua diretamente com a PDI, transferindo os seus elétrons para o oxigênio molecular (Khan & Mutus, 2014).

2.3.3 Adaptação da célula ao *stress* oxidativo induzido

Os organismos eucariotas, bem como os procariotas, parecem conseguir adaptar-se à alteração dos níveis de *stress* oxidativo através da ação enzimática e da alteração da expressão de determinados genes (Pickering, Vojtovicha, Towerb, & Daviesa, 2013). Existem diferentes tipos de indutores como o choque térmico, elevada osmolaridade e etanol que geram radicais livres e podem ativar os sistemas celulares de resposta ao *stress* oxidativo, induzindo resistência às condições de *stress* (Figura 2.5) (Costa & Moradas-Ferreira, 2001).

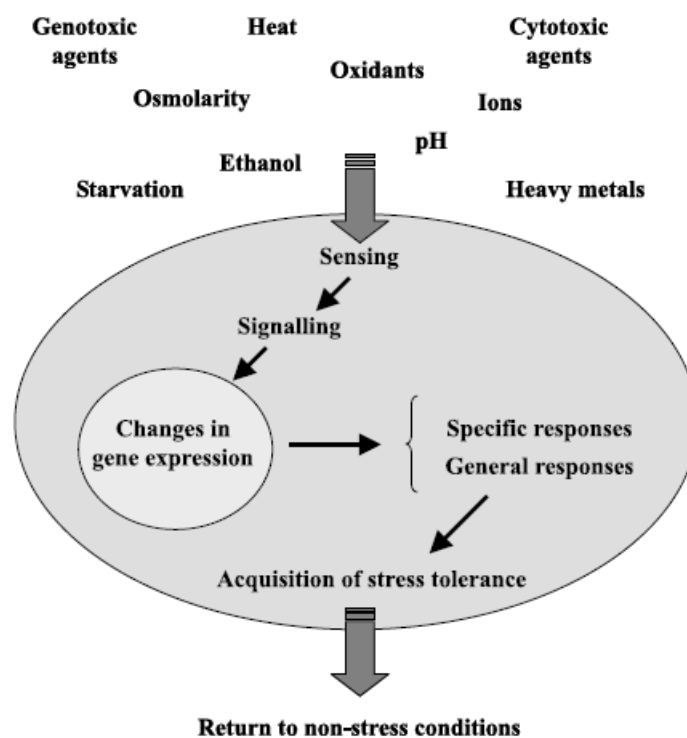


Figura 2.5: Adaptação das células ao *stress* oxidativo induzido

Retirado de "Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases" (Costa & Moradas-Ferreira, 2001)

A proteção contra o excesso de radicais livres pode recorrer a defesas antioxidantes, à ativação da apoptose, ao abrandamento da síntese proteica ou à sua síntese *de novo* e aos

sistemas PDI/ERO-1, NAD⁺/NADH e NADP⁺/NADPH e glutationa oxidada e reduzida (GSSG/GSH) (Bhandary *et al.*, 2013 e Costa & Moradas-Ferreira, 2001).

Como resposta aos níveis alterados, a célula também pode modelar a expressão de determinados genes garantindo a sobre-expressão dos genes relacionados com a proteção celular enquanto os genes relacionados com a proliferação celular mantêm-se suprimidos (Pickering *et al.*, 2013).

2.3.4 Peróxido de hidrogénio e α -tocoferol

O H₂O₂ pode ser utilizado como indutor do *stress* oxidativo, apesar de ser considerado um agente com fraco poder oxidante (Powers & Jackson, 2010). Este composto é considerado tóxico na medida em que gera radicais livres como o radical hidróxido, conseguindo incorporar as membranas e modificar as proteínas celulares. Esta modificação pode impedir o normal funcionamento da célula ou causar apoptose e necrose celular (Pickering *et al.*, 2013). No entanto, a sua ação isolada não permite a oxidação do DNA ou lípidos (Powers & Jackson, 2010). A toxicidade deste composto é mediada pela reação de Fenton (equação 2.4) onde o radical hidróxido é gerado na presença de ferro (Fe²⁺). A reação entre Fe²⁺ e H₂O origina o radical hidróxido e Fe³⁺ que será depois reciclado em Fe²⁺ através do sistema enzimático NADH (Bostanci, Bas & Bagirici, 2010; Lu, Chen, Liang, & Yan, 2018).



O ferro é um composto abundante no nosso corpo, principalmente no cérebro e no fígado. No entanto, elevados níveis deste elemento no cérebro estão relacionados com doenças neurodegenerativas uma vez que potenciam o *stress* oxidativo.

O α -tocoferol é a forma mais ativa da vitamina E, sendo a que se encontra em maior quantidade no plasma humano quando comparada com outras formas desta vitamina (Zingg *et al.*, 2013). Este composto é um lipossolúvel com atividade antioxidante capaz de reverter o efeito oxidante causado pelo excesso de ferro na perda neuronal no hipocampo e na *subs-*

tância nigra (Bostanci *et al.*, 2010). A inativação dos compostos oxidantes é feita pela doação de 1 átomo de hidrogénio por parte da vitamina, presente no anel cromanol (Figura 2.6). O α -tocoferol é caracterizado por proteger a célula contra danos, mantendo a integridade da membrana (Bostanci *et al.*, 2010), prevenindo a oxidação proteica e inibindo a peroxidação lipídica (Bartesaghi *et al.*, 2017).

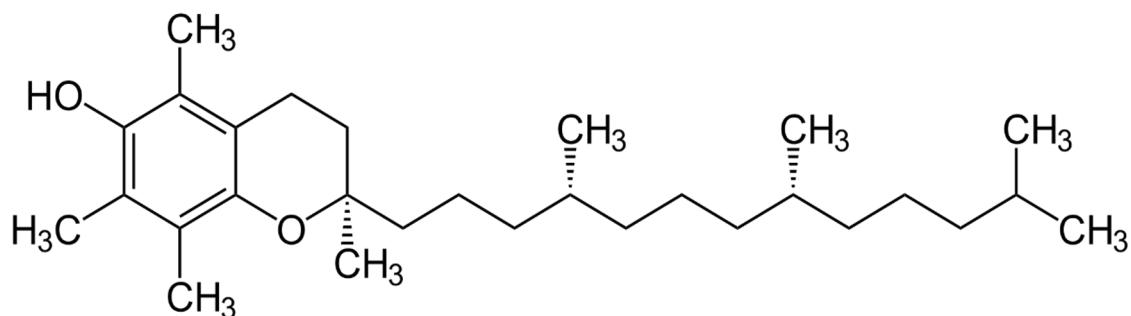


Figura 2.6: Estrutura de α -tocoferol obtida através de "ChemDraw JS."

Estudos reportam a eficácia da Vitamina E na prevenção da formação de radicais livres em células de neuroblastoma, em modelos iniciais de Parkinson e em modelos isquémicos, contra a citotoxicidade induzida por óxido nítrico e álcool (Amoroso, Gioielli, Cataldi, Renzo, & Annunziato, 1999; Bostanci *et al.*, 2010). No entanto, o papel deste antioxidante no combate do *stress* oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogénio ainda é controverso. Osakada *et al.* (2003) descreveu o composto como não eficaz na diminuição da citotoxicidade causada pelo H_2O_2 . Por sua vez, Adami *et al.* (2018) demonstrou a sua eficácia da vitamina E na redução do efeito do *stress* oxidativo celular.

2.4 Agregação proteica

Em 1907, Alois Alzheimer questionou a existência de uma relação entre a agregação proteica e as doenças neurodegenerativas quando observou agregados proteicos nos seus doentes que sofriam de demência. No entanto, após um século, ainda não existem evidências concretas que relacionem os dois acontecimentos. A ambiguidade passa pelo facto de os agregados não estarem diretamente relacionados com a gravidade da doença bem como

pelo facto de poderem estar presentes em doentes assintomáticos. Desta forma, ainda não se pode assumir a agregação como uma causa ou como uma consequência do processo neurodegenerativo, apesar de a agregação já ser considerada uma evidência em diferentes tipos de doenças neurodegenerativas (Lansbury & Lashuel, 2006).

Atualmente, os estudos nesta área visam compreender a correlação entre a agregação e a origem destas doenças, a função dos agregados nas células e visam encontrar possíveis estratégias para evitar essa agregação (Lansbury & Lashuel, 2006; Volkman & Offen, 2017). Estudos conduzidos por Currais *et al.* (2017) sugerem a relação direta entre os agregados amiloidóticos e a indução da resposta inflamatória. Por sua vez, pensa-se que o processo inflamatório possa estar relacionado com a neurodegeneração.

O fenómeno de agregação deve-se normalmente ao incorreto dobramento das proteínas que origina a acumulação das mesmas, formando agregados insolúveis, como descrito na Figura 2.7. Este fenómeno pode ocorrer devido a problemas funcionais do sistema de controlo das proteínas, quer no enrolamento molecular (chaperone) ou na degradação proteica (sistema ubiquitina-proteassoma e autofagia) uma vez que a ineficiência destes sistemas impede a correta dobragem das proteínas e a sua eliminação, respetivamente (Chaturvedi, Siddigi, Alam, & Hasankhan, 2016; Currais *et al.*, 2017; Ross & Poirier, 2004). No entanto, a presença de polimorfismos nas zonas promotoras de genes relacionados com doenças neurodegenerativas também podem promover a transcrição proteica e consequentemente, a agregação. Para além disso, modificações covalentes ou na estrutura da proteína, bem como a presença de indutores de *stress* oxidativo e a fosforilação podem também potenciar a agregação uma vez que reduzem a manutenção dos sistemas (Currais *et al.*, 2017; Ross & Poirier, 2005).

Diferentes agregados proteicos estão relacionados com doenças neurodegenerativas específicas (Ross & Poirier, 2004; Volkman & Offen, 2017). A doença de Alzheimer é caracterizada pela presença do péptido β - amiloide e da proteína tau. A proteína tau existe normalmente nos axónios em pequenas quantidades, com função de estabilizar os microtúbulos, ao contrário do péptido β - amiloide que é gerado através da clivagem da proteína precursora amiloide (APP) e deposita-se no tecido cerebral (Tatarnikova, Orlov, & Bobkova, 2015). Ape-

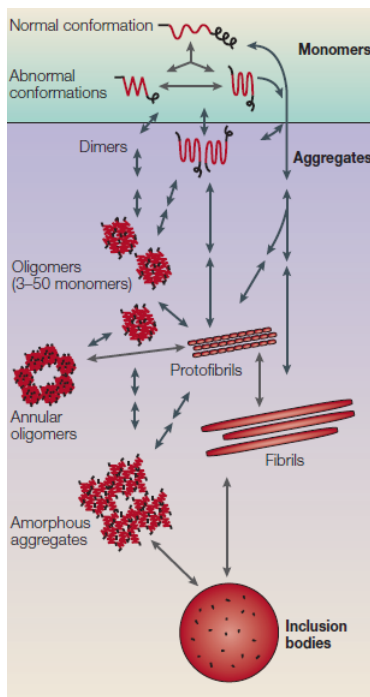


Figura 2.7: Mecanismo de agregação proteica
Retirado de "Protein aggregation and neurodegenerative diseases" (Ross & Poirier, 2004)

A junção de uma ou mais proteínas defeituosas inicia o processo de agregação proteica. Posteriormente, sucessivos monômeros podem ser adicionados linearmente formando as fibras amiloidóticas. Por sua vez, a agregação também pode originar oligômeros ou protofibrilas, capazes de se agregar em formato de anel (circular). Mais tarde, transformar-se-ão em agregados amorfos. Estes e as fibras originam os corpos de inclusão.

sar destes dois tipos de lesões serem formados independentemente, a presença do péptido β - amiloide promove a agregação da proteína tau (He *et al.*, 2018). A agregação é originada pela hiperfosforilação da proteína tau, uma vez que nestas condições, a proteína tau desprende-se dos microtúbulos, permitindo a sua agregação. Desta forma, a proteína é inibida de estabilizar os microtúbulos e o transporte axonal é comprometido (Nisbet, Polanco, Ittner & Götz, 2014; Tatarnikova *et al.*, 2015).

Os agregados do péptido β - amiloide depositam-se extracelularmente, formando as placas amiloides, enquanto que os agregados da proteína tau, os emaranhados neurofibrilares, são armazenados intracelularmente (Tatarnikova *et al.*, 2015). Apesar dos agregados do péptido β -amiloide serem específicos da doença de Alzheimer, os emaranhados da proteína tau também podem ser associados a outras doenças neurodegenerativas como Parkinson relacionado com o cromossoma 17 e Encefalopatia traumática crónica (ETC), entre outras (Goedert, 2015).

A doença de Parkinson está relacionada com a presença de Corpos de *Lewi*, constituídos

maioritariamente pela α -sinucleína na sua forma agregada. Esta é expressa no cérebro sendo que, nos terminais nervosos, liga-se à superfície das vesículas sinápticas, onde se considera a possibilidade de esta ter um papel na neurotransmissão (Goedert, 2015). A sua forma agregada, tal como o péptido β -amiloide e a proteína tau, pode ser originada quando esta assume a conformação de folha β . As funções sinápticas, do RE, das mitocôndrias bem como das vias da degradação proteica são afetadas quando ocorre agregação (Goedert, 2015; Lücking & Brice, 2000).

Posto isto, esta dissertação de Mestrado apresentou os objetivos principais de: estudar a influência do *stress* oxidativo na agregação proteica e no material genético bem como o efeito da vitamina E na reversão do *stress* oxidativo induzido e otimizar a técnica de eletroforese para separação de proteínas.

Capítulo 3

Metodologia

3.1 Levedura e condições de crescimento

A levedura *S. cerevisiae* ATCC 9763 foi utilizada ao longo deste estudo. A partir de uma cultura sólida, crescida em meio de cultura contendo 1%(w/v) de extrato de levedura, 2%(w/v) de dextrose, 2%(w/v) de peptona e 1%(w/v) de agar (YEPD) durante 48h, a *S. cerevisiae* foi inoculada em meio de cultura YEPD líquido e incubada com agitação (130 rpm) a 30°C durante 16h. De seguida, o inóculo foi transferido para um matraz com meio YEPD fresco cuja densidade ótica final era compreendida entre 0,075 e 0,1 (600 nm). O inóculo foi incubado com agitação (130 rpm) a 30°C durante 6h, tempo necessário para atingir a fase exponencial de crescimento, de acordo com estudos prévios (Costa, 2018).

3.2 Recolha da amostra

Após a incubação com agitação a 30°C durante 6h, com uma densidade ótica compreendida entre 0,750 e 1 (600 nm), a cultura foi transferida para diferentes matrizes correspondentes a cada condição descrita na Tabela 3.1. Amostras de 20, 15, 10, 10 e 10 mL foram recolhidas aos 0, 45, 90, 135 e 180 minutos posteriores à incubação de cada uma das diferentes con-

dições, respetivamente. Após a recolha, as amostras foram conservadas em glicerol 30% e armazenadas a -80°C . Este procedimento foi realizado para as diferentes concentrações de H_2O_2 e α -tocoferol, presentes na Tabela 3.2.

Tabela 3.1: Diferentes condições de exposição da amostra durante a fase exponencial de crescimento. Avaliação da exposição isolada de *S. cerevisiae* ao H_2O_2 que atuou como agente oxidante e ao α -tocoferol como agente antioxidante e ainda o seu efeito conjunto

	Condição	Componentes
1	Controlo	<i>S. cerevisiae</i>
2	Agente oxidante	<i>S. cerevisiae</i> + H_2O_2
3	Agente antioxidante	<i>S. cerevisiae</i> + α -tocoferol
4	Agente oxidante e antioxidante	<i>S. cerevisiae</i> + H_2O_2 + α -tocoferol

Tabela 3.2: Concentrações de agente oxidante (H_2O_2) e antioxidante (α -tocoferol) utilizadas para o tratamento de *S. cerevisiae*

	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ (mM)	$[\alpha\text{-tocoferol}]$ (mg/L)
	3	11,25
	5	11,25

3.3 Tratamento com peróxido de hidrogénio e α -tocoferol

O H_2O_2 foi o agente utilizado para induzir o *stress* oxidativo e o α -tocoferol para induzir a resposta antioxidante. Os dois compostos foram adicionados aos matrizes correspondentes no início de cada ensaio. O H_2O_2 30% (v/v) (Emsure-Merck, Portugal) não sofreu tratamento prévio à sua utilização.

O α -tocoferol foi usado na forma de Succinato α -tocoferol (Sigma-Aldrich, Portugal) e dissolvido em 95% etanol para uma solução stock de 100 mg/L, correspondente a 80 mg/L de α -tocoferol, e posteriormente filtrado através de um filtro com porosidade 0,02 μm e armazenado a 4°C .

3.4 Análise do DNA

3.4.1 Extração do DNA

O protocolo de extração de DNA foi adaptado de Harju (2004). O protocolo foi reproduzido como descrito pelo autor à exceção de que: todas as centrifugações foram realizadas a 12 000 x g em substituição de 20 000 x g; a fase aquosa foi incubada a -20°C durante 5 minutos ao invés da temperatura ambiente e o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de H₂O ultra-pura (UP) em substituição a 20-50 µL de Tris-EDTA (TE).

3.4.2 *Polymerase Chain Reaction- PCR*

Para amplificar o DNA das amostras foram realizados *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD)-PCR com os *primers* M13 e OPA-3. O termociclador utilizado para os PCR foi o Px2 Thermal cycler (Thermo Electron Corporation).

M13. Para um volume total da mistura de amplificação de 10 µL foi utilizado 1 µL de amostra de DNA, 0,5 µL de primer M13 (Frilabo, Portugal) (10 µM) (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'), 5 µL de NZYtaq II 2x Green Master Mix (Nzytech, Portugal) e 3,5 µL de H₂O UP. Após uma desnaturação inicial de 95°C durante 3 minutos, foram realizados 35 ciclos de PCR: desnaturação a 94°C durante 30 segundos, *annealing* a 45 °C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. A extensão final ocorreu a 72°C durante 10 minutos.

OPA-3. O protocolo utilizado foi adaptado de Pinto, Resende, Koga-Ito & Tendler (2004). Para um volume total da mistura de amplificação de 10 µL foi utilizado 0,2 µL de amostra de DNA, 2 µL de dNTP's (Bioline, Portugal) (1 mM), 1 µL *buffer* KCl (Bioron) (10x), 1 µL Taq polimerase (Bioron) (1 u/µL), 0,8 µL MgCl₂ (Bioron) (25 mM), 0,25 µL primer OPA-3 (Frilabo, Portugal) (33 µM) (5'-AGT CAG CCA C-3') e 4,75 µL de H₂O UP. Após uma desnaturação inicial de 94°C durante 5 minutos, foram realizados 35 ciclos de PCR: desnaturação a 95°C durante 1 minuto, *annealing* a 36 °C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1

minuto. No primeiro ciclo a desnaturação ocorreu durante 3 minutos e no último, a extensão durante 5 minutos.

3.4.3 Condições de eletroforese e captação de imagem

As amostras foram corridas num gel 1,5% (w/v) de agarose preparado em 1X *buffer* Tris-Acetato-EDTA (TAE) e utilizado o GreenSafe Premium (Nyztech, Portugal) como o agente intercalante fluorescente. Todas as amostras foram corridas em triplicado para garantir a reprodutibilidade dos ensaios. A eletroforese correu em 1X *buffer* TAE, durante 1h30 a 90V à temperatura ambiente. As imagens do gel foram obtidas e visualizadas através de um transiluminador acoplado a um sistema de fotodocumentação.

3.5 Análise bioquímica da agregação proteica

Extração proteica. Protocolo adaptado de Johnson *et al.* (2009). As células foram lizadas com *beads* de vidro de tamanho 425-600 μm (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) e *buffer* de lise (30 mM HEPES pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% glicerol, 1 mM Dithiothreitol, 0,5% Triton X-100, 50 mM N-ethylmaleimide, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 X mistura inibidores de proteases) durante 10 minutos. Centrifugou-se 6000 x g - 5 min - 4°C para eliminar os resíduos e uma alíquota do sobrenadante (Fração total) foi armazenada em *ependorfs* vazios previamente colocados em gelo. Após quantificação proteica, foi feita a normalização proteica para precipitados de 850 μg . Para isso, foram retirados volumes de proteína total (Tabela 6.2 em "Anexos") para novos *ependorfs* colocados no gelo. Dessa alíquota foram retiradas alíquotas para 30 μg de proteína total para correr no gel (Tabela 5.3 em "Anexos"). O restante volume foi centrifugado a 16,000 x g; 30 min; 4°C. O sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* (Fração insolúvel) foi ressuscitado em 10 μL de *sample buffer*, através da fervura. As amostras foram armazenadas a -20°C.

Quantificação proteica. Para quantificar a proteína extraída recorreu-se ao método de Lo-

wry utilizando albumina de soro de bovino (BSA) como padrão. Padrões de 0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de BSA foram utilizados para elaborar a curva padrão e posteriormente extrapolar a concentração proteica de cada amostra. A absorvância foi medida a 750 nm através do espectrofotômetro (Genesys 20 Visible Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific).

Condições de eletroforese e captação de imagem. Para verificar a expressão dos agregados proteicos ao longo do tempo nas células expostas e não expostas ao H_2O_2 , 10 μL de proteína total e insolúvel por poço foram separadas por SDS-PAGE num gel de poliacrilamida de 10% a 70 V durante 1h30, à temperatura ambiente. As imagens foram obtidas através de um densitômetro GS800 (Biorad). Não existiram réplicas das amostras.

As soluções utilizadas foram:

Stacking gel (para um volume final de 5 mL) : H_2O , Acrilamida/Bis-acrilamida 30%, 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 10% (w/v) SDS, 10% (w/v) APS e TEMED.

Separating gel (para um volume final de 10 mL) : H_2O , Acrilamida/Bis-acrilamida 30%, 1,5 M Tris pH 8,8, 10% (w/v) SDS, 10% (w/v) APS e TEMED.

Running buffer (para um volume final de 1 L) : 25 mM Tris-HCl, 200 mM Glicina e 0,1% (w/v) SDS.

Sample buffer (Para um volume de 1 L) : 10% (w/v) SDS, 10 mM β -mercaptoetanol, 20% (v/v) Glicerol, 0,2 M Tris-HCl pH 6,8 e 0,05% (w/v) Azul de Bromofenol.

Coloração. A coloração foi feita com uma solução de 0,25% (m/v) *Coomasie Brilliant Blue R-250*, 1% (v/v) ácido acético glacial e 45% (v/v) de metanol em H_2O durante 3h em agitação. A descoloração foi feita com H_2O .

3.6 Implementação da técnica eletroforética para análise proteica

A técnica de eletroforese vertical para análise de proteínas é um processo que ainda não se encontrava otimizado no laboratório de Ciências Químicas e das Biomoléculas. Para a tentativa da sua implementação foram utilizados géis de 10% e 12% de poliacrilamida e um sistema de eletroforese vertical (Clever scientific), como esquematizado na figura 3.1.

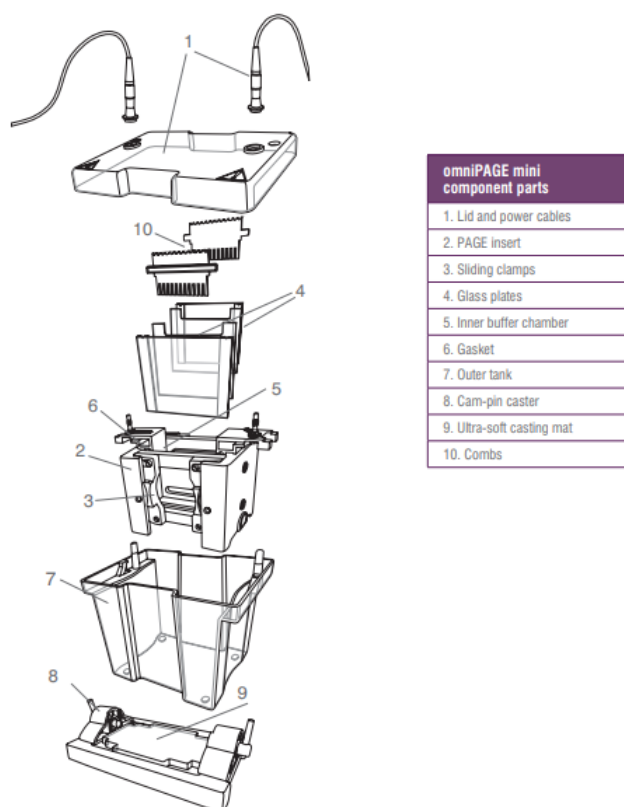


Figura 3.1: Esquema do sistema de eletroforese vertical utilizado

Retirado do catálogo de descrição do Sistema de eletroforese mini vertical OmniPAGE disponível em www.cleaverscientific.com

As condições do SDS-PAGE testadas foram 70V durante 1h30 e 90V durante 1h30. Para a corrida, diferentes *running buffers* foram utilizados, entre os quais:

- 25 mM de Tris, 190 mM de Glicina, 0,1% de SDS;
- 25 mM de Tris, 250 mM de Glicina, 0,1% de SDS;

Capítulo 4

Resultados e discussão

4.1 Análise do DNA

Um dos objetivos deste trabalho era analisar possíveis alterações do DNA da *S. cerevisiae* após a sua exposição a diferentes concentrações de H₂O₂ e à vitamina E, durante 180 minutos. Com esse propósito, o padrão de fragmentação de bandas gerado através do RAPD-PCR com o primer M13 foi visualizado através de gel de agarose 1,5%, representado nas Figuras 4.1 - 4.4. Nas figuras 4.1 e 4.2 é possível visualizar o padrão gerado para as diferentes condições estudadas com a exposição a 3 mM de H₂O₂ e 11,25 mg/L de Vitamina E e as figuras 4.3 e 4.4 com a exposição a 5 mM de H₂O₂ e 11,25 mg/L de Vitamina E.

A recolha da amostra na fase exponencial de crescimento permitiu avaliar a resposta celular da levedura às condições de *stress* induzidas, uma vez que trabalhos anteriormente descritos demonstram que, na fase estacionária, a *S. cerevisiae* é tolerante a grandes concentrações de H₂O₂ (10-20 mM), contrariamente ao que acontece na fase exponencial (Izawa *et al.*, 1996; Jamieson, Rivers, & Stephen, 1994). Para além disso, trabalhos anteriores do grupo reportaram que a fase ótima de crescimento da levedura tinha início 6h após a inoculação da levedura em meio fresco e que a exposição a concentrações de 3mM e 5 mM de H₂O₂ são sub-letais para a estirpe utilizada, verificando-se a redução da viabilidade celular ao longo do tempo para ambas as concentrações (Costa, 2018).

Devido ao facto de uma grande parte dos danos oxidativos causados pelos ROS centrar-se na fragmentação do DNA (Yi *et al.*, 2016), esta foi analisada como um marcador de toxicidade para o peróxido de hidrogénio, através de RAPD-PCR com o primer M13 descrito anteriormente para esta levedura (Gomes *et al.*, 2009 e Guerra *et al.*, 2001). O primer OPA-3 não se encontra documentado neste capítulo devido a problemas com a otimização do protocolo.

As leveduras foram expostas ao agente oxidante, antioxidante e aos dois em simultâneo, ao longo de 180 minutos. A exposição da *S. cerevisiae* a 3 e 5 mM de H₂O₂ (Figuras 4.1-4.4) não demonstrou qualquer diferença no padrão de fragmentação do material genético entre os 0 e 180 minutos de exposição, pelo que não se verificou uma relação direta entre a concentração de H₂O₂ e alterações no material genético, durante o período de tempo estudado. As réplicas realizadas para as diferentes condições apresentam um padrão de bandas semelhante, pelo que a reprodutibilidade do ensaio é assegurada, com execução das réplicas E1 (Figura 4.2) que a imagem não permite a sua correta visualização e F2 (Figura 4.3) que aparenta um padrão de bandas diferente de F1 e F3.

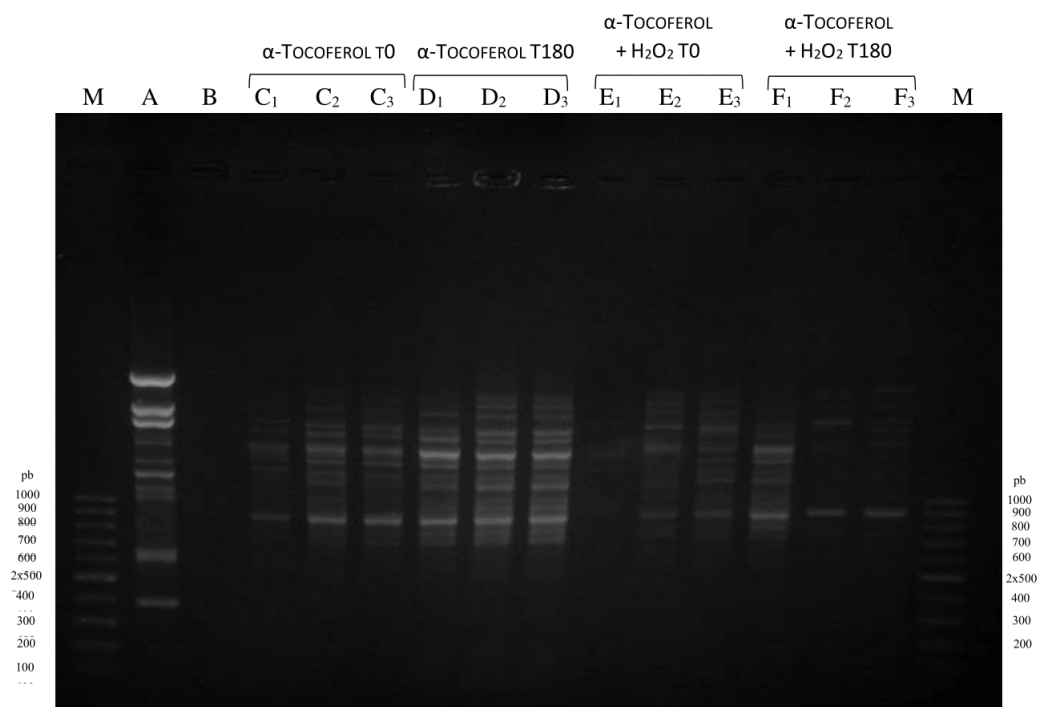


Figura 4.1: Padrão de bandas de fragmentação de DNA com primer M13 com exposição a 3 mM de H₂O₂

Legenda: **M**- Marcador de Peso molecular; **A**- controlo positivo; **B**- controlo negativo; **C₁- C₃**- Condição 1 T0; **D₁- D₃**- Condição 1 T180; **E₁- E₃**- Condição 2 T0; **F₁- F₃**- Condição 2 T180

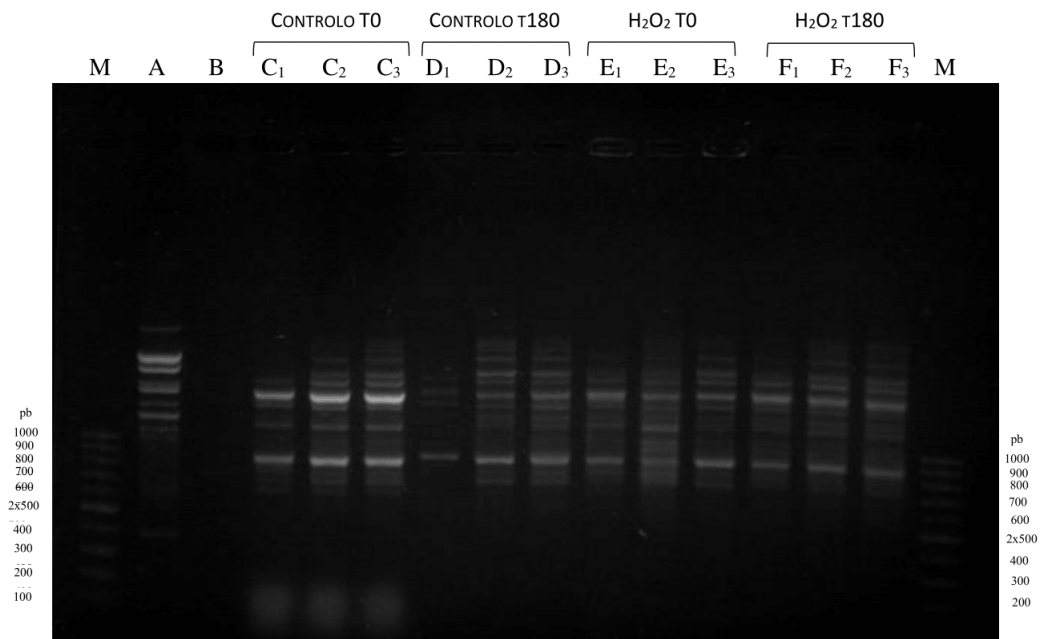


Figura 4.2: Padrão de bandas de fragmentação de DNA com primer M13 com exposição a 3 mM de H_2O_2 e 11,25 mg/L de Vitamina E

Legenda: **M**- Marcador de Peso molecular; **A**- controlo positivo; **B**- controlo negativo; **C₁- C₃**- Condição 3 T0; **D₁- D₃**- Condição 3 T180; **E₁- E₃**- Condição 4 T0; **F₁- F₃**- Condição 4 T180

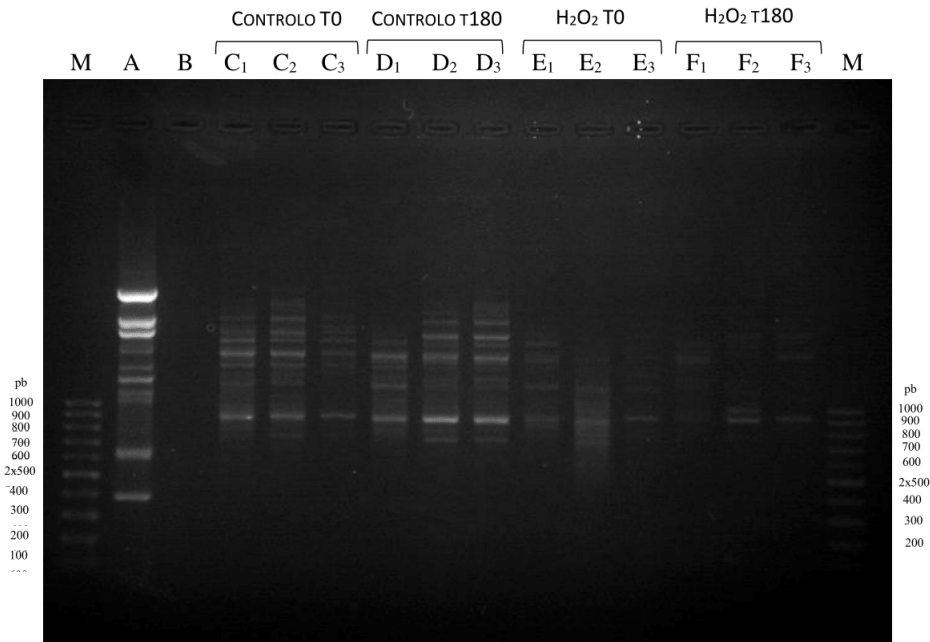


Figura 4.3: Padrão de bandas de fragmentação de DNA com primer M13 com exposição a 5 mM de H_2O_2

Legenda: **M**- Marcador de Peso molecular; **A**- controlo positivo; **B**- controlo negativo; **C₁- C₃**- Condição 1 T0; **D₁- D₃**- Condição 1 T180; **E₁- E₃**- Condição 2 T0; **F₁- F₃**- Condição 2 T180

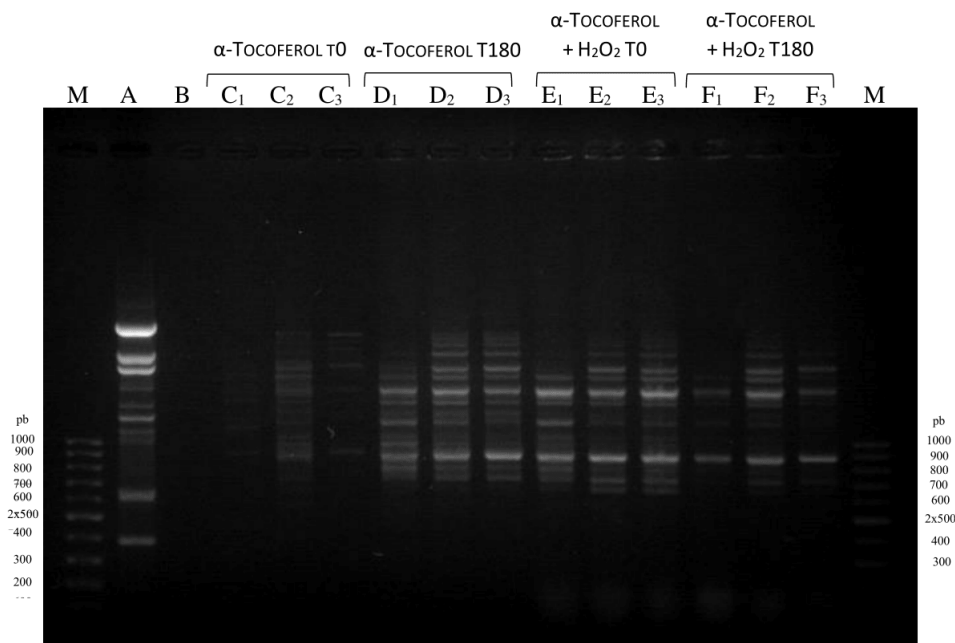


Figura 4.4: Padrão de bandas de fragmentação de DNA com primer M13 com exposição a 5 mM de H_2O_2 e 11,25 mg/L de Vitamina E

Legenda: M- Marcador de Peso molecular; A- controlo positivo; B- controlo negativo; C₁- C₃- Condição 3 T0; D₁- D₃- Condição 3 T180; E₁- E₃- Condição 4 T0; F₁- F₃- Condição 4 T180

Madeo *et al.* (1999) também retratou que não foi observada clivagem quando analisado por gel de agarose, apesar da análise da microscopia eletrónica e o ensaio de Túnel demonstrarem sinais de fragmentação nas células de *S. cerevisiae* quando expostas a 3 mM de H_2O_2 . No entanto, existem trabalhos descritos na literatura que demonstram uma linearidade entre a concentração de H_2O_2 e o dano causado no DNA (Azevedo, Marques, Fokt, Oliveira & Johansson *et al.*, 2010; Stanicka *et al.* 2015).

Como reportado por Leroy *et al.* (2001), na *S. cerevisiae*, podem ocorrer mutações silenciosas no DNA sem que sejam detetadas. Para além disso, a organização da cromatina através das histonas permite formar uma barreira protetiva contra o ROS e pode impedir a correta difusão do H_2O_2 até ao núcleo (Yakes & houten, 1997).

Por sua vez, as células podem ter a capacidade de se adaptarem às condições do meio e induzirem a reparação do dano causado em cerca de 1h30 min como demonstrado por Yakes and Houten (1997). Desta forma, uma análise aos tempos anteriores aos 180 minutos poderá ser importante para detetar possíveis danos. Para além disso, diferentes estirpes podem

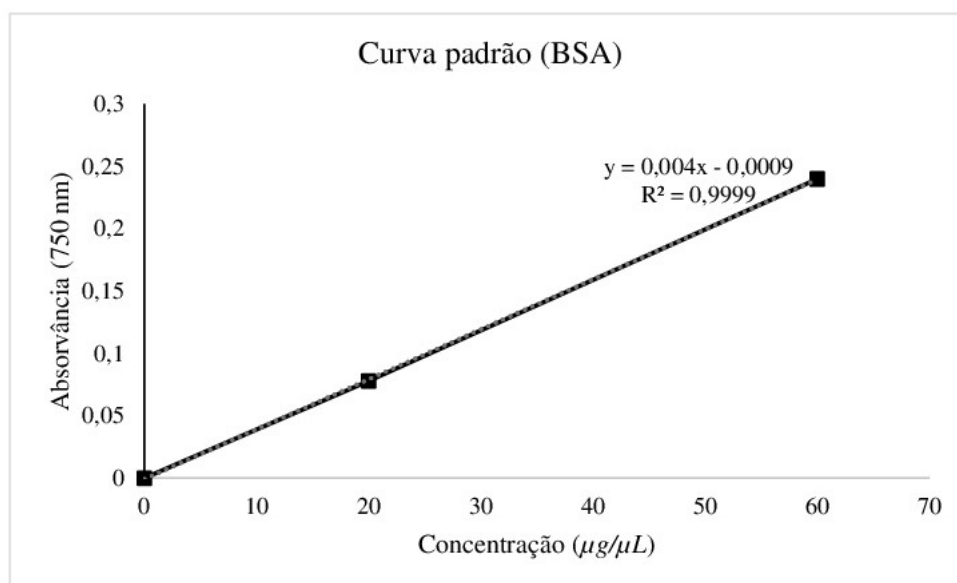
apresentar diferentes sensibilidades ao H_2O_2 (Bayliak, Semchyshyn, & Lushchak, 2006).

Outros métodos de estudo podem ser adaptados para a toxicidade dos agregados como o crescimento da levedura em meio de cultura sólido, onde o agente oxidante está difundido no meio e o ensaio de túnel onde a detecção da fragmentação do DNA é feita através da marcação dos ácidos nucleicos (Madeo *et al.*, 1999; 2002). No entanto, apesar da curva de crescimento ser um método mais moroso, permite determinar a que ponto de exposição (tempo) o H_2O_2 começava a ser tóxico (Summers & Cyr, 2011).

4.2 Quantificação proteica

Para posterior comparação dos agregados insolúveis entre as diferentes amostras foi importante garantir que a mesma quantidade de proteína era inserida em cada poço. Para esse efeito, a quantificação proteica foi realizada pelo método de Lowry onde, através da curva padrão de BSA (Figura 4.2) foi possível determinar a concentração proteica presente em cada amostra (Tabela 6.1 em "Anexos").

Figura 4.5: Curva padrão de BSA pelo método de Lowry. A curva foi elaborada com padrões de BSA de $0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ e $60 \mu\text{g}/\mu\text{L}$



A equação da reta gerada pela curva padrão de BSA e a absorvância medida a 750 nm permitiu retirar a concentração de proteína presente em cada amostra. Para uma absorvância de 0,146, a concentração proteica foi de 18,363 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$:

$$y = 0,004x - 0,0009$$

$$0,146 = 0,004x - 0,0009$$

$$x = 36,725 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

$$[\text{proteína}] = \frac{36,725}{2*} = 18,363 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

*Divisão devido à utilização de 2 μL de amostra para a quantificação.

Após quantificação, todas as amostras foram normalizadas para agregados insolúveis de 850 μg de proteína total (Tabela 6.2 em "Anexos") uma vez que esta era a quantidade máxima presente na amostra com menor teor proteico (Condição 4 T180) e a proteína total foi normalizada para 30 μg (Tabela 6.3 em "Anexos").

4.3 Análise proteica

Após extração e quantificação proteica, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE com o intuito de analisar possíveis alterações na agregação proteica provenientes da exposição ao agente oxidante e antioxidante. As figuras 4.6 e 4.7 representam a proteína insolúvel e 4.8 e 4.9 a proteína total extraída.

A exposição da *S. cerevisiae* a 3 mM e 5 mM de H_2O_2 e 11,25 mg/L de Vitamina E parece ter induzido síntese proteica. Na exposição a 3 mM de H_2O_2 (Figura 4.6) verificou-se uma expressão aumentada da proteína com peso molecular de aproximadamente 45kDa aos 180 minutos, assinalado com 1. O aumento foi visível em todas as condições estudadas, sendo mais notório em G quando comparada com C. Como reportado por diversos estudos, esta proteína tende a alterar a sua conformação quando exposta a diferentes condições como elevadas temperaturas, altas pressões, reações enzimáticas ou agitação. A desnaturação e

a agregação são consequências da exposição a elevadas temperaturas (Galazka *et al.*, 1999; Matsudomi, Takahashi, & Miyata, 2001; Nyemb *et al.*, 2014; Sponton, Perez, Carrara & Santiago, 2014; Weijers *et al.*, 2003). Porém, Zhou *et al.* (2017) descreveu que o H_2O_2 é capaz de causar desnaturação nesta proteína à temperatura ambiente.

Um aumento da expressão da proteína de peso molecular entre os 14,4 kDa e 31 kDa em G e H, assinalado com 2, também foi verificado. No entanto, o marcador utilizado não permite definir o peso aproximado da proteína em questão.

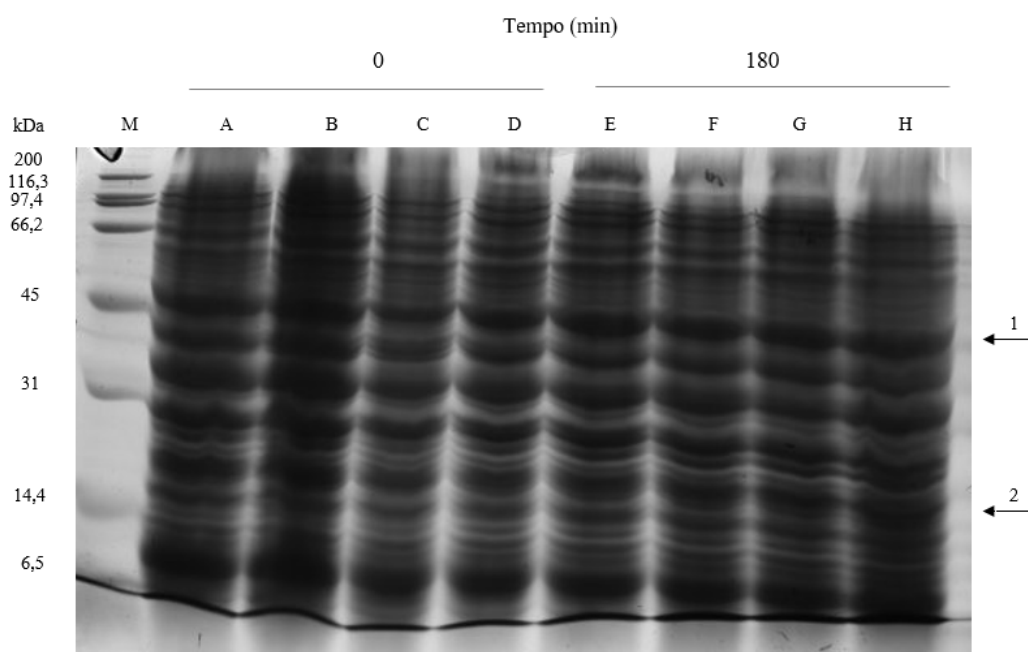


Figura 4.6: Separação dos agregados insolúveis com exposição a 3 mM de H_2O_2 e 11,25 mg/mL de Vitamina E através de SDS-PAGE

Legenda: **M**- Marcador de peso molecular; **A**- Condição 1 T0; **B**- Condição 2 T0; **C**- Condição 3 T0; **D**- Condição 4 T0; **E**- Condição 1 T180; **F**- Condição 2 T180; **G**- Condição 3 T180; **H**- Condição 4 T180. Os locais assinalados pelas setas 1 e 2 demonstram as variações na expressão proteica entre os 0 e os 180 minutos em proteínas de peso 45 kDa e entre 14,4 e 31 kDa

A sobre-expressão da ovalbumina também aconteceu na exposição a 5 mM de H_2O_2 e 11,25 mg/L de Vitamina E (Figura 4.7), o que pode sugerir que é uma proteína induzida pelo *stress* oxidativo. Neste caso (assinalado com 3), é importante salientar a diferença denotada entre D e H. Ambas as condições correspondem à exposição dos agentes oxidante e antioxidante em simultâneo, o que sugere que a vitamina E não reverteu a citotoxicidade causada pelo

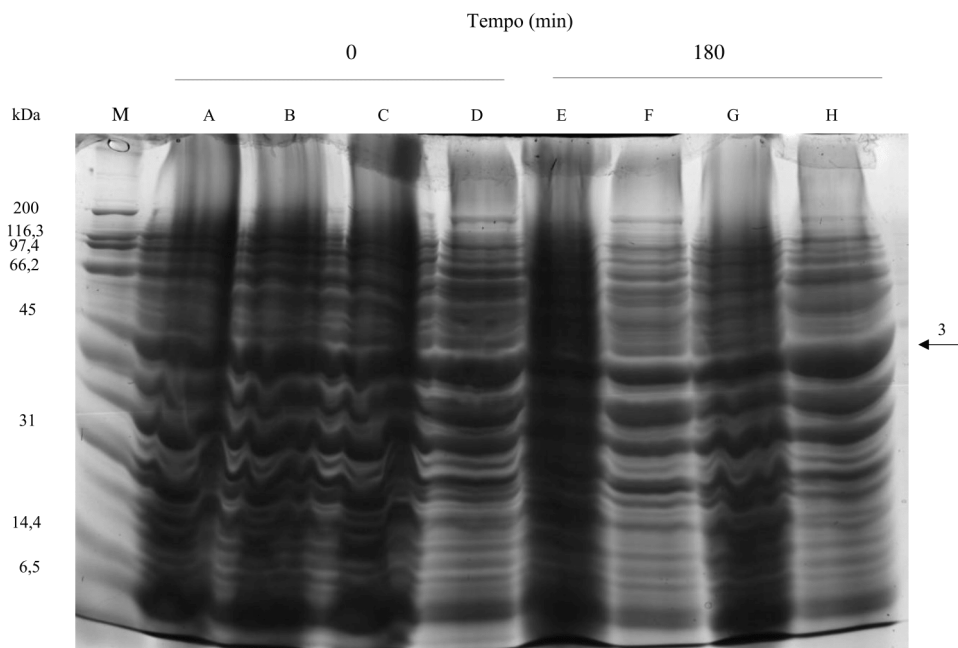


Figura 4.7: Separação dos agregados insolúveis com exposição a 5 mM de H_2O_2 e 11,25 mg/L de Vitamina E através de SDS-PAGE

Legenda: **M**- Marcador de peso molecular; **A**- Condição 1 T0; **B**- Condição 2 T0; **C**- Condição 3 T0; **D**- Condição 4 T0; **E**- Condição 1 T180; **F**- Condição 2 T180; **G**- Condição 3 T180; **H**- Condição 4 T180. O local assinalado pela seta 3 demonstra as variações na expressão proteica entre os 0 e os 180 minutos em proteínas de peso 45 kDa.

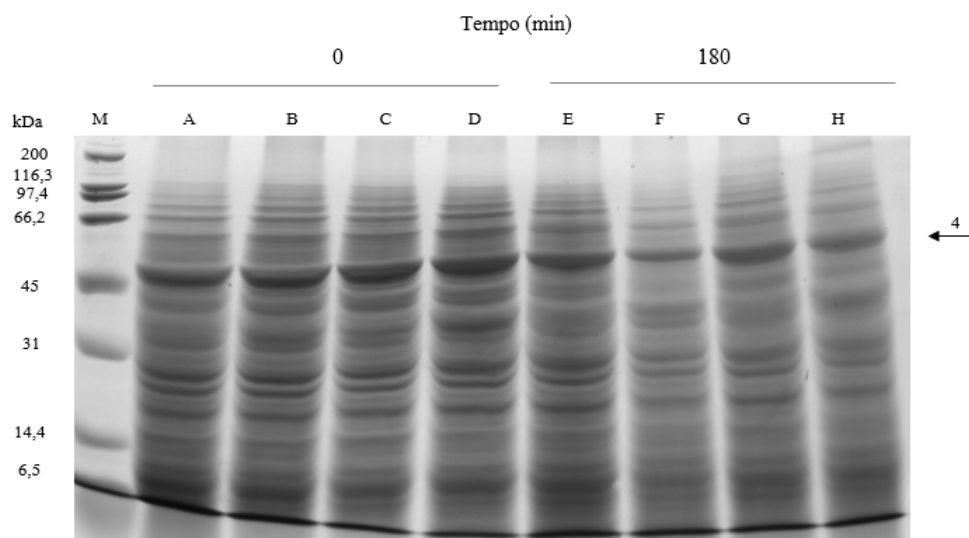


Figura 4.8: Gel 10% poliacrilamida representativo da proteína total com exposição a 3 mM de H_2O_2 e 11,25 mg/L de Vitamina E

Legenda: **M**- Marcador de peso molecular; **A**- Condição 1 T0; **B**- Condição 2 T0; **C**- Condição 3 T0; **D**- Condição 4 T0; **E**- Condição 1 T180; **F**- Condição 2 T180; **G**- Condição 3 T180; **H**- Condição 4 T180.

H₂O₂. A incapacidade deste composto reverter o efeito já tinha sido anteriormente descrita por Osakada *et al.* (2003). Para além disso, o facto de se observar uma síntese proteica superior na exposição conjunta dos agentes ao invés da exposição isolada ao agente oxidante, pode representar que a vitamina E exerce um efeito pró-oxidante tal como já foi descrito por Pearson *et al.* (2006) e Thomas & Stocker (2000).

Na exposição a 3 mM de H₂O₂ (Figura 4.8), assinalado com 4, verificou-se uma ligeira diminuição da expressão de proteína total na posição F, podendo ser uma consequência dos agregados proteicos ficarem retidos nos poços sem a capacidade de migrar no gel. Por sua vez, na exposição a 5 mM de H₂O₂ (Figura 4.9), verificou-se um ligeiro aclaramento das bandas na parte inferior de D, F e H (assinalado com 5), possivelmente pela mesma razão.

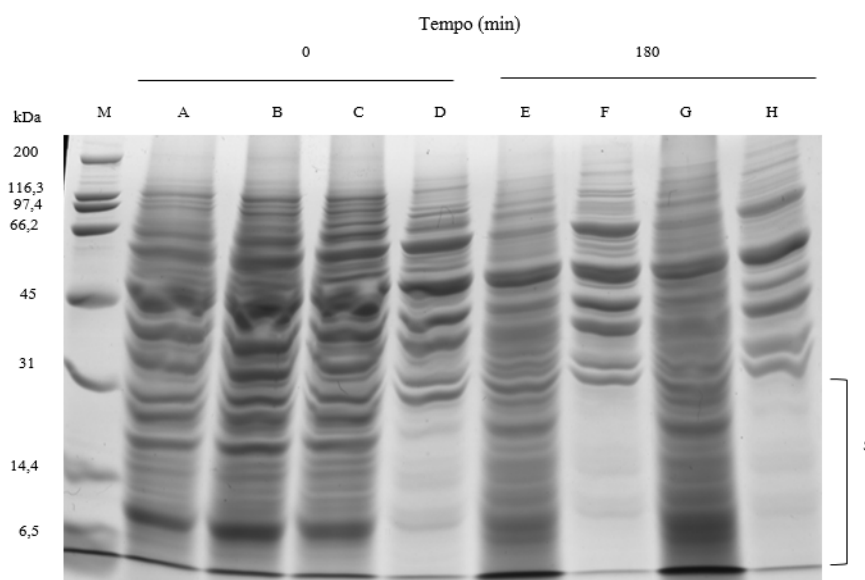


Figura 4.9: Gel 10% poliacrilamida representativo da proteína total com exposição a 5 mM de peróxido e 11,25 mg/L de Vitamina E

Legenda: **M**- Marcador de peso molecular; **A**- Condição 1 T0; **B**- Condição 2 T0; **C**- Condição 3 T0; **D**- Condição 4 T0; **E**- Condição 1 T180; **F**- Condição 2 T180; **G**- Condição 3 T180; **H**- Condição 4 T180.

O método de SDS-PAGE é um método simples que permite a separação dos agregados solúveis dos insolúveis. No entanto, não é sensível a pequenas diferenças e alguns dos agregados ficam retidos nos poços. Futuramente, para uma análise mais detalhada deste fenómeno, o SDD-PAGE-agarose gel poderá ser uma opção viável apesar de ser um método moroso uma vez que permite a passagem de proteínas com maiores tamanhos (Summer & Cyr, 2011). A

utilização de um *buffer* específico para dissolver os agregados facilitará a dissolução completa dos depósitos como o caso de *buffer* de tioreia e ureia (Natarajan, Xu, Caperna, & Garret, 2005).

4.4 Implementação da técnica eletroforética

A implementação da técnica de eletroferese vertical para a separação de proteínas também era um dos objetivos deste trabalho. No entanto, devido a problemas técnicos não foi possível concretizar a sua implementação devido à incapacidade da passagem da corrente elétrica pelo módulo interno do sistema utilizado. Um problema no equipamento eletrônico, nomeadamente na fonte de alimentação bem como nos cabos de conexão utilizados para ligar a fonte de alimentação ao tanque poderiam ser a razão para não se verificar a passagem da corrente. Por essa razão, os cabos, a fonte de alimentação e a tomada ao qual se encontrava ligado o aparelho foram modificados. No entanto, não se verificou qualquer alteração.

Para além disso, a tampa do tanque, por onde a corrente elétrica flui, também foi substituída. Esta alteração demonstrou um aumento da corrente elétrica mas a passagem da corrente elétrica apenas era visível na zona onde não se encontrava o gel, o que sugeriu que o problema estaria na constituição do gel. Por essa razão, várias percentagens do gel foram testadas. No entanto, o teste de 10% e 12% demonstraram o mesmo efeito. Desta forma, o problema poderia estar no *running buffer*, impedindo a passagem da corrente elétrica. Foram testados três *buffers* diferentes mas nenhum deles demonstrou uma passagem de corrente superior, induzindo que o problema também não estaria na constituição do buffer. Desta forma e devido à escassez de tempo, os ensaios foram realizados nas instalações do i3s.

Após as tentativas referidas anteriormente foi possível concluir que o equipamento não se encontrava a funcionar corretamente, pelo que a implementação da técnica eletroforética ainda necessita de ajustes. Se um defeito de fabrico dos componentes do sistema não for comprovado, a alteração da constituição do gel de poliacrilamida poderá ser a próxima etapa dos testes.

Capítulo 5

Conclusão

5.1 Principais resultados

O *stress* oxidativo tem sido relacionado com as doenças neurodegenerativas pela sua relação com a agregação proteica e o dano no material genético.

Apesar de trabalhos anteriores demonstrarem que concentrações de 3 mM e 5 mM de H₂O₂ afetam a viabilidade celular da *S. cerevisiae*, estas concentrações não demonstraram causar dano no material genético durante os 180 minutos estudados.

Relativamente ao estudo da influência do *stress* oxidativo na agregação proteica, foi possível concluir que a exposição de 3 mM e 5 mM de H₂O₂ durante 180 minutos se verificou a sobre-expressão de uma proteína com peso molecular de aproximadamente 45KDa. Essa proteína encontrava-se expressa em células expostas ao agente oxidante e antioxidante em conjunto, fazendo com que esta se considere como uma proteína induzida pelo *stress* oxidativo.

A exposição à vitamina não demonstrou reverter os efeitos da agregação causados pela exposição ao agente de *stress* oxidativo. Aliás, a vitamina E parece exercer um papel pró-oxidante uma vez que é verificada uma síntese proteica superior quando ocorre a exposição conjunta do H₂O₂ e da vitamina quando comparado com a exposição apenas ao H₂O₂.

5.2 Prespetivas futuras

Num curto período de tempo, o principal objetivo será analisar um período de exposição da levedura ao H_2O_2 mais longo e verificar se ocorrem alterações a nível genético. Para além disso, a microscopia eletrónica e o ensaio túnel poderiam ser alternativas ao invés da visualização em gel de agarose.

A otimização da técnica de eletroforese vertical para separação de proteínas e a incorporação de *buffers* de lise de agregados proteicos também são objetivos a serem alcançados.

No futuro, poderá ser interessante expressar proteínas humanas associadas a doenças neurodegenerativas nas leveduras através da inserção de plasmídeos e verificar se os resultados são similares.

Capítulo 6

Anexos

Tabela 6.1: Concentração proteica de cada amostra através da absorvância a 750 nm

[H ₂ O ₂] (mM)	Tempo de exposição (min)	Condição	Abs	[Proteína] (µg/µL)
3	0	1	0,146	18,363
3	0	2	0,135	16,763
3	0	3	0,132	16,388
3	0	4	0,158	19,638
3	180	1	0,166	20,638
3	180	2	0,108	13,388
3	180	3	0,119	14,763
3	180	4	0,119	14,763
5	0	1	0,144	17,888
5	0	2	0,123	15,263
5	0	3	0,166	20,638
5	0	4	0,053	6,513
5	180	1	0,126	15,638
5	180	2	0,059	7,263
5	180	3	0,088	10,888
5	180	4	0,042	5,138

Tabela 6.2: Volumes de proteína e H₂O necessários para normalizar a proteína insolúvel/agregados proteicos para 850 µg

[H ₂ O ₂] (mM)	Tempo de exposição (min)	Condição	[Proteína] (µg/µL)	Vol. proteína (µL)	Vol. H ₂ O (µL)
3	0	1	18,363	46,300	113,710
3	0	2	16,763	50,708	109,292
3	0	3	16,388	51,869	108,131
3	0	4	19,638	43,285	116,715
3	180	1	20,638	41,187	118,813
3	180	2	13,388	63,492	96,508
3	180	3	14,763	57,578	102,423
3	180	4	14,763	57,578	102,423
5	0	1	17,888	47,519	112,481
5	0	2	15,623	55,692	104,307
5	0	3	20,638	41,187	118,813
5	0	4	6,513	130,518	29,482
5	180	1	15,638	54,357	105,643
5	180	2	7,263	117,040	42,960
5	180	3	10,888	78,0712	81,929
5	180	4	5,138	160	-

Tabela 6.3: Volumes de proteína e *sample buffer* necessários para normalizar a proteína total de cada amostra para 30 µg

[H ₂ O ₂] (mM)	Tempo de exposição (min)	Condição	[Proteína] (µg/µL)	Vol. proteína (µL)	Vol. <i>sample buffer</i> (µL)
3	0	1	18,363	1,634	8,366
3	0	2	16,763	1,790	8,210
3	0	3	16,388	1,831	8,169
3	0	4	19,638	1,528	8,472
3	180	1	20,638	1,454	8,546
3	180	2	13,388	2,241	7,759
3	180	3	14,763	2,032	7,968
3	180	4	14,763	2,032	7,968
5	0	1	17,888	1,677	8,323
5	0	2	15,623	1,966	8,034
5	0	3	20,638	1,454	8,546
5	0	4	6,513	4,607	5,393
5	180	1	15,638	1,918	8,082
5	180	2	7,263	4,131	5,869
5	180	3	10,888	2,755	7,245
5	180	4	5,138	5,839	4,161

Capítulo 7

Bibliografía

Adami, L. N. G., Belardin, L. B., Lima, B. T., Jeremias, J. T., Antoniassi, M. P., Okada, F. K., & Bertolla, R. P. (2018). Effect of in vitro vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation in human spermatozoon submitted to oxidative stress. *Andrologia*, 50(4), e12959. DOI: 10.1111/and.12959

Aguzzi, A., & O'Connor, T. (2010). Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nature*, 9, 237-248. DOI: 10.1038/nrd3050

Amoroso, S., Gioielli, A., Cataldi, M., Renzo, D. G., & Annunziato, L. (1999). In the neuronal cell line SH-SY5Y, oxidative stress-induced free radical overproduction causes cell death without any participation of intracellular Ca²⁺ increase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1452, 151–160. DOI: 10.1016/S0167-4889(99)00110-X

Awan, A. R., Blount, B. A., Bell, D. J., Shaw, W. S., Ho, J. C. H., McKiernan, R. M., & Ellis, T. (2017). Biosynthesis of the antibiotic nonribosomal peptide penicillin in baker's yeast. *Nature Communications*, 8, 15202. DOI: 10.1038/ncomms15202

Bartesaghi, S., Herrera, D., Martinez, D. M., Petruk, A., Demicheli, V., Trujillo, M., Martí, M. A., Estrín, D. A., & Radi, R. (2017). Tyrosine oxidation and nitration in transmembrane peptides is connected to lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 622, 9–25. DOI: 10.1016/j.abb.2017.04.006

- Barzilai, A., & Yamamoto, K. - I. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA repair*, 3(8-9), 1109-15.
- Bhandary, B., Marahatta, A., Kim, H-R., & Chae, H-J. (2013). An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 434-456. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.03.002
- Bose, A. & Beal, M. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 139(1), 216-231. DOI: 10.1111/jnc.13731
- Bostanci, M. O., Bas, O., & Bagirici, F. (2010). Alpha-Tocopherol Decreases Iron-Induced Hippocampal and Nigral Neuron Loss. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30, 389–394. DOI: 10.1007/s10571-009-9461-8
- Chaturvedi, S. K., Siddiqi, M. K., Alam, P., & HasanKhan, R. (2016). Protein misfolding and aggregation: Mechanism, factors and detection. *Process Biochemistry*, 1-10. DOI: 10.1016/j.proc bio.2016.05.015
- Costa, A. R. S. B. (2018). Oxidative stress in neurodegenerative diseases using yeast as a model. (Tese de Mestrado, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto).
- Costa, V., & Moradas-Ferreira, P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular aspects of Medicine*, 22, 217-246. DOI: 10.1016/s0098-2997(01)00012-7
- Currais, A., Fischer, W., Maher, P., & Schubert, D. (2017). Intraneuronal protein aggregation as a trigger for inflammation and neurodegeneration in the aging brain. *The FASEB Journal*, 31(1), 5-10. DOI: 10.1096/fj.201601184
- Dewji, N. N., Singer, S. J., Masliah, E., Rockenstein, E., Kim, M., Harber, M., & Horwood, T. (2015). Peptides of Presenilin-1 Bind the Amyloid Precursor Protein Ectodomain and Offer a Novel and Specific Therapeutic Approach to Reduce β -Amyloid in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, 10(4), e0122451. DOI: 10.1371/journal.pone.0122451
- El-Osta H., & Circu M.L. (2016) Mitochondrial ROS and Apoptosis. In: Buhlman L. (eds)

Mitochondrial Mechanisms of Degeneration and Repair in Parkinson's Disease. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-42139-1₁

Emerit, J., Edeas, M., & Bricaire, F. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, 39-46. DOI: 10.1016/j.biopha.2003.11.004

Fernández-Trapero, M., Espejo-Porras, F., Rodríguez-Cueto, C., Coates, J. R., Pérez-Díaz, C., de Lago, E., & Fernández-Ruiz, J. (2017). Upregulation of CB2 receptors in reactive astrocytes in canine degenerative myelopathy, a disease model of amyotrophic lateral sclerosis. *Disease Models & Mechanisms*, 10, 551-558. DOI: 10.1242/dmm.028373

Ferreira, I. C. F. R., & Abreu, R. M. V. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*, 2: 32-39.

Follmer, C., & Bezerra Netto, H. J. C. (2013). Fármacos multifuncionais: Monoamina oxidase e α -sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. *Química Nova*, 36(2), 306-313. DOI: 10.1590/S0100-40422013000200017.

Franssens, V., Bynens, T., Van den Brande, J., Vandermeeren, K., Verduyck, M. & Winderickx, J. (2013). The Benefits of Humanized Yeast Models to Study Parkinson's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 760629. DOI: 10.1155/2013/760629

Galazka, V. B., Smith, D., Ledward, D. A., & Dickinson, E. (1999). Interactions of ovalbumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength, heat and high pressure treatment. *Food Hydrocolloids*, 13, 81-88. DOI: 10.1016/S0268-005X(98)00073-3

Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-11. DOI: 10.1155/2012/428010

Ghavami, S., Shojaeid, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jaganmohan, R. J., Mehrpour, M., Christoffersson, J., Chaabane, W., Moghadam, A. R., Kashani, H. H., Hashemi, M., Owji, A. A., & Los, M. J. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, 112, 24-48. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.004

Gitler, A. D., Dhillon, P., & Shorter, J. (2017). Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Disease Models & Mechanisms*, 10, 499-502.

Goedert, M. (2015). Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A, tau, and α -synuclein. *Science*, 349(6248), 1255555-1–1255555-9. DOI: 10.1242/dmm.030205

Gomes, F. C. O., Araújo, R. A. C., Cisalpino, P. S., Moreira, E. S. A., Zani, C. L., & Rosa, C. A. (2009). Comparison between two selected *Saccharomyces cerevisiae* strains as fermentation starters in the production of traditional cachaça. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(2), 449-455. DOI: 10.1590/S1516-89132009000200023

Guerra, J. B., Araújo, R. A. C., Pataro, C., Franco, G. R., Moreira, E. S. A., Mendonça-Hagler, L. C., & Rosa, C. A. (2001). Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 106-111. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2001.00959.x

Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K. R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology*, 4 (1), 8. DOI: 10.1186/1472-6750-4-8

He, Z., Guo, J. L., McBride, J. D., Narasimhan, S., Kim, H., Changolkar, L., Zhang, B., Gathagan, R. J., Yue, C., Dengler, C., Stieber, A., Nitla, M., Coulter, D. A., Abel, T., Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2017). Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nature Medicine*, 24(1), 29–38. DOI: 10.1038/nm.4443

Huang, M., Bao, J., Hallström, B. M., Petranovic, D. & Nielsen, J. (2017). Efficient protein production by yeast requires global tuning of metabolism. *Nature Communications*, 8(1), 1-12. DOI: 10.1038/s41467-017-00999-2

Jagadish, K., Gould, A., Borra, R., Majumder, S., Mushtaq, Z., Shekhtman, A., & Camarero, J. A. (2015). Recombinant Expression and Phenotypic Screening of a Bioactive Cyclotide Against α -Synuclein-Induced Cytotoxicity in Baker's Yeast. *Angewandte Chemie International Edition*, 54, 8390 –8394. DOI: 10.1002/anie.201501186

- Jamieson, D. J., Rivers, S. T., & Stephen, D. W. S. (1994). Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology*, 140, 3277-3283. DOI: 10.1099/13500872-140-12-3277
- Johnson, B. S., Snead, D., Lee, J. J., McCaffery, J. M., Shorter, J., & Gitler, A. D. (2009). TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity. *The journal of biological chemistry*, 284 (30), 20329–20339.
- Jung, J., Michalak, M., & Agellon, L. B. (2017). Endoplasmic reticulum malfunction in the nervous system. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 1-7. DOI: 10.1074/jbc.M109.010264
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *Plos one*, 6(2), e16015. DOI: 10.1371/journal.pone.0016015
- Khan, H. A., & Mutus, B. (2014). Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Frontiers in Chemistry*, 2, 70. DOI: 10.3389/fchem.2014.00070
- Khebbeb, M. N., Djebbar, M. R., Saib, A., & Berrebah, H. (2015). Evaluation of oxidative stress induced by nanoparticles (ZnO) on a unicellular biological model (*Saccharomyces cerevisiae*). *Der Pharma Chemica*, 7(10), 573-578.
- Khurana, V., & Lindquist, S. (2010). Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nature Review Neuroscience*, 11, 436-439. DOI: 10.1038/nrn2809
- Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*, 24(4), 325-340. DOI: 10.5607/en.2015.24.4.325
- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., & Hocevar, B. A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic pathology*, 38(1), 96-109. DOI: 10.1177/0192623309356453
- Kritzer, J. A., Hamamichi, S., McCaffery, J. M., Santagata, S., Naumann, T. A., Caldwell, K. A., (2009). Rapid Selection of Cyclic Peptides that Reduce α -Synuclein Toxicity in Yeast and Animal Models. *Nature Chemical Biology*, 5(9), 655–663. DOI: 10.1038/nchembio.193

- Lansbury, P. T., & Lashuel, H. A. (2006). A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature*, 443 (19), 774-779. DOI: 10.1038/nature05290
- Le bras, M., Clément, M. V., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2005). Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and Histopathology*, 20(1), 205-219. DOI: 10.14670/HH-20.205
- Leroy, C., Mann, C., & Marsolier, M. - C. (2001). Silent repair accounts for cell cycle specificity in the signaling of oxidative DNA lesions. *The EMBO Journal*, 20(11), 2896–2906. DOI: 10.1093/emboj/20.11.2896
- Ligr, M., Velten, I., Fröhlich, E., Madeo, F., Ledig, M., Fröhlich, K.-U., Wolf, D. H., & Hilt, W. (2001). The proteasomal substrate Stm1 participates in apoptosis-like cell death in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 12(8), 2422–2432. DOI: 10.1091/mbc.12.8.2422
- Lin, M. T. & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787-795. DOI: 10.1038/nature05292
- Lodato, M. A., Rodin, R. E., Bohrson, C. L., Coulter, M. E., Barton, A. R., Kwon, M., Sherman, M. A., Vitzthum, C. M., Luquette, L. J., Yandava, C. N., Yang, P., Chittenden, T. W., Hatem, N. E., Ryu, S. C., Woodworth, M. B., Park, P. J., & Walsh, C. A. (2018). Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. *SCIENCE*, eaao4426. DOI: 10.1126/science.aao4426
- Lu, H., Liu, X., Deng, Y., & Qing, H. (2013). DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5, 85. DOI: 10.3389/fnagi.2013.00085
- Lu, J., Chen, R., Liang, H., & Yan, Q. (2018). The influence of concentration of hydroxyl radical on the chemical mechanical polishing of SiC wafer based on the Fenton reaction. *Precision Engineering*, 52, 221-226. DOI: 10.1016/j.precisioneng.2017.12.011
- Lücking, C. B., & Brice, A. (2000). Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(13), 1894–1908. DOI: 10.1007/PL00000671
- Ma, K., Thomason, L. A., & McLaurin, J. (2012). Scyllo-Inositol, preclinical, and clinical data

for Alzheimer's disease. *Advances in Pharmacology*, 64, 177-212. DOI: 10.1016/B978-0-12-394816-8.00006-4

Mackiewicz, P., Kowalczyk, M., Mackiewicz, D., Nowicka, A., Dudkiewicz, M., Laszkiewicz, A., Dudek, M.R., & Cebrat, S. (2002). How many protein-coding genes are there in the *Saccharomyces cerevisiae* genome? *Yeast*, 19(7), 619-29. DOI: 10.1002/yea.865

Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., & Fröhlich, K-U. (1999). Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. *The Journal of Cell Biology*, 145, 757-767.

Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S., & Fröhlich, K-U. (2002). A Caspase-Related Protease Regulates Apoptosis in Yeast. *Molecular Cell*, 9, 911-917.

Magen, I., Ostritsky, R., Richter, F., Zhu, C., Fleming, S. M., Lemesre, V., Stewart, A. J., Morimoto, B. H., Gozes, I., & Chesselet, M. F. (2014). Intranasal NAP (davunetide) decreases tau hyperphosphorylation and moderately improves behavioral deficits in mice overexpressing alpha-synuclein. *Pharmacology Research & Perspectives*, 2, e00065. DOI: 10.1002/prp2.65

Mandal, S., Debnath, K., Jana, N. R., & Jana, N. R. (2017). Trehalose-Functionalized Gold Nanoparticle for Inhibiting Intracellular Protein Aggregation. *Langmuir*, 33, 13996-14003. DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b02202

Mandel, R. J., Marmion, D. J., Kirik, D., Chu, Y., Heindel, C., McCown, T., Gray, S. J., & Kordower, J. H. (2017). Novel oligodendroglial alpha synuclein viral vector models of multiple system atrophy: studies in rodents and nonhuman primates. *Acta Neuropathologica Communications*, 5 (1), 1-15. DOI: 10.1186/s40478-017-0451-7

Martínez-Reyes, I., Diebold, L. P., Kong, H., Schieber, M., Huang, H., Hensley, C. T., Mehta, M. M., Wang, T., Santos, J. H., Woychik, R., Dufour, E., Spelbrink, J. N., Weinberg, S. E., Zhao, Y., DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions. *Molecular Cell*, 61, 199-209. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.12.002

- Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M. T., Loureiro, V., & Querol, A. (2006). Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 79–84. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.014
- Matsudomi, N., Takahashi, H., & Miyata, T. (2001). Some structural properties of ovalbumin heated at 80° in the dry state. *Food Research International*, 34, (2–3), 229–235. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00157-5
- Melo, T. Q., Van Zomeren, K. C., Ferrari, M. F., Boddeke, H. W., & Copray, J. C. (2017). Impairment of mitochondria dynamics by human A53T α -synuclein and rescue by NAP (davunetide) in a cell model for Parkinson's disease. *Experimental Brain Research*, 235(3), 731–742. DOI: 10.1007/s00221-016-4836-9
- Merlo, S., Basile, L., Giuffrida, M. L., Sortino, M. A., Guccione, S., & Copani, A. (2015). Identification of 5-Methoxyflavone as a Novel DNA Polymerase-Beta Inhibitor and Neuroprotective Agent against Beta-Amyloid Toxicity. *Journal of Natural Products*, 78(11), 2704–2711. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00621
- Nakazawa, N., Mehrotra, R., Arakawa, O., & Yanagida, M. (2016). ICRF-193, an anticancer topoisomerase II inhibitor, induces arched telophase spindles that snap, leading to a ploidy increase in fission yeast. *Genes to Cells*, 21 (9), 978. DOI: 10.1111/gtc.12397
- Natarajan, S., Xu, C., Caperna, T. J., & Garret, W. M. (2005). Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Analytical Biochemistry*, 342, 214–220. DOI: 10.1016/j.ab.2005.04.046
- Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J. & Filip, M. (2016). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 53, 4094–4125. DOI: 10.1007/s12035-015-9337-5
- Nisbet, R. M., Polanco, J.-C., Ittner, L. M., & Götz, J. (2014). Tau aggregation and its interplay with amyloid- β . *Acta Neuropathologica*, 129(2), 207–220. DOI: 10.1007/s00401-014-1371-2

- Nyemb, K., Guérin-Dubiard, C., Dupont, D., Jardin, J., Rutherford, S. M., & Nau, F. (2014). The extent of ovalbumin in vitro digestion and the nature of generated peptides are modulated by the morphology of protein aggregates. *Food Chemistry*, 157, 429–438. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.048
- O'Neill, K. L., Huang, K., Zhang, J., Chen, Y. & Luo, X. (2016). Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. *Genes & Development*, 30(8), 973–988. DOI: 10.1101/gad.276725.115
- Osakada, F., Hashino, A., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., & Akaike, A. (2003). Neuroprotective effects of α -tocopherol on oxidative stress in rat striatal cultures. *European Journal of Pharmacology*, 465,15–22.
- Palluzzi, F., Ferrari, R., Graziano, F., Novelli, V., Rossi, G., Galimberti, D., Rainero, I., Benussi, L., Nacmias, B., Bruni, A. C., Cusi, D., Salvi, E., Borroni, B., & Grassi, M. (2017). A novel network analysis approach reveals DNA damage, oxidative stress and calcium/cAMP homeostasis-associated biomarkers in frontotemporal dementia. *PLoS ONE*, 12(10), e0185797. DOI: 10.1371/journal.pone.0185797
- Pamudurti, N. R., Bartok, O., Jens, M., Ashwal-Fluss, R., Stottmeister, C., Ruhe, L., Hanan, M., Wyler, E., Perez-Hernandez, D., Ramberger, E., Shenzis, S., Samson, M., Dittmar, G., Landthaler, M., Chekulaeva, M., Rajewsky, N., & Kadener, S. (2017). Translation of CircRNAs. *Molecular Cell*, 66(1), 9–21. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.02.021
- Park, J-B., Lee, J-K., Park, S-J., Kim, K-W. & Riew, D. (2005). Mitochondrial Involvement in Fas-Mediated Apoptosis of Human Lumbar Disc Cells. *The journal of bone and joint surgery*, 87(6), 1338-42. DOI: 10.2106/JBJS.D.02527
- Pearson, P., Lewis, S. A., Britton, J., Young, I. S., & Fogarty, A. (2005). The Pro-Oxidant Activity of High-Dose Vitamin E Supplements in Vivo. *BioDrugs*, 20(5), 271-273. DOI: 10.2165/00063030-200620050-00002
- Pertea, M., Shumate, G., Pertea, G., Varabyou, A., Chang, Y-C., Madugundu, A. K., Pandey, A., & Salzberg, S. L. (2018). Thousands of large-scale RNA sequencing experiments yield

- a comprehensive new human gene list and reveal extensive transcriptional noise. *bioRxiv*, 1-21. DOI: 10.1101/332825
- Pfister, B., Sánchez-Ferrer, A., Diaz, A., Lu, K., Otto, C., Holler, M., Shaik, F. R., Meier, F., Mezzenga, R., & Zeeman, S. C. (2016). Recreating the synthesis of starch granules in yeast. *eLife*, 5, e15552. DOI: 10.7554/eLife.15552
- Pickering, A. M., Vojtovicha, L., Towerb, J., & Daviesa, K. J. A. (2013). Oxidative stress adaptation with acute, chronic and repeated stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 55, 109–118. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.001
- Pinto, P. M., Resende, M. A., Koga-Ito, C. Y., & Tendler, M. (2004). Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. isolates Using random amplified polymorphic DNA. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 99(2): 147-152. DOI:10.1590/S0074-02762004000200006
- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, 88(4), 1243–1276. DOI: 10.1152/physrev.00031.2007
- Raamsdonk, J. M. V., Vega, I. E., & Brundin, P. (2017). Oxidative stress in neurodegenerative disease: causation or association? *Oncotarget*, 8(7), 10777-10778. DOI: 10.18632/oncotarget.14650
- Raven, F., Ward, J. F., Zoltowska, K. M., Wan, Y., Bylykbashi, E., Miller, S. J., Shen, X., Choi, S. H., Ryneerson, K. D., Berezovska, O., Wagner, S. L., Tanzi, R. E., & Zhang, C. (2017). Soluble Gamma-Secretase Modulators Attenuate Alzheimer's β -Amyloid Pathology and Induce Conformational Changes in Presenilin 1. *EBioMedicine*, 24, 93–101. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.08.028
- Richter, K., Konzack, A., Pihlajaniemi, T., Heljasvaara, R., & Kietzmann, T. (2015). Redox-fibrosis: Impact of TGF β 1 on ROS generators, mediators and functional consequences. *Redox Biology*, 6, 344-352. DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.015
- Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative diseases.

Nature medicine, S10-S17. DOI: 10.1038/nm1066

Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2005). What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 891–898. DOI: 10.1038/nrm1742

Sanchez-Mut, J. V., Heyn, H., Vidal, E., Moran, S., Sayols, S., Delgado-Morales, R., Schultz, M. D., Ansoleaga, B., Garcia-Esparcia, P., Pons-Espinal, M., de Lagran, M. M., Dopazo, J., Rabano, A., Avila, J., Dierssen, M., Lott, I., Ferrer, I., Ecker, J. R., & Esteller, M. (2016). Human DNA methylomes of neurodegenerative diseases show common epigenomic patterns. *Translational Psychiatry*, 6, e718. DOI: 10.1038/tp.2015.214

Siddigi, M. K., Alam, P., Chaturvedi, S. K., Nusrat, S., Shahein, Y. E., & HasanKhan, R. (2017). Attenuation of amyloid fibrillation in presence of Warfarin: A biophysical investigation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 713–718. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.110

Soto, C., Kindy, M. S., Baumann, M., & Frangione, B. (1996). Inhibition of Alzheimer's Amyloidosis by Peptides That Prevent β -Sheet Conformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226(3), 672–680. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1413

Sponton, O. E., Perez, A., Carrara, C. R., & Santiago, L. G. (2015). Impact of environment conditions on physicochemical characteristics of ovalbumin heat-Induced nanoparticles and on their ability to bind PUFAs. *Food Hydrocolloids*, 48, 165–173. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.02.011

Summers, D. W., & Cyr, D. M. (2011). Use of yeast as a system to study amyloid toxicity. *Methods*, 53, 226–231. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.11.007

Tatarnikova, O. G., Orlov, M. A., & Bobkova, N. V. (2015). Beta-Amyloid and Tau-Protein: Structure, Interaction, and Prion-Like Properties. *Biochemistry (Moscow)*, 80(13), 1800–1819. DOI: 10.1134/S000629791513012X

Tavassoli, A. (2017). SICLOPPS cyclic peptide libraries in drug discovery. *ScienceDirect*, 38, 30–35. DOI: 10.1016/j.cbpa.2017.02.016

Thomas, S. R., & Stocker, R. (2000). Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: Implications for atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(12), 1795–1805.

- Verbandt, S., Cammue, B. P. A., Thevissen, K. (2016). Yeast as a model for the identification of novel survival-promoting compounds applicable to treat degenerative diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 161(B), 306-316. DOI: 10.1016/j.mad.2016.06.003
- Volkman, R., & Offen, D. (2017). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells in Neurodegenerative Diseases. *Stem cells*, 35 (8), 1867–1880. DOI: 10.1002/stem.2651
- Wang, X., Wang, w., Li, L., Perry, G., Lee, H. G., & Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842 (8), 1240-1247.
- Weijers, M., Barneveld, P. A., Cohen Stuart, M. A., & Visschers R. W. (2003). Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin at neutral pH described by irreversible first-order kinetics. *Protein Science*, 12, 2693–2703. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.10.015
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P. E., & Kluck, R. M. (2011). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica Biophysica Acta.*, 1813(4), 521-31. DOI: 10.1016/j.bbasmcr.2010.12.019
- Wobst, H. J., Sharma, A., Diamond, M. I., Wanker, E. E., & Bieschke, J. (2015). The green tea polyphenol - epigallocatechin gallate prevents the aggregation of tau protein into toxic oligomers at substoichiometric ratios. *Febs Letters*, 589(1), 77–83. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.11.026
- Wu, J., Ryskamp, D. A., Liang, X., Egorova, P., Zakharova, O., Hung, G., & Bezprozvanny, I. (2016). Enhanced Store-Operated Calcium Entry Leads to Striatal Synaptic Loss in a Huntington's Disease Mouse Model. *The Journal of Neuroscience*, 36(1), 125–141. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1038-15.2016
- Xie, M., Han, Y., Yu, Q., Wang, X., Wang, S., & Liao, X. (2016). UCH-L1 Inhibition Decreases the Microtubule-Binding Function of Tau Protein. *Journal of Alzheimer's Disease*, 49(2), 353-363. DOI: 10.3233/JAD-150032
- Yoon, W. H., Sandoval, H., Nagarkar-Jaiswal, S., Jaiswal, M., Yamamoto, S., Haelterman, N. A., Putluri, N., Putluri, V., Sreekumar, A., Tos, T., Aksoy, A., Donti, T., Graham, B. H., Ohno,

- M., Nishi, E., Hunter, J., Muzny, D. M., Carmichael, J., Shen, J., Arboleda, V. A., Nelson, S. F., Wangler, M. F., Karaca, E., Lupski, J. R., & Bellen, H. J. (2017). Loss of Nardilysin, a Mitochondrial Co-chaperone for α -Ketoglutarate Dehydrogenase, Promotes mTORC1 Activation and Neurodegeneration. *Neuron*, 93(1), 115-131. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.11.038
- Zarrouk, A., Nury, T., Samadi, M., O'Callaghan, Y., Hammamib, M., O'Brien, N. M., Lizard, G., & Mackrill, J. J. (2015). Effects of cholesterol oxides on cell death induction and calcium increase in human neuronal cells (SK-N-BE) and evaluation of the protective effects of docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). *Steroids*, 99, 238–247. DOI: 10.1016/j.steroids.2015.01.018
- Zhang, Z., Zhang, Z., Wang, H., Zhang, G., Hu, D., & Xiong, J. (2014). Proliferating Cell Nuclear Antigen Binds DNA Polymerase- β and Mediates 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced Neuronal Death. *Plos One*, 9, 1-8. DOI: 10.1371/journal.pone.0106669
- Zhou, G., Yao, Y., Lu, Z., Yang, X., Han, J., Wang, G., Rao, X., Li, P., Liu, Q., & Song, Q. (2017). Hydrogen peroxide modified egg albumen for transparent and flexible resistive switching memory. *Nanotechnology*, 28, 425202. DOI: 10.1088/1361-6528/aa8397
- Zingg, J.-M., Han, S. N., Pang, E., Meydani, M., Meydani, S. N., & Azzi, A. (2013). In vivo regulation of gene transcription by alpha- and gamma-tocopherol in murine T lymphocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 538(2), 111–119. DOI:10.1016/j.abb.2013.08.010
- Zito, E. (2015). ERO1: A protein disulfide oxidase and H_2O_2 producer. *Free Radical Biology and Medicine*, 83, 299-304.
- Zorzi, A., Deyle, K., & Heinis, C. (2017). Cyclic peptide therapeutics: past, present and future. *Current Opinion in Chemical Biology*, 38, 24-29. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.011