

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Daniela Vilas Boas da Silva Campos

**Avaliação de efeitos neuroprotetores de  
extratos de plantas medicinais**

Daniela Campos **Avaliação de efeitos neuroprotetores de extratos de plantas medicinais**

UMinho | 2018

Fevereiro de 2018





Universidade do Minho  
Escola de Ciências

Daniela Vilas Boas da Silva Campos

## **Avaliação de efeitos neuroprotetores de extratos de plantas medicinais**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e  
Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação de  
**Professor Doutor Alberto Dias**  
**Professora Doutora Patrícia Maciel**

Fevereiro 2018

## Declaração

**Nome:** Daniela Vilas Boas da Silva Campos

**Endereço eletrónico:** danielacampos93@hotmail.com

**Nº cartão de cidadão:** 14372579

**Título da dissertação:**

Avaliação de efeitos neuroprotetores de extratos de plantas medicinais

**Orientador (es):** Professor Doutor Alberto Dias e Professora Doutora Patrícia Maciel

**Designação do Mestrado:** Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

A concretização deste trabalho não seria possível sem a colaboração de diversas pessoas, às quais quero expressar o meu reconhecimento e os mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores, prof. Alberto Dias e prof. Patrícia Maciel pela oportunidade de embarcar neste projeto.

À prof. Patrícia Maciel, por todas as críticas construtivas nas reuniões de quarta-feira, pelo apoio incansável, compreensão e motivação em todas as fases do desenvolvimento desta dissertação de mestrado, e principalmente agradecer pelo conhecimento transmitido.

Ao Carlos Bessa, pela recepção a este mundo de cientistas, pela motivação e toda a ajuda inicial que foi fundamental para o meu desempenho ao longo deste projeto, pelos conhecimentos de estatística, por me ensinares a contar a história do meu trabalho.

À Marta Costa, a minha especial gratidão por toda a disponibilidade e simpatia, por todas as sugestões e orientações nos mais diversos ensaios; pela motivação para nunca desistir; por fazeres com que este projeto andasse para a frente; pelo conhecimento transmitido; pelas correções infinitas e por seres um exemplo a seguir um sincero, MUITO OBRIGADO! Sem ti não seria possível!

À Andreia Castro, o meu obrigado pelos conhecimentos transmitidos e pelas críticas construtivas.

Um Obrigado a todo o grupo dos *C. elegans*, pelas conversas nas salinhas e por me transmitirem os vossos conhecimentos, e a todo o grupo PM por me terem recebido tão bem.

Por fim gostaria de agradecer à minha família pelo apoio incondicional, em especial à minha mãe, por não compreenderes o que faço, mas mesmo assim me apoiares em todas as etapas da minha vida.

Aos meus amigos que sempre demonstraram o seu apoio incentivo durante esta etapa, e que cuidaram da minha Crocas quando eu passava os dias no laboratório.

**Obrigado!**



## Resumo

Existe atualmente uma tendência crescente para o uso de produtos naturais. O conhecimento empírico do uso de plantas medicinais deve ser melhor compreendido e estudado, porque se utilizado de forma adequada, pode proporcionar estratégias alternativas para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial neuroprotetor de extratos de plantas medicinais no modelo *Caenorhabditis elegans*, da doença Machado-Joseph (DMJ) (AT3q130) e num modelo de tauopatia (CK10).

Os resultados indicam que o tratamento crónico (até dia 4) com 1 mg/mL de extrato das folhas de *Hyptis suaveolens* (HS), *Hyptis pectinata* (HP) e *Hyptis marruboides* (HM) resultaram no melhoramento do fenótipo motor nos dois modelos de neurodegeneração estudados. No entanto não se observou um impacto significativo na agregação proteica para o modelo da DMJ. Mostramos também que este tratamento aumentou significativamente a resistência dos animais ao stress oxidativo induzido por 240 µM de juglona, nos modelos de neurodegeneração (>50%) e no modelo selvagem (>28%). Neste contexto, verificou-se um aumento significativo na expressão de um gene repórter para a proteína GST em condições de stress oxidativo. Resultados preliminares indicam que o tratamento crónico levou a um aumento significativo na longevidade no modelo DMJ e, também reduziu significativamente a expressão génica de *skn-1a/c* e apresentou uma tendência para o aumento do gene *gst-10* e *sod-3*.

Estes resultados sugerem um potencial efeito neuroprotetor dos extratos de HS, HP e HM e apoiam a ideia de que os antioxidantes podem ser uma abordagem promissora para impulsionar os sistemas defensivos contra o stress e a neurodegeneração. Neste sentido, será premente estudar os seus mecanismos de ação com mais detalhe, bem como procurar identificar os principais elementos ativos existentes nos extratos usados.

**Palavras-chave:** plantas medicinais; *C. elegans*; doenças neurodegenerativas; stress oxidativo





## Abstract

There is currently a growing trend towards the use of natural products. The empirical knowledge of the use of medicinal plants should be better understood and studied, because if used properly may provide alternative strategies for the treatment of neurodegenerative diseases. This work aims to evaluate the neuroprotective potential of medicinal plant extracts in the *Caenorhabditis elegans* model of Machado-Joseph disease (MDJ) (AT3q130) and a model of tauopathy (CK10).

The results indicate that chronic treatment (up to day 4) with 1 mg/mL extract of *Hyptis suaveolens* (HS), *Hyptis pectinata* (HP) and *Hyptis marrubioides* (HM) leaves resulted in the improvement of the motor phenotype in both models of neurodegeneration studied. However, no significant impact on protein aggregation was observed for the MJD model. We also showed that chronic treatment significantly increased the resistance of animals to oxidative stress induced by 240  $\mu$ M juglone in the neurodegeneration models (> 50%) and wild-type (> 28%). In this context, there was a significant increase in the expression of a reporter gene for the GST protein under conditions of oxidative stress. Preliminary results indicate that chronic treatment led to a significant increase in longevity in the MJD model and significantly reduced the gene expression of *skn-1a/c* and showed a tendency for the *gst-10* and *sod-3* gene to increase.

These results suggest a potential neuroprotective effect of HS, HP and HM extracts, and support the view that antioxidants may be a promising approach to boosting the defense systems against stress and neurodegeneration. In this sense, it will be relevant to study its mechanisms of action in more detail, as well as to identify the main active elements in the extracts used.

Keywords: medicinal plants; *C. elegans*; neurodegenerative diseases; oxidative stress



# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract .....	vii
Lista de abreviaturas .....	xiii
Lista de figuras .....	xv
Lista de tabelas.....	xxi

## Capítulo I - Introdução

1. Breve introdução e considerações gerais.....	3
2. Doenças neurodegenerativas.....	3
2.1. Doença de Alzheimer.....	6
2.1.1. História da descoberta .....	6
2.1.2. Epidemiologia e causas.....	7
2.1.3. Aspectos clínicos e patológicos.....	8
2.2. Demência fronto temporal com Parkinsonianismo ligado ao cromossoma 17 (FTDP17).....	12
2.3. Doenças das Poliglutaminas.....	13
2.3.1. Doença Machado-Joseph/ATAXIA 3 .....	14
2.3.1.1. Epidemiologia e aspectos clínicos .....	14
2.3.1.2. Ataxina-3: agregação, interações e funções.....	15
3. <i>C. elegans</i> como organismo modelo .....	16
3.1. Modelo de DMJ em <i>C. elegans</i> .....	18
3.2. Modelo de Tauopatia em <i>C. elegans</i> .....	19
4. Stress oxidativo e neurodegenerescência.....	20

5. Extratos/compostos naturais.....	21
5.1. Fitoquímicos e plantas medicinais .....	22
5.2. Extratos/Compostos naturais aplicados à neurodegeneração.....	27
6. Organização e objetivos do trabalho.....	33

## Capítulo II- Materiais e Métodos

1. Espécies utilizadas e preparação dos extratos.....	37
2. Estirpes de <i>C. elegans</i> .....	37
3. Crescimento e manutenção de <i>C. elegans</i> .....	39
3.1. <i>E. coli</i> OP50.....	39
4. Sincronização do estadio de desenvolvimento de <i>C. elegans</i> .....	39
4.1. Postura de ovos .....	39
4.2. Sincronização por hipoclorito 20% alcalino .....	40
5. Toxicidade dos extratos.....	40
6. Tratamento dos <i>C. elegans</i> com extratos de plantas.....	41
7. Avaliação dos fenótipos dos modelos de <i>C. elegans</i> da DMJ e de tauopatias.....	42
8. Avaliação da agregação da ataxina-3 em <i>C. elegans</i> modelo de DMJ .....	43
9. Avaliação da descendência no modelo <i>C. elegans</i> de Tauopatia .....	43
10. Tamanho corporal dos <i>C. elegans</i> .....	43
11. Avaliação dos efeitos dos extratos HS, HP e HM na longevidade de <i>C. elegans</i> .....	43
12. Avaliação da resistência ao stress oxidativo induzido por juglona.....	44
13. Avaliação da expressão de marcadores da resposta antioxidante usando estirpes repórter .	45
14. Análise da expressão génica.....	46
14.1. Extração de RNA.....	46
14.2. Tratamento das amostras de RNA com DNAase.....	46

14.3. Verificação da integridade do RNA.....	47
14.4. Síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa.....	47
14.5. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	47
14.5.1. Determinação da eficiência dos primers .....	47
14.6. Reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para análise da expressão de genes .....	48
15. Análise estatística.....	49

### Capítulo III - Resultados e Discussão

1. Avaliação do grau de toxicidade dos extratos de plantas em <i>C. elegans</i> .....	53
2. Avaliação dos efeitos dos extratos de plantas nos fenótipos dos modelos de DMJ (AT3q130) e tauopatias (CK10).....	54
2.1. Impacto do tratamento com extratos de plantas no fenótipo dos animais AT3q130 .....	55
2.1.1. Impacto do tratamento com extratos de plantas no fenótipo motor .....	55
2.1.2. Avaliação do impacto do tratamento na agregação da proteína ATXN-3 mutada.....	61
2.2. Impacto do tratamento com extratos de plantas nos fenótipos dos animais CK10.....	63
2.2.1. Avaliação do impacto dos extratos de plantas no fenótipo motor.....	63
2.2.2. Avaliação do efeito do tratamento no número de descendentes no modelo <i>C. elegans</i> de Tauopatia .....	68
3. Avaliação dos efeitos do tratamento com extrato de HS, HP e HM no tamanho corporal dos <i>C. elegans</i> AT3q130 e CK10 .....	69
4. Avaliação dos efeitos do tratamento com os extratos de HS, HP e HM na longevidade dos <i>C. elegans</i> AT3q130 e CK10 .....	70
4.1. Efeito do pré-tratamento com HS, HP e HM na longevidade dos animais AT3q130 e CK10.....	70
4.2. Efeito do tratamento crônico com HS, HP e HM na longevidade dos animais AT3q130 e CK10.....	73
5. Avaliação da resistência ao stress oxidativo induzido por juglona.....	76
6. Avaliação da expressão de marcadores antioxidantes através de estirpes repórter .....	79

7. Avaliação da expressão génica de enzimas antioxidantes no modelo DMJ.....	83
--	----

## Capítulo IV - Conclusão e Perspetivas Futuras

1. Conclusão e Perspetivas Futuras .....	89
--	----

## Capítulo V - Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas .....	93
----------------------------------	----

## Capítulo VI - Anexos

Anexo I.....	111
--------------	-----

Anexo II.....	112
---------------	-----

Anexo III.....	113
----------------	-----

## Lista de abreviaturas

<b>A<math>\beta</math></b>	Peptídeo $\beta$ -amiloide
<b>ATXN3</b>	ataxina-3
<b>AT3q130</b>	ataxina-3 mutada contendo um segmento de 130 pliglutaminas
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonate
<b>DH</b>	Doença de Huntington
<b>DMJ</b>	Doença de Machado-Joseph
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>DUBs</b>	Enzimas de desubiquitilação
<b>GCS-1</b>	$\gamma$ -glutamyl cisteína sintetase-1
<b>GFP</b>	Proteína fluorescente verde
<b>GST-4</b>	Glutathione s-Transferase-4
<b>HS</b>	<i>Hyptis suaveolens</i>
<b>HSF-1</b>	Fator de transcrição da resposta de choque térmico
<b>HP</b>	<i>Hyptis pectinata</i>
<b>HM</b>	<i>Hyptis marrubioides</i>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogénio
<b>IIS</b>	Via de sinalização da insulina
<b>LB</b>	Luria-Bertani broth
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>NGM</b>	Nematode Growth Medium
<b>NFT</b>	Agregados neurofibrilares
<b>PoliQ</b>	Poliglutamina
<b>PHF-<math>\tau</math></b>	Filamentos helicoidais emparelhados da tau
<b>PSEN1/2</b>	Presenilina-1/presenilina-2
<b>qRT-PCR</b>	Real-time quantitative PCR
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SEM</b>	Erro padrão da média
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SOD</b>	Superoxide dismutase
<b>SKN-1</b>	Fator de transcrição de resposta ao stress oxidativo
<b>TFs</b>	Fatores de transcrição
<b>WT</b>	Wild-type
<b>UIMs</b>	Motivos de interação com a ubiquitina
<b>UPS</b>	Sistema ubiquitina proteossoma
<b>YFP</b>	Proteína fluorescente amarela





## Lista de figuras

### Capítulo I - Introdução

- Figura 1.** Prevalência das doenças neurodegenerativas com a idade. A) Doenças com início precoce, < 65 anos. (B) demência com início tardio ( $\geq 65$  anos) (Kester e Scheltens 2009)..... 4
- Figura 2.** Agregados cerebrais em doenças neurodegenerativas. As placas extracelulares de amilóide (setas brancas) e os emaranhados neurofibrilares intracitoplasmáticos (setas amarelas) são a assinatura patológica da doença de Alzheimer. Os agregados intracitoplasmáticos estão tipicamente presentes nos neurônios de pessoas afetadas pela doença de Parkinson e ELA. As inclusões intranucleares de huntingtina são observadas em pacientes com doença de Huntington. Apesar das diferentes composições de proteínas, a estrutura desses depósitos parece ser semelhante e composta principalmente de uma rede de polímeros fibrilares (centro) (adaptado de Soto 2003)..... 6
- Figura 3.** Principais fatores de risco para a doença de Alzheimer (adaptado de Kester e Scheltens 2009) ..... 7
- Figura 4.** Representação de um cérebro saudável e com doença de Alzheimer, com representação de um neurônio saudável (A) e de uma paciente com DA (B) com deposição de placas A $\beta$  e NFTs. (adaptado de «Alzheimer’s Progression - Alzheimer’s Association»; Falco et al. 2016)..... 8
- Figura 5.** Áreas cerebrais afetadas na doença de Alzheimer. Afetando inicialmente (a) as áreas relacionadas com memória/aprendizagem e planejar/pensar progressivamente espalhando-se pelo córtex (b) e afetar áreas envolvidas no discurso/compreensão e noção de espaço (c). (d) Diferentes regiões do cérebro, destacadas a vermelho as áreas mais afetadas pela DA (adaptado de «Alzheimer’s Progression - Alzheimer’s Association»; Falco et al. 2016)..... 10
- Figura 6.** A patologia molecular multifacetada de AD. Representação esquemática das causas possíveis para AD, onde os eventos causais podem interagir entre eles e formar uma rede, resultando na morte neuronal observada nos doentes (adaptado de Sulistio e Heese 2015)..... 11
- Figura 7.** Ciclo de vida de *C. elegans*, a 20 °C. Após a eclosão do ovo, passa por 4 estado larvares (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta (aproximadamente 4 dias). ..... 17
- Figura 8.** Expressão pan-neuronal de ATXN3 contendo expansões de PoliQ de diferente tamanho (Q14, Q15, Q130) em *C. elegans*. A expressão das proteínas AT3q14 e AT3q75 apresenta um padrão de distribuição suave e difusa (A e B), enquanto as proteínas AT3q130 são encontradas em focos discretos em certos neurónios e são solúveis em outros (C). A expressão da proteína AT3q14 (A) pode ser visualizada em corpos celulares (seta fina) e em processos neuronais (seta grossa). A distribuição das proteínas AT3q130 (C) é diferente: a formação de focos é claramente evidente no VNC (flecha fina), DNC (flecha grossa) e em certas células do anel nervoso (cabeça de seta). Todos os animais representados são adultos jovens (4 dias após a incubação). Escala 100  $\mu$ m. As caixas brancas indicam regiões ampliadas (adaptado de Teixeira-Castro, et al. 2011)..... 19
- Figura 9.** Mutação da tau na demência frontotemporal FTDP-17. (a) Diagrama esquemático das seis isoformas da Tau (352–441 aa) expressas no cérebro adulto de um humano, com mutações na região de codificação indicadas usando a isoforma 441-aa. As seis isoformas são produzidas por *splicing* do mRNA alternativo a partir de um único gene e diferem pela presença ou ausência de três inserções, indicado a vermelho (codificado pelo exão 2), verde (codificado pelo exão 3) e amarelo (codificado pelo exão 10). São mostradas 19 mutações missense, duas mutações de exclusão e três mutações silenciosas, mas que afetam o *splicing*. (Kraemer et al.

2003) produziram linhas de *C. elegans* transgênicos para a isoforma 412-aa (seta) sem e com mutações P301L ou V337M (indicado em vermelho). (b) Estrutura no pré-mRNA no limite entre o exão 10 e o intrão que o segue, com nove mutações que desestabilizam o loop do caule. As sequências de exões estão em caixas e são mostradas em letras maiúsculas, e as sequências de intrão são mostradas em letras minúsculas (Michel Goedert 2003).20

**Figura 10.** Novos medicamentos aprovados entre 1981-2014; n = 1562. B, Biológico: péptido ou proteína (> 50 resíduos) isolada de um organismo/linha celular ou produzida por meios biotecnológicos através de um hospedeiro substituto; V, vacinas; S, droga sintética; S\*, droga sintética mas o farmacóforo de origem natural; N, produto natural, não modificado estruturalmente, embora possa ser semi- ou totalmente sintético; NB, produto natural “droga botânica”; ND, derivado de um produto natural, modificação semi-sintética (adaptado de Newman e Cragg 2016).....22

## Capítulo II - Materiais e Métodos

**Figura 11.** Representação esquemática do ensaio de toxicidade dos extratos de plantas. Os nemátodes da estirpe N2 são incubados numa placa de 96-poços com *E. coli* OP50 como fonte de comida e diferentes concentrações de extrato. A densidade ótica é medida todos os dias usando o leitor de microplacas (Bio-Rad microplate reader 680), durante 7 dias. ....41

**Figura 12.** Representação esquemática do ensaio de motilidade. Os nemátodes L1's sincronizados da estirpe AT3q130, CK10 e N2 (controlo) são incubados com extratos de plantas ou 1% DMSO (controlo). Ao dia 4, é avaliado o efeito no movimento espontâneo (2 vídeos de 1 minuto) e estimulado (1 vídeo de 30 segundos) dos animais através da realização de vídeos, após a ausência de comida por 30 minutos. Estes são processados utilizando o software Image J e o plugin Wrmtrck. ....42

**Figura 13.** Representação esquemática do ensaio de resistência ao stress oxidativo. Os nemátodes sincronizados no estadio L1 são incubados com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL. Ao dia 4, são sujeitos ao stress oxidativo induzido pela exposição em meio líquido a 240 µM de juglona, e 16h depois quantificada a sobrevivência. ....44

**Figura 14.** Representação esquemática do ensaio de expressão de genes codificantes de proteínas antioxidantes usando estirpes repórter. Os *C. elegans* CL2166 e LD1171 foram incubados com extrato de HS, HP e HM e ao dia 4, foi avaliada por microscopia de fluorescência a expressão génica de genes repórter em condições normais e de stress oxidativo induzido por 150uM de juglona.....45

## Capítulo III - Resultados e Discussão

**Figura 15.** Determinação do grau de toxicidade dos extratos de plantas em *C. elegans* da estirpe selvagem N2. A quantidade de bactéria OP50 foi monitorizada a cada 24 h, durante 7 dias utilizando o leitor de microplacas para medir a absorvância a 595 nm (Infinite®200 NanoQuant (Tecan). Resultados representativos de 3 ensaios independentes. ....54

**Figura 16.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de HS \*\* (A), HP \*\*\* (B) e HM \*\*\* (C) no fenótipo motor de um modelo de DMJ em *C. elegans*. Animais adultos, crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento espontâneo na ausência de comida e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 100 animais, divididos por 2 vídeos de 1 minuto, por condição experimental e experiencia independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o

erro padrão da média de 8 experiências independentes para HS, 7 para HP e 6 para HM. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.....56

**Figura 17.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de HS NS (A), HP NS (B) e HM \* (C) no fenótipo motor de um modelo de DMJ em *C. elegans*. Animais adultos crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento estimulado e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 50 animais, com 1 vídeo de 30 segundos, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 8 experiências independentes para HS, 7 para HP e 6 para HM. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001. ....57

**Figura 18.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de LR NS (A) e LB NS (B) no fenótipo motor de um modelo de DMJ em *C. elegans*. Animais adultos crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento espontâneo na ausência de comida e determinação da velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 100 animais, divididos por 2 vídeos de 1 minuto, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 8 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.....58

**Figura 19.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de LR NS (A) e LB NS (B) no fenótipo motor de um modelo de DMJ em *C. elegans*. Animais adultos crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento estimulado e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 50 animais, com 1 vídeo de 30 segundos, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 8 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.....58

**Figura 20.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de EP NS (A), PL NS (B) e GE NS (C) no fenótipo motor de um modelo de DMJ em *C. elegans*. Animais adultos crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento espontâneo na ausência de comida e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 100 animais, divididos por 2 vídeos de 1 minuto, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001. ....59

**Figura 21.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos EP NS (A), PL NS (B) e GE NS (C) no fenótipo motor de um modelo de DMJ em *C. elegans*. Animais adultos, crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento estimulado e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 50 animais, com 1 vídeo de 30 segundos, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.....60

**Figura 22.** Efeito dos extratos de HS, HP e HM na agregação da ATXN-3 mutada no modelo AT3q130. Os nematodes sincronizados no estadio L1 foram incubados com 1 mg/mL de extrato até dia 4. As fotografias foram tiradas usando o microscópio Confocal. A quantificação do padrão de agregação da ATXN-3 mutada foi realizada recorrendo ao software MeVisLab, nomeadamente número de agregados (A) (com p=0,07 para HS, p=0,04 para HP e p=0,149 para HM), número de agregados pela área do animal (B) (com p=0,519 para HS, p=0,771 para

HP e  $p=0,988$  para HM), e pela área total dos agregados (C) (com  $p=0,838$  para HS,  $p=0,159$  para HP e  $p=0,174$  para HM). A estatística foi realizada por ANOVA unidirecional (Dunnet T3 (bilateral)) comparando o grupo controle (DMSO 1%) com os grupos tratados. Os gráficos mostram um ensaio independente representativo de 3 ensaios independentes, com 8 animais analisados por condição. ....62

**Figura 23.** Avaliação do impacto do tratamento crônico com os extratos de HS \*\* (A), HP \*\*\* (B) e HM \*\*\* (C) no fenótipo motor de um modelo de tauopatia em *C. elegans*. Animais adultos crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento espontâneo na ausência de comida e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 100 animais, divididos por 2 vídeos de 1 minuto, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001. ....65

**Figura 24.** Avaliação do impacto do tratamento crônico com os extratos de HS \* (A), HP \* (B) e HM \*\* (C) no fenótipo motor de um modelo de tauopatia em *C. elegans*. Animais adultos crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento estimulado e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 50 animais, com 1 vídeo de 30 segundos, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001. ....66

**Figura 26.** Avaliação do impacto do tratamento crônico com os extratos de LR NS (A) e LB NS (B) no fenótipo motor de um modelo de tauopatia em *C. elegans*. Animais adultos, crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento espontâneo na ausência de comida e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 100 animais, divididos por 2 vídeos de 1 minuto, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001. ....67

**Figura 25.** Avaliação do impacto do tratamento crônico com os extratos LR NS (A) e LB NS (B) no fenótipo motor de um modelo de tauopatia em *C. elegans*. Animais adultos, crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento estimulado e determinação da velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 50 animais, com 1 vídeo de 30 segundos, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001. ....67

**Figura 27.** Avaliação da produção de descendência dos animais tratados com extrato de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL. Os animais em estadio L4 sincronizados foram transferidos individualmente para novas placas de NGM e transferidos a cada 24 h para novas placas até cessarem a postura de ovos. Foram analisados 10 animais por condição e ensaio independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 3 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,01; \*\*\* p-value < 0,001. ....68

**Figura 28.** Avaliação do efeito no tamanho corporal das estirpes N2 (A), CK10(B) e At3q130(C). Os nemátodes na fase larvar L1 sincronizados foram incubados com 1 mg/mL de extrato de HS, HP e HM. Ao dia 4, foram tiradas fotografias com as mesmas definições e trabalhadas usando o software Image J. Não houve diferenças

significativas no comprimento corporal em nenhuma das estirpes testadas ( $p > 0,05$ ). Foram analisados  $\approx 50$  animais por condição e ensaio independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnett bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 5 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,01; \*\*\* p-value < 0,001. .69

**Figura 29.** Avaliação dos efeitos na longevidade na estirpe AT3q130, do pré-tratamento com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL e 1% DMSO (controle) até estado larvar L4. O gráfico representa 1 ensaio, com 100 animais testados por condição. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).....71

**Figura 30.** Avaliação dos efeitos na longevidade da estirpe CK10, do pré-tratamento com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL e 1% DMSO (controle) até estado larvar L4. O gráfico representa 1 ensaio, com 100 animais testados por condição. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).....72

**Figura 31.** Avaliação dos efeitos na longevidade nos animais WT. Os nemátodes da estirpe N2 foram expostos a um tratamento crônico com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL ou com 1% DMSO (controle). O gráfico representa 1 ensaio, com 100 animais testados por condição. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). .....73

**Figura 32.** Avaliação dos efeitos na longevidade no modelo de tauopatias. Os nemátodes da estirpe CK10 foram expostos a um tratamento crônico com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL ou com 1% DMSO (controle). O gráfico representa 1 ensaio, com 100 animais testados por condição. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). .....74

**Figura 33.** Avaliação dos efeitos na longevidade no modelo da DMJ. Os nemátodes da estirpe AT3q130 foram expostos a um tratamento crônico com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL, ou com 1% DMSO (controle). O gráfico representa 1 ensaio, com 100 animais testados por condição. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). .....74

**Figura 34.** Avaliação dos efeitos dos extratos de HS, HP e HM na resistência ao stress oxidativo induzido pela exposição em meio líquido a 240  $\mu$ M de juglona (1h), em animais N2 (A), AT3q130 (B) e CK10 (C), dia 4. Observamos diferenças significativas nas sobrevivências dos WT quando tratados com HS ( $p=0,013$ , \* (28%)), HP ( $p=0,005$ , \*\* (34%)) e HM ( $p=0,009$ , \*\* (30%)), bem como para AT3q130 tratados com HS ( $p=0,000$ , \*\*\* (55%)), HP ( $p=0,000$ , \*\*\* (58%)) e HM ( $p=0,000$ , \*\*\* (54%)), e também para CK10 quando tratados com HS ( $p=0,000$ , \*\*\* (61%)), HP ( $p=0,000$ , \*\*\* (65%)) e HM ( $p=0,000$ , \*\*\* (64%)). Foram analisados 100-150 animais por condição e ensaio independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnett bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 5 experiências independentes para CK10 e AT3q130 e 3 para o WT. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,01; \*\*\* p-value < 0,001. ....78

**Figura 35.** Efeito do extrato HS, HP e HM (A) na expressão de *gst4p::GFP*. A intensidade de fluorescência relativa (%) da GFP (B) na estirpe repórter CL2166 (*gst-4p::GFP*), quando tratados de L1 até dia 4 com 1 mg/mL de extrato de HS, HP e HM em condições normais e de stress oxidativo induzido por 150  $\mu$ M juglone (1h + 3h de recuperação). Foi utilizado o microscópio de fluorescência e a intensidade de fluorescência GFP foi quantificada usando o software Image J. Foram analisados 10 animais por condição e ensaio independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnett bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,01; \*\*\* p-value < 0,001.....81

**Figura 36.** Efeito dos extratos de HS, HP e HM na expressão de *gcs-1p::GFP*: A intensidade de fluorescência relativa (%) da GFP na estirpe repórter LD1171 (*gcs-1p::GFP*), quando tratados de L1 até dia 4 com 1 mg/mL de extrato de HS, HP e HM em condições normais e de stress oxidativo induzido por 150  $\mu$ M juglone (1h + 3h de recuperação). Foi utilizado o microcópico de fluorescência e a intensidade de fluorescência GFP foi quantificada usando o software Image J). Foram analisados 10 animais por condição e ensaio independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,01; \*\*\* p-value < 0,001. ....82

**Figura 37.** Expressão do fator de transcrição SKN-1 (isoformas a e c) (A) e dos genes *gst-10* (B) e *sod-3* (C) no modelo da DMJ após tratamento com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL. O gráfico representa níveis médios de expressão relativa aos genes de referência *rpb-2* e *pmp-3* considerando 2-4 réplicas biológicas e pelo menos 2 réplicas técnicas. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média e os asteriscos indicam p-values <0,002 (\*\*) e <0,033 (\*) no teste One-Way Anova.....84

## Capítulo VI - Anexos

<b>Figura 38.</b> Eficiência do primer <i>gst-10</i> . ....	113
<b>Figura 39.</b> Eficiência do primer <i>skn-1a/c</i> . ....	113
<b>Figura 40.</b> Eficiência do primer <i>sod-3</i> . ....	113
<b>Figura 41.</b> Eficiência do primer <i>pmp-3</i> . ....	113
<b>Figura 42.</b> Eficiência do primer <i>rpb-2</i> . ....	113

## Lista de tabelas

### Capítulo I - Introdução

Tabela 1. Doenças neurodegenerativas: proteínas e patologia (adaptado de Ross e Poirier 2004) .....	5
Tabela 2. Doenças das poliglutaminas. ....	13

### Capítulo II - Materiais e Métodos

Tabela 3. Extratos de plantas usados neste estudo. ....	37
Tabela 4. Estirpes modelo de doenças neurodegenerativas utilizadas neste estudo (wormbase.com). ....	38
Tabela 5. Estirpes repórter utilizadas neste estudo (Wormbase.com). ....	38
Tabela 6. Concentrações de extratos de plantas testadas. ....	41
Tabela 7. Primers utilizados no qPCR. ....	48

### Capítulo III - Resultados e Discussão

Tabela 8. Efeito do pré-tratamento com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL na longevidade da estirpe AT3q130. ....	71
Tabela 9. Efeito do pré-tratamento com 1 mg/mL de extratos de HS, HP e HM na longevidade da estirpe CK10. ....	72
Tabela 10. Efeito na longevidade dos WT, AT3q130 e CK10 expostos ao tratamento crônico com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL. ....	75

### Capítulo VI - Anexos

Tabela 11. Quantificação do RNA utilizando NanoDrop, para tratamento com DNAase. ....	111
Tabela 12. Quantificação do RNA utilizando NanoDrop, para síntese de cDNA. ....	112





# Capítulo I

## Introdução



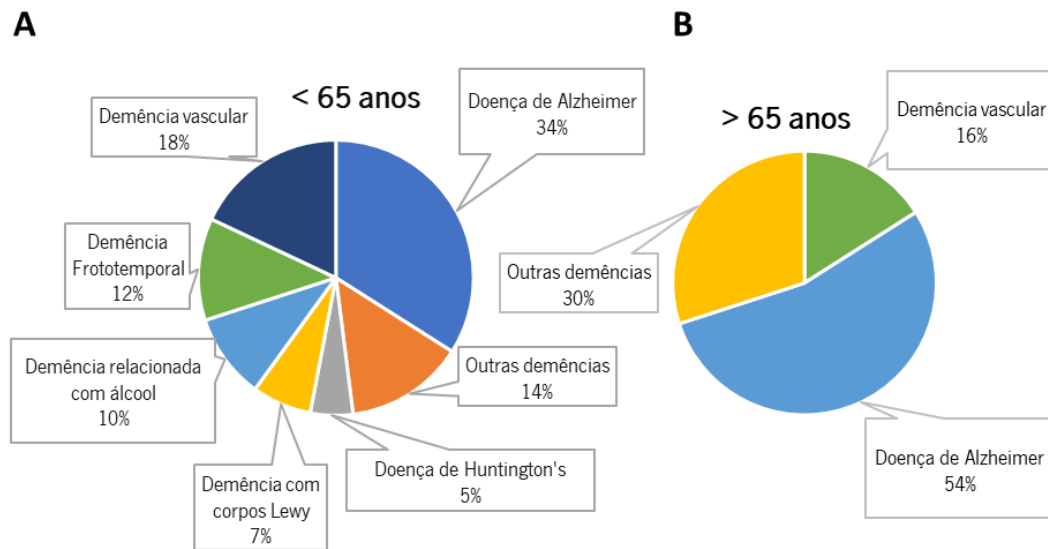
## 1. Breve introdução e considerações gerais

O conhecimento empírico adquirido pelo Homem sobre plantas medicinais resulta de um conjunto de experiências, ao longo de várias gerações, onde os seres humanos descobriram que a Natureza lhes podia dar soluções para as suas necessidades na cura de um amplo espectro de doenças. No entanto, a capacidade terapêutica destas moléculas deve ser confirmada pela ciência, potencializando a sua utilização ou dos seus derivados. Na atualidade, em que existe uma tendência crescente para o uso de produtos naturais, torna-se fundamental a descoberta e o desenvolvimento do potencial terapêutico de compostos presentes em plantas medicinais que poderão torna-se uma resposta à cura de várias doenças, nomeadamente doenças neurodegenerativas (DNs). Num contexto em que, devido aos avanços tecnológicos nas mais diversas áreas, assistimos a uma evolução na qualidade de vida do Homem, traduzida por exemplo no aumento da longevidade da população e, conseqüentemente uma maior incidência de doenças associadas ao envelhecimento, como é o caso das DNs. Existe uma tendência para as indústrias farmacêuticas apostarem em fontes naturais para a descoberta de novos compostos terapêuticos, que sejam aplicáveis em todo o espectro de doenças. São várias as razões que estão a impulsionar o crescimento do uso de plantas medicinais no mercado mundial: a valorização de uma vida de hábitos mais saudáveis e, conseqüentemente, o consumo de produtos naturais; os efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos; a descoberta de novos princípios ativos nas plantas; e o preço que, de maneira geral, é mais acessível à população com menor poder económico.

## 2. Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas (DNs) são um grupo heterogéneo de distúrbios que se caracterizam pela degeneração progressiva da estrutura e função do sistema nervoso central ou do sistema nervoso periférico, marcados pela perda de neurónios no cérebro e/ou medula espinhal. Estas doenças afetam milhões de pessoas em todo o mundo e são um fardo social e financeiro, sendo por isso fundamental o desenvolvimento de novas estratégias para prevenir e regredir os efeitos destas doenças. No grupo das doenças neurodegenerativas estão incluídas a doença de Alzheimer (DA), as ataxias espinocerebelosas (SCAs), a doença de Parkinson (DP), a doença de Huntington (DH), e a esclerose lateral amiotrófica (ELA) que são caracterizadas por disfunção neuropsiquiátrica progressiva e pela perda de estrutura e função de circuitos neuronais específicos que, por sua vez, resultam em sintomas comportamentais com diferentes graus de severidade. As DNs podem ocorrer na maioria dos casos de forma esporádica (por exemplo DA, DP, ELA), embora possam existir também numa base completamente hereditária (por

exemplo, DH e SCAs) (Muchowski 2002). Está descrito que o envelhecimento é um importante fator de risco para estas doenças (Fig.1), que apresentam no geral uma incidência predominante em indivíduos com mais de 65 anos (Kester e Scheltens 2009).



**Figura 1.** Prevalência das doenças neurodegenerativas com a idade. A) Doenças com início precoce, < 65 anos. (B) demência com início tardio ( $\geq 65$  anos) (Kester e Scheltens 2009).

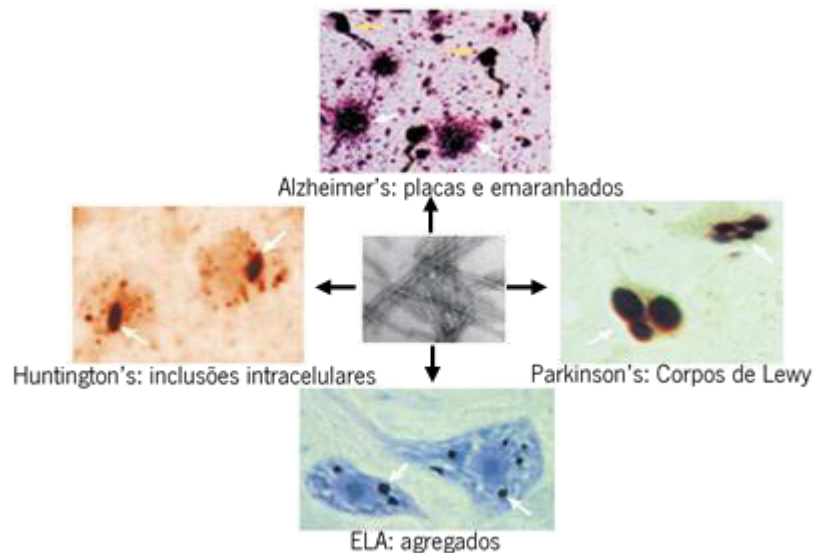
Apesar das suas diferenças várias ao nível dos sintomas clínicos e da própria progressão, as DN's partilham algumas características comuns nomeadamente o facto de todas surgirem numa fase mais tardia da vida (com algumas exceções), e de a sua patologia ser caracterizada por perda neuronal, anomalias sinápticas e agregação proteica (Martin 1999). As DN's podem assim ter causas e mecanismos patológicos comuns (Tabela 1), nomeadamente a alteração da conformação proteica, agregação e acumulação de proteínas no cérebro (Fig.2), resultando em disfunção neuronal.

Existindo uma tendência crescente para uma população mais envelhecida, torna-se crucial compreender os mecanismos implicados na disfunção celular que ocorre durante o envelhecimento, podendo ser definida como uma perda progressiva de funções que aumenta a vulnerabilidade aos fatores ambientais e o risco de doença e morte (Mrak et al. 1997).

Tabela 1. Doenças neurodegenerativas: proteínas e patologia (adaptado de Ross e Poirier 2004)

Doença	Etiologia	Regiões mais afetadas	Características da patologia	Depósitos de proteínas da doença
<b>Doença de Alzheimer (DA)</b>	Esporádica (95%) (fator de risco ApoE) Hereditário (5%) Proteína precursora de Amilóide (APP) (dominante) Presenilina 1, 2 (dominante)	Córtex, hipocampo, encéfalo frontal, tronco cerebral	Placas neuríticas e agregados neurofibrilares	Péptido A $\beta$ (clivagem APP) e hiperfosforilação da Tau
<b>Demência fronto-temporal com Parkinsonismo</b>	Mutações na Tau (dominante)	Córtex frontal e temporal, hipocampo	Corpos de Pick	Hiperfosforilação da proteína Tau
<b>Doença poliglutaminas</b>	Atrofina-1; ataxina-1-3, etc; recetor de androgénos (RA) (dominante)	Gânglios basais, tronco cerebral, cerebelo, medula espinhal	Inclusões intracelulares	Atrofina-1, ataxinas ou RA
<b>Doença de Parkinson</b>	Esporádica $\alpha$ -sinucleína (dominante) parkina (DJ-1, PINK1) recessivo (alguns dominantes)		Corpos de Lewy	$\alpha$ -sinucleína
<b>Doença de Huntington</b>	Huntingtina (dominante)	Estriado, gânglios basais, córtex entre outras regiões	Inclusões intracelulares e agregados citoplasmáticos	Huntingtina com expansão nas poliglutaminas
<b>Esclerose lateral amiotrófica (ELA)</b>	Esporádico Superóxido dismutase-1 (dominante)	Neurónios motores espinhais e córtex motor	Corpos de Bunina e esferóides axonais	-

Estudos em diferentes áreas apoiam fortemente esta hipótese e indicam que uma terapia comum para estas doenças pode ser possível (Soto 2003). Por exemplo, em todos os principais exemplos dessas doenças, existem fortes evidências de que a disfunção mitocondrial ocorre cedo e atua causalmente na patogénese de várias destas doenças (Lin e Beal 2006). As mitocôndrias têm um papel central nas doenças neurodegenerativas, pois estas são reguladores críticos da morte celular, uma característica fundamental da neurodegeneração. As mutações no DNA mitocondrial e o stress oxidativo contribuem para o envelhecimento, que é o maior fator de risco para doenças neurodegenerativas.



**Figura 2.** Agregados cerebrais em doenças neurodegenerativas. As placas extracelulares de amilóide (setas brancas) e os emaranhados neurofibrilares intracitoplasmáticos (setas amarelas) são a assinatura patológica da doença de Alzheimer. Os agregados intracitoplasmáticos estão tipicamente presentes nos neurônios de pessoas afetadas pela doença de Parkinson e ELA. As inclusões intranucleares de huntingtina são observadas em pacientes com doença de Huntington. Apesar das diferentes composições de proteínas, a estrutura desses depósitos parece ser semelhante e composta principalmente de uma rede de polímeros fibrilares (centro) (adaptado de Soto 2003).

## 2.1. Doença de Alzheimer

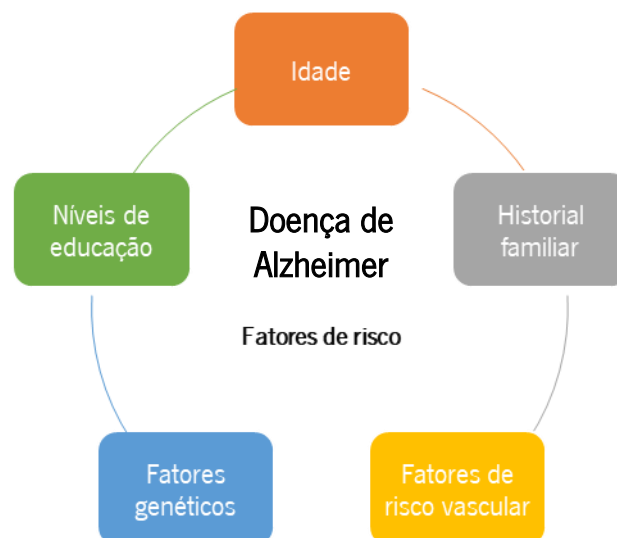
### 2.1.1. História da descoberta

A Doença de Alzheimer (DA) foi descoberta há mais de um século pelo médico alemão Alois Alzheimer, quando estudava um caso clínico de uma paciente de 51 anos com sintomas de perda de memória progressiva, alucinações e delírios. Após a sua morte, identificou as principais características neuropatológicas da doença, como a presença de depósitos extra e intracelulares (que viriam a ser caracterizados mais tarde), e também a perda neuronal (Michel Goedert e Spillantini 2006). Estima-se que atualmente existam cerca de 46,8 milhões de pessoas que possuem algum tipo de demência («World Alzheimer Report 2016 | Alzheimer's Disease International»), e as previsões sugerem que o número pode duplicar a cada 20 anos, podendo atingir os 74,7 milhões em 2030 e 131,5 milhões em 2050. Entre os vários tipos de demência, a DA é a mais prevalente, representando cerca de 70 a 80% dos casos. Está relacionada principalmente com o envelhecimento, uma vez que a maior parte dos casos ocorre em indivíduos com mais de 65 anos de idade e aumenta de forma progressiva com a idade, apresentando uma incidência predominante em indivíduos com mais de 85 anos. Em pacientes mais jovens, a doença de Alzheimer é relativamente pouco comum, enquanto a demência

frontotemporal, a demência relacionada com o abuso de álcool e outras doenças como a esclerose múltipla são relativamente mais comuns (Kester e Scheltens 2009).

### 2.1.2. Epidemiologia e causas

A patologia da DA é um processo complexo, geneticamente heterogênea e progressiva, podendo ser causada por uma acumulação de eventos genéticos, bem como fatores ambientais (Fig. 3), sendo o envelhecimento o maior fator de risco. A forma hereditária de DA (<40 anos), que representa menos de 5% de todos os casos de DA (Campion et al. 1999) é causada por mutações dominantes raras em genes que codificam a proteína precursora amiloide (APP) e/ou enzimas envolvidas no seu processamento como os componentes do complexo  $\gamma$ -secretase (PSEN), PSEN1 e PSEN2 (Shastri 1998). A DA também pode manifestar-se de forma esporádica, quando não há indícios explícitos sobre a patogênese, podendo a mesma ser desencadeada por diversos fatores, sendo a forma mais prevalente, representando mais de 90% dos casos. O seu início geralmente ocorre em indivíduos com idade entre 60 e 70 anos (Crews e Masliah 2010).

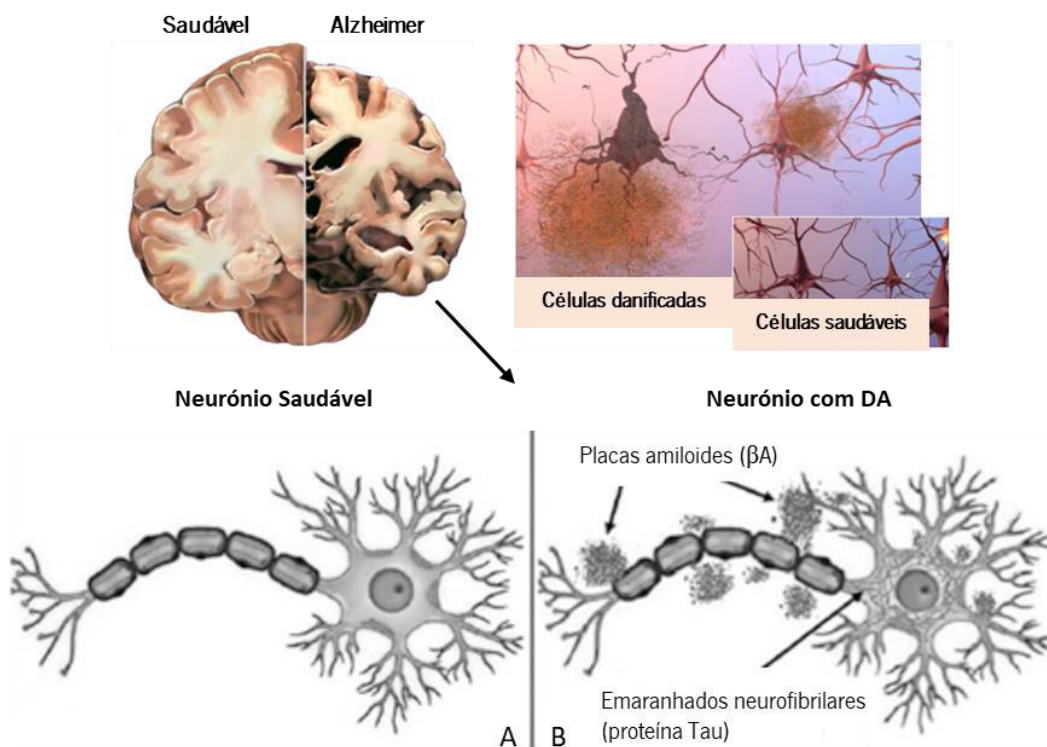


**Figura 3.** Principais fatores de risco para a doença de Alzheimer (adaptado de Kester e Scheltens 2009)

### 2.1.3. Aspetos clínicos e patológicos

Do ponto de vista clínico entre os sintomas apresentados estão a afasia, que consiste numa desordem linguística com dificuldades de fluência, compreensão e associação de palavras, a apraxia que se caracteriza pela perda da capacidade de executar movimentos e agnosia que corresponde à perda da capacidade de reconhecer ou identificar objetos e/ou familiares (Helmes e Østbye 2002). As regiões do cérebro mais afetadas em doentes com DA estão localizadas, sobretudo, nas amígdalas cerebelosas, no hipocampo e no córtex entorrinal (Fig. 5) do lóbulo temporal (Serrano-Pozo et al. 2011).

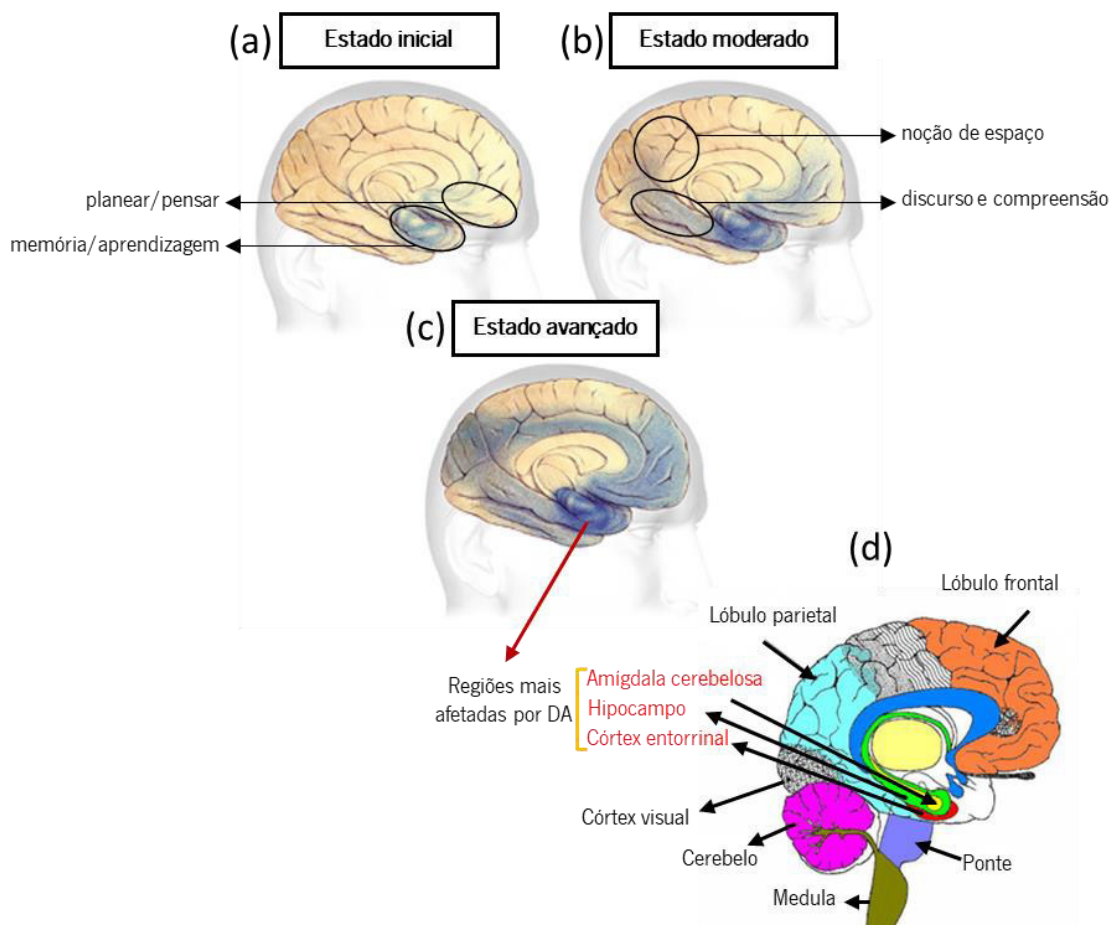
Em doentes com DA, os dados neuropatológicos mais relevantes são a existência de atrofia cortical difusa, perdas neuronais e sinápticas, degeneração neurovascular e, a presença de placas de amiloide extracelulares compostas por agregados filamentosos da proteína  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A) e agregados neurofibrilares intracelulares (NFT's) da proteína Tau (Fig. 4) (Gandhi e Wood 2010; Serrano-Pozo et al. 2011). A  $A\beta$  é formada a partir da clivagem da APP em monómeros solúveis que depois se agregam em fibrilas e são eventualmente depositados como placas no espaço extracelular. A Tau é uma proteína associada aos microtúbulos que sofre hiperfosforilação e se acumula como inclusões intraneuronais ou emaranhados no cérebro de indivíduos com Alzheimer doença (Hardy 2006; Small e Duff 2008).



**Figura 4.** Representação de um cérebro saudável e com doença de Alzheimer, com representação de um neurónio saudável (A) e de uma paciente com DA (B) com deposição de placas  $A\beta$  e NFTs. (adaptado de «Alzheimer's Progression - Alzheimer's Association»; Falco et al. 2016)

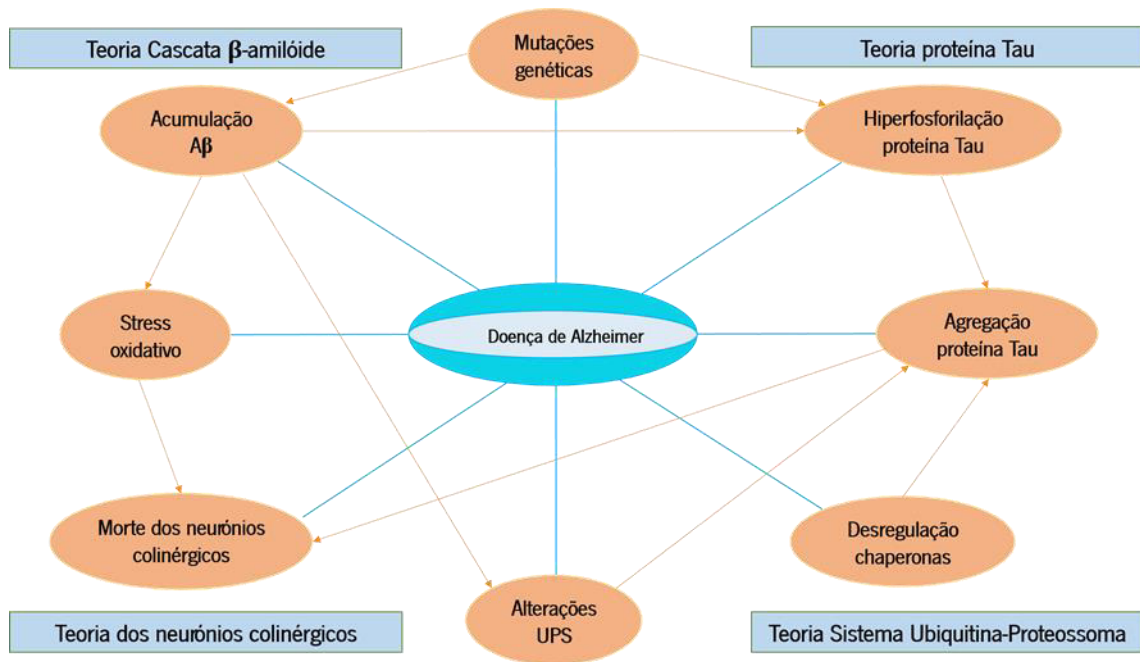


As placas amilóides extracelulares e os NFTs representados na Fig.4, têm uma tendência para se espalharem pelo córtex com um padrão previsível à medida que a doença avança. Estas alterações podem ter início 20 anos antes do diagnóstico da doença, e nos estados iniciais, antes que os sintomas possam ser detetados, as placas e os emaranhados começam a formar-se em áreas cerebrais envolvidas na aprendizagem/memória e capacidade de planear/pensar (Fig.5(a)). Em estados moderados, as regiões cerebrais relacionadas com memória/aprendizagem e com o planeamento/pensamento desenvolvem mais placas e emaranhados do que estavam presentes nos estágios iniciais, e estes espalham-se por outras áreas (Fig.5(b)) e como resultado os doentes têm dificuldades em comunicar e compreender, perdendo a noção espacial do seu corpo em relação aos objetos envolventes. À medida que a doença de Alzheimer progride, a maior parte do córtex fica seriamente afetada (Fig.5(c)), devido à morte celular generalizada e os indivíduos perdem a capacidade de comunicar, reconhecer familiares e cuidar de si mesmos («Alzheimer's Progression - Alzheimer's Association»). As terapias atuais para pacientes com DA são direcionadas para aliviar os sintomas comportamentais e psicológicos associados à demência, proporcionando uma melhoria temporária e reduzindo a taxa de declínio cognitivo, prevenindo a progressão da doença (Chu 2012). Embora os mecanismos patológicos envolvidos na DA ainda não estejam completamente caracterizados, pensa-se que a deposição de  $\beta$ -amilóide extracelular e a hiperfosforilação de tau intracelular sejam dois eventos críticos (Fig.6) a causar a disfunção neuronal (Hong-Qi et al. 2012).



**Figura 5.** Áreas cerebrais afetadas na doença de Alzheimer. Afetando inicialmente (a) as áreas relacionadas com memória/aprendizagem e planejar/pensar progressivamente espalhando-se pelo córtex (b) e afetar áreas envolvidas no discurso/compreensão e noção de espaço (c). (d) Diferentes regiões do cérebro, destacadas a vermelho as áreas mais afetadas pela DA (adaptado de «Alzheimer's Progression - Alzheimer's Association»; Falco et al. 2016).

São várias as hipóteses que procuram explicar os mecanismos patológicos envolvidos na DA (Fig.6), e nenhuma deve ser considerada isoladamente (Sulistio e Heese 2015).



**Figura 6.** A patologia molecular multifacetada de AD. Representação esquemática das causas possíveis para AD, onde os eventos causais podem interagir entre eles e formar uma rede, resultando na morte neuronal observada nos doentes (adaptado de Sulistio e Heese 2015).

### *Teoria da Cascata de β-amilóide*

A hipótese da cascata amiloide surgiu em 1992, quando Hardy e Higgins (Hardy e Higgins 1992) propuseram como o evento inicial da patogénese na DA, a acumulação de fibrilas insolúveis do péptido A $\beta$ . Embora a A $\beta$  também permaneça na forma solúvel no meio extracelular, na doença ocorre uma excessiva formação e deposição de A $\beta$  fibrilar insolúvel e a conseqüente agregação e deposição na forma de placas. Esta acumulação anormal de A $\beta$  resulta do desequilíbrio entre a sua síntese, agregação e eliminação, devido às falhas nos mecanismos de eliminação de A $\beta$  (Crews e Masliah 2010). De acordo com esta hipótese, o desequilíbrio entre a produção e/ou a diminuição da eliminação dos péptidos levam à sua acumulação, ativando várias vias de sinalização celular e causando disfunção sináptica, stress oxidativo e inflamação, que resultam conseqüentemente em degeneração sináptica, perda neuronal e declínio da função cognitiva (Roberson e Mucke 2006).

### *Teoria da hiperfosforilação da proteína Tau*

A proteína *tau* de ligação aos microtúbulos (microtubule-binding protein tau, MAPT) é fundamental para a função neuronal normal no sistema nervoso. É considerada a principal componente dos depósitos filamentosos intracelulares que definem uma série de doenças neurodegenerativas, incluindo DA esporádica (Weaver et al. 2000), bem como demência frontotemporal hereditária com parkinsonismo ligada ao cromossoma 17 (FTDP-17) (Goedert 2004). O *splicing* alternativo do gene *tau* (*MAPT*) no exão 10 origina isoformas de tau incluindo 3 ou 4 repetições de domínios de ligação aos microtúbulos, 3R ou 4R tau, com um rácio de 1:1 (Kosik et al. 1989; Goedert e Jakes 1990). O desequilíbrio do rácio tau 4R/3R poderá contribuir para várias doenças neurodegenerativas, nomeadamente as demências frontotemporais (Hong et al. 1998).

## **2.2. Demência frontotemporal com Parkinsonianismo ligado ao cromossoma 17 (FTDP17)**

A proteína *tau* é codificada pelo gene humano *MAPT* (microtubule-associated protein tau) e participa em funções essenciais como a polimerização, estabilização e modulação da dinâmica dos microtúbulos (Kalbfuss et al. 2001), sendo que as mutações neste gene associadas a FTDP-17 afetam a ligação da proteína à tubulina (Hyman et al. 2005).

Um marcador biológico das Tauopatias é a acumulação intracelular da proteína *tau* hiperfosforilada em neurónios ou células gliais. Vários estudos demonstraram que a hiperfosforilação favorece a formação de agregados, reduzindo a capacidade da *tau* estabilizar os microtúbulos, afetando o transporte intraneuronal e perturbando assim afetar a dinâmica microtubular, que conseqüentemente é necessário para a manutenção da homeostase neuronal. No entanto, a desfosforilação da Tau e dos filamentos helicoidais emparelhados faz com que a proteína recupere as suas atividades biológicas normais (Wang e Liu 2008). A proteína *tau* é altamente solúvel e a sua conversão em peptídeos insolúveis é o evento central na patologia da DA, e também os casos de FTDP-17 são caracterizados pela presença e inclusão de filamentos compostos pela proteína *tau* (Ballatore et al. 2007). Um dos principais mecanismos da doença é o aumento da inclusão no mRNA alternativo da *tau* do exão 10 durante o *splicing* alternativo, o que leva a uma interação anormal da *tau* com os microtúbulos, causando desestabilização dos polímeros de tubulina, e desta forma aumentando as concentrações de *tau* livre, que conseqüentemente leva à de formação de agregados. Está descrito que os defeitos resultantes do *splicing* alternativo da *tau*, encontrados em doentes com FTDP-17, podem ser corrigidos por aplicação de oligonucleótidos

antisense, sendo esta abordagem vista como uma possível via terapêutica nas Tauopatias (Kalbfuss et al., 2001).

### 2.3. Doenças das Poliglutaminas

As doenças de poliglutaminas (poliQ) são o grupo de doenças mais comuns dentro das doenças neurodegenerativas hereditárias. São causadas por uma expansão de repetições citosina-adenina-guanina (CAG), nos genes respetivos que resulta na expansão de sequências de poliglutamina nas proteínas correspondentes, e caracterizadas por uma disfunção neuronal progressiva. Este grupo abrange 9 doenças (tabela 2) nomeadamente: doença de Huntington (DH), atrofia muscular espino-bulbar (SBMA), atrofia dentatorubropalidolusiana (DRPLA) e ataxias espinocerebelosas (SCAs) tipo 1, 2, 3, 6, 7 e 17 (Zoghbi e Orr 2000; Stefani e Dobson 2003). Possuem todas uma transmissão autossómica dominante, com exceção da SBMA cujo gene se localiza no cromossoma X. A agregação maioritariamente intracelular de proteínas de poliQ expandidas é uma característica patológica partilhada por todas estas doenças e tem sido o foco de extensa investigação (Stefani e Dobson 2003).

**Tabela 2.** Doenças das poliglutaminas.

Doença	Transmissão	Gene	Proteína	Tamanho da repetição CAG	
				normal	mutada
Doença de Huntington (DH)	autossómica dominante	HD	huntingtina	6-35	36-121
Ataxia espinocerebelosa tipo 1	autossómica dominante	ATXN1	ataxina-1	6-44	39-82
Ataxia espinocerebelosa tipo 2	autossómica dominante	ATXN2	ataxina-2	15-31	36-63
Ataxia espinocerebelosa tipo 3 (MJD)	autossómica dominante	ATXN3	ataxina-3	12-44	54-86
Ataxia espinocerebelosa tipo 6	autossómica dominante	CACNA1A	subunidade do canal cálcio $\alpha$ 1A	4-18	21-33
Ataxia espinocerebelosa tipo 7	autossómica dominante	ATXN7	ataxina-7	4-35	37-306
Ataxia espinocerebelosa tipo 17	autossómica dominante	TBP	TATA <i>binding protein</i>	30-42	45-63
Atrofia muscular espino-bulbar (Doença de Kennedy)	recessiva ligada ao X	AR	receptor de androgénios	9-36	38-66

A idade de aparecimento dos sintomas depende diretamente do comprimento da expansão de CAG, e cada doença tem um limiar patológico característico relativamente ao comprimento do tracto poliQ, abaixo do qual a doença não ocorre.

### 2.3.1. Doença Machado-Joseph/ATAXIA 3

A doença de Machado-Joseph (DMJ) foi descrita pela primeira vez em 1972 por Nakano em famílias originárias do arquipélago dos Açores, sendo mais tarde encontrada em Portugal continental e em famílias sem ancestrais portugueses (Rosenberg et al. 1976). Mais tarde, numa homenagem às duas primeiras famílias descritas “Machado” e “Joseph” (Coutinho e Andrade 1978) é proposto o nome de doença de Machado-Joseph. A DMJ é também designada por ataxia espinocerebelosa do tipo 3 (SCA3) (Stevanin et al. 1994; Twist et al. 1995), é provocada por uma expansão de uma repetição de pelo menos 60 CAG no exão 10 do gene *ATXN3* (14q32.1), que codifica a proteína ataxina-3. Esta contém um segmento variável de glutaminas na região C-terminal que corresponde ao segmento CAG do gene *ATXN3* (Kawaguchi et al. 1994). O segmento de trinucleotídeos CAG é polimórfico: os indivíduos saudáveis apresentam entre 12 e 44 CAGs; e os indivíduos com DMJ entre 54 e 86 CAGs (Maciel et al. 2001). A patogénese das doenças PoliQ é atribuída a um ganho de função devido à toxicidade das proteínas portadoras da expansão de poliQ. Este trato de poliQ causa o aparecimento de espécies proteicas com uma conformação anormal, agregados proteicos, disfunção neuronal, progressão dos sintomas e por fim morte celular (Orr e Zoghbi 2007).

#### 2.3.1.1. Epidemiologia e aspetos clínicos

Globalmente, as ataxias espinocerebelosas (SCA) são consideradas doenças raras, com estimativas de prevalência variando de 0,3 a 2,0 por 100,000 (Coutinho e Andrade 1978). A doença de Machado-Joseph é atualmente considerada a forma mais comum de SCA (Schöls et al. 2004). Apesar de constituir o subtipo mais prevalente de SCA em Portugal, por exemplo, a DMJ é relativamente rara no continente (1/100,000) (Coutinho 1992), com poucas exceções, como uma pequena área do Vale do Tejo (1/1000) (Maciel et al. 2001), mas altamente prevalente nas Ilhas dos Açores, onde a maior prevalência mundial ocorre na Ilha das Flores (1/239) (Bettencourt et al. 2008).

Os indivíduos afetados possuem alelos com 54 a 86 repetições de trinucleótidos CAG (Maciel et al. 2001).

Fisicamente, apresentam disfunções motoras que se agravam progressivamente, síndrome de pernas inquietas e síndromes extrapiramidais que se assemelham ao parkinsonismo, bem como problemas de

espasticidade, sono, distonia e fadiga (Manto 2005; Bettencourt e Lima 2011; Paulson 2015). Está também descrito que doentes com DMJ apresentam défices de memória verbal e atenção visual (Maruff et al. 1996), e de fluidez verbal, independentemente do comprimento da repetição CAG (Kawai et al. 2004). Os doentes com DMJ apresentam algum défice cognitivo, com um desempenho inferior relativamente à memória de trabalho e episódica, depressão e ansiedade. Observa-se também uma redução do volume de substância cinzenta no cerebelo, *putamen*, *cingulum*, lobo pre-central e parietal (Lopes et al. 2013).

### 2.3.1.2. Ataxina-3: agregação, interações e funções

O estudo da estrutura e a função da ataxina-3, é fundamental para compreender melhor os mecanismos patológicos observados na DMJ. A ataxina-3 pertence a uma classe de proteases específicas da Ubiquitina, as enzimas de desubiquitinação (DUBs), que desempenham papéis importantes numa variedade de processos celulares, incluindo mecanismos no controlo de qualidade proteico (Kristensen et al. 2018).

A ataxina-3 é composta por um domínio N-terminal estruturado (domínio Josefina), e a sua região C-terminal é parcialmente desorganizada, sobretudo na região que contém o segmento de poliglutaminas, com alto conteúdo de estruturas secundárias nas regiões onde estão localizados os motivos de interação com a ubiquitina (UIMs) (Masino et al. 2003). As isoformas mais representativas da proteína ATXN3 são as que contêm 2UIM e 3UIM, que se diferenciam por terem diferentes regiões carboxílicas. A isoforma 2UIM é uma variante de *splicing* que corresponde ao clone MJD1a inicialmente descrito, que inclui 10 exões (Kawaguchi et al. 1994), e contém um domínio Josefina, dois motivos de interação com a ubiquitina, a cadeia de poliglutaminas e uma região C-terminal hidrofóbica. A isoforma 3UIM corresponde a uma variante de *splicing* MJD1-1 que contém 11 exões e apresenta mais um UIM na região carboxílica (Goto et al. 1997). Independentemente da expansão da poliQ, a isoforma 3UIM é largamente expressa e é a principal isoforma encontrada a nível do encéfalo. Embora, *in vitro*, as duas isoformas partilhem a mesma função de desubiquitinação, a 2UIM é mais propensa a agregar e degradada mais rapidamente pelo proteossoma, o que sugere que diferentes sequências de aminoácidos conferem propriedades distintas à ATXN3 (Harris et al. 2010). A ATXN-3 atua na via ubiquitina-proteossoma, ligando-se preferencialmente a cadeias com 4 ou mais ubiquitinas através dos seus 2 primeiros UIMs (Burnett et al. 2003). *In vitro*, a ATXN3 pode clivar cadeias de poliubiquitina de substratos ubiquitinados bem como separar monómeros de ubiquitina de cadeias de poliubiquitina. Esta

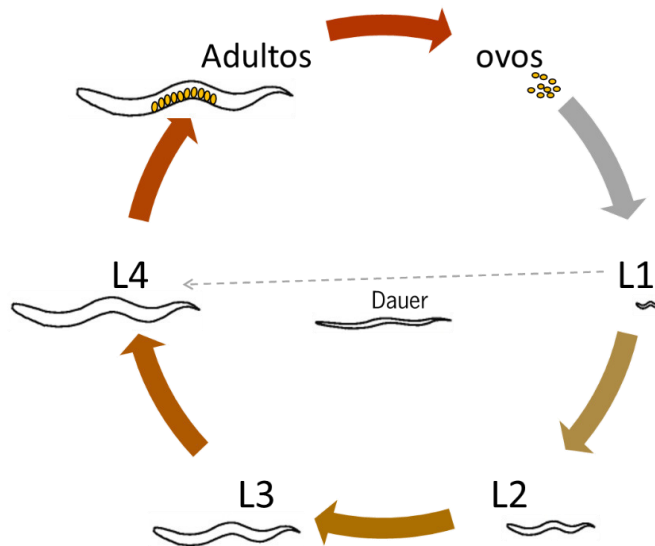
atividade de desubiquitinação é dependente da cisteína 14 do local catalítico (Burnett et al. 2003; Chow et al. 2004).

Um estudo *in vivo* realizado com ratinhos *Atxn3* knockout e transgênicos expressando a ATXN-3 humana mutante (modelo da DMJ) mostrou que ambos tinham níveis diminuídos da  $\alpha 5$  integrin subunit (ITGA5) no cérebro, e que a expressão de ATXN3 wild-type resgatava a ITGA5 da degradação proteossomal nos neurónios. Pensa-se assim, que a expansão do polyQ causa uma perda parcial desta função celular, consequentemente resultando na sinalização da integrina reduzida e modificações do citoesqueleto neuronal, sugerindo contribuição para a neurodegeneração (Neves-Carvalho et al. 2015). Em modelos celulares, foi demonstrado que a ATXN3 é necessária para a diferenciação neuronal e morfologia celular normal, organização do citoesqueleto, proliferação e sobrevivência das células SH-SY5Y e PC12 (Neves-Carvalho et al. 2015).

### 3. *C. elegans* como organismo modelo

O uso de modelos animais de doenças oferece enormes oportunidades para a avaliação do potencial terapêutico de extratos/compostos naturais em doenças neurodegenerativas. O nemátode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) é um organismo de vida livre introduzido como organismo modelo no mundo científico por Sidney Brenner, em 1965 (Riddle e Albert 1997), e é amplamente utilizado como modelo em vários campos de investigação científica: desenvolvimento, a neurociência, a apoptose e o envelhecimento (Chen et al. 2005). Do ponto de vista prático é de fácil manutenção em laboratório, pois tem um tamanho reduzido (adultos  $\approx 1$  mm) e podem ser mantidos em placas de Petri usando a bactéria *Escherichia coli* como fonte de alimento. Para além disso, apresentam um ciclo de vida curto (4 dias a 20 °C) e uma longevidade de aproximadamente 20 dias a 20 °C. São animais hermafroditas, e, portanto, capazes de se auto-fertilizarem, produzindo cerca de 300 descendentes durante o seu ciclo de vida. Após a eclosão do ovo, o animal passa por quatro estados larvares (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta (Fig.7) (Brenner 1974; Riddle e Albert 1997). Isto torna-o especialmente adequado em estudos genéticos (Brenner 1974), uma vez que permite o isolamento de mutantes recessivos e a geração de mutantes homozigóticos com fenótipos extraordinariamente graves.





**Figura 7.** Ciclo de vida de *C. elegans*, a 20 °C. Após a eclosão do ovo, passa por 4 estado larvares (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta (aproximadamente 4 dias).

O facto de ser transparente e muito simples anatomicamente permitiu a descrição de todos os seus sistemas fisiológicos, bem como de todas as suas 959 células somáticas (Riddle e Albert 1997), tendo sido o primeiro organismo eucariota a possuir o seu genoma totalmente sequenciado (*C. elegans* Sequencing Consortium 1998). Existe um banco de dados de bioinformática facilmente acessível, o Wormbase (Chen et al. 2005), um conjunto muito abrangente de estirpes mutantes e transgênicas facilmente disponíveis, bem como ferramentas e bibliotecas de RNAi que permitem analisar a função de genes através do mecanismo de RNA interferência (Reinke et al. 2000; Ohkumo et al. 2008). A sua transparência permite também a visualização de proteínas repórteres, como a GFP (*green fluorescent protein*), o que facilita as análises por microscopia ótica sem necessidade de dissecação do animal, bem como a geração de estirpes transgênicas (Boulin et al. 2006).

### ***C. elegans* como organismo modelo em doenças neurodegenerativas**

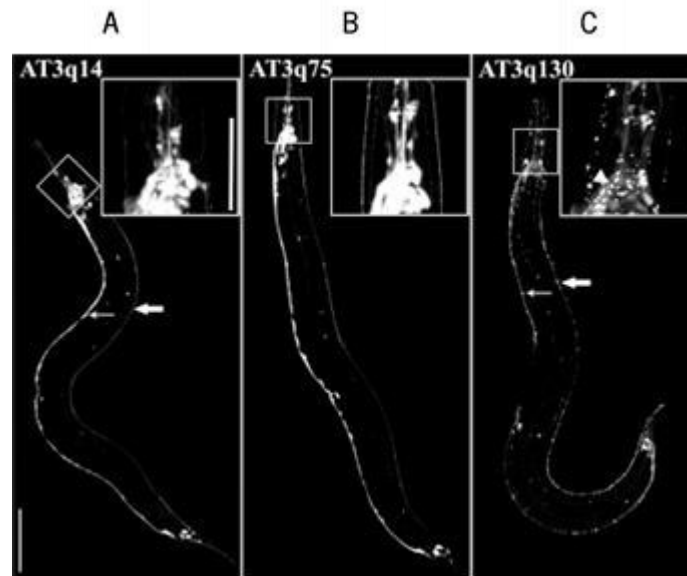
A aplicação de *C. elegans* no campo da Neurociência vem do conhecimento, já aprofundando, do seu sistema nervoso: das 959 células que possui, 302 correspondem ao sistema nervoso do animal, totalmente determinado através de microscopia eletrónica. Cada um destes neurónios possui uma posição única, e a sua identidade é reprodutível de animal para animal (White et al. 1986; Riddle e Albert 1997). Para além disso, os principais sistemas de neurotransmissão são conservados entre os mamíferos e este nemátode (Dimitriadi e Hart 2010). Num contexto de doença, está descrito que *C. elegans* possui ortólogos para 42% dos genes envolvidos em doenças humanas (Culetto e Sattelle 2000).

O uso de invertebrados (moscas e nemátodes) no estudo de DNs não é recente e foram vários os modelos desenvolvidos com o objetivo de estudar os mecanismos patológicos subjacente a várias doenças, bem como identificar fatores e mecanismos que possam modular o processo da doença dando origem a possíveis abordagens terapêuticas.

### 3.1. Modelo de DMJ em *C. elegans*

No contexto da DMJ, foi gerada uma estirpe *C. elegans* transgênica que expressa uma isoforma da ATXN3 humana com uma expansão de poliQ, em todo o sistema nervoso do nemátode. Este modelo, AT3q130, recapitula vários aspetos da DMJ, nomeadamente uma agregação proteica dependente do tamanho de poliQ (Fig.9) e que se correlaciona diretamente com uma disfunção neurológica progressiva (Teixeira-Castro et al. 2011).

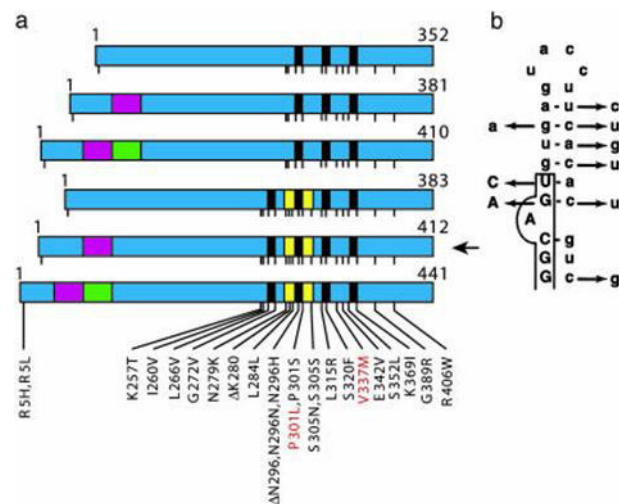
Neste modelo, observou-se que os diferentes comprimentos de poliQ, resultavam num padrão consistente de agregação nas células neuronais, afetando principalmente os neurónios do cordão nervoso ventral e dorsal. A presença de agregados proteicos em certos processos sensoriais na cabeça ocorre apenas quando a expansão poliQ está dentro das sequências flanqueantes da proteína ATXN3 e não quando expressa sozinha. Estes agregados insolúveis de ATXN3 estão presentes apenas no modelo com elevado número de poliQ (AT3q130), e não no modelo da doença WT (AT3q14)). Este modelo apresenta também uma redução significativa da longevidade, e neste contexto a redução do mecanismo da sinalização da insulina (IIS) e a ativação do fator de transcrição de resposta ao choque térmico (HSF-1) foram capazes de reduzir a patogénese, suportando as ligações mecanísticas entre o processo de envelhecimento e a agregação neuronal de proteínas tóxicas, características comuns a várias DNs (Teixeira-Castro et al. 2011).



**Figura 8.** Expressão pan-neuronal de ATXN3 contendo expansões de PoliQ de diferente tamanho (Q14, Q15, Q130) em *C. elegans*. A expressão das proteínas AT3q14 e AT3q75 apresenta um padrão de distribuição suave e difusa (A e B), enquanto as proteínas AT3q130 são encontradas em focos discretos em certos neurónios e são solúveis em outros (C). A expressão da proteína AT3q14 (A) pode ser visualizada em corpos celulares (seta fina) e em processos neuronais (seta grossa). A distribuição das proteínas AT3q130 (C) é diferente: a formação de focos é claramente evidente no VNC (flecha fina), DNC (flecha grossa) e em certas células do anel nervoso (cabeça de seta). Todos os animais representados são adultos jovens (4 dias após a incubação). Escala, 100  $\mu$ m. As caixas brancas indicam regiões ampliadas (adaptado de Teixeira-Castro, Ailion, et al. 2011).

### 3.2. Modelo de Tauopatia em *C. elegans*

A demência frontotemporal com parkinsonismo no cromossoma 17 (FTDP-17) é causada por mutações no gene *MAPT*, que codifica a proteína Tau. Em *C. elegans*, a expressão de uma forma mutante de tau (mutações P301L e V337M) (Fig.9) nas células do sistema nervoso leva ao aparecimento de um fenótipo de descoordenação motora, causado por um defeito de transmissão pré-sináptico (Kraemer et al. 2003). Comparativamente com a expressão de *tau* normal, a expressão de *tau* mutada resultou também numa maior acumulação de formas insolúveis desta proteína, seguida de neurodegeneração, vista como protuberâncias e lacunas em processos nervosos, seguida de perda de neurónios. Estes animais transgênicos são mais resistentes aos inibidores colinérgicos e apresentaram degenerescência axonal mais grave quando comparadas com animais que expressam *tau* normal.



**Figura 9.** Mutação da *tau* na demência frontotemporal FTDP-17. (a) Diagrama esquemático das seis isoformas da Tau (352–441 aa) expressas no cérebro adulto de um humano, com mutações na região de codificação indicadas usando a isoforma 441-aa. As seis isoformas são produzidas por *splicing* do mRNA alternativo a partir de um único gene e diferem pela presença ou ausência de três inserções, indicado a vermelho (codificado pelo exão 2), verde (codificado pelo exão 3) e amarelo (codificado pelo exão 10). São mostradas 19 mutações missense, duas mutações de exclusão e três mutações silenciosas, mas que afetam o *splicing*. (Kraemer et al. 2003) produziram linhas de *C. elegans* transgênicos para a isoforma 412-aa (seta) sem e com mutações P301L ou V337M (indicado em vermelho). (b) Estrutura no pré-mRNA no limite entre o exão 10 e o intrão que o segue, com nove mutações que desestabilizam o loop do caule. As sequências de exões estão em caixas e são mostradas em letras maiúsculas, e as sequências de intrão são mostradas em letras minúsculas (Goedert 2003).

Estudos subsequentes permitiram identificar alguns moduladores genéticos do fenótipo induzido pela expressão de *tau* mutante (Kraemer et al. 2003). Desta forma, demonstrou-se que este modelo é suficientemente robusto para ser utilizado na avaliação de compostos potencialmente terapêuticos, que possam modular a disfunção neuronal induzida pela proteína *tau* mutada.

#### 4. Stress oxidativo e neurodegenerescência

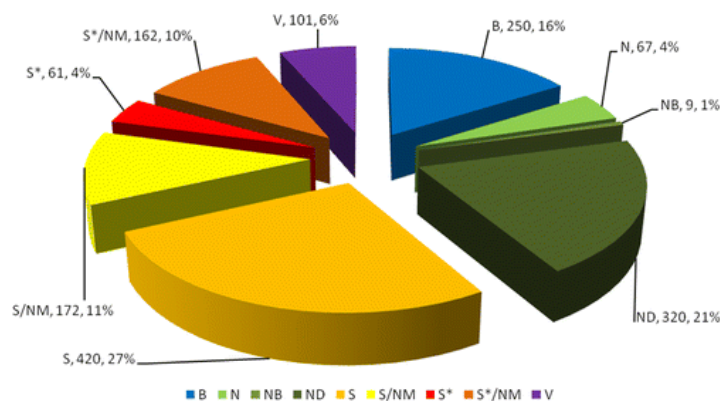
O ambiente celular está constantemente submetido a stress causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) que se formam a partir do metabolismo de vários compostos. Estas provocam vários tipos de danos e têm sido implicadas em várias doenças neurodegenerativas bem como no envelhecimento (Dröge 2002). Os antioxidantes, através da sua capacidade de eliminar as ROS ou impedir a sua formação têm sido associados à prevenção da degeneração das células nervosas (Sun et al. 2012). O cérebro é dos órgãos mais vulneráveis ao stress oxidativo e a maioria dos componentes celulares, como os lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, podem ser danificados. O stress oxidativo está descrito como sendo uma característica de diferentes DNs. No caso da DA promove a deposição de A $\beta$ , a hiperfosforilação de tau e subsequentemente a perda de sinapses e neurónios. O stress oxidativo pode ser uma parte essencial no processo patológico destas doenças e os antioxidantes podem ser

ferramentas úteis para o seu tratamento (Chen e Zhong 2014). Uma vez que o stress oxidativo parece ser um processo indissociável da neurodegenerescência, existe uma aposta por parte dos investigadores na modulação do ambiente oxidativo, na tentativa de inibir a progressão da neurodegenerescência. Está descrito, em modelo de ratinhos com DA, que a dieta suplementada com resveratrol, um polifenol encontrado na uva, amendoim, soja e romã, que possui uma ampla gama de efeitos biológicos, entre os quais o efeito antioxidante e indutor de autofagia, reduzindo a presença de placas amilóides nas regiões do córtex (48%), hipotálamo (90%) e estriado (89%), sugerindo um efeito neuroprotetor deste composto. Foi também relatado que os animais tratados apresentavam menor dano induzido por stress oxidativo, demonstrando uma diminuição de glutatona (21%) e o aumento de cisteína (54%) no cérebro. Este estudo apoia um conceito importante, de que o aparecimento da doença neurodegenerativa pode ser adiado ou mitigado com o uso de agentes antioxidantes (Karuppagounder et al. 2009), incluindo produtos naturais.

## 5. Extratos/compostos naturais

Durante o século XVIII, o desenvolvimento da Química levou à síntese de novos compostos ativos, e à purificação de extratos de plantas utilizadas como medicamentos. Estes continham uma série de substâncias farmacologicamente ativas, mas em quantidades desconhecidas e proporções variáveis. Foi entre os anos de 1803 e 1817 que o farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Serturner (1783-1841) isolou pela primeira vez e extraiu os cristais de morfina na sua forma pura a partir das sementes de papoila, promovendo um novo ramo na ciência. Das substâncias ativas usadas em medicina em 1800, o ópio permaneceu medicamento importante, usado principalmente como analgésico (Krishnamurti e Rao 2016). As novas descobertas de produtos naturais bioativos levaram a que se criasse uma relação entre as plantas e a Saúde, que é responsável pelo surgimento de uma nova geração de terapias com base em produtos naturais, usadas no tratamento/prevenção de diversas doenças (Raskin et al. 2002). Um dos pontos cruciais no uso de medicamentos alternativos/fitoterapêuticos, é a preparação das amostras, especificamente os aspectos relacionados com a qualidade, segurança e eficácia. Isto levou ao desenvolvimento de técnicas de preparação de amostras com vantagens significativas em relação aos métodos convencionais para a extração e análise de plantas medicinais, essenciais para o fornecimento de produtos à base de plantas de alta qualidade para os consumidores em todo o mundo (Huie 2002), e aumentou a eficiência na exploração dos fitoquímicos e na capacidade de manipulação das plantas no sentido de sintetizar novos produtos naturais (Raskin et al. 2002). Numa revisão elaborada por Newman e Cragg (2016) é patente como os produtos naturais (Fig.10) desempenham um papel

importante na descoberta/desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de doenças humanas. Estes representam uma fonte de diversidade molecular que poderá oferecer a melhor solução para a atual crise de produtividade da comunidade científica envolvida na descoberta e desenvolvimento de drogas.



**Figura 10.** Novos medicamentos aprovados entre 1981-2014; n = 1562. B, Biológico: péptido ou proteína (> 50 resíduos) isolada de um organismo/linha celular ou produzida por meios biotecnológicos através de um hospedeiro substituído; V, vacinas; S, droga sintética; S\*, droga sintética mas o farmacóforo de origem natural; N, produto natural, não modificado estruturalmente, embora possa ser semi- ou totalmente sintético; NB, produto natural “droga botânica”; ND, derivado de um produto natural, modificação semi-sintética (adaptado de Newman e Cragg 2016).

### 5.1. Fitoquímicos e plantas medicinais

O rastreio fenotípico no que diz respeito aos produtos naturais e seus derivados é uma abordagem poderosa para identificar novas moléculas, bem como estudar mecanismos de doenças mal compreendidos, fornecendo uma via para aumentar a inovação na indústria farmacêutica de modo a oferecer terapias inovadoras que respondam às necessidades médicas (Moffat et al. 2017).

A difícil compreensão dos mecanismos e a multiplicidade de respostas relatadas pelas drogas atualmente testadas exige uma busca por alternativas mais eficientes para prevenir e impedir a progressão de DNs. Está descrito que uma série de compostos naturais mostraram a capacidade de prevenir a formação de oligómeros tóxicos e interromper os agregados de proteínas envolvidas em doenças humanas, atraindo assim muita atenção. Os biofenóis distinguem-se dos outros fitoquímicos como arma natural contra as doenças neurodegenerativas. Algumas são as revisões publicadas sobre estudos *in vitro* e *in vivo* dos mecanismos de ação de extratos ou compostos naturais associados à prevenção das DNs, como por exemplo a neuroproteção de biofenóis na doença de Alzheimer (Omar et al. 2017), os mecanismos de ação dos polissacarídeos na neurodegenerescência (Gao et al. 2018),

e os mecanismos neuroprotectivos de diferentes extratos de plantas na neurotoxicidade da doença de Parkinson (Abushouk et al. 2017) .

### ***Lycium barbarum e Lycium ruthenicum***

As espécies *Lycium barbarum* (LB) e *Lycium ruthenicum* (LR) pertencem à família Solanaceae e os seus frutos são usados tradicionalmente na medicina oriental, pelas suas propriedades relatadas anti-envelhecimento e proteção celular (Yu et al. 2005; Wu et al. 2017). Diversas são as revisões que têm surgido (Amagase e Farnsworth 2011; Kulczyński e Gramza-Michałowska 2016; Qian et al. 2017; Yao et al. 2018; Masci et al. 2018; Wang et al. 2018) integrando dados históricos, etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos, e permitindo uma compreensão detalhada das espécies do género *Lycium* e do seu amplo potencial terapêutico.

As espécies LB e LR, também conhecidas como bagas de goji, são ricas em compostos fenólicos. Está descrito que a baga de goji preta (LR) possui maiores capacidades antioxidantes do que a baga de goji vermelha (LB) (Islam et al. 2017). Foi demonstrado que os extratos de LB promovem neuroproteção em doenças oculares e na doença de Alzheimer (DA) em ratos, neste último caso através da inibição das vias de sinalização pro-apoptóticas contra a toxicidade induzida pelo péptido amiloide  $\beta$  (Yu et al. 2005, 2006; Li et al. 2011). Também LR pode ser um potencial agente antioxidante e anti-neuroinflamatório para o tratamento da DA, melhorando significativamente o desempenho comportamental em modelos de rato (Wu et al. 2017).

### ***Gastrodia elata***

A espécie *Gastrodia elata* (GE) pertence à família das Orchidaceae e é uma planta medicinal usada na medicina tradicional chinesa para tratar dores de cabeça, tonturas, convulsões (Hsieh et al. 1999) e epilepsia, sendo indicadas também atividades de proteção neuronal e antidepressivas. Dos seus constituintes, a vanilina demonstrou exercer efeitos sedativos e anticonvulsivos (Wu et al. 1989). O álcool vanilil, um dos compostos bioativos desta planta, diminuiu os níveis de espécies reativas de oxigénio e modulou o processo apoptótico, diminuindo a citotoxicidade contra MPP<sup>+</sup>, em células dopaminérgicas MN9D (Kim et al. 2011). Está descrito, em ratos, que o pré-tratamento com GE atrasou o início da mudança neurocomportamental, e reduziu a gravidade das convulsões e o dano neuronal no hipocampo, após a administração do ácido cáinico (composto que atua sobre a ativação de recetores de glutamato), sugerindo um efeito anticonvulsivo e neuroprotetor (Kim et al. 2001).

## Capítulo I - Introdução

Também foi demonstrado, em ratos, que o tratamento com esta planta melhorou os défices de aprendizagem e memória induzidos pela natação forçada (Chen et al. 2011). Estudos adicionais, em células apoptóticas PC12, relatam que o mecanismo de neuroproteção da GE poderia ser mediado pela via  $A_{2A}$ -R/cAMP/PKA/CREB (Tsai et al. 2011). Foi ainda descrito que o extrato da raiz desta planta possuiu efeito antidepressivo em ratos e o possível mecanismo pode ser através da regulação dos sistemas serotoninérgicos e dopaminérgicos (Chen et al. 2009).

### *Pueraria lobata*

A espécie *Pueraria lobata* é uma das mais antigas e importantes plantas medicinais comestíveis, usada para vários fins médicos na medicina tradicional oriental. É comum o seu uso no alívio da febre e no tratamento de doenças cardiovasculares, como hipertensão, enfarte e arritmia. Foi demonstrado que a raiz desta planta exibe efeitos antioxidantes (Guerra et al. 2000; Jin et al. 2012), hipoglicémicos (Chung et al. 2008) e propriedades anti-inflamatórias (Jin et al. 2012). Está descrito que os principais componentes ativos do rizoma desta planta são flavonóides, cumarinas e isoflavonas, como a daidzeína, genisteína e puerarina que se presumem ser as responsáveis pelas suas várias atividades farmacológicas (Wong et al. 2011). Foi evidenciado que a puerarina, uma isoflavona presente nesta planta, demonstrou atividade neuroprotetora contra isquemia cerebral, em ratos (Xu et al. 2005), bem como proteção contra a toxicidade induzida por  $A\beta$ , por inibição da apoptose em células PC12 (Xing et al. 2011), e neuroproteção na substância *nigra*, num modelo de toxicidade induzida por 6-hidroxidopamina, através da inibição das vias de sinalização apoptótica e aumento da expressão do fator neurotrófico derivado da linha celular glial (GDNF), no estriado (Zhu et al. 2010).

### *Epimedium brevicornum*

Na medicina tradicional chinesa, a decoção BSNXD, que consiste numa combinação de 8 plantas medicinais especificamente formulada para aumentar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos adversos (Gui et al. 2015), tem sido usado desde há centenas de anos para tratar e prevenir doenças relacionadas com a idade. Esta planta, *Epimedium brevicornum* é um dos ingredientes mais ativos desta decoção e está descrito que previne e melhora a osteoporose pós-menopausa (Gui et al. 2015).

Os flavonóides são os principais componentes ativos desta planta. A icarina é o flavonóide mais estudado e tem uma ampla gama de atividades biológicas. Existem evidências que este flavonóide apresenta atividade anti-inflamatória (Wang et al. 2013; Cui et al. 2014) e também efeito neuroprotetor contra a toxicidade induzida por  $A\beta_{25-35}$  em células neuronais corticais de ratos (Wang et al. 2007).



Em *C. elegans* está descrito que o polissacarídeo EbPS-A1 isolado de *Epimedium brevicornum* foi capaz de inibir a disfunção comportamental mediada pela expressão de poliglutaminas (poliQ), e melhora a resistência ao stress oxidativo induzido por paraquat, no entanto, não teve impacto na agregação das proteínas poliQ, nem na longevidade dos nematodes. Foi sugerido que o efeito protetor deste polissacarídeo contra a neurotoxicidade mediada por poliQ seria provavelmente devido à sua função antioxidante (Xiang et al. 2016). Curiosamente, está descrito que a icarina e icariside II prolongam a vida de *C. elegans*. Os autores mostraram níveis de icariside II elevados nos animais tratados com icarina, sugerindo que icariside II é a forma bioativa *in vivo* da icarina. Este derivado, icariside II, também aumentou a resistência ao stress oxidativo e térmico, diminuiu os defeitos na locomoção, e atrasou o aparecimento da paralisia mediada pela proteotoxicidade de poliQ e A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Estes autores também referem que o efeito na longevidade depende da sinalização pelo mecanismo de insulina/IGF-1(IIS) (Cai et al. 2011).

### *Hyptis suaveolens*

A planta *Hyptis suaveolens* (HS) pertence à família das Lamiaceae e é uma planta medicinal etnobotanicamente importante. Embora considerada por muitos como uma erva daninha, encontra-se distribuída em todas as regiões tropicais e subtropicais e quase todas as partes desta planta são usadas na medicina tradicional para tratar várias doenças. Os extratos de folhas desta planta contêm alcalóides, glicosídeos, saponinas, taninos e flavonóides como constituintes principais (Shaikat et al. 2012) e tem sido demonstrada a sua capacidade de promoção de processos de cicatrização (Shenoy et al. 2009). Quando testado em ratinhos diabéticos, o extrato de HS mostraram ter um efeito anti-hiperglicémico, provavelmente atribuível a efeitos estimulantes na utilização de glicose e nas enzimas antioxidantes (Mishra et al. 2011), e também atividade gastro-protetora em ratos com úlceras provocadas por etanol (Vera-Arzave et al. 2012).

Os polifenóis solúveis livres, com elevada capacidade antioxidante, são muito mais abundantes nas folhas de HS do que os polifenóis ligados, e este facto pode ser o responsável pelo efeito protetor detetado sobre oxidação lipídica pelo Fe (II) no cérebro. No entanto, a capacidade de quelatação de Fe (II) parece ser o mecanismo dominante através do qual os extratos protegem o cérebro da peroxidação lipídica induzida por Fe (II) (Oboh 2008). No contexto das espécies reativas de oxigénio e stress oxidativo, um estudo realizado por Ghaffari et al. (2012) em que foi testado o efeito de HS em ratos e células HepG2 sugere que o extrato foi capaz de proteger o fígado contra o dano oxidativo induzido por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) em ratos e de proteger as células HepG2 contra danos oxidativos induzidos

## Capítulo I - Introdução

por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os efeitos hepatoprotetores e citoprotetores poderão estar relacionados com o seu efeito antioxidante e a capacidade de eliminação de radicais livres. Um efeito semelhante foi observado em células N2A de neuroblastoma de ratos, onde extrato de HS protegeu contra os danos induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através da regulação antioxidante e de genes protetores (Ghaffari et al. 2014). Estas observações sugerem que a HS poderá ter um potencial terapêutico para tratamento de neurodegenerescência associada ao stress oxidativo.

### *Hyptis pectinata*

A espécie *Hyptis pectinata* (HP), também pertencente à família das Lamiaceae, é cultivada nas regiões Nordeste do Brasil e é popularmente conhecida pelo nome comum de "sambacaitá" ou "canudinho". É amplamente utilizada em medicina popular para tratar doenças inflamatórias, infecções bacterianas e dor (Paixão et al. 2013).

Está descrito que os extratos de HP possuem propriedades antinociceptivas significativas com efeito opiáceo e local de ação supraspinal em ratos. A administração oral de extratos das folhas de HP reduziu significativamente o número de contorções induzidas por ácido acético em rato e aumentou a resposta aos estímulos térmicos no teste da placa quente. Esse efeito foi completamente revertido pelo antagonista opióide naloxona (Lisboa et al. 2006). Para além disso, também o óleo essencial de HP exibe efeitos anti-nociceptivos, provavelmente mediados por recetores opióides e colinérgicos, bem como atividade anti-inflamatória (Raymundo et al. 2011). Está descrito, em ratos, que o extrato aquoso das folhas de HP apresentaram efeitos anti-hematológicos e antinociceptivos, e foi sugerida a participação do sistema opióide nestes efeitos (Bispo et al. 2001). Foram ainda atribuídas propriedades anti-depressivas, demonstradas em ratos (Bueno et al. 2006), bem como propriedades antioxidantes (Paixão et al. 2013) às folhas desta planta.

### *Hyptis marruboides*

A espécie *Hyptis marruboides* (HM), conhecida pelo nome comum de "hortelã-do-campo", pertence também à família das Lamiaceae, e é uma espécie medicinal conhecida pelas suas atividades contra infeções gastrointestinais e cutâneas, dores e cólicas (McNeil et al. 2011). No entanto, tem sido menos estudada do que as outras plantas acima referidas do mesmo género. Num estudo comparativo entre 4 espécies do género *Hyptis*, a *H. marruboides* apresentou o maior teor de fenóis e flavonoides, indicadores de maior potencial antioxidante (Povh et al. 2012).

## 5.2. Extratos/Compostos naturais aplicados à neurodegeneração

São inúmeros os estudos publicados nas últimas décadas que relatam efeitos benéficos de extratos/compostos naturais em modelos de neurodegenerescência. A identificação de extratos/compostos naturais biologicamente ativos que promovam a Saúde, e a compreensão dos seus mecanismos de ação, proporcionará estratégias para desenvolver novas terapias para diferentes DNs. No contexto da DA, por exemplo, vários compostos/extratos têm sido testados em modelos animais e celulares, nomeadamente pelas suas propriedades antioxidantes. É o caso da mitoquinona, vitamina E, Gingko biloba, polifenóis naturais como os do chá verde, vinho, mirtilo e curcumina, ácidos gordos W3, vitaminas B6 e B12, selegilina e melatonina (Sun et al. 2012; Yiannopoulou e Papageorgiou 2013). Também a vitamina E tem sido um antioxidante bastante utilizado, podendo prevenir a ação oxidativa ao diminuir a morte celular induzida por A $\beta$  e atenuar a toxicidade em células do neuroblastoma (Mas et al. 2006). O nemátode *C. elegans* tem também sido usado como modelo da DA. Por exemplo, o péptido A $\beta$  (1-42) expresso transgenicamente neste organismo, quer nos neurónios quer no músculo, leva a fenótipos como défices motores, alterações do sistema serotoninérgico e défices em processos de aprendizagem por associação. Um destes modelos da DA em *C. elegans*, a estirpe CL4176, evidenciou também stress oxidativo, evidenciado pelo aumento da oxidação proteica, mesmo antes da formação de fibrilas de A $\beta$  (Drake et al. 2003). Os efeitos e possíveis mecanismos do fucoidan, um polissacarídeo extraído de algas castanhas, têm sido estudado em modelos de *C. elegans* da DA. Foi demonstrado que este composto aliviou o fenótipo de paralisia induzido por A $\beta$  (expressa no músculo) e levou a uma redução no número de depósitos de A $\beta$  nos animais tratados. Verificou-se ainda que o tratamento elevou a atividade do proteossoma, sugerindo-se assim que o Fucoïdan pode diminuir a acumulação de A $\beta$  através da proteólise. Além disso, o tratamento com Fucoïdan reduziu a produção ROS estimuladas pela indução de A $\beta$  (Wang, et al. 2018). O fucoïdan demonstrou ser capaz de diminuir a atividade de acetilcolina (ACh) e colina acetil-transferase (ChAT), bem como o aumento da atividade da acetilcolina esterase (AChE). Além disso, melhorou a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* por ativação da superóxido dismutase (SOD) e aumento da glutathiona reduzida (GSH). Estes resultados sugeriram que Fucoïdan poderia proteger as células PC12 da apoptose e melhorar a aprendizagem e capacidade de memória em modelos da DA em ratos, o que foi sugerido ser devido à regulação do sistema colinérgico, redução do stress oxidativo e inibindo a via de apoptose (Wei et al. 2017).

Estes resultados sugerem que o Fucoïdan pode ser útil como componente de produtos farmacêuticos ou alimentos funcionais para neuroproteção em DNs como a DA. Muitos outros extratos/compostos têm sido

## Capítulo I - Introdução

estudados relativamente ao impacto que têm sobre a paralisia induzida por A $\beta$ . Por exemplo, a Liuwei Dihuang (LWDH)), uma clássica fórmula usada na medicina tradicional chinesa, que compreende 6 espécies (raiz de *Rehmannia glutiosa*, frutos de *Cornus officinalis*, raiz de *Paeonia suffruticosa*, rizoma de *Dioscorea opposita*, *Poria cocos* e rizoma de *Alisma plantago-aquatica*) melhora a paralisia induzida por A $\beta$  em *C. elegans*, aumentando a expressão de proteínas HSP16.2 e reduzindo os níveis de ROS, sugerindo uma potencial neuroprotecção (Sangha et al. 2012).

No mesmo modelo foram ainda analisados os efeitos da *Baccharis trimera* (carqueja). Os animais tratados aumentaram a resistência ao stress oxidativo, e diminuíram os níveis de ROS em condições de stress. Nestes animais o aumento dos níveis de chaperonas e da atividade do proteossoma foram identificados como mecanismos responsáveis pela diminuição da toxicidade mediada pela A $\beta$ , (Paiva et al. 2015).

Vários têm sido os estudos a demonstrar os efeitos neuroprotetores do EGb761, um extrato padronizado de folhas de *Ginkgo biloba*, comumente usado para melhorar a memória em pacientes com DA. Os primeiros estudos demonstraram que o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* EGb 761 inibia a apoptose induzida por A $\beta$  em células de neuroblastoma e aumentava a resistência ao stress oxidativo. Além disso, era capaz de aumentar a longevidade em *C. elegans* (Wu et al. 2002). Mais tarde, foi também demonstrado em *C. elegans* que o EGb 761 e um dos seus componentes, o ginkgolide A, atenuavam os comportamentos patológicos induzidos por A $\beta$ , incluindo a paralisia, e normalizavam os fenótipos característicos deste modelo como o comportamento da quimiotaxia e a sensibilidade à serotonina. Mostraram também que o EGb761 inibia a oligomerização de A $\beta$  e os depósitos de A $\beta$  em *C. elegans*, demonstrando que o EGb 761 suprime os comportamentos patológicos relacionados com A $\beta$ , e esta proteção contra a toxicidade de A $\beta$  é mediada principalmente pela modulação de espécies oligoméricas deste péptido, sugerindo-se um potencial terapêutico para prevenção e tratamento de DA (Wu et al. 2006).

Outros estudos mostraram que o extrato de semente de uva (GSE), rico em antioxidantes fenólicos e antocianinas, reduzia a acumulação de beta amilóide e protegia contra a neurotoxicidade e o stress oxidativo *in vitro* (Bastianetto et al. 2000). Estudos adicionais relataram uma redução significativa nos níveis de A $\beta$  no cérebro de ratos transgênicos alimentados com GSE em 33%, comprovando que os polifenóis presentes no GSE são potentes agentes anti-amiloidogênicos, evitando a deposição de A $\beta$  e atenua a inflamação no cérebro de um modelo de rato transgênico, sendo promissor ao adiar o desenvolvimento da DA (Wang et al. 2009).

O consumo de mirtilos em humanos demonstrou ser uma estratégia eficaz para reverter problemas de memória e défices cognitivos, sugerindo-se que a suplementação com mirtilos pode conferir benefícios neurocognitivos e estabelecer uma base para ensaios humanos mais abrangentes para estudar potencial preventivo e mecanismos neuronais (Krikorian et al. 2010). Em ratos, após o consumo de mirtilo, a antocianina antioxidante proeminente acumula-se no cérebro, predominantemente na região do hipocampo e neocórtex, que são essenciais para a função cognitiva (Andres-Lacueva et al. 2005). É de realçar que os produtos naturais ricos em polifenóis são uma possível escolha para a prevenção de DA. Embora as evidências suportem o efeito neuroprotetor de certos produtos naturais, estudos adicionais são essenciais para explorar o efeito específico e os alvos dos polifenóis em várias vias de sinalização, bem como a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e o seu modo de ação em várias regiões do cérebro. Outro composto que demonstrou ser eficaz na prevenção de problemas associados com a DA em *C. elegans* foi a curcumina. Num modelo em *C. elegans*, que expressa a proteína *tau* em todos os neurónios, o tratamento com curcumina melhorou a descoordenação do movimento e as anomalias neuríticas, no entanto, não inibiu a fosforilação da *tau* nem a sua agregação (Miyasaka et al. 2016). Dados anteriores sobre este composto também relatam que suprimiu a agregação de A $\beta$ , em modelos transgênicos de ratos, no entanto, o composto falhou quando testado clinicamente em doentes, tendo sido apresentado a justificação da curcumina apresentar baixa bioviabilidade (Ringman et al. 2012). Em termos mecanísticos foi sugerido que a curcumina induz a via SKN-1/Nrf2, que é uma via crucial para manter a homeostase celular nomeadamente por efeitos antioxidantes (Jiménez-Osorio et al. 2015) sendo possível que esta via também esteja envolvida no efeito da curcumina em tauopatias, porque foi relatado que a ativação de Nrf2 melhorou o fenótipo em modelos de rato (Stack et al. 2014). Existem vários modelos animais que procuram recriar várias das características fenotípicas da DMJ, e desta forma potenciam a identificação de estratégias terapêuticas. Particularmente, um modelo de ratinho (CMVMJD135) que expressa a ataxina-3 humana mutada, mostra inclusões intranucleares de ataxina-3 no SNC e alterações neurodegenerativas em regiões específicas do cérebro semelhantes às da doença humana (Silva-Fernandes et al. 2014). Neste modelo, o tratamento crónico com 17-DMAG, um inibidor de Hsp90, resultou num atraso na progressão dos défices de coordenação motora, conseguindo recuperar o fenótipo de descoordenação para níveis dos animais wild-type. Isto foi acompanhado por uma indução limitada de proteínas de resposta ao choque térmico, mas também de autofagia, com a indução de LC3-II e beclina-1 no cérebro de animais tratados (Silva-Fernandes et al. 2014).

## Capítulo I - Introdução

Noutro tipo de organismo, *C. elegans*, o tratamento com ácido valproico (VPA) permitiu uma redução significativa tanto na disfunção motora (redução de 71,75% a 37,9%), como no fenótipo de agregação ao dia 10 da idade adulta (Teixeira-Castro et al. 2011). Estas observações foram confirmadas posteriormente no modelo de ratinho CMVMJD135, embora com efeitos limitados no impacto da capacidade motora dos animais (Esteves et al. 2015).

Noutra abordagem no mesmo modelo da DMJ em *C. elegans*, o citalopram, um inibidor seletivo da serotonina, recuperou a disfunção neuronal e a agregação da ATXN3. Além disso, o tratamento crónico em ratinhos CMVMJD135 com o mesmo composto foi capaz de reduzir significativamente as inclusões neuronais de ataxina-3 e a astrogliose, conduzindo a melhorias na atividade motora. Estes resultados mostraram o potencial do citalopram na supressão da patogénese de ATXN3 nos dois modelos de doença, indicando esta molécula como alvo terapêutico promissor para a doença de DMJ, sugerida para ensaios clínicos (Teixeira-Castro et al. 2015). Dados antecedentes (Suganuma et al. 1998) relataram para o composto natural purificado, EGCG, um polifenol presente no chá verde, propriedades antioxidantes e sugerem que atravessa a barreira hematoencefálica. Mais tarde, Ehrnhoefer et al. (2006) investigaram os efeitos do composto em moscas modelo de DH, que sobreexpressavam huntintina mutada (Htt<sup>Q93</sup>) e mostravam um movimento e comportamento de motor anormal que piorava progressivamente com a idade. Este fenótipo foi, no entanto, significativamente melhorado quando as moscas foram suplementadas com EGCG. Enquanto que as moscas transgênicas não tratadas conseguiam subir em média 4-5 cm/60 s num cilindro de vidro vertical, as moscas tratadas com EGCG subiram cerca de 18 cm no mesmo tempo, indicando que o composto não só reduzia a degeneração dos fotorreceptores, mas também melhorava significativamente a capacidade motora nas moscas transgênicas. Estes resultados sugeriram que o EGCG poderia proteger células neuronais das propriedades nocivas da huntintina mutada e, revelaram que o EGCG tem um potencial considerável como candidato a fármacos para o desenvolvimento de tratamentos de DH e doenças relacionadas com *misfolding* de proteínas.

A atividade neuroprotetora dos extratos das raízes e folhas de *Damnacanthus officinarum* foi também descrita no contexto das doenças de poliQ em *C. elegans*, tendo-se demonstrado que os extratos das raízes melhoravam significativamente o comportamento dos animais no ensaio de quimiossensação bem como a sobrevivência dos neurónios ASH (Yang et al. 2012).

Também o efeito do café e da cafeína tem sido demonstrado, principalmente na regulação da resposta ao choque térmico. Esta resposta celular é altamente conservada e funciona como um mecanismo citoprotetor durante o stress, mediada pelo fator de transcrição HSF-1. Está descrito que o café é um

indutor poderoso da resposta ao stress térmico, no entanto, uma dose moderada de cafeína pura também foi capaz de induzir esta resposta, sugerindo a cafeína como um componente importante no café para desencadear essa resposta, em ambos os casos de forma dependente de HSF-1. Modelos da DH em *C. elegans* quando tratados com café e/ou cafeína mostraram redução da agregação e toxicidade da huntintina (Brunquell et al. 2018).





## 6. Organização e objetivos do trabalho

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar os efeitos neuroprotetores de vários extratos de plantas medicinais em modelos de patologias neurodegenerativas em *C. elegans*, nomeadamente em organismos modelo da DMJ, que expressam a proteína ATXN3 expandida e em animais modelos de tauopatias, que expressam uma forma mutada da proteína tau, envolvida na DA e na FTD. Adicionalmente, procurou-se elucidar alguns dos mecanismos celulares eventualmente envolvidos na sua ação farmacológica.

### Objetivos específicos:

1. Avaliação do efeito neuroprotetor de 8 extratos de plantas medicinais selecionadas nos modelos de doenças neurodegenerativas em *C. elegans*.
2. Avaliação do efeito de extratos selecionados na longevidade da estirpe selvagem e nos modelos de neurodegeneração em *C. elegans*.
3. Avaliação do potencial antioxidante de extratos selecionados pelo seu efeito benéfico nos testes do fenótipo motor:
  - Impacto na sobrevivência dos nemátodes sob condições de stress oxidativo.
  - Capacidade de indução da expressão de proteínas antioxidantes utilizando estirpes repórter e qRT-PCR.



# Capítulo II

## Materiais e Métodos



## 1. Espécies utilizadas e preparação dos extratos

As espécies *Hyptis suaveolens* (HS), *Hyptis pectinata* (HP) e *Hyptis marrubioides* (HM) foram recolhidas no Brasil. As espécies *Lycium barbarum* (LB), *Lycium ruthenicum* (LR), *Pueraria lobata* (PL), *Gastrodia elata* (GE) e *Epimedium brevicornum* (EP) são provenientes da China.

Tabela 3. Extratos de plantas usados neste estudo.

Extratos:	Espécies	Família
fruto	<i>Lycium ruthenicum</i>	Solanaceae
fruto	<i>Lycium barbarum</i>	Solanaceae
raiz	<i>Pueraria lobata</i>	Fabaceae
raiz	<i>Gastrodia elata</i>	Orchidaceae
folhas	<i>Epimedium brevicornum</i>	Berberidaceae
folhas	<i>Hyptis marrubioides</i>	Lamiaceae
folhas	<i>Hyptis suaveolens</i>	Lamiaceae
folhas	<i>Hyptis pectinata</i>	Lamiaceae

As partes das plantas recolhidas foram cortadas em pedaços pequenos, secas e guardadas em frascos. Na obtenção do extrato, as partes selecionadas foram submetidas à extração com metanol 80% (v/v) com um rácio de 1:10 (1 grama de biomassa seca: 10 mL metanol 80%). Realizou-se evaporação do solvente líquido das amostras no evaporador rotativo e depois no liofilizador. As amostras foram solubilizadas em 100% sulfóxido de dimetilo (DMSO, Sigma), numa concentração stock de 100 mg/mL, e para efeitos experimentais foram realizadas diluições adequadas, de modo a obter as concentrações de teste, nomeadamente 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,1 mg/mL, e 0,05 mg/mL (em 1% DMSO).

## 2. Estirpes de *C. elegans*

As estirpes utilizadas para a realização desta dissertação de mestrado foram obtidas através do Caenorhabditis Genetics Center (CGC), University of Minnesota, EUA (<http://www.cbs.umn.edu/CGC>). Foram usadas as seguintes estirpes de *C. elegans*: N2 (tipo selvagem, WT); modelos *C. elegans* da DMJ (AT3q130) (Tabela 4) (Teixeira-Castro et al. 2011); modelo *C. elegans* de tauopatias (CK10) (Tabela 4) (Kraemer et al. 2003); LD1171 Idls3 [gcs-1p::GFP + rol-6(su1006)] (Tabela 5) e CL2166 (dvls19 [(pAF15)gst-4p::GFP::NLS] III; CF1038 (daf-16 (mu86) I); e CB1370 (daf-2 (e1370) III).

**Tabela 4.** Estirpes modelo de doenças neurodegenerativas utilizadas neste estudo (wormbase.com).

Estirpes	Genótipo	Fenótipo	Descrição
<b>AT3q130</b>	[pF25B3.3 :: AT3v1-1q130 :: yfp]	Tempo de vida reduzido, agregação proteica ao dia 4 e que progride com o envelhecimento, disfunção motora. (Teixeira-Castro, Ailion, et al. 2011)	Forma mutada da ATXN3 humana. O trato de 130Qs de pPD95.77:: Punc119 :: MJD1-130Q foi subclonado nos locais de restrição Bgl II e Eco0109 I do vetor pGEM-7Zf (+) :: MJD1-1q75.
<b>Ck10</b>	bkls10 [Paex-3 :: h4 R1NTauV337M; Pmyo-2 :: gfp]	Tempo de vida reduzido, disfunção motora, menos postura de ovos, alteração morfológica (Dpy). (Kraemer et al. 2003)	Forma mutada da Tau humana. Um transgene integrado que codifica as isoformas 1N4R de tau humano com a mutação FTDP-17 de 337M.

**Tabela 5.** Estirpes repórter utilizadas neste estudo (Wormbase.com).

Estirpes repórter	Genótipo	Expressão	Via	Fenótipo	
<b>CL2166</b>	dvIs19 [(pAF15) gst-4p::GFP::NLS] III	núcleo do intestino, parede muscular do corpo, faringe, cabeça e no citoplasma da maioria dos tecidos	Oxidativa	Fenótipo selvagem	Transgênico integrado com um plasmídeo que contém uma fusão transcricional da sequência genômica do promotor do gene <i>gst-4</i> com o gene que codifica para GFP.
<b>LD1171</b>	ldIs3 [gcs-1p::GFP + rol-6 ( su1006 )]	faringe, neurónios quimiossensíveis ASI, intestino anterior e posterior	Proteossoma	Fenótipo rolante	Transgênico integrado com um plasmídeo que contém uma fusão transcricional da sequência genômica do promotor do gene <i>gcs-1</i> com o gene que codifica para GFP.

### 3. Crescimento e manutenção de *C. elegans*

As estirpes estavam preservadas a -80 °C numa solução de 1:1 de M9 e solução de congelamento (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.0); glicerol 30%; 5 mM NaCl; MgSO<sub>4</sub> 1 M). Após descongelamento, os organismos *C. elegans* foram mantidos em placas de NGM (Nematode Growth Medium) contendo 1 mL de *E. coli* OP50 (fonte de alimento) a 20 °C e suplementadas com micronutrientes. Para preservação a -80 °C, as placas de NGM com muitos nemátodes em estado larvar L1/L2 e quase sem comida foram lavadas com meio M9 (3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 g NaCl; 1 mL de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 M e dH<sub>2</sub>O para volume final de 1 L) 3x, o precipitado foi ressuscitado numa solução de 1:1 de meio M9 e solução de congelamento e o volume distribuído por tubos de 1,5 mL armazenados a -80 °C.

#### 3.1. *E. coli* OP50

A cultura de *E. coli* OP50 utilizada como alimento para os nemátodes foi preparada em 200 mL de meio Luria Bertani (LB) a 37 °C, com agitação, durante 16 horas. Posteriormente, 1 mL desta cultura foi adicionada em cada placa NGM (90 mm), deixando-se as placas a secar à temperatura ambiente durante 4-5 dias, antes do armazenamento a 4 °C. Para os ensaios de tratamento dos animais em meio líquido usou-se a estirpe de *E. coli* OP50 inativada. Para tal, após o crescimento da cultura de OP50 durante a noite, esta foi centrifugada a 3500 rpm/4 °C durante 30 minutos, e o precipitado foi inativado por 3 ciclos de congelamento em azoto líquido alternados com descongelamento em banho quente, a 65 °C. A bactéria assim inativada foi armazenada a -80 °C para posterior utilização nos ensaios em meio líquido.

### 4. Sincronização do estadio de desenvolvimento de *C. elegans*

Para a realização de qualquer teste ou análise com *C. elegans*, é necessário que os animais usados estejam sincronizados no mesmo estadio de desenvolvimento. A preparação de culturas sincronizadas de animais é realizada através da postura de ovos ou pelo método de sincronização por hipoclorito 20% alcalino, dependendo do número total de animais que se deseja obter.

#### 4.1. Postura de ovos

A sincronização de animais por postura de ovos é realizada com a transferência de 15 animais jovens adultos para placas de NGM com *E. coli*. Nestas placas, os animais adultos, permanecem durante aproximadamente 2-3 horas, onde põem ovos, antes de serem removidos das placas. Deste modo, os

ovos depositados nas placas irão eclodir simultaneamente gerando uma população síncrona em termos de desenvolvimento. Assim, após 4 dias, todos os animais da placa serão novamente adultos.

### 4.2. Sincronização por hipoclorito 20% alcalino

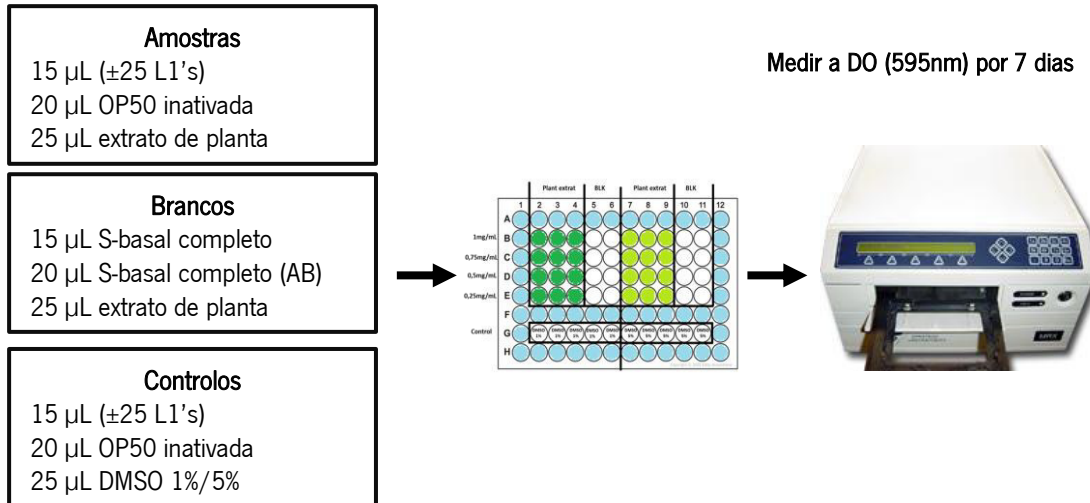
No processo de sincronização por hipoclorito 20% alcalino, os animais adultos são sujeitos a um tratamento com uma solução hipoclorito 20% alcalino contendo lixívia comercial (Pavão) e NaOH (0,5 M NaOH,  $\pm$  2.6% NaClO) durante aproximadamente 5-7 minutos, agitados vigorosamente e depois centrifugados (2000 xg, 20 °C, 1 min). Este processo causa a disrupção dos corpos dos animais adultos, permitindo a libertação dos ovos. Os ovos resultantes deste processo são lavados 3X com meio M9, e por fim mantidos durante a noite em meio S-basal completo (S-basal (5.85 g NaCl, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mL colesterol (5 mg/mL em etanol)), suplementado com MgSO<sub>4</sub> 1 M, CaCl<sub>2</sub> 1 M, solução “trance metal” e citrato de potássio 1 M) em agitação. Na ausência de comida, os ovos eclodem e permanecem nestas condições como larvas L1 até serem transferidos para placas com OP50 (aproximadamente 16 horas após tratamento com hipoclorito 20% alcalino).

## 5. Toxicidade dos extratos

A determinação das concentrações não tóxicas para cada extrato de planta, especificamente HS, HP, HM, LR, LB, GE, EP e PL, foi realizada em placas de 96 poços, como previamente descrito (Teixeira-Castro et al. 2015) e ilustrado na Fig.11, utilizando a taxa de consumo de alimento (*E. coli* OP50) como uma medida indireta do crescimento, reprodução e estado de saúde dos nemátodes.

Os nemátodes N2 sincronizados pela solução de hipoclorito 20% alcalino, no estadio L1 (N=20-25) foram colocados numa placa de 96-poços com diferentes concentrações de cada extrato (1 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL) e, *E. coli* OP50 inativada (DO<sub>595</sub> de 0,6-0,8), ressuspensa em S-basal completo suplementado com estreptomicina, penicilina e nistatina. As placas foram incubadas a 20 °C com agitação a 180 rpm durante 7 dias. A DO<sub>595</sub> da OP50 foi medida diariamente num leitor de placas (Bio-Rad) para se apurar a taxa de consumo do alimento (OP50) ao longo do tempo como medida do efeito de cada extrato no crescimento e na sobrevivência dos animais. Nesta experiência foi utilizado como controlo positivo tratamento com uma solução de 1% DMSO, e como controlo negativo foi utilizada uma solução de 5% DMSO que é tóxica para os animais. Cada concentração de extrato foi testada em 3 ensaios independentes.





**Figura 11.** Representação esquemática do ensaio de toxicidade dos extratos de plantas. Os nemátodes da estirpe N2 são incubados numa placa de 96-poços com *E. coli* OP50 como fonte de comida e diferentes concentrações de extrato. A densidade ótica é medida todos os dias usando o leitor de microplacas (Bio-Rad microplate reader 680), durante 7 dias.

## 6. Tratamento dos *C. elegans* com extratos de plantas

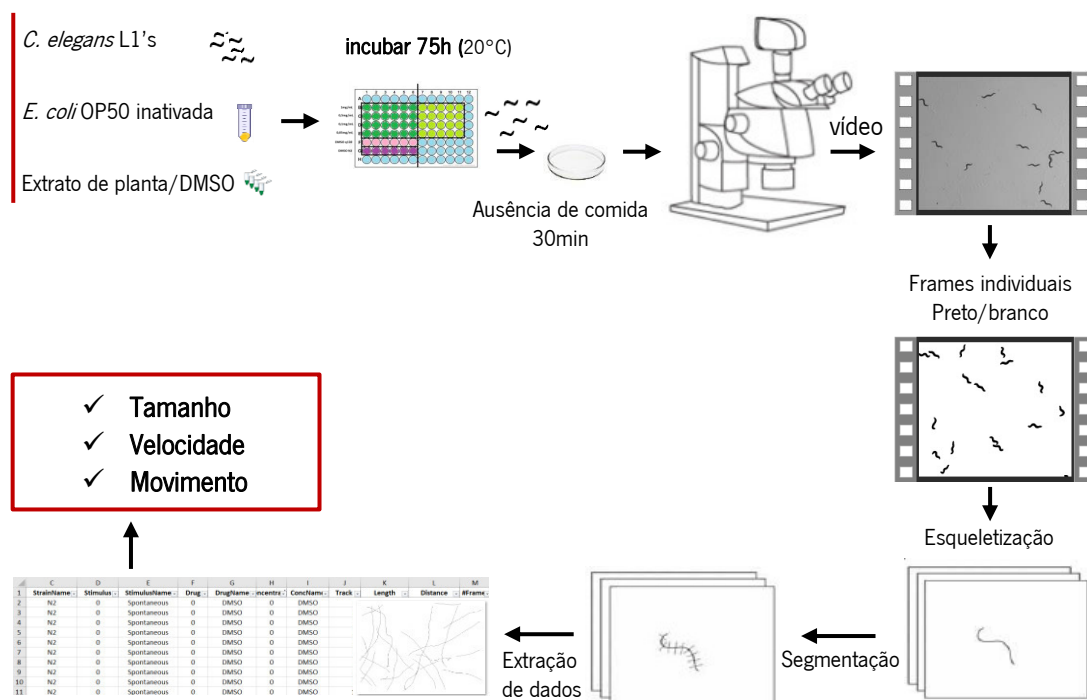
Os nemátodes das estirpes AT3q130 e CK10 sincronizados pela solução de hipoclorito 20% alcalino, no estadio L1, foram incubados, em meio líquido, numa placa de 96-poços com diferentes concentrações de cada extrato de planta (tabela 6) e 1% DMSO (controlo), e com *E. coli* OP50 inativada ( $DO_{595}$  de  $\approx 0,8$ ), ressuspensa em S-basal completo suplementado com estreptomicina, penicilina e nistatina. As placas foram incubadas a 20°C com agitação a 180 rpm. Ao dia 4 de vida pós-eclosão, os animais são utilizados para experiências de avaliação dos fenótipos motores.

**Tabela 6.** Concentrações de extratos de plantas testadas.

Solução stock concentração (mg/mL)	Concentração testada (mg/mL)
4.8	1
2.4	0.5
0.48	0.1
0.24	0.05

## 7. Avaliação dos fenótipos dos modelos de *C. elegans* da DMJ e de tauopatias

A expressão da ATXN3 humana expandida no modelo de *C. elegans* da DMJ e a expressão da tau mutada no modelo de tauopatias CK10, causa, entre outros aspetos, problemas motores nos animais. Para avaliar o efeito do tratamento com diferentes extratos no fenótipo motor dos animais AT3q130, CK10 e N2 (controlo) procedeu-se à obtenção de vídeos do seu movimento espontâneo e estimulado, usando uma lupa com uma câmara integrada (camara Olympus SC30, lupa Olymous SZX7). Os animais foram crescidos sincronizadamente na presença de diferentes concentrações de extratos de HS, HP, HP, LB, LR, GE, PL e EP como descrito anteriormente (secção 6), até ao dia 4, após a sincronização por hipoclorito 20% alcalino (ou seja, até o primeiro dia de estadio adulto). Os animais adultos foram lavados com meio M9 e transferidos para uma placa de meio NGM 60 mm sem comida, onde permaneceram durante 30 minutos antes da obtenção dos vídeos. Foram gravados 2 vídeos por ensaio e condição experimental e para documentar também o movimento estimulado dos animais, cada placa foi exposta a 3 quedas consecutivas da altura da base da lupa para a bancada previamente à gravação (1 vídeo de 30 s por condição experimental e ensaio). Os vídeos foram processados utilizando o software Image J e o plugin Wrmtrck, obtendo-se informações sobre o tamanho do animal e a sua velocidade de deslocação.



**Figura 12.** Representação esquemática do ensaio de motilidade. Os nematodos L1's sincronizados da estirpe AT3q130, CK10 e N2 (controlo) são incubados com extratos de plantas ou 1% DMSO (controlo). Ao dia 4 é avaliado o efeito no movimento espontâneo (2 vídeos de 1 minuto) e estimulado (1 vídeo de 30 segundos) dos animais através da realização de vídeos, após a ausência de comida por 30 minutos. Estes são processados utilizando o software Image J e o plugin Wrmtrck.

## 8. Avaliação da agregação da ataxina-3 em *C. elegans* modelo de DMJ

A quantificação dos níveis de agregação da ATXN3 mutada no sistema nervoso do modelo da DMJ (AT3q130) foi realizada a partir de imagens da cabeça dos animais (onde se concentra uma grande quantidade de neurónios) obtidas por microscopia confocal (Olympus FV1000). Os animais (tratados com HS, HP e HM e não tratados) foram transferidos para lâminas com finas camadas de agarose (5% em M9) e imobilizados com a ajuda do composto levamisole (5mM). No microscópio confocal as imagens foram adquiridas a cada 0,5 mm ao longo do eixo dos Z usando um laser de 515 nm. O “pinhole” do microscópio foi ajustado para “airy-unit 1” e foi apenas usada a ampliação de 60x. As imagens obtidas foram analisadas numa ferramenta denominada MeVisLab (Teixeira-Castro et al. 2011) de modo a quantificar o número de agregados de ATXN3 mutada, o número de agregados/área do animal e a área total dos agregados/área do animal. Foram realizados 3 ensaios independentes, sendo que em cada ensaio foram adquiridas 6-8 fotos por condição.

## 9. Avaliação da descendência no modelo *C. elegans* de Tauopatia

Após o tratamento com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL, 10 animais por condição foram transferidos para placas de 35 mm (1 animal por placa) suplementadas com *E. coli* OP50 inativada e transferidos para novas placas a cada 24 h. Em cada dia os descendentes L2-L3 presentes em cada placa foram contados utilizando uma lupa estereoscópica Olympus SZX7. Foram realizados 3 ensaios independentes por estirpe e condição de tratamento.

## 10. Tamanho corporal dos *C. elegans*

Para determinar o tamanho dos nemátodos, estes foram tratados como previamente descrito na secção 6 com os extratos de HS, HP e HM. Ao dia 4, após transferência para placas de NGM de 60 mm, foram fotografados (câmara Olympus SC30, lupa Olympus SZX7). Foram analisados  $\pm$  50 animais por condição e realizados 5 ensaios independentes. As imagens foram processadas e o tamanho dos animais determinado com o software ImageJ.

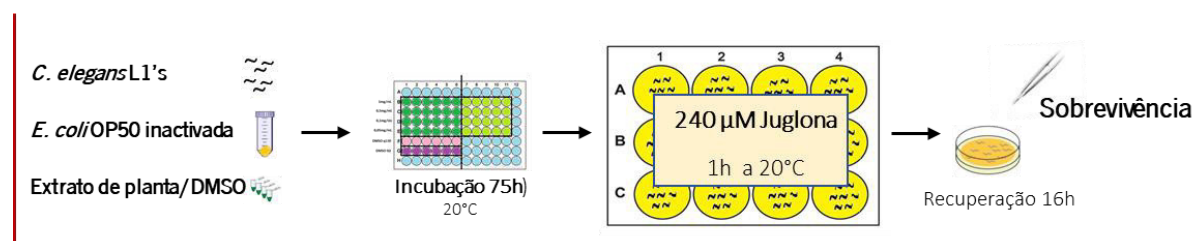
## 11. Avaliação dos efeitos dos extratos HS, HP e HM na longevidade de *C. elegans*

Para a determinação do efeito do tratamento com extratos na longevidade dos animais *C. elegans* foi analisada a sobrevivência de 100 animais por condição ao longo do tempo tendo-se incluído as estirpes *daf-16* (*mu86*) e *daf-2* (*e1370*) como controlos negativos e positivos, respetivamente. No ensaio de

longevidade a sobrevivência dos animais foi avaliada diariamente. Os animais foram transferidos diariamente para placas de 60 mm no sentido de eliminar toda a descendência ou, quando possível, a cada 2-3 dias. No presente estudo avaliou-se o efeito de um pré-tratamento com extratos na longevidade dos animais bem como o efeito de um tratamento crônico ao longo de toda a vida do animal. No primeiro caso, os animais foram tratados com extratos até ao dia 4 e posteriormente transferidos para placas de meio NGM 60 mm apenas com OP50 inativada, condição que se manteve no resto do ensaio. No segundo caso, os animais foram mantidos em placas de 60 mm com OP50 + extrato a 1 mg/mL ou OP50 + 1% DMSO. Diariamente, a sobrevivência dos animais foi avaliada. Os animais foram considerados mortos quando não respondiam ao toque e/ou na ausência de movimentos da faringe. Animais dissecados na parede das placas, com fenótipo de eclosão de ovos no interior do corpo (*bagging*) ou com extrusão do intestino foram censurados (eliminados da contagem).

### 12. Avaliação da resistência ao stress oxidativo induzido por juglona

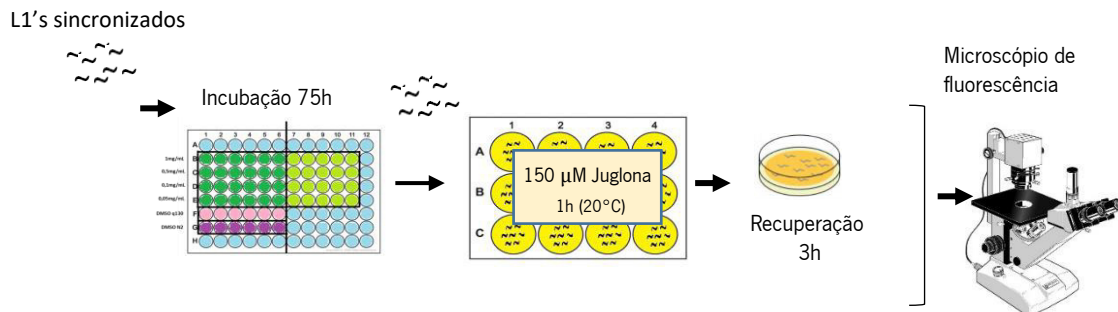
Para o ensaio de resistência ao stress oxidativo (Fig.13), os nemátodes das estirpes N2, AT3q130 e CK10 foram mantidos como descrito na secção 6, e ao dia 4 foram lavados com M9 e incubados numa placa de 12 poços contendo uma solução de M9 com juglona (Sigma) a uma concentração de 240  $\mu$ M, durante 1 hora a 20 °C, no agitador orbital, protegidos da luz. Após este período os animais foram lavados com meio M9 e transferidos para uma placa com meio NGM semeada com *E. coli*/OP50, durante 16 h até ser avaliada a taxa de sobrevivência na lupa estereoscópica (Olympus SZX7). Os animais foram considerados mortos após ausência de resposta quando tocados com um fio de platina e também pela ausência de batimento faríngeo. Foram realizados 5 ensaios independentes para as estirpes AT3q130 e CK10, e 3 para animais da estirpe N2, expostos aos extratos ou a 1% DMSO como controlo negativo.



**Figura 13.** Representação esquemática do ensaio de resistência ao stress oxidativo. Os nemátodes sincronizados no estadio L1 são incubados com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1mg/mL. Ao dia 4, são sujeitos ao stress oxidativo induzido pela exposição em meio líquido a 240  $\mu$ M de juglona, e 16h depois quantificada a sobrevivência.

### 13. Avaliação da expressão de marcadores da resposta antioxidante usando estirpes repórter

Os animais transgênicos LD1171 e CL2166, que contêm respetivamente os promotores dos genes *gcs-1* ( $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase-1) e *gst-4* (glutathiona-s-transferase-4) em fusão com o cDNA codificante da proteína fluorescente GFP, foram usados para avaliar a ativação da expressão destes genes no contexto do tratamento com extratos de HS, HP e HM. Ao dia 4 (Fig.14) aproximadamente 100 animais tratados foram incubados numa placa de 12-poços com M9 ou M9 com juglona a uma concentração de 150  $\mu$ M, durante 1 h. Os nemátodes foram depois lavados 5 vezes com M9 e transferidos para uma placa NGM com *E. coli* OP50, onde recuperaram durante 3 h.



**Figura 14.** Representação esquemática do ensaio de expressão de genes codificantes de proteínas antioxidantes usando estirpes repórter. Os *C. elegans* CL2166 e LD1171 foram incubados com extrato de HS, HP e HM e ao dia 4, foi avaliada por microscopia de fluorescência a expressão génica de genes repórter em condições normais e de stress oxidativo induzido por 150  $\mu$ M de juglona.

Após este período, cerca de 10 nemátodes por condição, foram transferidos e imobilizados numa lâmina onde previamente tinha sido colocada uma fina camada de agarose 3% com uma gota de sódio de azida a 2%. Nestas condições os animais foram alinhados lateralmente, e cobertos com uma lamela, tendo sido esta selada com agarose. Os animais foram depois fotografados num microscópio de fluorescência Olympus, em “Brightfield” e com o filtro para GFP. Para todas as condições experimentais e para cada estirpe testada, todas as imagens foram capturadas usando a mesma exposição na ampliação de 100X. A intensidade de fluorescência, que traduz o nível de expressão do transgene, e, portanto, o grau de indução dos promotores das enzimas antioxidantes em estudo, foi medida utilizando o software Image J. Foram realizados 4 ensaios independentes.

## 14. Análise da expressão génica

### 14.1. Extração de RNA

Animais N2, AT3q130 e CK10 tratados com extratos de HS, HP e HM, foram recolhidos ao dia 4 e lavados em meio M9. O precipitado de animais de cada estirpe foi mantido a -80 °C até se proceder à extração de RNA. O RNA total foi isolado adicionando a cada precipitado 100 µL de Trizol um reagente que provoca a lise da parede celular mantendo a integridade dos ácidos nucleicos. Após agitação em vortex 5 minutos para homogeneização, as amostras foram sujeitas a ciclos alternados de congelamento (azoto líquido) /descongelamento (banho 37 °C) seguido de agitação no vortex durante 5 minutos, para destruição da cutícula. De seguida, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente durante 10 minutos, seguindo-se uma centrifugação a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos *ependorf* de 1,5 mL livres de RNAses, aos quais foram adicionados 100 µL de clorofórmio, seguido de agitação no vortex durante 15 minutos, a 4 °C. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 3 minutos, e centrifugadas a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. A presença de clorofórmio levou à separação de fases no tubo *ependorf*. A camada superior, rica em RNA, foi transferida para novos tubos de 1,5 mL livres de RNAses onde se adicionou 500 µL de isopropanol. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente durante 10 minutos para precipitação do RNA. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, para a formação do precipitado de RNA. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 100 µL ETOH 75% (em água DEPC), e centrifugados a 10000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Após descarte do sobrenadante. O precipitado das amostras foi deixado à temperatura ambiente por 30 minutos e ressuspenso em 10 µL de água DEPC (para inibir as RNAses). Para uma dissolução completa do RNA as amostras foram submetidas a 60 °C por 10 minutos num bloco térmico e guardadas a -80 °C.

### 14.2. Tratamento das amostras de RNA com DNAase

As amostras de RNA extraído dos nemátodes foram quantificadas num NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher) (anexos I e II - tabela 1 e 2).

Previamente à síntese de DNA complementar foi efetuado um tratamento com DNAase para remoção de DNA genómico. A reação foi preparada com 2 µg de RNA, 2 µL de 10X RTBuffer, 2 µL DNAase (ThermoFisher), e água com DEPC até perfazer o volume de 20 µL. A reação decorreu a 37 °C num termociclador Bio-Rad durante 30 minutos. A reação foi terminada com a adição de 2 µL de EDTA (50 mM) por amostra e incubação a 65 °C durante 10 minutos.

### 14.3. Verificação da integridade do RNA

De forma a verificar a integridade do RNA extraído realizou-se uma eletroforese das amostras de RNA mantidas a -80 °C em gel de agarose 1,5% (TEA), ao qual se adicionou o corante GreenSafe Premium (3 µL/100 mL, NZYtech) para a deteção de ácidos nucleicos. Para cada amostra foram carregados no gel 1 µg de RNA juntamente com 5 µL de tampão (loading buffer). Após cerca de 20 minutos de corrida, o gel foi visualizado num transiluminador UV, para análise da integridade do RNA.

### 14.4. Síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa

O cDNA foi sintetizado a partir das amostras de RNA previamente extraído, utilizando o kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad). Assim, por reação foram misturados: 5 µL de mix (4 µL iScript reaction mix + 1 µL da enzima transcriptase reversa), 1 µg de RNA previamente extraído, e água com DEPC até perfazer o volume de 20 µL. A reação de transcrição reversa decorreu num termociclador Bio-Rad: 25 °C durante 5 min, 42 °C durante 30 min, e por fim 85 °C durante 5 min. O cDNA foi em seguida armazenado a -20 °C.

### 14.5. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

#### 14.5.1. Determinação da eficiência dos primers

Primers para diferentes marcadores da resposta antioxidante, disponíveis no laboratório, foram testados relativamente à sua eficiência em reações de qRT-PCR. Os primers tinham sido desenhados no primer blast (NCBI) de acordo com as características recomendadas para a sua utilização em qRT-PCR, por exemplo, serem desenhados de modo a emparelharem nas junções dos exões, gerarem fragmentos até 200 pares de bases, terem ≈ 50% de CGs, entre outros. Os primers (Tabela 7) foram preparados numa concentração de 10 µM e testados numa reação de qRT-PCR que usou 5 diluições consecutivas de uma mesma amostra de cDNA, em duplicado. A eficiência dos primers foi calculada com base no declive da recta definida pela regressão linear do valor do ciclo de amplificação Ct (cycle threshold) número do ciclo em que se deteta aumento de fluorescência sobre o logaritmo da quantidade de cDNA, segundo a fórmula: [Eficiência =  $10(-1/\text{slope}) - 1$ ].

Tabela 7. Primers utilizados no qPCR.

Gene	Sequência
sod-3	F-TCT CCA ACC AGC GCT GAA AT
	R- GAA CCG AAG TCG CGC TTA AT
gst-10	F-TCG AAG ACA TTC GGT TCG ACT
	R-TCT TGC TCG TTG GAT CCG TT
skn1-a/c	F-ACA GAA CGT CCA ACC ACA TCA
	R-GTG AGT GGC GCT ACT GTC G
rpb-2	F-CTT TGT CAA CGG TGC ATG GG
	R-TCA GCA GCC TCC TTC AAC TG
pmp-3	F-TCA TTG GTG TTC CCG TGT TCA
	R-TCG TGA AGT TCC ATA ACA CGA TG

#### 14.6. Reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para análise da expressão de genes

A reação de qRT-PCR foi realizado no termociclador Applied Biosystems 7500-FAST Real-Time PCR, utilizando SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems). A amplificação das amostras por qRT-PCR foi realizada em placas de 96 poços (Thermoscientific) seladas com adesivo para microplacas (Thermoscientific). Para cada reação usou-se 1 µL de cDNA, e 19 µL de uma solução mix contendo 10 µL de SYBR Green, 0,5 µL de primers (forward e reverse) e 8 µL de H<sub>2</sub>O MiliQ. Foram ainda incluídos em cada placa controlos negativos (solução mix, mas sem qualquer cDNA), para despiste de eventuais contaminações e dímeros de primers.

As condições usadas na reação de PCR foram as seguintes: desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguido de 95 °C por 15 segundos e 40 ciclos a 60 °C por 1 minuto. A curva de dissociação foi determinada no final dos ciclos de temperatura de acordo com o seguinte programa: 95 °C (15 s), 60 °C (1 min), 95 °C (30 s) e 60 °C (15 s). Foram analisadas três a quatro replicas biológicas de cada condição experimental e cada reação de qRT-PCR foi realizada em duplicado.

Os Cts obtidos na reação de qRT-PCR foram usados para determinar os níveis de expressão do cDNA de cada agente de resposta antioxidante através de um método de quantificação relativa. Assim, os Cts dos genes de interesse foram comparados com Cts de genes de referência (*rpb2* e *pmp-3* – genes cuja expressão é em geral estável e que não varia entre as diferentes condições de estudo). O cálculo da expressão relativa foi baseado na equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .



## 15. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SPSS. Para verificar se os dados apresentavam uma distribuição normal foram usados o teste de Shapiro-Wilk e, teste de Levene para avaliação da homogeneidade dos dados. Para variáveis contínuas e dados de amostras com distribuição normal e variâncias iguais foi aplicado o teste t de Student para comparar dois grupos, ou one-way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett bilateral para comparar três ou mais grupos. Para dados não normais, foi usado o teste de Mann-Whitney teste para comparar 2 grupos e o teste de Kruskal-Wallis teste seguido pelo teste de Dunn para comparar três ou mais grupos. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). Uma diferença estatisticamente significativa foi definida como  $p < 0,05$  e foi feita correção para comparações múltiplas sempre que aplicável.



# **Capítulo III**

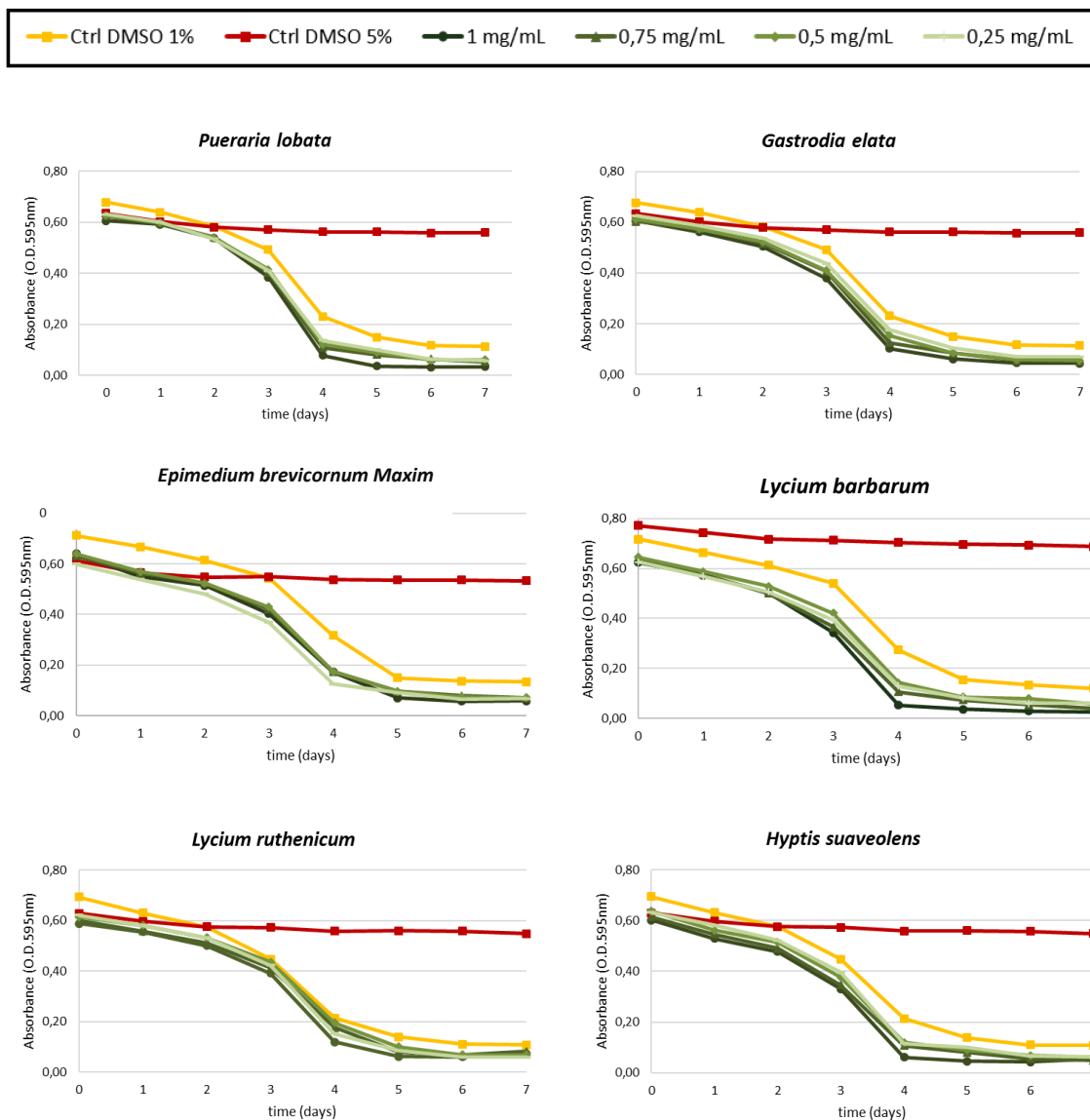
## **Resultados e**

## **Discussão**

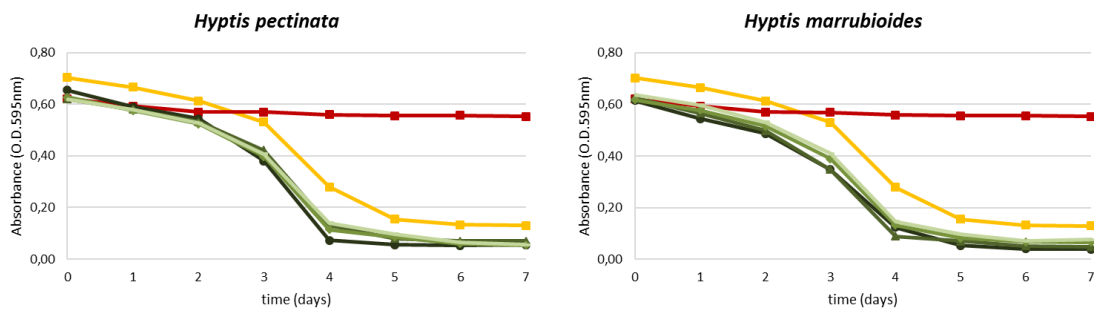


## 1. Avaliação do grau de toxicidade dos extratos de plantas em *C. elegans*

Para determinar possíveis concentrações tóxicas dos extratos de plantas: frutos de *Lycium barbarum* e *Lycium ruthenicum*; extratos de folhas de *Hyptis suaveolens*, *Hyptis pectinata*, *Hyptis marruboides* e *Epimedium brevicornum Maxim*; e extratos de raiz de *Pueraria lobata* e *Gastrodia elata*; em *C. elegans*, foi realizado um ensaio de toxicidade em meio líquido (placas de 96 poços), usando a estirpe selvagem N2. Neste ensaio os extratos de plantas foram testados nas seguintes concentrações: 1 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL (Fig.15).



### Capítulo III – Resultados e Discussão



**Figura 15.** Determinação do grau de toxicidade dos extratos de plantas em *C. elegans* da estirpe selvagem N2. A quantidade de bactéria OP50 foi monitorizada a cada 24 h, durante 7 dias utilizando o leitor de microplacas para medir a absorvância a 595nm (Infinite®200 NanoQuant (Tecan)). Resultados representativos de 3 ensaios independentes.

Neste ensaio, o decréscimo do consumo da OP50 ao longo do tempo (medida por DO 595 nm), foi utilizada como medida indireta da dinâmica de crescimento/desenvolvimento e saúde dos animais. Foi usada neste ensaio uma concentração tóxica de 5% DMSO, que como esperado, se refletiu na taxa de consumo de OP50 que permaneceu constante ao longo do tempo nesta condição. Foi possível observar que em todas as concentrações testadas, incluindo a concentração máxima de 1mg/mL os extratos apresentaram numa dinâmica de consumo de comida semelhante à observada para o solvente 1% DMSO (situação controlo) (Fig. 15), demonstrando a ausência de toxicidade dos extratos em *C. elegans*. Não foi, no entanto, possível testar concentrações mais elevadas de extratos devido a limitações na sua solubilidade e também na toxicidade induzida por concentrações de DMSO superiores a 1%.

## 2. Avaliação dos efeitos dos extratos de plantas nos fenótipos dos modelos de DMJ (AT3q130) e tauopatias (CK10)

O rastreio fenotípico no que diz respeito aos produtos naturais e seus derivados é uma abordagem poderosa para explorar novos alvos bem como mecanismos de doenças mal compreendidos, fornecendo uma via para aumentar a inovação na indústria farmacêutica e oferecer terapias alternativas (Moffat et al. 2017). Tendo em conta dados prévios da utilização destas plantas na medicina tradicional, bem como propriedades antioxidantes e evidências de neuroproteção descritas e, depois de definirmos as concentrações aceitáveis pelos *C. elegans* WT, fomos investigar o impacto dos extratos de plantas nos fenótipos dos modelos da DMJ (AT3q130) e tauopatias (CK10).

## 2.1. Impacto do tratamento com extratos de plantas no fenótipo dos animais

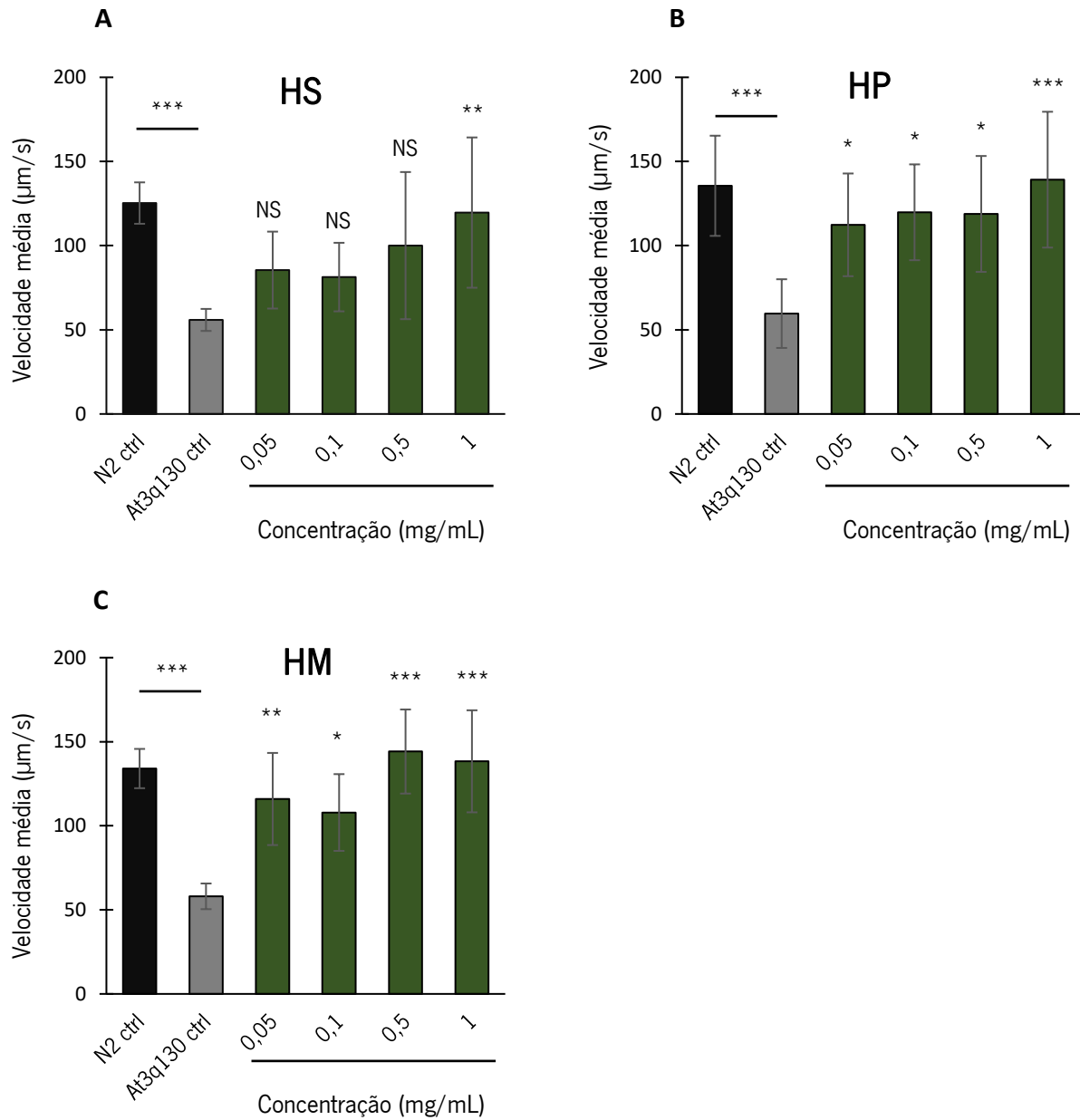
### AT3q130

#### 2.1.1. Impacto do tratamento com extratos de plantas no fenótipo motor

O modelo da DMJ (AT3q130) apresenta um déficit motor quando comparado com a estirpe selvagem, (Teixeira-Castro et al. 2011). Para avaliar o efeito terapêutico dos extratos de plantas neste modelo, nomeadamente no que respeita ao impacto no fenótipo motor destes animais, realizou-se um tratamento crónico com os oito extratos numa gama de concentrações 0,05; 0,1; 0,5 e 1 mg/mL (previamente definidas como não tóxicas) e avaliou-se a motilidade dos animais ao dia 4 de vida, por análise de vídeos do movimento espontâneo e estimulado dos animais.

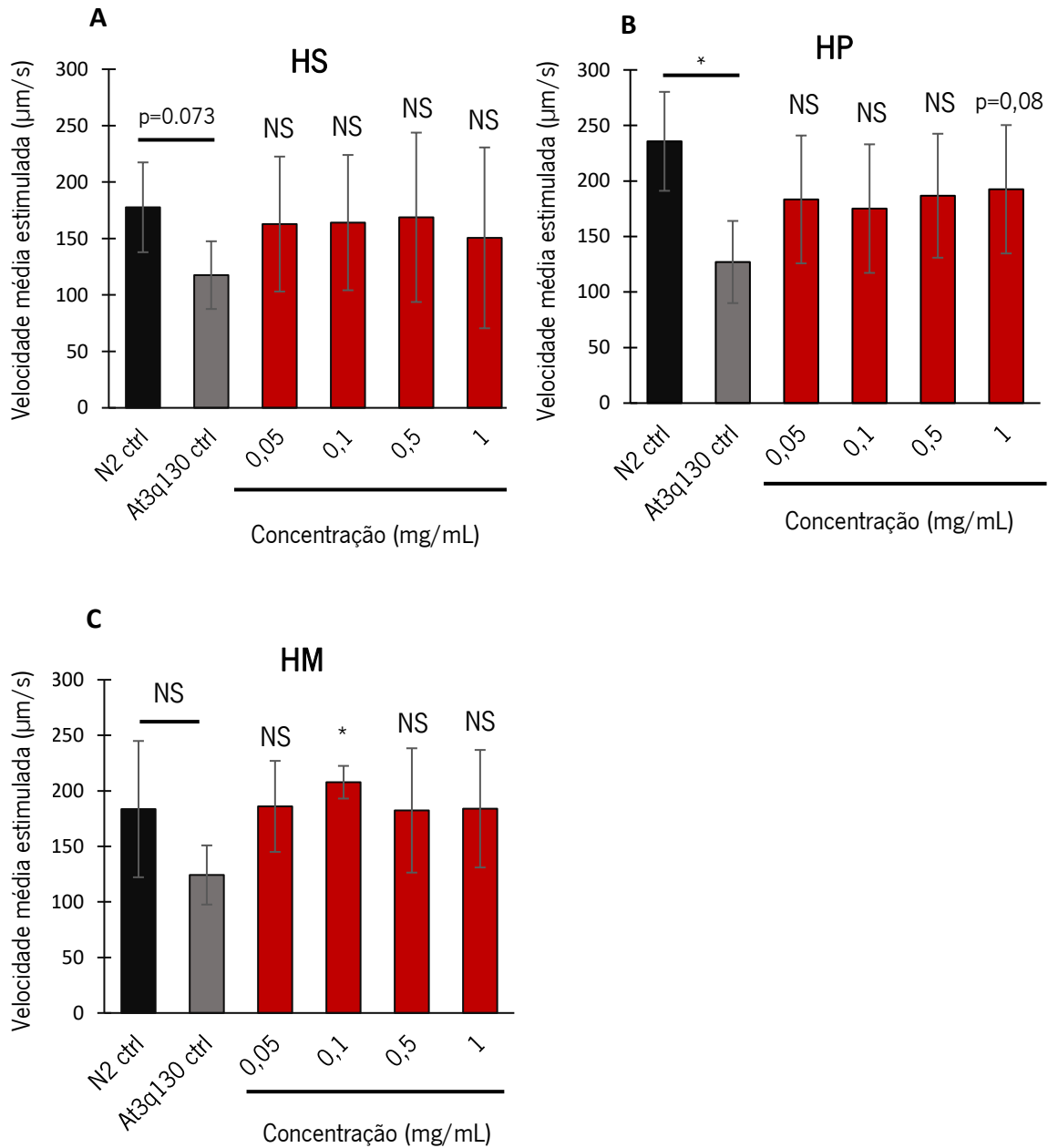
Os resultados demonstram que o extrato HS melhorou significativamente a motilidade espontânea do modelo da DMJ apenas para a concentração de 1 mg/mL ( $p=0,004$ ) (Fig.16A), mas não teve efeito estatisticamente significativo na velocidade dos animais após o seu movimento ter sido estimulado (Fig.17A). Relativamente ao extrato HP, todas as concentrações testadas causaram um aumento da velocidade média espontânea dos animais nomeadamente a concentração de 0,05 mg/mL com  $p=0,028$ , 0,1 mg/mL com  $p=0,011$ , 0,5 mg/mL com  $p=0,012$ , e 1 mg/mL com  $p=0,000$ , (Fig.16B), no entanto, tal efeito não foi observado na condição de estímulo ao movimento. (Fig.17B). Para o extrato HM (Fig.16C), também se observou uma melhoria no fenótipo motor dos animais em todas as concentrações do extrato testadas ( $p=0,009$  para a concentração de 0,05 mg/mL,  $p=0,033$  para 0,1 mg/mL,  $p=0,000$  para 0,5 mg/mL e,  $p=0,000$  para 1 mg/mL), um efeito que foi perdido quando o movimento dos animais foi estimulado. Neste caso, só se detetaram efeitos estatisticamente significativos para a concentração de 0,1 mg/mL ( $p=0,045$ ) (Fig.17C).

Os animais AT3q130 tratados cronicamente com os extratos de LR (bagas goji pretas) e de LB (bagas goji vermelhas) não apresentaram qualquer diferença na velocidade média relativamente à situação controlo, quer na situação de movimento espontâneo quer na situação de movimento estimulado (Figs. 18A e 18B; 19A e 19B).

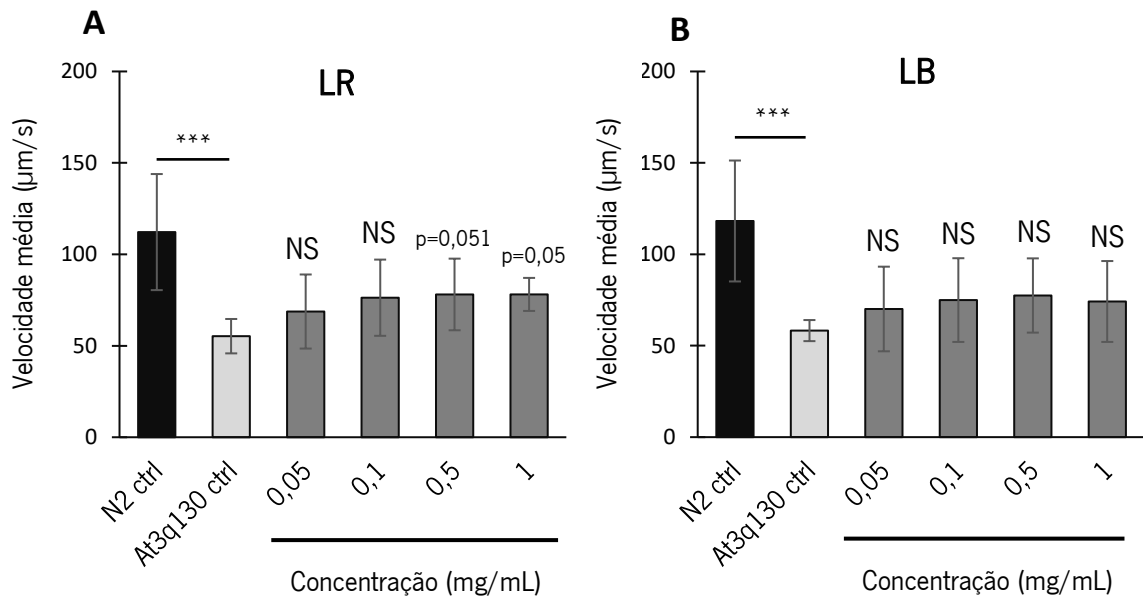


**Figura 16.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de HS \*\* (A), HP \*\*\* (B) e HM \*\*\* (C) no fenótipo motor de um modelo de DMJ em *C. elegans*. Animais adultos, crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento espontâneo na ausência de comida e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 100 animais, divididos por 2 vídeos de 1 minuto, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 8 experiências independentes para HS, 7 para HP e 6 para HM. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.

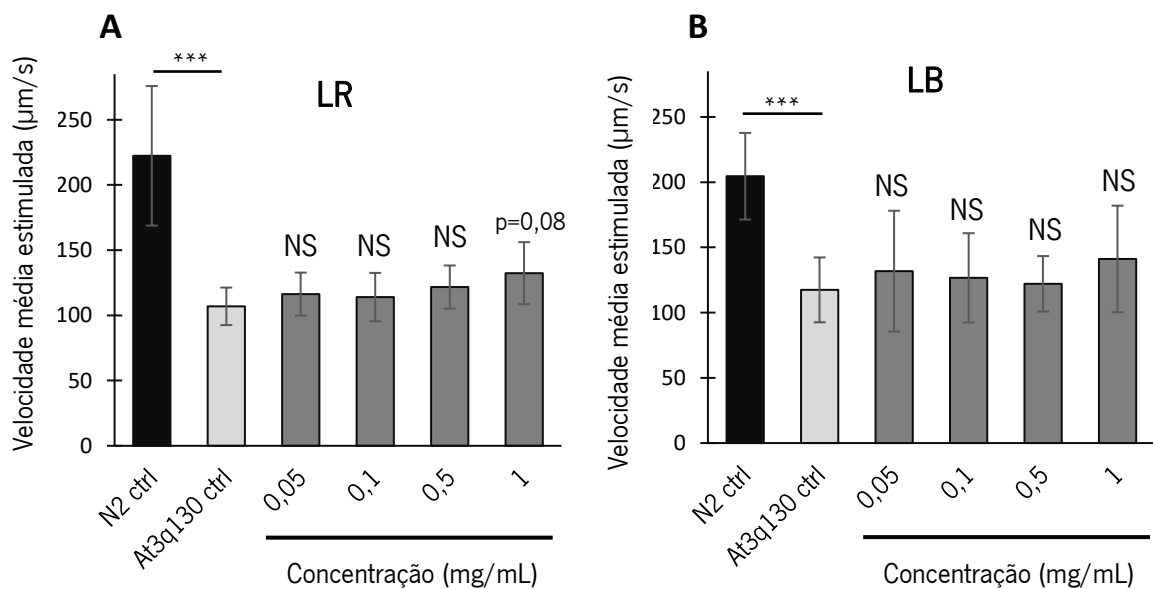




**Figura 17.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de HS NS (A), HP NS (B) e HM \* (C) no fenótipo motor de um modelo de DMJ em *C. elegans*. Animais adultos crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento estimulado e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 50 animais, com 1 vídeo de 30 segundos, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 8 experiências independentes para HS, 7 para HP e 6 para HM. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.

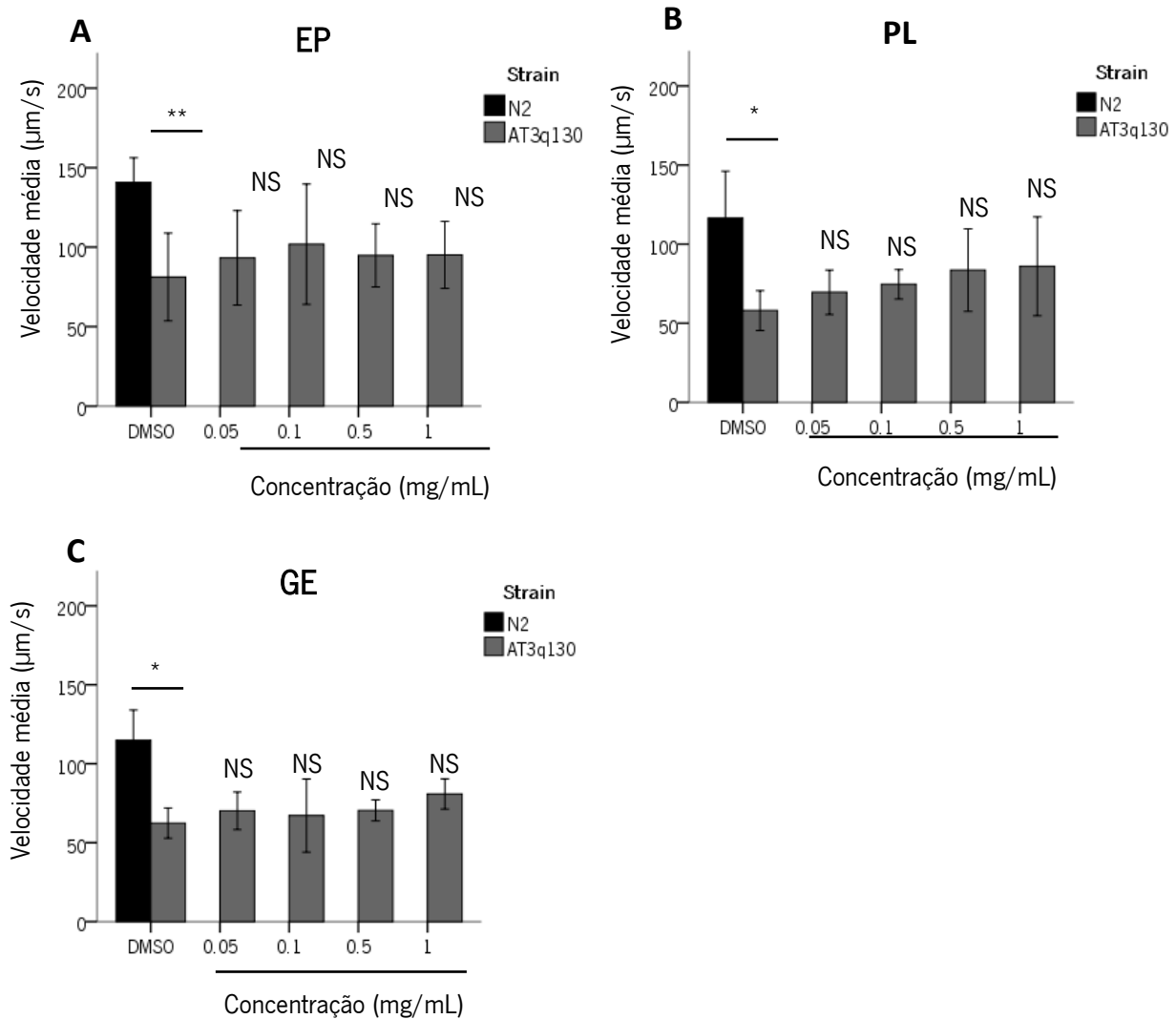


**Figura 18.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de LR NS (A) e LB NS (B) no fenótipo motor de um modelo de DMJ em *C. elegans*. Animais adultos crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento espontâneo na ausência de comida e determinação da velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 100 animais, divididos por 2 vídeos de 1 minuto, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 8 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.

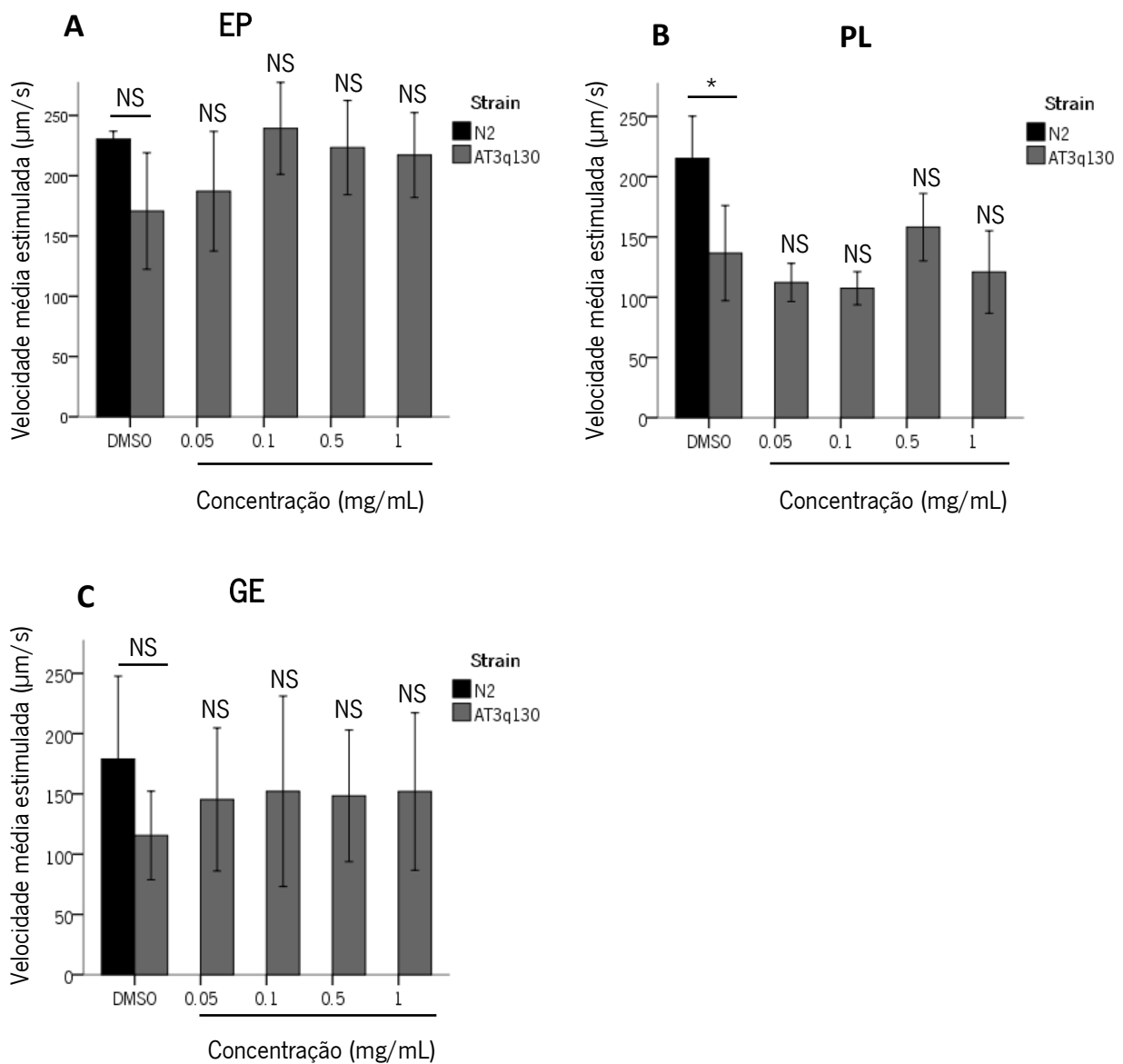


**Figura 19.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de LR NS (A) e LB NS (B) no fenótipo motor de um modelo de DMJ em *C. elegans*. Animais adultos crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento estimulado e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 50 animais, com 1 vídeo de 30 segundos, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 8 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.

Resultados semelhantes foram também obtidos após tratamento dos animais com os extratos de EP, GE e PL, não se tendo observado qualquer efeito benéfico da velocidade média espontânea (Figs. 20A, 20B e 20C) e na velocidade média dos animais após estimulação (Figs. 21A, 21B e 21C).



**Figura 20.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de EP NS (A), PL NS (B) e GE NS (C) no fenótipo motor de um modelo de DMJ em *C. elegans*. Animais adultos crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento espontâneo na ausência de comida e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 100 animais, divididos por 2 vídeos de 1 minuto, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.



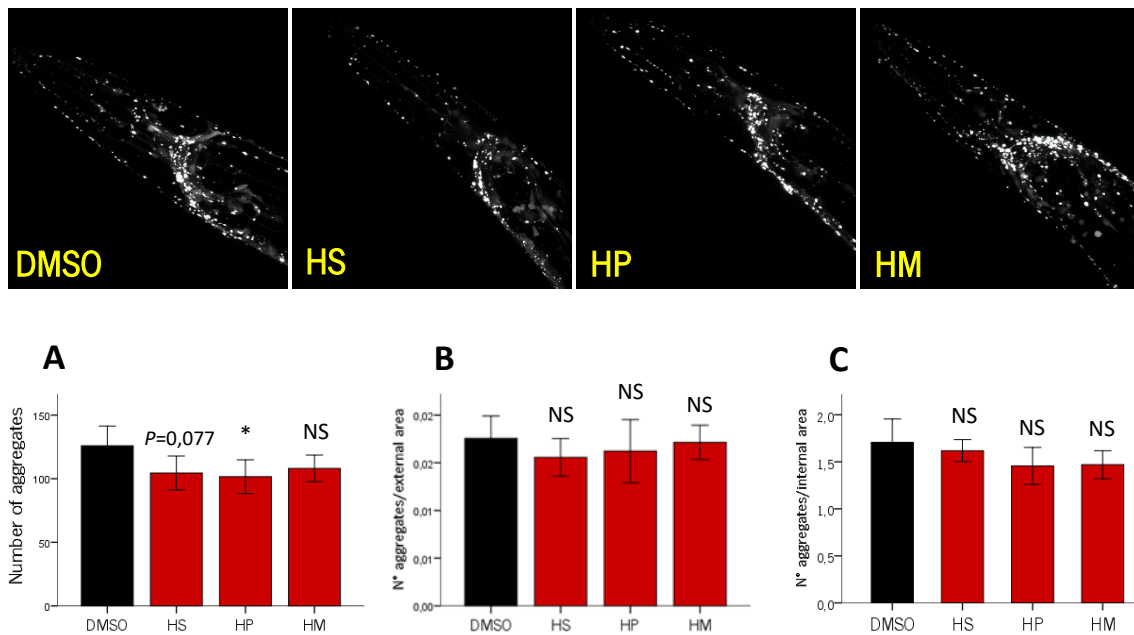
**Figura 21.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos EP NS (A), PL NS (B) e GE NS (C) no fenótipo motor de um modelo de DMJ em *C. elegans*. Animais adultos, crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento estimulado e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 50 animais, com 1 vídeo de 30 segundos, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.

Dos oito extratos testados no modelo *C. elegans* da DMJ, apenas três, nomeadamente, os extratos de HS, HP e HM conduziram a benefícios no fenótipo motor da estirpe AT3q130 após 4 dias de tratamento. Por outro lado, os extratos de LB, LR, GE, PL e EP, apesar de já terem demonstrando propriedades antioxidantes e de neuroprotecção noutros modelos, não alteraram a motilidade do modelo da DMJ em *C. elegans*. A comparação do impacto do tratamento de extratos entre diversos estudos depende sempre das próprias características do extrato (que depende do método de extração), do modelo e do contexto da doença neurodegenerativa em que são aplicados. Neste caso, em experiências futuras, seria importante testar estes extratos no modelo *C. elegans* da DMJ em concentrações mais elevadas e/ou aumentando o tempo de tratamento, uma vez que os defeitos no fenótipo motor dos animais AT3q130 se agravam com o envelhecimento (Teixeira-Castro et al. 2015).

### **2.1.2. Avaliação do impacto do tratamento na agregação da proteína ATXN-3 mutada**

A proteína ATXN3 expandida tende a formar agregados no sistema nervoso do modelo *C. elegans* da DMJ, agregação essa que aumenta ao longo do tempo de vida dos animais. Essa agregação da proteína causadora da doença é particularmente evidente nos neurónios da cabeça dos animais bem como ao longo das cordas dorsal e ventral (Teixeira-Castro et al. 2011).

Uma vez que a ATXN3 mutada é expressa juntamente com a proteína YFP, a quantificação do padrão de agregação nestes animais pode ser realizada com recurso a microscopia confocal. Desta forma, avaliou-se o efeito do tratamento com extratos das plantas HS, HP e HM, a 1 mg/mL no padrão de agregação da ATXN3 mutada nos animais AT3q130. Estes extratos, e particularmente nesta concentração, tinham tido previamente uma ação benéfica relativamente à motilidade destes animais (Fig.22).



**Figura 22.** Efeito dos extratos de HS, HP e HM na agregação da ATXN-3 mutada no modelo AT3q130. Os nemátodes sincronizados no estado larvar L1 foram incubados com 1 mg/mL de extrato até dia 4. As fotografias foram tiradas usando o microscópio confocal. A quantificação do padrão de agregação da ATXN-3 mutada foi realizada recorrendo ao software MeVisLab, nomeadamente número de agregados (A) (com  $p=0,07$  para HS,  $p=0,04$  para HP e  $p=0,149$  para HM), número de agregados pela área do animal (B) (com  $p=0,519$  para HS,  $p=0,771$  para HP e  $p=0,988$  para HM), e pela área total dos agregados (C) (com  $p=0,838$  para HS,  $p=0,159$  para HP e  $p=0,174$  para HM). A estatística foi realizada por ANOVA unidirecional (Dunnet T3 (bilateral)) comparando o grupo controlo (DMSO 1%) com os grupos tratados. Os gráficos mostram um ensaio independente representativo de 3 ensaios independentes, com 8 animais analisados por condição.

Os resultados não mostram diferenças significativas no número total de agregados (Fig.22A) no tratamento com o extrato de HM ( $p=0,149$ ) e com o extrato de HS ( $p=0,07$ ), e uma ligeira diferença estatisticamente significativa para o extrato de HP ( $p=0,04$ ). No entanto, essa diferença deixou de existir após se ter feito uma normalização do número de agregados relativamente à área do animal (Fig.22B). O número de agregados/área interna (ou área total dos agregados), é uma estimativa da área média ocupada pelos agregados da ATXN3 mutada e também nesta medida não foram registadas diferenças estatisticamente significativas dos animais tratados relativamente à situação controlo (Fig.22C).

Desta parte do trabalho conclui-se que embora os extratos das plantas HP, HS e HM, à concentração de 1 mg/mL tenham diminuído a neurotoxicidade da ATXN3 mutada, conduzindo a uma melhoria na locomoção dos animais, este tratamento não teve efeitos significativos na agregação desta proteína dos neurónios, ao dia 4 de vida. Esta dicotomia entre o impacto na motilidade *versus* o impacto na agregação tem sido descrita para vários modelos de doenças neurodegenerativas (Jadiya et al. 2011; Teixeira-

Castro et al. 2015). Por exemplo, o EbPS-A1, um polissacarídeo isolado de *Epimedium brevicornum* foi capaz de inibir a disfunção comportamental mediada pela poliQ, bem como aumentar a resistência ao stress oxidativo, no entanto, não mostrou impacto positivo na agregação de poliQ nem na longevidade dos nemátodes (Xiang et al. 2016). Outro exemplo, o salidroside, um glicosídeo extraído da planta *Rhodiola rosea* foi capaz de reduzir a morte neuronal e a disfunção comportamental mediada pela poliQ expressa nos neurónios ASH, mas o efeito neuroprotetivo não foi associado à prevenção da agregação de poliQ.

Além disso, com esta técnica apenas os agregados proteicos finais são quantificados, pelo que técnicas complementares podem ser usadas para perceber a dinâmica das restantes espécies de agregação e consequentemente, levar a uma maior compreensão do fenómeno de agregação. Também neste caso, seria, assim, relevante verificar a agregação da ATXN3 mutada nos nemátodes tratados com os extratos em estudo, em estadios mais avançados, por exemplo ao dia 6, 8 ou 10, tendo em conta que estudos anteriores demonstraram que em determinados tratamentos neste modelo, como foi o caso do tratamento com ácido valproico, houve uma redução da disfunção motora e o impacto na agregação foi apenas observado ao dia 10 da idade adulta dos animais (Teixeira-Castro et al. 2011).

## 2.2. Impacto do tratamento com extratos de plantas nos fenótipos dos animais CK10

### 2.2.1. Avaliação do impacto dos extratos de plantas no fenótipo motor

Está descrito que a estirpe CK10 apresenta defeitos acentuados no fenótipo motor, frequentemente visível após eclosão, tornando-se progressivamente mais pronunciado, mostrando paralisia parcial, movimento lento, enrolamento e arrasto da cauda, características essas que levam à quase imobilização dos animais ao dia 9 de adulto (Kraemer et al. 2003).

Avaliou-se o impacto do tratamento crónico com os extratos de plantas, no movimento espontâneo e estimulado dos animais CK10. Neste caso apenas foram testados cinco dos extratos iniciais: extratos HS, HP e HM (Figs. 16A, B e C), por terem reduzido significativamente a disfunção motora dos animais AT3q130 e os extratos LB e LR (Figs. 18A e B), que embora não tenham mostrado qualquer impacto positivo estatisticamente significativo apresentaram uma melhoria visualmente.

Observou-se que o extrato de HS (Fig.23A) melhorou significativamente o fenótipo motor espontâneo apenas para as concentrações de 0,5 mg/mL ( $p=0,005$ ) e 1 mg/mL ( $p=0,004$ ). Por outro lado, a avaliação da velocidade dos animais após estimulação (Fig.24A) demonstrou que o tratamento com o

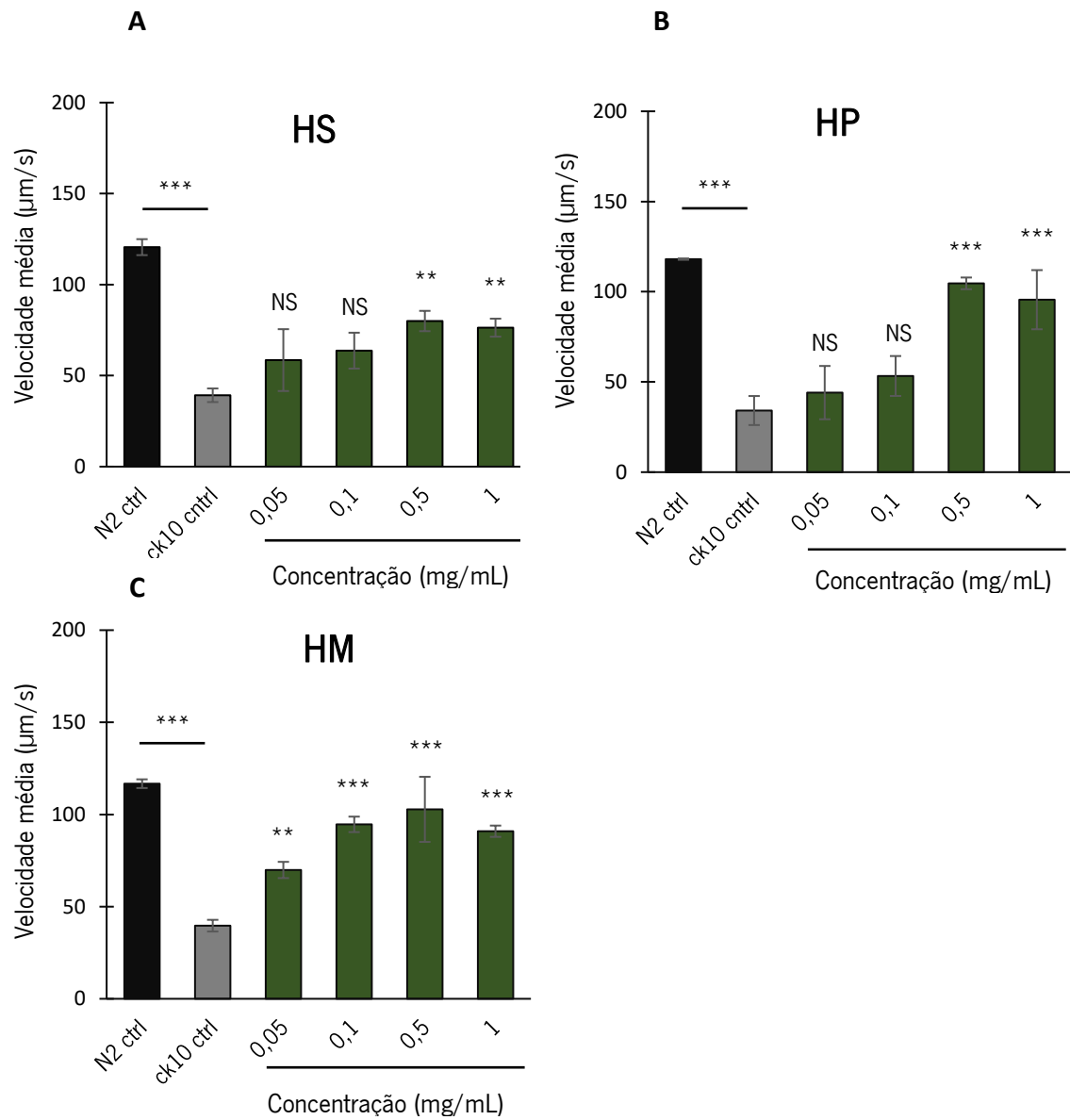
### Capítulo III – Resultados e Discussão

extrato de HS teve uma ação benéfica nas mesmas concentrações de 0,5 mg/mL ( $p=0,042$ ) e 1 mg/mL ( $p=0,018$ ). Resultados semelhantes foram obtidos após tratamento dos animais com o extrato de HP, tendo-se verificado melhorias significativa no movimento espontâneo dos animais para as duas concentrações mais elevadas (Fig.23B), de 0,5 mg/mL ( $p=0,000$ ) e 1 mg/mL ( $p=0,000$ ). Verificou-se que este extrato também melhorou significativamente o fenótipo motor dos animais após o estímulo (Fig.24B) com  $p=0,039$  e  $p=0,030$  para as concentrações de 0,5 e 1 mg/mL, respetivamente.

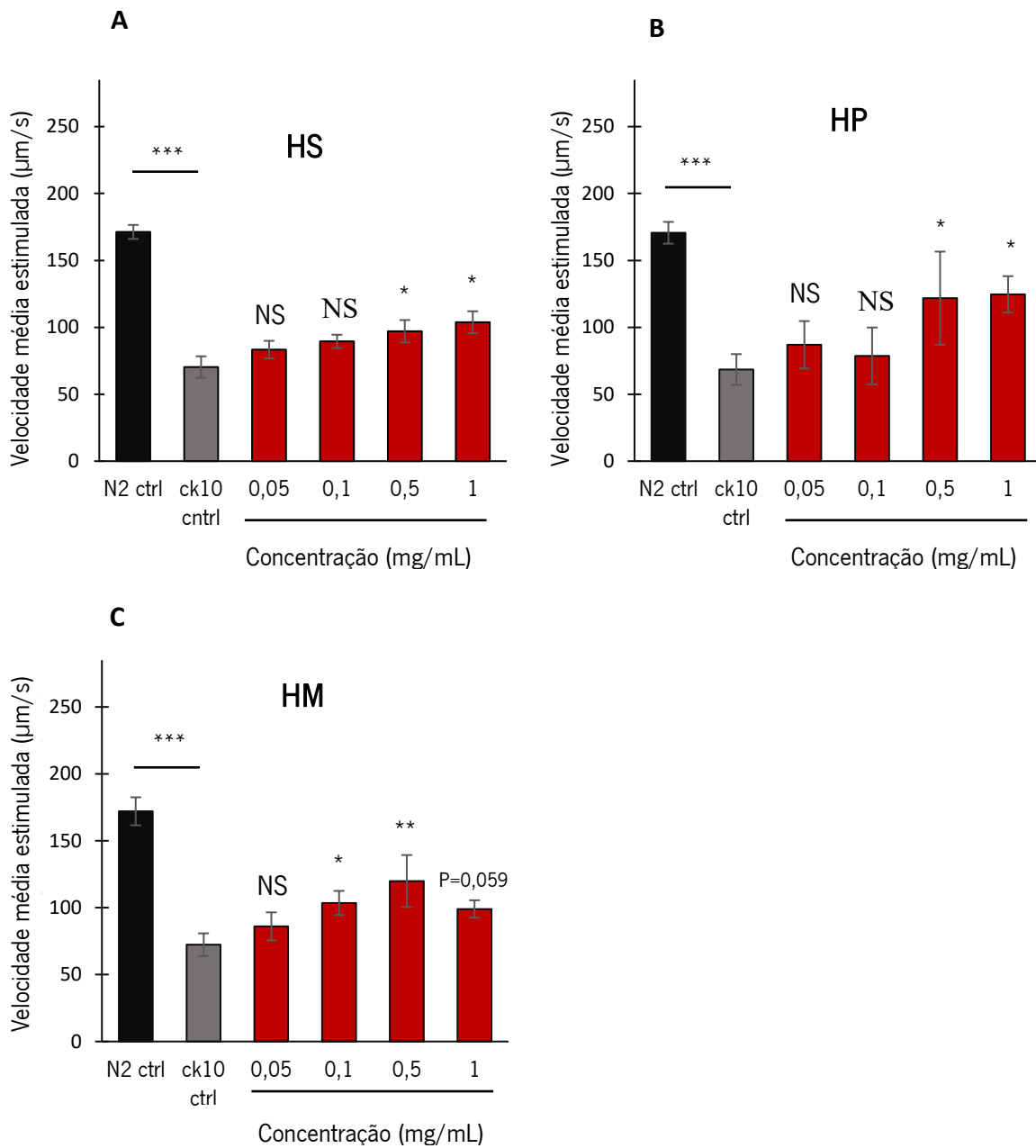
No caso de animais tratados com extrato de HM (Fig.23C), observou-se um aumento da velocidade média espontânea dos animais CK10 tratados, em todas as concentrações testadas 0,05 ( $p=0,005$ ), 0,1, 0,5 e 1 mg/mL ( $p=0,000$ ), relativamente ao controlo (1% DMSO). No caso do movimento estimulado (Fig.24C) observou-se uma melhoria significativa da motilidade dos animais após tratamento com as concentrações de 0,1 mg/mL ( $p=0,027$ ) e 0,5 mg/mL ( $p=0,002$ ).

Relativamente ao tratamento do modelo de tauopatias com extratos de LR e LB não se observaram diferenças significativas nos animais CK10, nem no movimento espontâneo (Fig.25A,B), nem estimulado (Fig.26A,B).

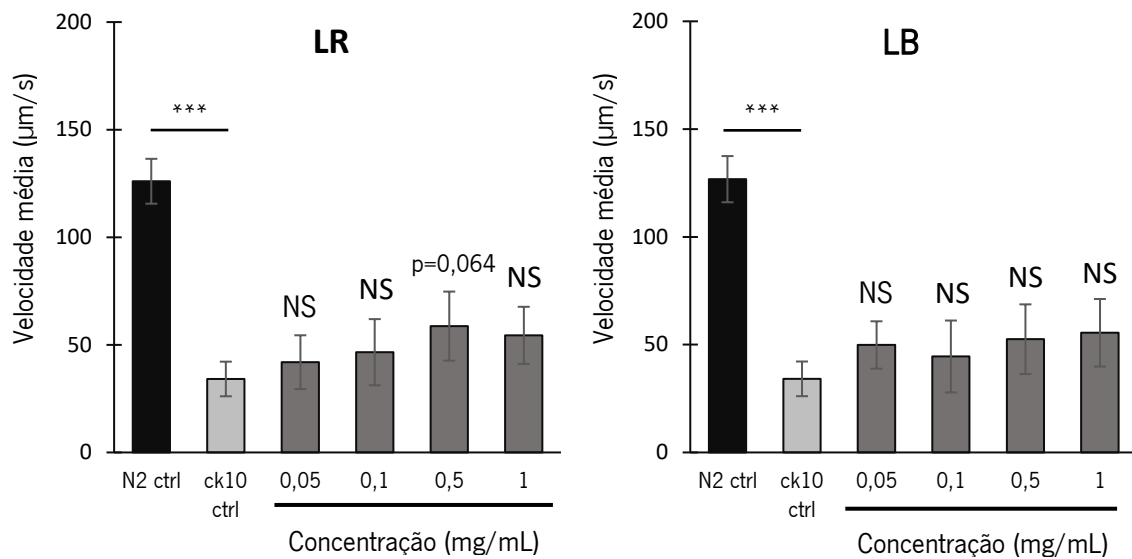




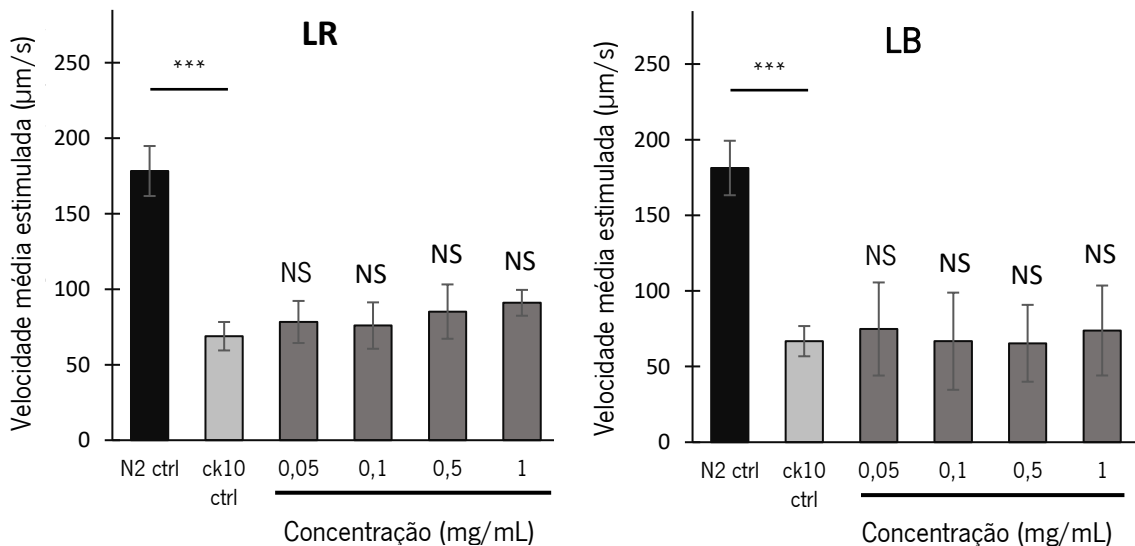
**Figura 23.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de HS \*\* (A), HP \*\*\* (B) e HM \*\*\* (C) no fenótipo motor de um modelo de Tauopatia em *C. elegans*. Animais adultos crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento espontâneo na ausência de comida e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 100 animais, divididos por 2 vídeos de 1 minuto, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.



**Figura 24.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de HS \* (A), HP \* (B) e HM \*\* (C) no fenótipo motor de um modelo de Tauopatia em *C. elegans*. Animais adultos crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento estimulado e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 50 animais, com 1 vídeo de 30 segundos, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.



**Figura 25.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos de LR NS (A) e LB NS (B) no fenótipo motor de um modelo de Tauopatia em *C. elegans*. Animais adultos, crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento espontâneo na ausência de comida e determinar a sua velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 100 animais, divididos por 2 vídeos de 1 minuto, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.



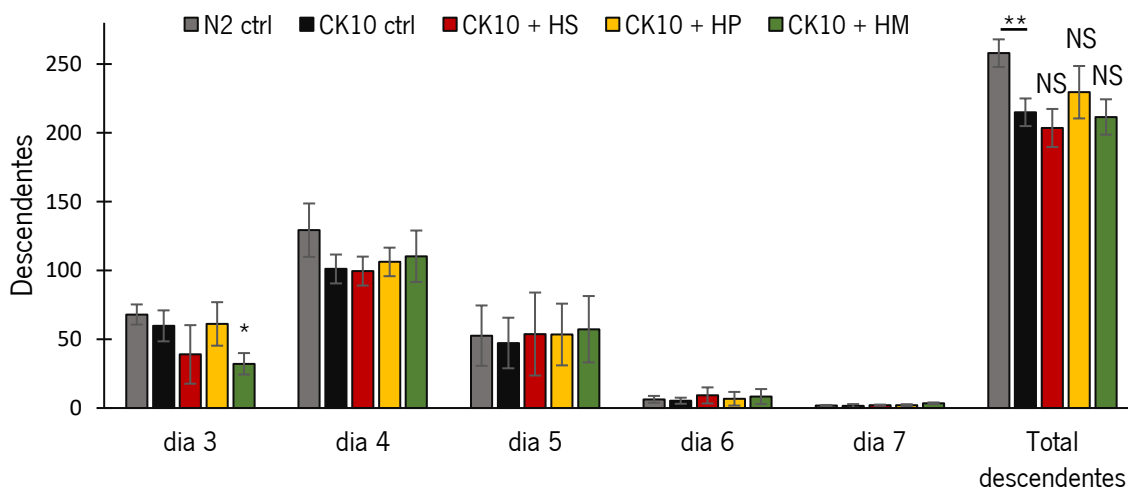
**Figura 26.** Avaliação do impacto do tratamento crónico com os extratos LR NS (A) e LB NS (B) no fenótipo motor de um modelo de Tauopatia em *C. elegans*. Animais adultos, crescidos na presença dos extratos, foram filmados ao dia 4 para documentar o seu movimento estimulado e determinação da velocidade média de deslocação. Foram analisados cerca de 50 animais, com 1 vídeo de 30 segundos, por condição experimental e experiência independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,001; \*\*\* p-value < 0,001.

Os resultados indicam que o tratamento crónico até dia 4 com 1 mg/mL de extrato das folhas de HS, HP e HM levaram a uma melhoria no fenótipo motor espontâneo e estimulado, também neste modelo de neurodegeneração. Por outro lado, neste modelo, o tratamento com extratos de LR e LB não teve qualquer impacto na motilidade dos animais.

## 2.2.2. Avaliação do efeito do tratamento no número de descendentes no modelo

### *C. elegans* de tauopatia

Os animais CK10 para além do fenótipo motor pronunciado, apresentam uma disfunção no número de descendentes quando comparados com a estirpe selvagem (Kraemer et al. 2003). Avaliou-se o efeito do tratamento com os extratos de HS, HP e HM relativamente a este fenótipo (Fig.27).

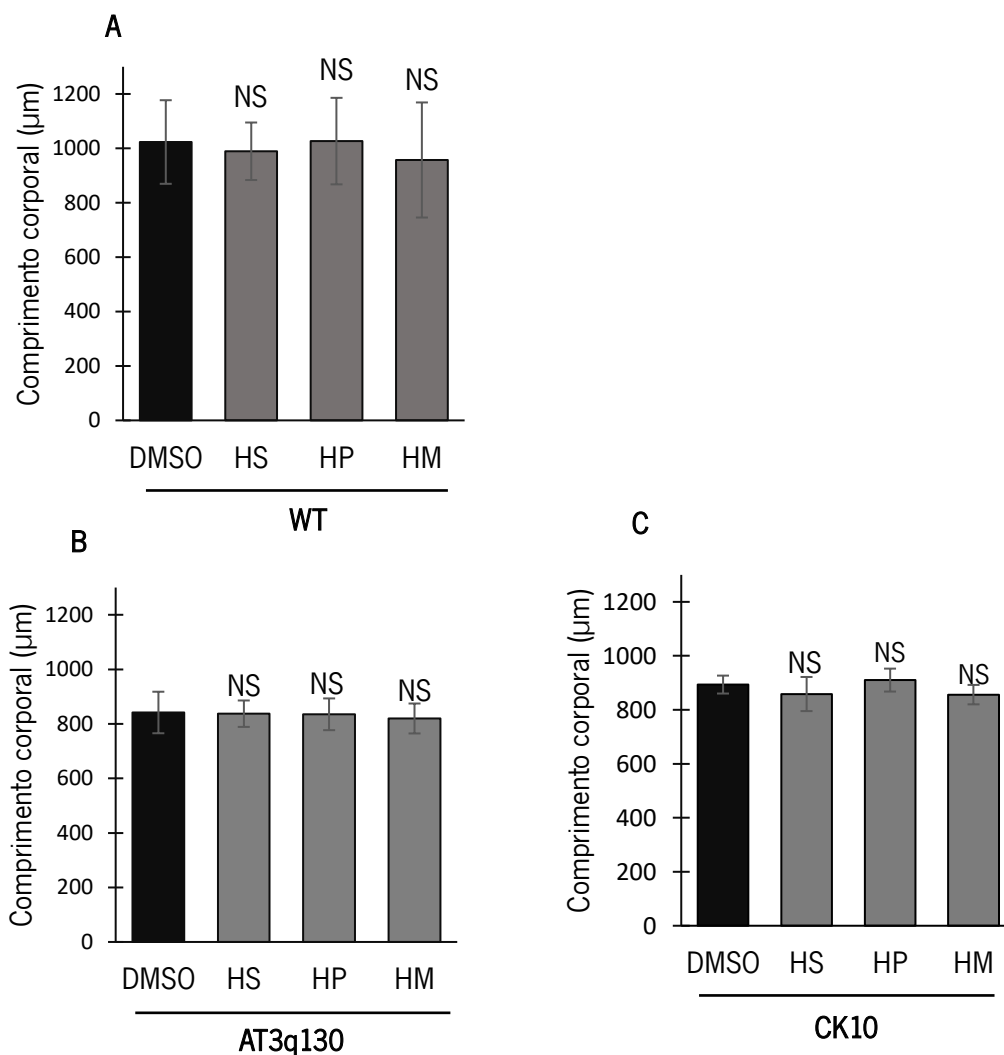


**Figura 27.** Avaliação da produção de descendência dos animais tratados com extrato de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL. Os animais em estadio L4 sincronizados foram transferidos individualmente para novas placas de NGM e transferidos a cada 24h para novas placas até cessarem a postura de ovos. Foram analisados 10 animais por condição e ensaio independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 3 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,01; \*\*\* p-value < 0,001.

Como esperado observou-se diferenças significativas no número total de descendentes entre os animais CK10 e a estirpe selvagem N2. No entanto, o tratamento com os extratos não foi capaz de reverter o fenótipo dos animais CK10, não se tendo observado diferenças estatisticamente relevantes na descendência total dos animais tratados com HS (p=0,886), HP (p=0,607) e HM (p=0,998) em relação ao controlo (1% DMSO). No entanto, ao analisar o perfil diário de postura de ovos, observámos que os animais tratados com extrato de HM começaram a postura de ovos numa fase mais tardia, apresentando diferenças significativas (p=0,04). Os animais tratados com extrato de HS também demonstraram uma tendência para uma postura de ovos mais tardia, sendo de realçar a dessincronização entre animais.

### 3. Avaliação dos efeitos do tratamento com extrato de HS, HP e HM no tamanho corporal dos *C. elegans* AT3q130 e CK10

Devido ao efeito promissor dos extratos de HS, HP e HM nos modelos da DMJ e de tauopatias, os ensaios seguintes foram apenas realizados no contexto de tratamento com estes extratos. Para verificar se o tratamento com extratos de HS, HP e HM afetava o tamanho corporal dos animais *C. elegans*, uma medida indicadora do grau de desenvolvimento dos animais, estes foram expostos a 1 mg/mL de cada extrato e o seu comprimento corporal foi avaliado.



**Figura 28.** Avaliação do efeito no tamanho corporal das estirpes N2 (A), CK10(B) e At3q130(C). Os nemátodes na fase larvar L1 sincronizados foram incubados com 1 mg/mL de extrato de HS, HP e HM. Ao dia 4, foram tiradas fotografias com as mesmas definições e trabalhadas usando o software Image J. Não houve diferenças significativas no comprimento corporal em nenhuma das estirpes testadas ( $p > 0,05$ ). Foram analisados  $\approx 50$  animais por condição e ensaio independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 5 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,01; \*\*\* p-value < 0,001.

Os resultados mostram que os nemátodes N2, AT3q130 e CK10, não apresentam diferenças significativas no crescimento, quando tratados com extrato de HS, HP e HM (Fig.28), em comparação com a situação controlo. Estes resultados indicam que o tratamento não afectou, de forma geral, o desenvolvimento e estado de saúde dos animais, situação que nos poderia conduzir à realização de ensaios mais específicos e detalhados para avaliar possíveis alterações de desenvolvimento dos animais no contexto de tratamento

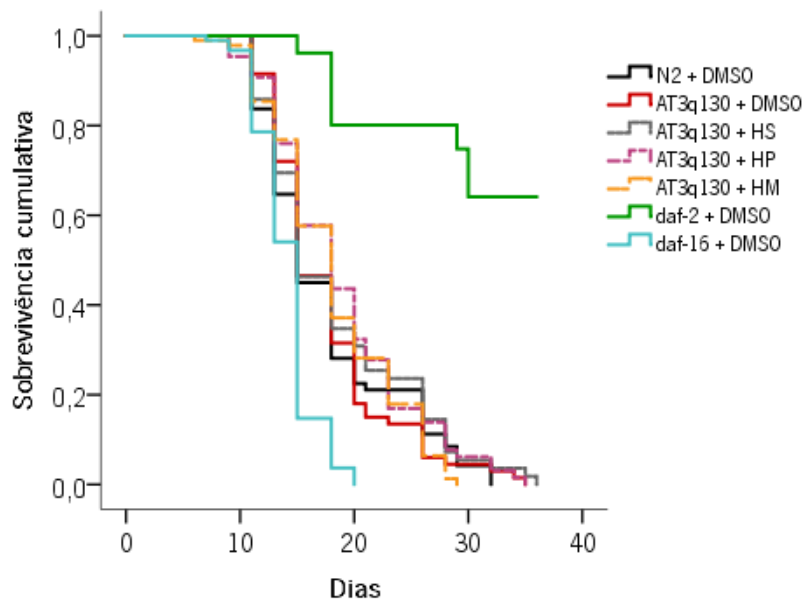
#### **4. Avaliação dos efeitos do tratamento com os extratos de HS, HP e HM na longevidade dos *C. elegans* AT3q130 e CK10**

Está descrito que os modelos de neurodegeneração em estudo, AT3q130 (Teixeira-Castro et al. 2011) e CK10 (Kraemer et al. 2003) apresentam uma longevidade ligeiramente reduzida. No primeiro caso, os animais foram tratados com os extratos até dia 3 após eclosão, e no segundo caso, os animais foram mantidos em contacto com os extratos ao longo de toda a sua vida.

Em ambos os ensaios as estirpes *daf-2* (e1370) e *daf-16* (*mu86*) foram usadas como controlos positivo e negativo, respetivamente. Estas mutações foram descritas como causadoras de alterações na longevidade de *C. elegans* (Dorman et al. 1995; Lee et al. 2003; Murphy et al. 2003).

##### **4.1. Efeito do pré-tratamento com HS, HP e HM na longevidade dos animais AT3q130 e CK10**

Os resultados mostram que o pré-tratamento, não causou diferenças significativas na longevidade dos nemátodes AT3q130 (Fig.29) e CK10 (Fig.30) para nenhum dos extratos testados quando comparados com a situação controlo. Também não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre a estirpe N2 (1% DMSO) quando comparada com as estirpes AT3q130 e CK10 também em 1% DMSO (tabela 8 e 9).



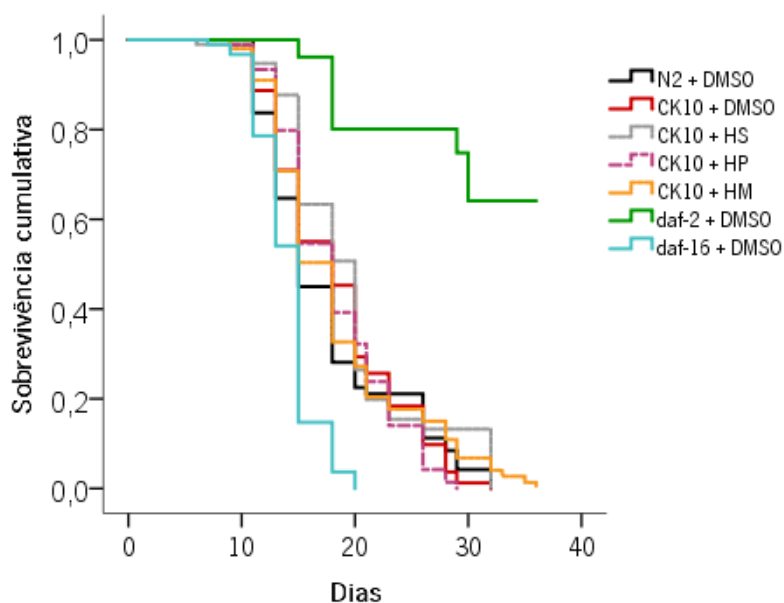
**Figura 29.** Avaliação dos efeitos na longevidade na estirpe AT3q130, do pré-tratamento com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL, e 1% DMSO (controlo) até estado larvar L4. O gráfico representa 1 ensaio, com 100 animais testados por condição. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

**Tabela 8.** Efeito do pré-tratamento com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL na longevidade da estirpe AT3q130.

Estirpe (n*)	Mediana longevidade (dias)	s.e.m (dias)	Média longevidade (dias)	s.e.m (dias)	Estirpe controlo (n)	Mediana longevidade (dias)	s.e.m (dias)	Média longevidade (dias)	s.e.m (dias)	P value (Log Rank, Mantel-Cox)**
daf-16 (82)	15	0,25	14,08	0,28	N2 (75)	15	0,58	17,597	0,705	0,000
daf-2 (20)	-	-	31,29	1,48	N2 (75)	15	0,58	17,597	0,705	0,000
AT3q130 (67)	15	0,75	17,56	0,67	N2 (75)	15	0,58	17,597	0,705	0,842
AT3q130 + HS (72)	15	0,81	18,37	0,77	AT3q130 (67)	15	0,75	17,559	0,67	0,346
AT3q130 + HP (72)	18	1,23	18,85	0,72	AT3q130 (67)	15	0,75	17,559	0,67	0,189
AT3q130 + HM (80)	18	0,79	18,17	0,60	AT3q130 (67)	15	0,75	17,559	0,67	0,610

\*Número total de animais analisados

\*\*O teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para comparar os grupos



**Figura 30.** Avaliação dos efeitos na longevidade da estirpe CK10, do pré-tratamento com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL, e 1% DMSO (controle) até estado larvar L4. O gráfico representa 1 ensaio, com 100 animais testados por condição. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

**Tabela 9.** Efeito do pré-tratamento com 1 mg/mL de extratos de HS, HP e HM na longevidade da estirpe CK10.

Estirpe (n*)	Mediana longevidade (dias)	s.e.m (dias)	Média longevidade (dias)	s.e.m (dias)	Estirpe controlo (n)	Mediana longevidade (dias)	s.e.m (dias)	Média longevidade (dias)	s.e.m (dias)	P value (Log Rank, Mantel-Cox)**
daf-16 (82)	15	0,25	14,08	0,28	N2 (75)	15	0,58	17,60	0,71	0,000
daf-2 (20)	-	-	31,29	1,48	N2 (75)	15	0,58	17,60	0,71	0,000
CK10 (83)	18	1,06	18,36	0,62	N2 (75)	15	0,58	17,60	0,71	0,724
CK10 + HS (60)	20	0,82	19,43	0,75	CK10 (83)	18	1,06	18,36	0,62	0,212
CK10 + HP (73)	18	0,71	18,18	0,56	CK10 (83)	18	1,06	18,36	0,62	0,633
CK10 + HM (76)	18	0,71	18,29	0,74	CK10 (83)	18	1,06	18,36	0,62	0,654

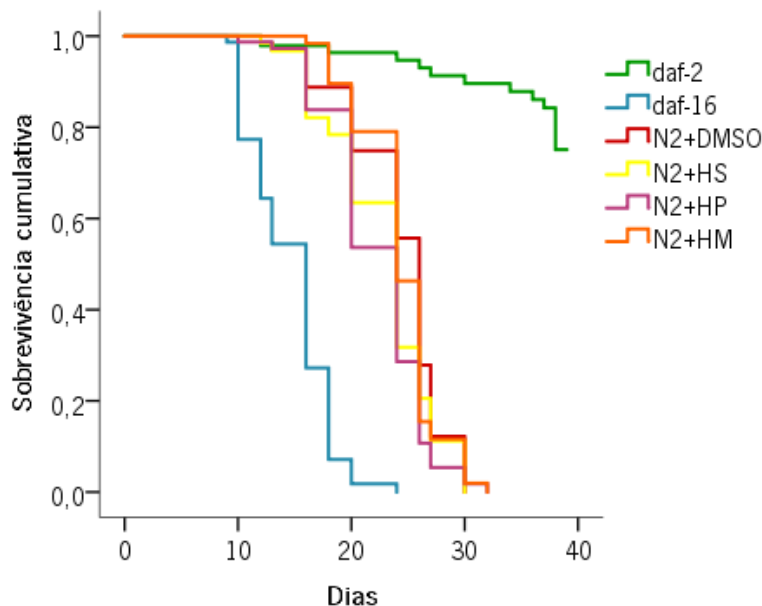
\*Número total de animais analisados

\*\*O teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para comparar os grupos

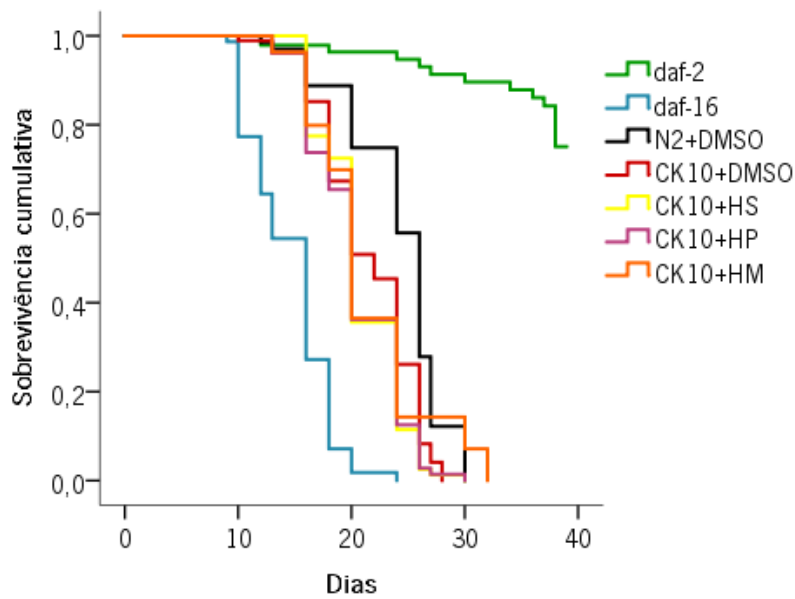


## 4.2. Efeito do tratamento crónico com HS, HP e HM na longevidade dos animais AT3q130 e CK10

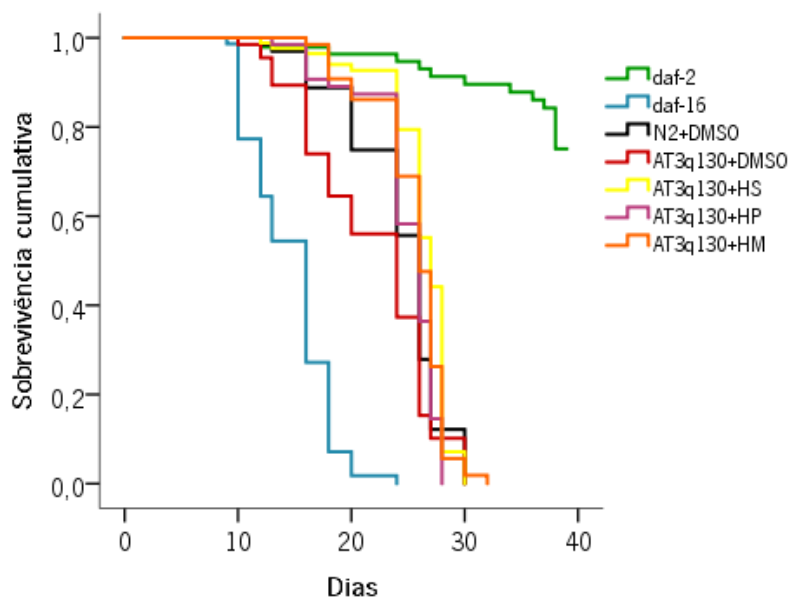
O tratamento crónico com os extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL na longevidade dos *C. elegans* (tabela10) não alterou significativamente a longevidade dos nemátodes N2 (Fig.31), quando tratados com extrato de HS ( $p=0,136$ ), HM ( $p=0,670$ ) e HP ( $p=0,009$ ). O mesmo se verificou para a estirpe CK10 (Fig.32), em que não se detetaram diferenças significativas na longevidade dos nemátodes quando tratados com extrato de HS ( $p=0,144$ ), HP ( $p=0,105$  bem como de HM ( $p=0,567$ ). Por outro lado, os nemátodes da estirpe AT3q130 (Fig.33) quando tratados com os extratos de HS, HP e HM demonstraram um aumento estatisticamente significativo na longevidade, especificamente para HS ( $p=0,000$ ), HP ( $p=0,037$ ) e HM ( $p=0,001$ ).



**Figura 31.** Avaliação dos efeitos na longevidade nos animais WT. Os nemátodes da estirpe N2 foram expostos a um tratamento crónico com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL, ou com 1% DMSO (controlo). O gráfico representa 1 ensaio, com 100 animais testados por condição. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).



**Figura 32.** Avaliação dos efeitos na longevidade no modelo de Tauopatias. Os nemátodes da estirpe CK10 foram expostos a um tratamento crônico com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL, ou com 1% DMSO (controle). O gráfico representa 1 ensaio, com 100 animais testados por condição. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).



**Figura 33.** Avaliação dos efeitos na longevidade no modelo da DMJ. Os nemátodes da estirpe AT3q130 foram expostos a um tratamento crônico com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL, ou com 1% DMSO (controle). O gráfico representa 1 ensaio, com 100 animais testados por condição. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

**Tabela 10.** Efeito na longevidade dos WT, AT3q130 e CK10 expostos ao tratamento crônico com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1mg/mL.

Estirpe (n*)	Mediana longevidade (dias)	s.e.m. (dias)	Média longevidade (dias)	s.e.m. (dias)	Estirpe controlo (n)	Mediana longevidade (dias)	s.e.m. (dias)	Média longevidade (dias)	s.e.m. (dias)	P value (Log Rank, Mantel-Cox)**
daf-16 (70)	16	0,6	14,6	0,4	N2 + DMSO (58)	26	0,4	24,2	0,6	0,000
daf-2 (55)	39	0,9	35,2	1,1	N2 + DMSO (58)	26	0,4	24,2	0,6	0,000
AT3q130 + DMSO (61)	24	1,3	21,8	0,7	N2 + DMSO (58)	26	0,4	24,2	0,6	0,034
AT3q130 + HS (73)	27	0,5	26,2	0,4	AT3q130 + DMSO (61)	24	1,3	21,8	0,7	0,000
AT3q130 + HP (57)	26	0,6	24,7	0,4	AT3q130 + DMSO (61)	24	1,3	21,8	0,7	0,037
AT3q130 + HM (60)	26	0,4	25,5	0,4	AT3q130 + DMSO (61)	24	1,3	21,8	0,7	0,001
CK10 + DMSO (73)	22	0,8	21,5	0,5	N2 + DMSO (58)	26	0,4	24,2	0,6	0,000
CK10 + HS (79)	20	0,3	20,7	0,4	CK10 + DMSO (73)	22	0,8	21,5	0,5	0,144
CK10 + HP (72)	20	0,4	20,4	0,5	CK10 + DMSO (73)	22	0,8	21,5	0,5	0,105
CK10 + HM (60)	20	0,4	21,3	0,6	CK10 + DMSO (73)	22	0,8	21,5	0,5	0,567
N2 + HS (54)	24	0,8	22,8	0,6	N2 + DMSO (58)	26	0,4	24,2	0,6	0,136
N2 + HP (59)	24	0,9	22,3	0,5	N2 + DMSO (58)	26	0,4	24,2	0,6	0,009
N2 + HM (53)	24	0,6	24,4	0,5	N2 + DMSO (58)	26	0,4	24,2	0,6	0,670

\*Número total de animais analisados

\*\*O teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para comparar os grupos

As características do ensaio de longevidade em meio sólido, comparativamente ao meio líquido, implicam uma menor disponibilidade dos extratos que apenas estão dissolvidos na OP50 e não em total contacto com o animal como acontece em meio líquido. Por essa razão as concentrações de extratos a usar em cada um dos ensaios, devem ser ajustadas de acordo. Neste trabalho, apenas um ensaio de longevidade foi realizado para cada situação, no entanto em ensaios futuros, diferentes concentrações (possivelmente mais elevadas) devem ser testadas.

Embora estes resultados sejam ainda preliminares, mostram um efeito promissor do tratamento crônico com extratos, especificamente no modelo AT3q130. A ausência de efeito na longevidade destes extratos nas estirpes N2 e CK10 foi algo surpreendente, dados os seus efeitos biológicos conhecidos.

Por outro lado, a correlação entre o efeito antioxidante e o aumento da longevidade em *C. elegans* nem sempre é observada. Num estudo, de um total de 34 extratos de plantas, foram selecionaram seis, com base na sua capacidade antioxidante *in vitro*. Os seis extratos aumentaram a resistência ao stress oxidativo induzido por paraquat, em *C. elegans*, no entanto apenas um deles foi capaz de aumentar a longevidade da estirpe N2 (Pun et al. 2010). Existem, no entanto, vários estudos que mostram outros extratos naturais ou compostos isolados de plantas com capacidade para aumentar o tempo de vida em *C. elegans*, como os extratos das folhas de *Ginkgo biloba* (EGb 761) (Z. Wu et al. 2002) e polifenóis de mirtilo (*Vaccinium angustifolium*) (Wilson et al. 2006).

Está descrito que os compostos de tioalilo derivados do alho S-allylcysteine (SAC) e S-allylmercaptocysteine (SAMC) aumentaram a longevidade e a resistência ao stress oxidativo induzido

por juglona e ao stress térmico em *C. elegans*, bem como a redução da acumulação de ROS, tendo sido sugerido que estes compostos naturais poderiam servir como potenciais agentes retardadores do envelhecimento (Ogawa et al. 2016). Em *C. elegans* WT, a tomatidina, um composto natural derivado do tomate também aumentou a longevidade, melhorou a função da mitocôndria e protegeu a função muscular habitualmente deteriorada com a idade. Foi ainda reportada a ativação da via SKN-1/Nrf2 e outras respostas celulares antioxidantes, seguido do aumento da mitofagia (Fang et al. 2017).

Está descrito que a via de sinalização Ins/IGF-1 (IIS) é um regulador da longevidade bem conhecido em *C. elegans*, *Drosophila* e ratos (Kenyon 2001; Houthoofd et al. 2005).

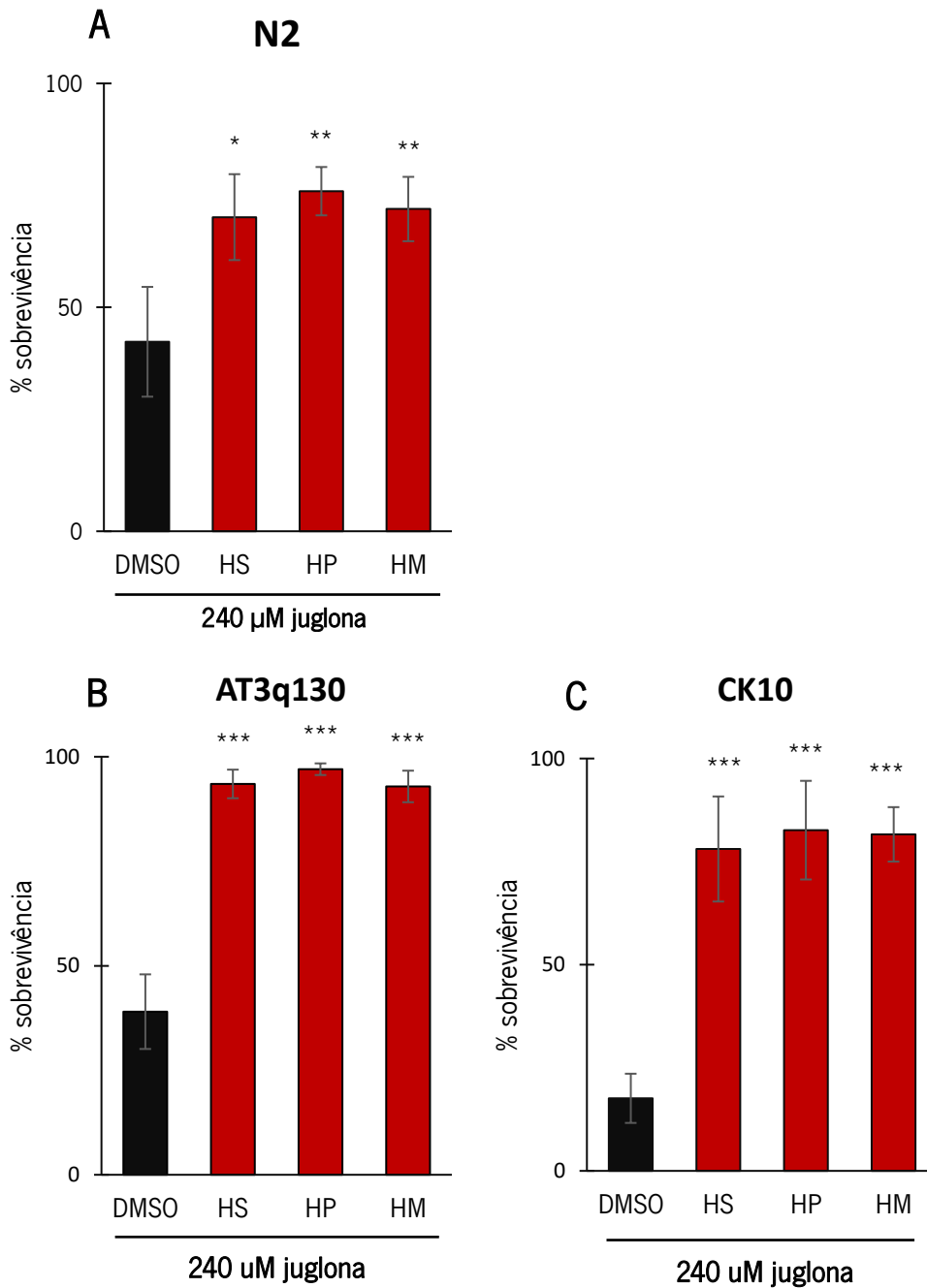
Em *C. elegans*, dois fatores de transcrição, DAF-16 e SKN-1, promovem a expressão de enzimas antioxidantes ou de destoxificação. O fator de transcrição DAF-16/FOXO promove a expressão de genes que conferem longevidade prolongada e resistência ao stress (Lee et al. 2003). O SKN-1, está relacionado com as proteínas Nrf em vertebrados, promove a expressão de enzimas de destoxificação em resposta ao stress oxidativo (An e Blackwell 2003a). O tratamento com polifenóis de mirtilo prolongou a vida útil dos animais *daf-16* (*mgDf50*) e *skn-1* (*zu67*), mostrando assim que os compostos presentes nesta planta podem agir independentemente da activação destes genes (Wilson et al. 2006). Poderia ser interessante verificar, também neste estudo, os efeitos dos extratos HS, HP e HM na longevidade da estirpe AT3q130 cruzada com estas estirpes mutantes.

### 5. Avaliação da resistência ao stress oxidativo induzido por juglona

O stress oxidativo é considerado uma das principais causas do envelhecimento e tem sido implicado na patogénese de muitas doenças. Estudos prévios relatam atividade antioxidante para os extratos de HS (Nantitanon et al. 2007; Ghaffari et al. 2014), HP (Paixão et al. 2013) e HM (Povh et al. 2012). Em *C. elegans*, a resistência ao stress oxidativo pode ser quantificada após exposição dos animais a um composto indutor de ROS como a juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona), e vai depender do equilíbrio entre os níveis basais de ROS, a capacidade de destoxificar e de reparar os danos causados (Senchuk et al. 2017).

Neste estudo foi utilizada juglona (240 µM), um pro-oxidante natural, para induzir stress oxidativo nos *C. elegans* N2, CK10 e AT3q130 pré-tratados com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL. Observou-se que a estirpe N2 (Fig.34A) pré-tratada com extrato de HS apresentou uma sobrevivência média de 28% ( $p=0,013$ ), já para HP com uma taxa média de 34% ( $p=0,005$ ) e HM com uma taxa média de sobrevivência de 30% ( $p=0,009$ ), em relação ao controlo tratado com 1% DMSO. O potencial antioxidante dos extratos foi também avaliado no contexto das doenças neurodegenerativas

(DMJ e tauopatias). Os resultados mostram taxas de sobrevivência maiores que 50% nos dois modelos de neurodegeneração após tratamento com os diferentes extratos à concentração de 1 mg/mL. Especificamente, vemos para o modelo AT3q130 pré-tratado até dia 4 com extrato de HS uma taxa média de sobrevivência em relação ao controlo (1% DMSO) de 55% ( $p=0,000$ ), HP de 58% ( $p=0,000$ ) e, HM com 54% ( $p=0,000$ ). O mesmo demonstramos para o modelo CK10, com taxas de sobrevivência acima dos 60%, nomeadamente para HS representada com 61% ( $p=0,000$ ), para HP de 65% ( $p=0,000$ ) e para HM de 64% ( $p=0,000$ ).



**Figura 34.** Avaliação dos efeitos dos extratos de HS, HP e HM na resistência ao stress oxidativo induzido pela exposição em meio líquido a 240  $\mu$ M de juglona (1 h), em animais N2 (A), AT3q130 (B) e CK10 (C), dia 4. Observamos diferenças significativas nas sobrevivências dos N2 quando tratados com HS ( $p=0,013$ , \* (28%)), HP ( $p=0,005$ , \*\* (34%)) e HM ( $p=0,009$ , \*\* (30%)), bem como para AT3q130 tratados com HS ( $p=0,000$ , \*\*\* (55%)), HP ( $p=0,000$ , \*\*\* (58%)) e HM ( $p=0,000$ , \*\*\* (54%)), e também para CK10 quando tratados com HS ( $p=0,000$ , \*\*\* (61%)), HP ( $p=0,000$ , \*\*\* (65%)) e HM ( $p=0,000$ , \*\*\* (64%)). Foram analisados 100-150 animais por condição e ensaio independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 5 experiências independentes para CK10 e AT3q130 e 3 para o N2. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,01; \*\*\* p-value < 0,001.

Estes resultados sugerem que os extratos de *Hyptis* apresentaram atividade antioxidante. O aumento significativo da sobrevivência dos *C. elegans* tratados com extratos HS, HP e HM pode estar relacionado com ativação de vias de sinalização de resposta ao stress oxidativo, bem como da sua capacidade de remoção de ROS. Os compostos que induzem resistência ao stress oxidativo através da indução da transcrição de proteínas antioxidantes exercem ação antioxidante indireta. Está descrito num estudo em *C. elegans* pré-tratados com extrato das folhas de *Syzygium jambos*, que os nematodes sobreviveram mais comparados com o controlo, quando sujeitos à toxicidade da juglona (80  $\mu$ M), indicando que os polifenóis presentes neste extrato apresentaram atividade antioxidante (Sobeh et al. 2018). Também em *C. elegans*, o extrato da raiz de *Cassia abbreviata*, rico em polifenóis, foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência em 44,56% quando sujeitos a 80  $\mu$ M de juglona, e reduziu o nível de ROS para 61,73%, em comparação com o grupo controlo (Sobeh et al. 2018). Futuramente seria importante a avaliação dos níveis intracelulares de ROS e/ou de danos oxidativos (por exemplo peroxidação lipídica) nos animais tratados com os extratos aqui testados.

## 6. Avaliação da expressão de marcadores antioxidantes através de estirpes repórter

Para correlacionar o efeito antioxidante *in vivo* observado pelo tratamento com extratos de HS, HP e HM a uma resposta molecular em *C. elegans*, analisou-se os níveis de expressão de dois genes, que medem a indução da transcrição de genes que codificam importantes enzimas de detoxificação, nomeadamente a expressão da  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase-1 (GCS-1) e da glutathione-S-transferase-4 (GST-4).

A estirpe repórter CL2166, contendo o promotor do gene *gst-4* em fusão com o cDNA da GFP, *gst-4p::GFP*, apresenta expressão GFP nos núcleos do intestino e na parede muscular dos animais, na faringe, na cabeça e no citoplasma da maioria dos tecidos. Esta indução da expressão pode ser causada por diversos agentes de stress como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou juglona (Kahn et al. 2008; Hasegawa et al. 2010). A estirpe repórter LD1171, contendo o promotor do gene *gcs-1* em fusão com o cDNA da GFP, *gcs-1p::GFP*, apresenta expressão do gene repórter na faringe, neurónios quimiossensíveis ASI, intestino anterior e posterior, sendo que quando exposto a um stress aumenta dramaticamente a expressão intestinal (Wormbase).

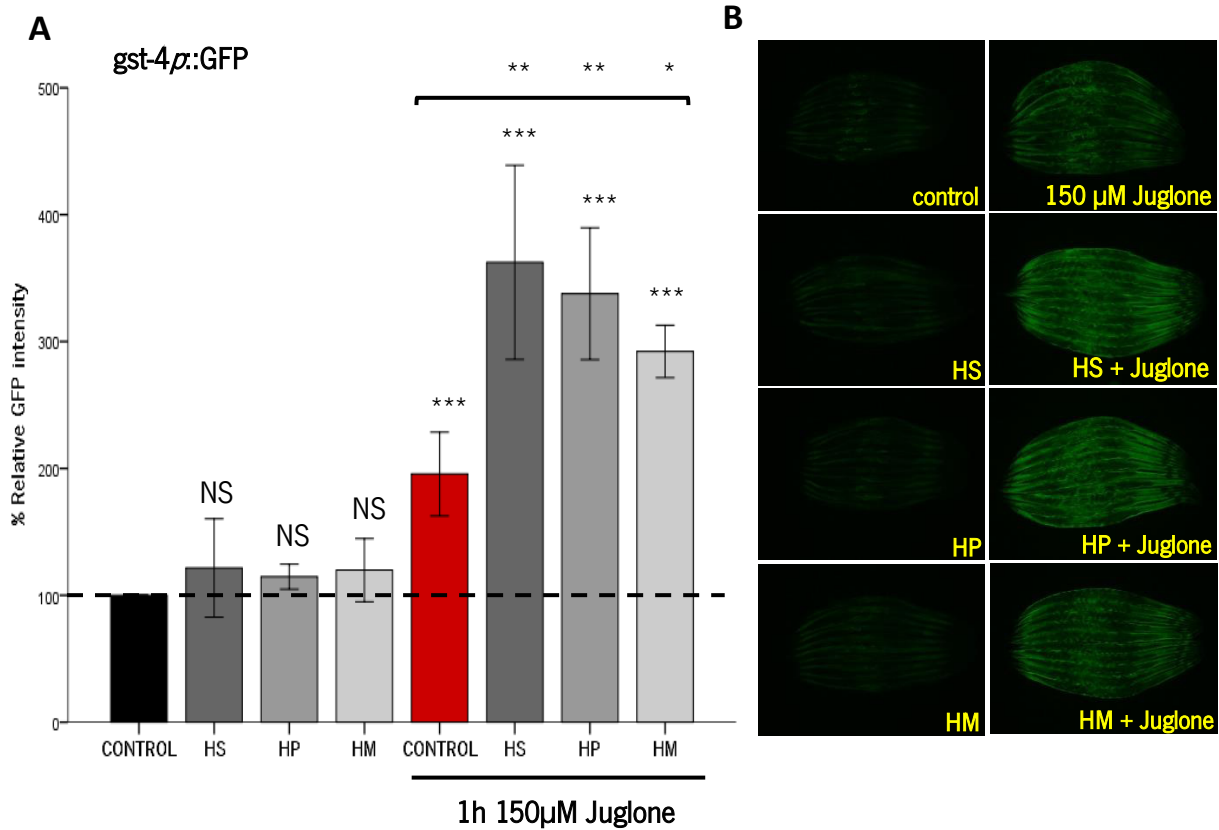
As glutathione S-transferases (GSTs) são enzimas de desintoxicação celular. Esta família de enzimas multifuncionais catalisa a conjugação de vários eletrófilos com glutathione (GSH), desintoxicando compostos tóxicos derivados de forma exógena e endógena. Muitos são os fitoquímicos presentes em

### Capítulo III – Resultados e Discussão

plantas ou extratos naturais que induzem a expressão ou aumentam a atividade de GST, produzindo assim efeitos protetores ao organismo, prevenindo diversas doenças, é o que relatam os autores numa revisão (Galal et al. 2015). Em *C. elegans* a ativação transcricional da glutathione S-transferase 4 (*gst-4*) é frequentemente usada como “read-out” para a atividade de SKN-1, já que este gene é regulado por este fator de transcrição (An e Blackwell 2003). Está descrito, em *C. elegans* que flavonoides e fitoquímicos aumentam a expressão de genes protetores, tais como *gst-4* (Hasegawa et al. 2010). O fator de transcrição SKN-1 funciona de forma semelhante às proteínas bZIP que regulam os genes de destoxificação da Fase II em vertebrados (Nrf1, Nrf2) (An e Blackwell 2003b). O metabolismo de xenobióticos e a indução de enzimas da Fase II da destoxificação em condições de stress são controlados, em parte, pelo SKN-1, que desempenha também um papel importante no controlo da longevidade. A resposta de desintoxicação da fase II fornece uma defesa contra o stress oxidativo e consiste em inúmeras enzimas que eliminam os radicais livres e produzem ou transferem glutathione (McMahon et al. 2001). O gene *gcs-1* está envolvido na via de resposta ao stress oxidativo, como uma enzima de destoxificação de fase II que catalisa o primeiro passo limitante na biossíntese de glutathione. Em *C. elegans* a GCS-1 é expressa em níveis elevados no intestino em resposta ao stress oxidativo, um efeito dependente de SKN-1, e em níveis basais nas condições normais (An e Blackwell 2003b). Embora a expressão de *gcs-1* no intestino seja induzida por SKN-1 em resposta ao stress, apenas a presença de SKN-1 nuclear permite a expressão de *gcs-1* nos neurónios ASI; por outro lado, a expressão desta enzima é independente de SKN-1 na faringe (An e Blackwell 2003b).

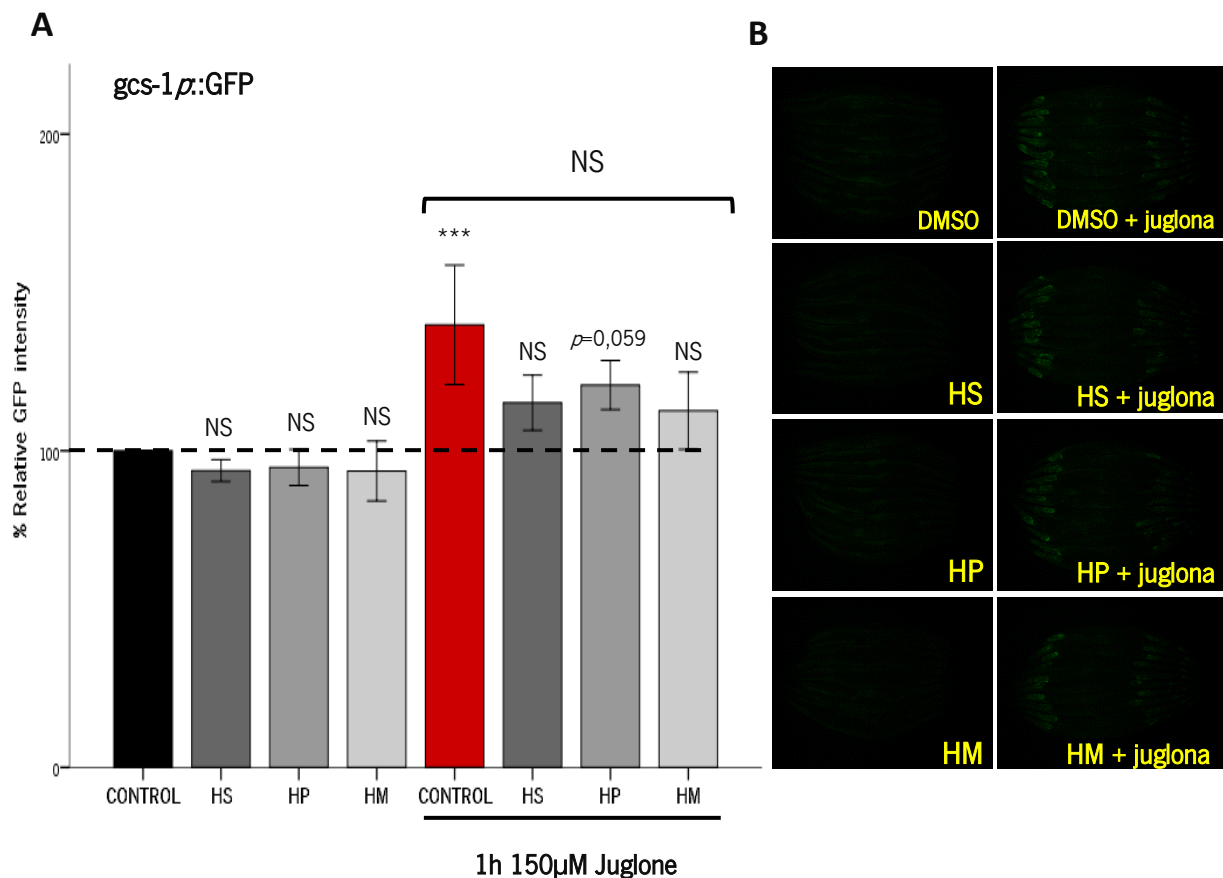
O tratamento das estirpes *C. elegans* repórter com 1 mg/mL de HS, HP e HM não causou um aumento significativo da expressão de *gst-4p::GFP* (Fig.35A,B) em relação ao controlo 1% DMSO (linha a tracejado). No entanto, na presença do stress oxidativo induzido pela juglona observou-se um aumento significativo da expressão de *gst-4p::GFP* em relação ao controlo.





**Figura 35.** Efeito do extrato HS, HP e HM (A) na expressão de *gst4p::GFP*. A intensidade de fluorescência relativa (%) da GFP (B) na estirpe repórter CL2166 (*gst-4p::GFP*), quando tratados de L1 até dia 4 com 1 mg/mL de extrato de HS, HP e HM em condições normais e de stress oxidativo induzido por 150 µM juglone (1h + 3h de recuperação). Foi utilizado o microscópio de fluorescência e a intensidade de fluorescência GFP foi quantificada usando o software Image J. Foram analisados 10 animais por condição e ensaio independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,01; \*\*\* p-value < 0,001.

Está descrito, em *C. elegans*, que flavonoides e fitoquímicos aumentam a expressão de genes protetores, tais como *gst-4* (Hasegawa et al. 2010). O facto de não se ter verificado uma activação significativa da *gst-4* nos animais tratados, em condições normais, pode sugerir que estes não atuam como xenobiótico, na concentração usada. Por outro lado, a expressão significativa da *gst-4* em condições de stress oxidativo, pode indicar que os extratos causaram um aumento da expressão da enzima antioxidante em resposta à necessidade de combater os ROS produzidos pela juglona.



**Figura 36.** Efeito dos extratos de HS, HP e HM na expressão de *gcs-1p::GFP*: A intensidade de fluorescência relativa (%) da GFP na estirpe repórter LD1171 (*gcs-1p::GFP*), quando tratados de L1 até dia 4 com 1 mg/mL de extrato de HS, HP e HM em condições normais e de stress oxidativo induzido por 150 µM juglone (1h + 3h de recuperação). Foi utilizado o microscópio de fluorescência e a intensidade de fluorescência GFP foi quantificada usando o software Image J. Foram analisados 10 animais por condição e ensaio independente. Foi aplicado o teste de “one-way ANOVA” seguido do teste de Dunnet bilateral para identificar diferenças estatisticamente significativas. As barras de erro representam o erro padrão da média de 4 experiências independentes. \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,01; \*\*\* p-value < 0,001.

No caso da estirpe LD1171, quer em condições normais quer em condições de stress oxidativo, não se observou nenhuma diferença significativa ( $p>0,05$ ) na expressão de *gcs-1p::GFP* em relação ao controle (linha a tracejado). No entanto, parece haver uma tendência para um decréscimo da expressão deste gene repórter em condições normais, que se observa também nos nemátodes sujeitos ao stress oxidativo (Fig.36A,B). De realçar que os nemátodes pré-tratados com extratos e sujeitos ao stress da juglona não mostraram diferenças significativas em relação ao controle 1% DMSO que não foi sujeito à juglona, o que sugere que os extratos de HS, HP e HM foram capazes de prevenir a necessidade de sintetizar mais glutatona.

Os nossos resultados sugerem que os extratos de HS, HP e HM podem atuar também como antioxidantes diretos através da remoção de ROS, prevenindo o consumo de grupo SH e diminuindo a

ativação de enzimas de destoxificação induzíveis pela condição de stress oxidativo em *C. elegans*. No entanto, não é de excluir a hipótese de estes extratos atuarem por via indireta, induzindo outras respostas protetoras que tornem desnecessária a ativação da expressão da GCS-1.

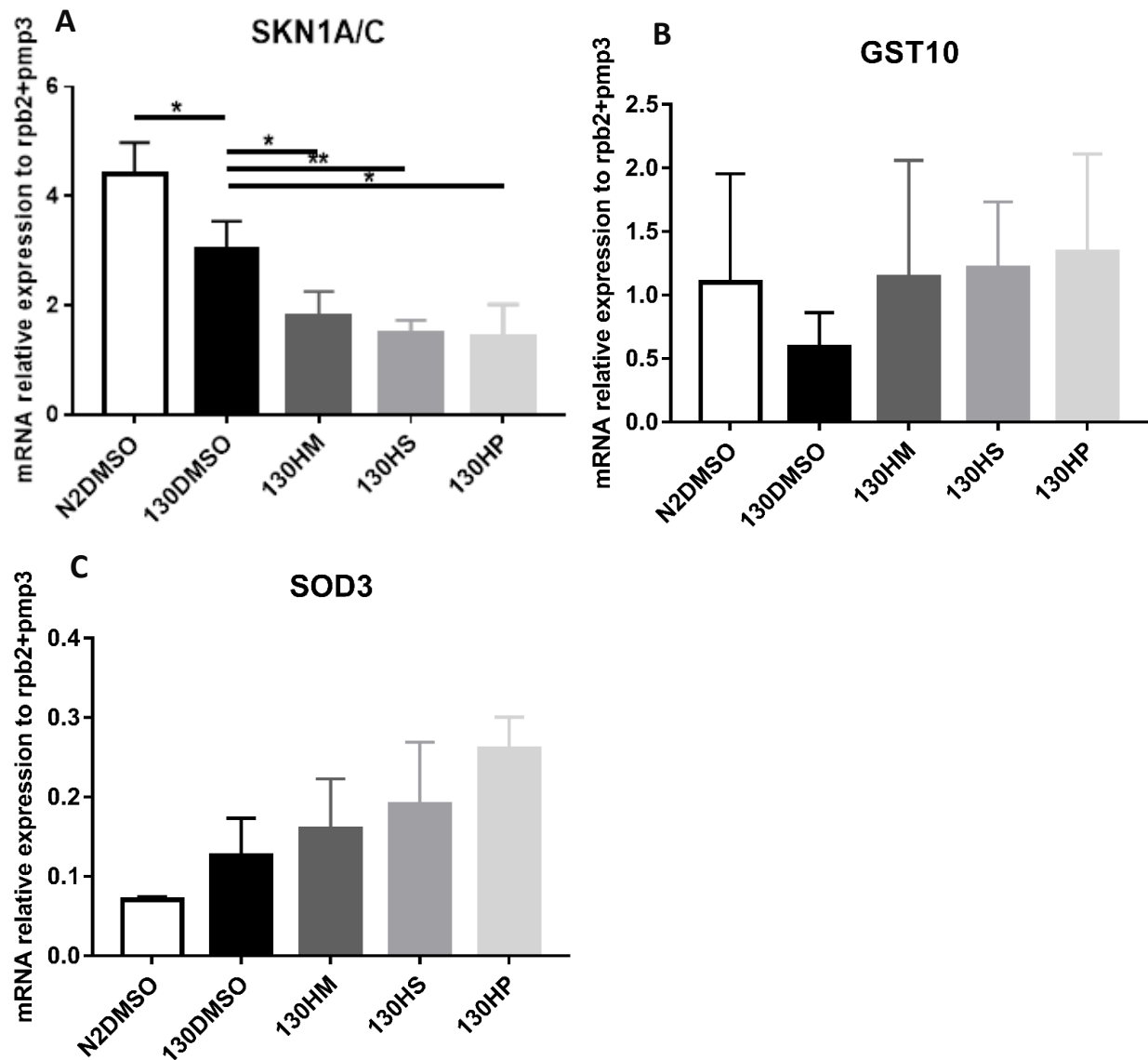
Estes resultados vão de encontro ao que está descrito por Bonomo et al. (2014), num estudo realizado com extrato aquoso de açai (*Euterpe precatoria*) em *C. elegans*, indicam que a exposição ao t-BOOH (tert-butyl hydroperoxide), um pro-oxidante indutor de ROS, aumentou a expressão do gene repórter *gcs-1p::GFP* e o tratamento com o extrato de açai preveniu esta ativação. De forma semelhante está descrito que o tratamento com carqueja (*Baccharis trimera*) também diminui a expressão de *gcs-1* em condições basais e de stress induzido por t-BOOH, e por outro lado aumentou a expressão de *gst-4* em condições basais e de stress (Paiva 2015). Também está descrito a relevância desta indução com o facto de que as células utilizam a glutathione (GSH), o maior agente redutor celular, para combater o aumento da produção de ROS sob condições de stress (Lu 2009). Em *C. elegans*, está descrito que a glutathione é necessária para o desenvolvimento do animal nos primeiros estádios, no entanto, a partir do estadio L4, uma redução desta induziu uma maior resistência ao stress oxidativo e aumento da longevidade (Urban et al. 2017).

Estes resultados complementam os resultados anteriores de resistência ao stress oxidativo e, em conjunto são indicativos de uma ação antioxidante dos extratos que possivelmente reduz os níveis de ROS no organismo através do aumento da expressão de determinadas enzimas antioxidantes. Deste modo, estes extratos parecem atuar em vias de resposta ao stress oxidativo.

## 7. Avaliação da expressão génica de enzimas antioxidantes no modelo DMJ

A expressão das enzimas antioxidantes *gst-10* e *sod-3*, bem como o fator de transcrição *skn-1* (isoformas a e c do intestino) envolvido na resposta antioxidante em *C. elegans* foi quantificada por qRT-PCR. Numa primeira fase, a eficiência dos primers para estes genes bem como a eficiência dos genes de referência *rpb-2* e *pmp3* foi confirmada (Anexo III - Figs.38-42).

Estes resultados, embora preliminares, mostram que nos animais *C. elegans* AT3q130 tratados com 1 mg/mL de extrato de HS, HP e HM houve um decréscimo significativo nos níveis de expressão do gene *skn1-a/c* comparativamente à situação controlo de tratamento com 1% DMSO (Fig. 37A). Embora, não tenham sido observadas diferenças significativas nos níveis de expressão de *gst-10* (Fig.37B) e *sod-3* (Fig.37C), entre animais tratados e não tratados, parece haver uma tendência para níveis de expressão superiores nos animais tratados, principalmente no caso do gene *sod-3*.



**Figura 37.** Expressão do fator de transcrição SKN-1 (isoformas a e c) (A) e dos genes *gst-10* (B) e *sod-3* (C) no modelo da DMJ após tratamento com extratos de HS, HP e HM à concentração de 1 mg/mL. O gráfico representa níveis médios de expressão relativa aos genes de referência *rpb-2* e *pmp-3* considerando 2-4 réplicas biológicas e pelo menos 2 réplicas técnicas. As barras de erro correspondem ao erro padrão da média e os asteriscos indicam p-values <0,002 (\*\*) e <0,033 (\*) no teste One-Way Anova.

Em *C. elegans*, está bem estabelecido que o fator de transcrição SKN-1 funciona como um coordenador central de respostas ao stress e longevidade (An e Blackwell 2003a; Oliveira et al. 2009; Tang, Dodd, e Choe 2016). Está descrito que a ausência de SKN-1 provoca uma maior sensibilidade ao stress oxidativo e redução na longevidade (An e Blackwell 2003b), enquanto que os animais que possuem o SKN-1 constitutivamente ativado apresentam defeitos na função neuromuscular (Staab et al. 2013). Em

condições normais, o SKN-1 possui uma ampla gama de funções na desintoxicação e modulação de mecanismos envolvidos na longevidade, por outro lado, em resposta ao stress, SKN-1 e outros reguladores adaptam os programas de transcrição para enfrentar o desafio em questão (Oliveira et al. 2009). Existem três isoformas da proteína SKN-1: SKN-1a, SKN-1b e SKN-1c, que diferem nos terminais N e nos padrões de expressão. Está descrito, que o SKN-1a parece ser expresso nos neurónios motores; SKN-1b nos neurónios sensoriais ASI; e SKN-1c detetado principalmente no intestino (Bishop e Guarente 2007; Staab et al. 2014). Estudos atribuem um papel para o SKN-1c (intestinal) na resposta oxidativa. Em condições normais, o SKN-1c está presente em níveis muito baixos no intestino e, em resposta ao stress oxidativo, acumula-se nos núcleos intestinais (An e Blackwell 2003b). Esta regulação pós-transcricional da expressão de SKN-1 é regulado pela via p38 (MAPK) (Inoue et al. 2005).

Está descrito que a expressão do gene *sod-3* (que codifica uma superóxido dismutase de manganês, MnSOD) está envolvido na defesa antioxidante e resposta ao stress e, é conhecido por ser regulado por DAF-16 (Miyasaka et al. 2016; Oh et al. 2006). Em *C. elegans* está descrito que o aumento da longevidade é frequentemente associado ao aumento da resistência ao stress e atividade antioxidante. Por exemplo, a longevidade descrita para *dauers* e mutantes IIS está associado ao aumento da resistência ao stress e alta atividade da SOD (Houthoofd et al. 2002, 2005; McElwee et al. 2004). Alguns estudos relacionam a expressão génica da *sod-3* com a longevidade aumentada, por exemplo, em *C. elegans* WT mostrou-se que o tratamento com extrato de mirtilos aumentou a longevidade, e apresentou uma elevada expressão do gene *sod-3* (Guha et al. 2013). Está descrito que o gene *sod-3* é regulado de forma independente de SKN-1 no contexto de IIS reduzida (Tullet et al. 2008). Além disso, testamos a expressão do gene *gst-10* (que codifica uma glutathione S-transferase), predominantemente regulado por SKN-1 (Kahn et al. 2008; Park et al. 2009; Oliveira et al. 2009). Está descrito que a sua expressão está correlacionada com a resistência ao stress oxidativo e aumento da longevidade (Ayyadevara et al. 2005, 2007; Park et al. 2009). Os resultados, embora careçam ainda de confirmação adicional, parecem indicar que no contexto de uma doença neurodegenerativa como a DMJ, os extractos são capazes de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes, de forma similar à observada anteriormente nas estirpes repórter em contacto com juglona. Esta activação ao diminuir o dano oxidativo poderá criar mecanismos de “feedback” negativo para o factor de transcrição SKN-1, o principal sensor de stress oxidativo. A quantificação da expressão de outros marcadores da reposta antioxidante poderá levar, no futuro, à melhor compreensão destes resultados.



# **Capítulo IV**

## **Conclusão e**

### **Perspetivas Futuras**





## 1. Conclusão e Perspetivas Futuras

Nos últimos anos, um número crescente de investigadores tem-se focado no desenvolvimento de uma nova geração de compostos terapêuticos mais seletivos, específicos e eficazes para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a DMJ e as tauopatias.

Neste trabalho, fizemos um estudo do potencial terapêutico de produtos naturais derivados de plantas para este mesmo fim. De um total de 8 extratos de plantas estudados, os resultados indicam que apenas o tratamento crónico com extratos das folhas de *Hyptis suaveolens*, *Hyptis pectinata* e *Hyptis marrubioides* induziu uma melhoria consistente no fenótipo motor nos modelos de neurodegeneração estudados, AT3q130 e CK10, ao dia 4. No entanto, não se verificou um impacto significativo noutros fenótipos destes modelos, nomeadamente na agregação da ATXN-3 no modelo de MJD, nem diferenças significativas na descendência no número total de descendentes no modelo de Tauopatia. Os extratos destas plantas mostraram ainda um potencial efeito promissor no atraso do envelhecimento do modelo da DMJ.

Após tratamento até dia 4, também se observou um aumento da resistência dos animais às condições de stress oxidativo induzido por juglona. Os resultados mostram taxas de sobrevivência acima dos 50% nos dois modelos de neurodegeneração, e maiores do que 25% no WT.

Os estudos complementares em que se avaliou a expressão de enzimas antioxidantes em estirpes *C. elegans* repórter com background genético WT e, em que se quantificou por qRT-PCR a expressão de alguns marcadores de resposta antioxidante, confirmaram que a presença destes extratos ativa determinados agentes antioxidantes nos animais e, conseqüentemente, será este um dos mecanismos por detrás do aumento da resistência ao stress oxidativo induzido pela juglona.

Em conjunto, estes resultados sugerem um potencial efeito neuroprotetor para os extratos HS, HP e HM indicando que o seu potencial antioxidante pode estar envolvido nesta resposta reforçando a ideia de que compostos com potencial antioxidante podem ser uma abordagem promissora para impulsionar os sistemas defensivos contra o stress e a neurodegenerescência.

Os mecanismos de ação devem ser estudados mais detalhadamente no futuro para uma melhor compreensão da ação destes fitoquímicos e desta forma definir as possíveis abordagens terapêuticas a empregar.

**No futuro, os seguintes procedimentos poderão contribuir com dados importantes para o presente estudo:**

- ➔ Os ensaios de longevidade e da quantificação da expressão de genes antioxidantes, deverão ser repetidos para que se possa confirmar os resultados preliminares aqui apresentados.
- ➔ No modelo de DMJ, a verificação da agregação proteica da ATXN3 em estados mais avançados de idade poderiam trazer informações importantes, e permitir detetar eventuais efeitos dependentes de uma exposição mais prolongada ou mais facilmente detetáveis com um fenótipo mais grave.
- ➔ Os níveis de ROS nos nemátodos tratados deverão ser avaliados, bem como dos níveis da peroxidação lipídica e danos proteicos.
- ➔ A expressão de outros genes antioxidantes em estirpes repórter e por qRT-PCR deverá ser avaliada na estirpe WT e nos modelos de neurodegeneração; estes resultados poderão ser confirmados por Western-Blot.
- ➔ O impacto do tratamento dos diferentes extratos nos fenótipos dos modelos de neurodegeneração deve ser estudado tendo em consideração outros estádios de desenvolvimento dos animais.
- ➔ O impacto do tratamento dos diferentes extratos noutros fenótipos descritos para estes modelos (por exemplo da perda neuronal no modelo de tauopatia, CK10) poderá ser analisado.

**Capítulo V**  
**Referências**  
**Bibliográficas**



## Referências Bibliográficas

- Abushouk, Abdelrahman Ibrahim, Ahmed Negida, Hussien Ahmed, e Mohamed M. Abdel-Daim. 2017. «Neuroprotective mechanisms of plant extracts against MPTP induced neurotoxicity: Future applications in Parkinson's disease». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 85 (Janeiro): 635–45. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.074>.
- «Alzheimer's Progression - Alzheimer's Association». sem data. Acedido 5 de Janeiro de 2018. <https://www.alz.org/braintour/progression.asp>.
- Amagase, Harunobu, e Norman R. Farnsworth. 2011. «A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of Lycium barbarum fruit (Goji)». *Food Research International, Exotic Fruits: their Composition, Nutraceutical and Agroindustrial Potential*, 44 (7): 1702–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.027>.
- An, Jae Hyung, e T. Keith Blackwell. 2003a. «SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response». *Genes & Development* 17 (15): 1882–93. <https://doi.org/10.1101/gad.1107803>.
- Andres-Lacueva, Cristina, Barbara Shukitt-Hale, Rachel L. Galli, Olga Jauregui, Rosa M. Lamuela-Raventos, e James A. Joseph. 2005. «Anthocyanins in Aged Blueberry-Fed Rats Are Found Centrally and May Enhance Memory». *Nutritional Neuroscience* 8 (2): 111–20. <https://doi.org/10.1080/10284150500078117>.
- Aparecida Paiva, Franciny, Larissa de Freitas Bonomo, Patrícia Ferreira Boasquivis, Borges Raposo de Paula, Igor Thadeu, Joyce Ferreira da Costa Guerra, Wagney Mendes Leal, Marcelo Eustáquio Silva, Maria Lúcia Pedrosa, e Riva de Paula Oliveira. 2015. «Carqueja (*Baccharis Trimeria*) Protects against Oxidative Stress and  $\beta$ -Amyloid-Induced Toxicity in *Caenorhabditis Elegans*». Research article. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/740162>.
- Ayyadevara, Srinivas, Abhijit Dandapat, Sharda P. Singh, Eric R. Siegel, Robert J. Shmookler Reis, Ludwika Zimniak, e Piotr Zimniak. 2007. «Life span and stress resistance of *Caenorhabditis elegans* are differentially affected by glutathione transferases metabolizing 4-hydroxynon-2-enal». *Mechanisms of Ageing and Development* 128 (2): 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.025>.
- Ayyadevara, Srinivas, Mark R. Engle, Sharda P. Singh, Abhijit Dandapat, Cheryl F. Lichti, Helen Beneš, Robert J. Shmookler Reis, Eva Liebau, e Piotr Zimniak. 2005. «Lifespan and Stress Resistance of *Caenorhabditis Elegans* Are Increased by Expression of Glutathione Transferases Capable of Metabolizing the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal». *Ageing Cell* 4 (5): 257–71. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2005.00168.x>.
- Ballatore, Carlo, Virginia M.-Y. Lee, e John Q. Trojanowski. 2007. «Tau-Mediated Neurodegeneration in Alzheimer's Disease and Related Disorders». *Nature Reviews. Neuroscience* 8 (9): 663–72. <https://doi.org/10.1038/nrn2194>.
- Bastianetto, Stéphane, Wen-Hua Zheng, e Rémi Quirion. 2000. «Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons». *British Journal of Pharmacology* 131 (4): 711–20. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703626>.
- Bettencourt, Conceição, e Manuela Lima. 2011. «Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6 (Junho): 35. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-35>.

## Capítulo V – Referências Bibliográficas

- Bettencourt, Conceição, Cristina Santos, Teresa Kay, João Vasconcelos, e Manuela Lima. 2008. «Analysis of Segregation Patterns in Machado-Joseph Disease Pedigrees». *Journal of Human Genetics* 53 (10): 920–23. <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0330-y>.
- Bishop, Nicholas A., e Leonard Guarente. 2007. «Two Neurons Mediate Diet-Restriction-Induced Longevity in *C. Elegans*». *Nature* 447 (7144): 545–49. <https://doi.org/10.1038/nature05904>.
- Bispo, M. D., R. H. Mourão, E. M. Franzotti, K. B. Bomfim, M. F. Arrigoni-Blank, M. P. Moreno, M. Marchioro, e A. R. Antonioli. 2001. «Antinociceptive and Antiedematogenic Effects of the Aqueous Extract of *Hyptis Pectinata* Leaves in Experimental Animals.» *Journal of Ethnopharmacology* 76 (1): 81–86. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00172-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00172-6).
- Bonomo, Larissa de Freitas, David Nunes Silva, Patrícia Ferreira Boasquivis, Franciny Aparecida Paiva, Joyce Ferreira da Costa Guerra, Talita Alves Faria Martins, Álvaro Gustavo de Jesus Torres, et al. 2014. «Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Modulates Oxidative Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans* by Direct and Indirect Mechanisms». *PLoS ONE* 9 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089933>.
- Boulin, Thomas, John F. Etchberger, e Oliver Hobert. 2006. *Reporter gene fusions*. WormBook. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19738/>.
- Brenner, S. 1974. «The Genetics of CAENORHABDITIS ELEGANS». *Genetics* 77 (1): 71–94.
- Brunquell, Jessica, Stephanie Morris, Alana Snyder, e Sandy D. Westerheide. 2018. «Coffee Extract and Caffeine Enhance the Heat Shock Response and Promote Proteostasis in an HSF-1-Dependent Manner in *Caenorhabditis Elegans*». *Cell Stress and Chaperones* 23 (1): 65–75. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0824-7>.
- Bueno, Alexandro X., Alisson T. S. Moreira, Flávia T. Silva, Charles S. Estevam, e Murilo Marchioro. 2006. «Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system». *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16 (3): 317–23. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000300007>.
- Burnett, Barrington, Fusheng Li, e Randall N. Pittman. 2003. «The Polyglutamine Neurodegenerative Protein Ataxin-3 Binds Polyubiquitylated Proteins and Has Ubiquitin Protease Activity». *Human Molecular Genetics* 12 (23): 3195–3205. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg344>.
- C. elegans Sequencing Consortium. 1998. «Genome Sequence of the Nematode *C. Elegans*: A Platform for Investigating Biology». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5396): 2012–18.
- Cai, Wai-Jiao, Jian-Hua Huang, Su-Qin Zhang, Bin Wu, Pankaj Kapahi, Xin-Min Zhang, e Zi-Yin Shen. 2011. «Icariin and Its Derivative Icariside II Extend Healthspan via Insulin/IGF-1 Pathway in *C. Elegans*». *PLoS ONE* 6 (12): e28835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028835>.
- Campion, D., C. Dumanchin, D. Hannequin, B. Dubois, S. Belliard, M. Puel, C. Thomas-Anterion, et al. 1999. «Early-Onset Autosomal Dominant Alzheimer Disease: Prevalence, Genetic Heterogeneity, and Mutation Spectrum». *American Journal of Human Genetics* 65 (3): 664–70. <https://doi.org/10.1086/302553>.
- Chen, Chun-Chieh G., Martin J. Simard, Hiroaki Tabara, Daniel R. Brownell, Jennifer A. McCollough, e Craig C. Mello. 2005. «A Member of the Polymerase  $\beta$  Nucleotidyltransferase Superfamily Is Required for RNA Interference in *C. elegans*». *Current Biology* 15 (4): 378–83. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.009>.
- Chen, Pei-Ju, Ching-Liang Hsieh, Kuan-Pin Su, Yu-Chi Hou, Hsiu-Mei Chiang, e Lee-Yan Sheen. 2009. «Rhizomes of *Gastrodia Elata* B(L) Possess Antidepressant-like Effect via Monoamine Modulation in Subchronic

- Animal Model». *The American Journal of Chinese Medicine* 37 (6): 1113–24. <https://doi.org/10.1142/S0192415X09007533>.
- Chen, Pei-Ju, Keng-Chen Liang, Hui-Chen Lin, Ching-Liang Hsieh, Kuan-Pin Su, Mei-Chu Hung, e Lee-Yan Sheen. 2011. «Gastrodia elata Bl. Attenuated Learning Deficits Induced by Forced-Swimming Stress in the Inhibitory Avoidance Task and Morris Water Maze». *Journal of Medicinal Food* 14 (6): 610–17. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.1209>.
- Chen, Zhichun, e Chunjiu Zhong. 2014. «Oxidative Stress in Alzheimer’s Disease». *Neuroscience Bulletin* 30 (2): 271–81. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1423-y>.
- Chow, Michelle K. M., Joel P. Mackay, James C. Whisstock, Martin J. Scanlon, e Stephen P. Bottomley. 2004. «Structural and Functional Analysis of the Josephin Domain of the Polyglutamine Protein Ataxin-3». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322 (2): 387–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.131>.
- Chu, L. W. 2012. «Alzheimer’s Disease: Early Diagnosis and Treatment». *Hong Kong Medical Journal = Xianggang Yi Xue Za Zhi* 18 (3): 228–37.
- Chung, Mi Ja, Nak-Ju Sung, Cheon-Seok Park, Dong-Keon Kweon, Alberto Mantovani, Tae-Wha Moon, Sung-Joon Lee, e Kwan-Hwa Park. 2008. «Antioxidative and Hypocholesterolemic Activities of Water-Soluble Puerarin Glycosides in HepG2 Cells and in C57 BL/6J Mice». *European Journal of Pharmacology* 578 (2–3): 159–70. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.09.036>.
- Coutinho, Maria Paula Mourão do Amaral. 1992. «Doença de Machado-Joseph: Tentativa de definição». <http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/10229>.
- Coutinho, P., e C. Andrade. 1978. «Autosomal Dominant System Degeneration in Portuguese Families of the Azores Islands. A New Genetic Disorder Involving Cerebellar, Pyramidal, Extrapyramidal and Spinal Cord Motor Functions». *Neurology* 28 (7): 703–9.
- Crews, Leslie, e Eliezer Masliah. 2010. «Molecular Mechanisms of Neurodegeneration in Alzheimer’s Disease». *Human Molecular Genetics* 19 (R1): R12–20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq160>.
- Cui, Jingfu, Mo Zhu, Shijun Zhu, Guixian Wang, Yaozeng Xu, e Dechun Geng. 2014. «Inhibitory Effect of Icaritin on Ti-Induced Inflammatory Osteoclastogenesis». *The Journal of Surgical Research* 192 (2): 447–53. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.05.038>.
- Culetto, E., e D. B. Sattelle. 2000. «A Role for Caenorhabditis Elegans in Understanding the Function and Interactions of Human Disease Genes». *Human Molecular Genetics* 9 (6): 869–77.
- Dimitriadi, Maria, e Anne C. Hart. 2010. «Neurodegenerative Disorders: Insights from the Nematode Caenorhabditis Elegans». *Neurobiology of Disease* 40 (1): 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.012>.
- Dorman, J. B., B. Albinder, T. Shroyer, e C. Kenyon. 1995. «The Age-1 and Daf-2 Genes Function in a Common Pathway to Control the Lifespan of Caenorhabditis Elegans». *Genetics* 141 (4): 1399–1406.
- Drake, Jennifer, Christopher D. Link, e D. Allan Butterfield. 2003. «Oxidative Stress Precedes Fibrillar Deposition of Alzheimer’s Disease Amyloid  $\beta$ -Peptide (1–42) in a Transgenic Caenorhabditis Elegans Model». *Neurobiology of Aging* 24 (3): 415–20. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00225-7](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00225-7).
- Dröge, Wulf. 2002. «Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function». *Physiological Reviews* 82 (1): 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.

## Capítulo V – Referências Bibliográficas

- Ehrnhoefer, Dagmar E., Martin Duennwald, Phoebe Markovic, Jennifer L. Wacker, Sabine Engemann, Margaret Roark, Justin Legleiter, et al. 2006. «Green Tea (-)-Epigallocatechin-Gallate Modulates Early Events in Huntingtin Misfolding and Reduces Toxicity in Huntington's Disease Models». *Human Molecular Genetics* 15 (18): 2743–51. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl210>.
- Esteves, Sofia, Sara Duarte-Silva, Luana Naia, Andreia Neves-Carvalho, Andreia Teixeira-Castro, Ana Cristina Rego, Anabela Silva-Fernandes, e Patricia Maciel. 2015. «Limited Effect of Chronic Valproic Acid Treatment in a Mouse Model of Machado-Joseph Disease». *PLOS ONE* 10 (10): e0141610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141610>.
- Falco, Anna De, Daphne Schneider Cukierman, Rachel A. Hauser-Davis, Nicolás A. Rey, Anna De Falco, Daphne Schneider Cukierman, Rachel A. Hauser-Davis, e Nicolás A. Rey. 2016. «ALZHEIMER'S DISEASE: ETIOLOGICAL HYPOTHESES AND TREATMENT PERSPECTIVES». *Química Nova* 39 (1): 63–80. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150152>.
- Fang, Evandro F., Tyler B. Waltz, Henok Kassahun, Qiping Lu, Jesse S. Kerr, Marya Morevati, Elayne M. Fivenson, et al. 2017. «Tomatidine Enhances Lifespan and Healthspan in *C. Elegans* through Mitophagy Induction via the SKN-1/Nrf2 Pathway». *Scientific Reports* 7 (Abril): 46208. <https://doi.org/10.1038/srep46208>.
- Galal, Ahmed M., Larry A. Walker, e Ikhlas A. Khan. 2015. «Induction of GST and Related Events by Dietary Phytochemicals: Sources, Chemistry, and Possible Contribution to Chemoprevention». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 14 (24): 2802–21.
- Gandhi, Sonia, e Nicholas W. Wood. 2010. «Genome-Wide Association Studies: The Key to Unlocking Neurodegeneration?» *Nature Neuroscience* 13 (7): 789–94. <https://doi.org/10.1038/nn.2584>.
- Gao, Qing-Han, Xueyan Fu, Rui Zhang, Zhisheng Wang, e Muzhen Guo. 2018. «Neuroprotective effects of plant polysaccharides: A review of the mechanisms». *International Journal of Biological Macromolecules* 106 (Janeiro): 749–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.075>.
- Ghaffari, Hadi, Behrouz Jalali Ghassam, S. Chandra Nayaka, K. Ramachandra Kini, e H. S. Prakash. 2014. «Antioxidant and Neuroprotective Activities of Hyptis suaveolens (L.) Poit. Against Oxidative Stress-Induced Neurotoxicity». *Cellular and Molecular Neurobiology* 34 (3): 323–31. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-0016-7>.
- Ghaffari, Hadi, Behrouz Jalali Ghassam, e HS Prakash. 2012. «Hepatoprotective and cytoprotective properties of Hyptis suaveolens against oxidative stress-induced damage by CCl4 and H2O2». *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5 (11): 868–74. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60162-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60162-X).
- Goedert, M., e R. Jakes. 1990. «Expression of Separate Isoforms of Human Tau Protein: Correlation with the Tau Pattern in Brain and Effects on Tubulin Polymerization». *The EMBO Journal* 9 (13): 4225–30.
- Goedert, Michel. 2003. «Neurodegenerative Tauopathy in the Worm». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (17): 9653–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834191100>.
- Goedert, Michel. 2004. «Tau Protein and Neurodegeneration». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15 (1): 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.12.015>.
- Goedert, Michel, e Maria Grazia Spillantini. 2006. «A Century of Alzheimer's Disease». *Science (New York, N.Y.)* 314 (5800): 777–81. <https://doi.org/10.1126/science.1132814>.
- Goto, Jun, Masahiko Watanabe, Yaeko Ichikawa, Su-Bog Yee, Noriyo Ihara, Kotaro Endo, Shuichi Igarashi, et al. 1997. «Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini». *Neuroscience Research* 28 (4): 373–77. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(97\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(97)00056-4).



- Guerra, M. C., E. Speroni, M. Broccoli, M. Cangini, P. Pasini, A. Minghetti, N. Crespi-Perellino, M. Mirasoli, G. Cantelli-Forti, e M. Paolini. 2000. «Comparison between Chinese Medical Herb Pueraria Lobata Crude Extract and Its Main Isoflavone Puerarin Antioxidant Properties and Effects on Rat Liver CYP-Catalysed Drug Metabolism». *Life Sciences* 67 (24): 2997–3006.
- Guha, Sujay, Min Cao, Ryan M. Kane, Anthony M. Savino, Sige Zou, e Yuqing Dong. 2013. «The longevity effect of cranberry extract in *Caenorhabditis elegans* is modulated by daf-16 and osr-1». *Age* 35 (5): 1559–74. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9459-x>.
- Gui, Yuyan, Xuemin Qiu, Yingping Xu, Dajin Li, e Ling Wang. 2015. «Bu-Shen-Ning-Xin Decoction Suppresses Osteoclastogenesis via Increasing Dehydroepiandrosterone to Prevent Postmenopausal Osteoporosis». *BioScience Trends* 9 (3): 169–81. <https://doi.org/10.5582/bst.2015.01011>.
- Hardy, J. A., e G. A. Higgins. 1992. «Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis». *Science (New York, N.Y.)* 256 (5054): 184–85.
- Hardy, John. 2006. «A Hundred Years of Alzheimer's Disease Research». *Neuron* 52 (1): 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.016>.
- Harris, Ginny Marie, Katerina Dodelzon, Lijie Gong, Pedro Gonzalez-Alegre, e Henry L. Paulson. 2010. «Splice Isoforms of the Polyglutamine Disease Protein Ataxin-3 Exhibit Similar Enzymatic yet Different Aggregation Properties». *PLoS One* 5 (10): e13695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013695>.
- Hasegawa, Koichi, Satsuki Miwa, Kaname Tsutsumiuchi, e Johji Miwa. 2010. «Allyl Isothiocyanate That Induces GST and UGT Expression Confers Oxidative Stress Resistance on *C. Elegans*, as Demonstrated by Nematode Biosensor». *PLOS ONE* 5 (2): e9267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009267>.
- Helmes, Edward, e Truls Østbye. 2002. «Beyond memory impairment: cognitive changes in Alzheimer's disease». *Archives of Clinical Neuropsychology* 17 (2): 179–93. [https://doi.org/10.1016/S0887-6177\(00\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0887-6177(00)00109-8).
- Hong, Ming, Victoria Zhukareva, Vanessa Vogelsberg-Ragaglia, Zbigniew Wszolek, Lee Reed, Bruce I. Miller, Dan H. Geschwind, et al. 1998. «Mutation-Specific Functional Impairments in Distinct Tau Isoforms of Hereditary FTDP-17». *Science* 282 (5395): 1914–17. <https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1914>.
- Hong-Qi, Yang, Sun Zhi-Kun, e Chen Sheng-Di. 2012. «Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting A $\beta$  and tau». *Translational Neurodegeneration* 1 (Outubro): 21. <https://doi.org/10.1186/2047-9158-1-21>.
- Houthoofd, Koen, Bart P. Braeckman, Isabelle Lenaerts, Kristel Brys, Annemie De Vreese, Sylvie Van Eygen, e Jacques R. Vanfleteren. 2002. «Ageing Is Reversed, and Metabolism Is Reset to Young Levels in Recovering Dauer Larvae of *C. Elegans*». *Experimental Gerontology* 37 (8–9): 1015–21.
- Houthoofd, Koen, Manuel A. Fidalgo, David Hoogewijs, Bart P. Braeckman, Isabelle Lenaerts, Kristel Brys, Filip Matthijssens, et al. 2005. «Metabolism, Physiology and Stress Defense in Three Aging Ins/IGF-1 Mutants of the Nematode *Caenorhabditis Elegans*». *Aging Cell* 4 (2): 87–95. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2005.00150.x>.
- Hsieh, C. L., N. Y. Tang, S. Y. Chiang, C. T. Hsieh, e J. G. Lin. 1999. «Anticonvulsive and Free Radical Scavenging Actions of Two Herbs, *Uncaria Rhynchophylla* (MIQ) Jack and *Gastrodia Elata* Bl., in Kainic Acid-Treated Rats». *Life Sciences* 65 (20): 2071–82.

## Capítulo V – Referências Bibliográficas

- Huie, Carmen W. 2002. «A Review of Modern Sample-Preparation Techniques for the Extraction and Analysis of Medicinal Plants». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373 (1–2): 23–30. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1265-3>.
- Hyman, Bradley T., Jean C. Augustinack, e Martin Ingelsson. 2005. «Transcriptional and conformational changes of the tau molecule in Alzheimer's disease». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, The Biology and Pathobiology of Tau*, 1739 (2): 150–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.06.015>.
- Inoue, Hideki, Naoki Hisamoto, Jae Hyung An, Riva P. Oliveira, Eisuke Nishida, T. Keith Blackwell, e Kunihiro Matsumoto. 2005. «The C. Elegans P38 MAPK Pathway Regulates Nuclear Localization of the Transcription Factor SKN-1 in Oxidative Stress Response». *Genes & Development* 19 (19): 2278–83. <https://doi.org/10.1101/gad.1324805>.
- Islam, Tahidul, Xiaoming Yu, Tanvir Singh Badwal, e Baojun Xu. 2017. «Comparative Studies on Phenolic Profiles, Antioxidant Capacities and Carotenoid Contents of Red Goji Berry (<Emphasis Type="Italic">Lycium Barbarum</Emphasis>) and Black Goji Berry (<Emphasis Type="Italic">Lycium Ruthenicum</Emphasis>)». *Chemistry Central Journal* 11 (1): 59. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0287-z>.
- Jadiya, Pooja, Asif Khan, Shreesh Raj Sammi, Supinder Kaur, Snober S. Mir, e Aamir Nazir. 2011. «Anti-Parkinsonian effects of Bacopa monnieri: Insights from transgenic and pharmacological Caenorhabditis elegans models of Parkinson's disease». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 413 (4): 605–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.010>.
- Jiménez-Osorio, A. S., S. González-Reyes, e J. Pedraza-Chaverri. 2015. «Natural Nrf2 Activators in Diabetes.» *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 448 (Agosto): 182–92. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.07.009>.
- Jin, Seong Eun, You Kyung Son, Byung-Sun Min, Hyun Ah Jung, e Jae Sue Choi. 2012. «Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Constituents Isolated from Pueraria Lobata Roots». *Archives of Pharmacal Research* 35 (5): 823–37. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0508-x>.
- Kalbfuss, B., S. A. Mabon, e T. Misteli. 2001. «Correction of Alternative Splicing of Tau in Frontotemporal Dementia and Parkinsonism Linked to Chromosome 17». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (46): 42986–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105113200>.
- Karuppagounder, Saravanan S., John T. Pinto, Hui Xu, Huan-Lian Chen, M. Flint Beal, e Gary E. Gibson. 2009. «Dietary Supplementation with Resveratrol Reduces Plaque Pathology in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease». *Neurochemistry International* 54 (2): 111–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.10.008>.
- Kawaguchi, Y., T. Okamoto, M. Taniwaki, M. Aizawa, M. Inoue, S. Katayama, H. Kawakami, S. Nakamura, M. Nishimura, e I. Akiguchi. 1994. «CAG Expansions in a Novel Gene for Machado-Joseph Disease at Chromosome 14q32.1». *Nature Genetics* 8 (3): 221–28. <https://doi.org/10.1038/ng1194-221>.
- Kawai, Yoshinari, Akinori Takeda, Yuji Abe, Yukihiko Washimi, Fumiaki Tanaka, e Gen Sobue. 2004. «Cognitive Impairments in Machado-Joseph Disease». *Archives of Neurology* 61 (11): 1757–60. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.11.1757>.
- Kenyon, C. 2001. «A Conserved Regulatory System for Aging». *Cell* 105 (2): 165–68.
- Kester, Maartje I., e Philip Scheltens. 2009. «Dementia: The Bare Essentials». *Practical Neurology* 9 (4): 241–51. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.182477>.

- Kim, Hyeon-Ju, Kwang-Deog Moon, Sang-Young Oh, Sang-Pyo Kim, e Seong-Ryong Lee. 2001. «Ether fraction of methanol extracts of *Gastrodia elata*, a traditional medicinal herb, protects against kainic acid-induced neuronal damage in the mouse hippocampus». *Neuroscience Letters* 314 (1): 65–68. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02296-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02296-0).
- Kim, In Su, Dong-Kug Choi, e Hun Jong Jung. 2011. «Neuroprotective Effects of Vanillyl Alcohol in *Gastrodia Elata* Blume Through Suppression of Oxidative Stress and Anti-Apoptotic Activity in Toxin-Induced Dopaminergic MN9D Cells». *Molecules* 16 (7): 5349–61. <https://doi.org/10.3390/molecules16075349>.
- Kosik, K. S., L. D. Orecchio, S. Bakalis, e R. L. Neve. 1989. «Developmentally Regulated Expression of Specific Tau Sequences». *Neuron* 2 (4): 1389–97.
- Kraemer, Brian C., Bin Zhang, James B. Leverenz, James H. Thomas, John Q. Trojanowski, e Gerard D. Schellenberg. 2003. «Neurodegeneration and Defective Neurotransmission in a *Caenorhabditis Elegans* Model of Tauopathy». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (17): 9980–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533448100>.
- Krikorian, Robert, Marcelle D. Shidler, Tiffany A. Nash, Wilhelmina Kalt, Melinda R. Vinqvist-Tymchuk, Barbara Shukitt-Hale, e James A. Joseph. 2010. «Blueberry Supplementation Improves Memory in Older Adults». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (7): 3996–4000. <https://doi.org/10.1021/jf9029332>.
- Krishnamurti, Chandrasekhar, e SSC Chakra Rao. 2016. «The isolation of morphine by Serturmer». *Indian Journal of Anaesthesia* 60 (11): 861–62. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.193696>.
- Kristensen, Line V., Felix S. Oppermann, Matthias J. Rauen, Karina Fog, Thorsten Schmidt, Jana Schmidt, Tina Harmuth, Rasmus Hartmann-Petersen, e Kenneth Thirstrup. 2018. «Mass spectrometry analyses of normal and polyglutamine expanded ataxin-3 reveal novel interaction partners involved in mitochondrial function». *Neurochemistry International* 112 (Janeiro): 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.10.013>.
- Kulczyński, Bartosz, e Anna Gramza-Michałowska. 2016. «Goji Berry (*Lycium barbarum*): Composition and Health Effects – a Review». *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 66 (2): 67–76. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0040>.
- Lee, Siu Sylvia, Scott Kennedy, Andrew C. Tolonen, e Gary Ruvkun. 2003. «DAF-16 Target Genes That Control *C. Elegans* Life-Span and Metabolism». *Science* 300 (5619): 644–47. <https://doi.org/10.1126/science.1083614>.
- Li, Suk-Yee, Di Yang, Chung-Man Yeung, Wing-Yan Yu, Raymond Chuen-Chung Chang, Kwok-Fai So, David Wong, e Amy C. Y. Lo. 2011. «*Lycium Barbarum* Polysaccharides Reduce Neuronal Damage, Blood-Retinal Barrier Disruption and Oxidative Stress in Retinal Ischemia/Reperfusion Injury». *PLOS ONE* 6 (1): e16380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016380>.
- Lin, Michael T., e M. Flint Beal. 2006. «Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases». *Nature* 443 (7113): 787–95. <https://doi.org/10.1038/nature05292>.
- Lisboa, Ana C. C. D., Iderjane C. M. Mello, Rogeria S. Nunes, Marquês A. dos Santos, Angelo R. Antonioli, Rosilene M. Marçal, e Sócrates C. de H. Cavalcanti. 2006. «Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts». *Fitoterapia* 77 (6): 439–42. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.06.001>.
- Lopes, Tátilla Martins, Anelyssa D'Abreu, Marcondes Cavalcante França, Clarissa Lin Yasuda, Luiz Eduardo Betting, Adriana Bastos Samara, Gabriela Castellano, et al. 2013. «Widespread Neuronal Damage and Cognitive Dysfunction in Spinocerebellar Ataxia Type 3». *Journal of Neurology* 260 (9): 2370–79. <https://doi.org/10.1007/s00415-013-6998-8>.

## Capítulo V – Referências Bibliográficas

- Lu, Shelly C. 2009. «Regulation of glutathione synthesis». *Molecular Aspects of Medicine*, Glutathione in Health and Disease, 30 (1): 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>.
- Maciel, P., M. C. Costa, A. Ferro, M. Rousseau, C. S. Santos, C. Gaspar, J. Barros, G. A. Rouleau, P. Coutinho, e J. Sequeiros. 2001. «Improvement in the Molecular Diagnosis of Machado-Joseph Disease». *Archives of Neurology* 58 (11): 1821–27.
- Manto, Mario-Ubaldo. 2005. «The Wide Spectrum of Spinocerebellar Ataxias (SCAs)». *The Cerebellum* 4 (1): 2. <https://doi.org/10.1080/14734220510007914>.
- Martin, J. B. 1999. «Molecular Basis of the Neurodegenerative Disorders». *The New England Journal of Medicine* 340 (25): 1970–80. <https://doi.org/10.1056/NEJM199906243402507>.
- Maruff, P., P. Tyler, T. Burt, B. Currie, C. Burns, e J. Currie. 1996. «Cognitive Deficits in Machado-Josephs Disease». *Annals of Neurology* 40 (3): 421–27. <https://doi.org/10.1002/ana.410400311>.
- Masci, Alessandra, Simone Carradori, Maria Antonietta Casadei, Patrizia Paolicelli, Stefania Petralito, Rino Ragno, e Stefania Cesa. 2018. «Lycium barbarum polysaccharides: extraction, purification, structural characterisation and evidence about hypoglycaemic and hypolipidaemic effects. A review». *Food Chemistry*, Fevereiro. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.176>.
- Masino, Laura, Valeria Musi, Rajesh P. Menon, Paola Fusi, Geoff Kelly, Thomas A. Frenkiel, Yvon Trottier, e Annalisa Pastore. 2003. «Domain Architecture of the Polyglutamine Protein Ataxin-3: A Globular Domain Followed by a Flexible Tail». *FEBS Letters* 549 (1–3): 21–25. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00748-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00748-8).
- McElwee, Joshua J., Eugene Schuster, Eric Blanc, James H. Thomas, e David Gems. 2004. «Shared Transcriptional Signature in Caenorhabditis Elegans Dauer Larvae and Long-Lived Daf-2 Mutants Implicates Detoxification System in Longevity Assurance». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (43): 44533–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406207200>.
- McMahon, M., K. Itoh, M. Yamamoto, S. A. Chanas, C. J. Henderson, L. I. McLellan, C. R. Wolf, C. Cavin, e J. D. Hayes. 2001. «The Cap'n'Collar Basic Leucine Zipper Transcription Factor Nrf2 (NF-E2 P45-Related Factor 2) Controls Both Constitutive and Inducible Expression of Intestinal Detoxification and Glutathione Biosynthetic Enzymes». *Cancer Research* 61 (8): 3299–3307.
- McNeil, Megil, Petrea Facey, e Roy Porter. 2011. «Essential Oils from the Hyptis Genus—a Review (1909-2009)». *Natural Product Communications* 6 (11): 1775–96.
- Mishra, Shanti Bhushan, Amita Verma, Alok Mukerjee, e M. Vijayakumar. 2011. «Anti-Hyperglycemic Activity of Leaves Extract of Hyptis suaveolens L. Poit in Streptozotocin Induced Diabetic Rats». *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4 (9): 689–93. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60175-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60175-2).
- Miyasaka, Tomohiro, Ce Xie, Satomi Yoshimura, Yuki Shinzaki, Sawako Yoshina, Eriko Kage-Nakadai, Shohei Mitani, e Yasuo Ihara. 2016. «Curcumin Improves Tau-Induced Neuronal Dysfunction of Nematodes». *Neurobiology of Aging* 39 (Março): 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.004>.
- Moffat, John G., Fabien Vincent, Jonathan A. Lee, Jörg Eder, e Marco Prunotto. 2017. «Opportunities and Challenges in Phenotypic Drug Discovery: An Industry Perspective». *Nature Reviews Drug Discovery* 16 (8): 531. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.111>.
- Mrak, R. E., S. T. Griffin, e D. I. Graham. 1997. «Aging-Associated Changes in Human Brain». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56 (12): 1269–75.

- Muchowski, Paul J. 2002. «Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Neurodegeneration: A Critical Role for Molecular Chaperones?» *Neuron* 35 (1): 9–12.
- Murphy, Coleen T., Steven A. McCarroll, Cornelia I. Bargmann, Andrew Fraser, Ravi S. Kamath, Julie Ahringer, Hao Li, e Cynthia Kenyon. 2003. «Genes That Act Downstream of DAF-16 to Influence the Lifespan of *Caenorhabditis Elegans*». *Nature* 424 (6946): 277–83. <https://doi.org/10.1038/nature01789>.
- Nantitanon, Witayapan, Sombat Chowwanapoonpohn, e Siriporn Okonogi. 2007. «Antioxidant and Antimicrobial Activities of Hyptis Suaveolens Essential Oil». *Scientia Pharmaceutica* 75 (1): 35–54. <https://doi.org/10.3797/scipharm.2007.75.35>.
- Neves-Carvalho, Andreia, Elsa Logarinho, Ana Freitas, Sara Duarte-Silva, Maria do Carmo Costa, Anabela Silva-Fernandes, Margarida Martins, et al. 2015. «Dominant Negative Effect of Polyglutamine Expansion Perturbs Normal Function of Ataxin-3 in Neuronal Cells». *Human Molecular Genetics* 24 (1): 100–117. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu422>.
- Newman, David J., e Gordon M. Cragg. 2016. «Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014». *Journal of Natural Products* 79 (3): 629–61. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- Oboh, Ganiyu. 2008. «Polyphenol extracts from Hyptis suaveolens leaves inhibit Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in brain». *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.* 2 (Janeiro): 41–46.
- Ogawa, Takahiro, Yukihiko Kodera, Dai Hirata, T. Keith Blackwell, e Masaki Mizunuma. 2016. «Natural Thioallyl Compounds Increase Oxidative Stress Resistance and Lifespan in *Caenorhabditis Elegans* by Modulating SKN-1/Nrf». *Scientific Reports* 6 (Fevereiro): 21611. <https://doi.org/10.1038/srep21611>.
- Oh, Seung Wook, Arnab Mukhopadhyay, Bharat L. Dixit, Tamal Raha, Michael R. Green, e Heidi A. Tissenbaum. 2006. «Identification of Direct DAF-16 Targets Controlling Longevity, Metabolism and Diapause by Chromatin Immunoprecipitation». *Nature Genetics* 38 (2): 251–57. <https://doi.org/10.1038/ng1723>.
- Ohkumo, Tsuyoshi, Chikahide Masutani, Toshihiko Eki, e Fumio Hanaoka. 2008. «Use of RNAi in *C. Elegans*». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 442: 129–37. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-191-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-191-8_10).
- Oliveira, Riva P., Jess Porter Abate, Kieran Dilks, Jessica Landis, Jasmine Ashraf, Coleen T. Murphy, e T. Keith Blackwell. 2009. «Condition-Adapted Stress and Longevity Gene Regulation by *Caenorhabditis Elegans* SKN-1/Nrf». *Aging Cell* 8 (5): 524–41.
- Omar, Syed H., Christopher J. Scott, Adam S. Hamlin, e Hassan K. Obied. 2017. «The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer’s disease». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 47 (Setembro): 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.02.016>.
- Orr, Harry T., e Huda Y. Zoghbi. 2007. «Trinucleotide Repeat Disorders». *Annual Review of Neuroscience* 30: 575–621. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113042>.
- Paiva, Franciny Aparecida. 2015. «Baccharis trimera protege contra o estresse oxidativo e toxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide no *Caenorhabditis elegans*.» <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/5426>.
- Paixão, M. S., M. S. Melo, M. G. B. Oliveira, M. T. Santana, A. C. B. Lima, N. P. Damascena, A. S. Dias, et al. 2013. «Hyptis Pectinata: Redox Protection and Orofacial Antinociception». *Phytotherapy Research: PTR* 27 (9): 1328–33. <https://doi.org/10.1002/ptr.4869>.

## Capítulo V – Referências Bibliográficas

- Park, Sang-Kyu, Patricia M. Tedesco, e Thomas E. Johnson. 2009. «Oxidative Stress and Longevity in *Caenorhabditis Elegans* as Mediated by SKN-1». *Aging Cell* 8 (3): 258–69. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00473.x>.
- Paulson, Henry. 2015. *Spinocerebellar Ataxia Type 3*. University of Washington, Seattle. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1196/>.
- Povh, Juliana Aparecida, Flávia Borges Santos, e Kleber Resende Silva. 2012. «Teor de fenóis totais e flavonóides em quatro espécies do gênero *Hyptis* Jacq. ocorrentes no cerrado». *Brazilian Geographical Journal: Geosciences and Humanities research medium* 3 (2): 3.
- Pun, Pamela Boon Li, Jan Gruber, Soon Yew Tang, Sebastian Schaffer, Raphael Lee Sheng Ong, Sheng Fong, Li Fang Ng, Irwin Cheah, e Barry Halliwell. 2010. «Ageing in Nematodes: Do Antioxidants Extend Lifespan in *Caenorhabditis Elegans*?» *Biogerontology* 11 (1): 17–30. <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9223-5>.
- Qian, Dan, Yaxing Zhao, Guang Yang, e Luqi Huang. 2017. «Systematic Review of Chemical Constituents in the Genus *Lycium* (Solanaceae)». *Molecules* 22 (6): 911. <https://doi.org/10.3390/molecules22060911>.
- Raskin, Ilya, David M. Ribnicky, Slavko Komarnytsky, Nebojsa Ilic, Alexander Poulev, Nikolai Borisjuk, Anita Brinker, et al. 2002. «Plants and Human Health in the Twenty-First Century». *Trends in Biotechnology* 20 (12): 522–31.
- Raymundo, Larissa J. R. P., Carolina C. Guilhon, Daniela S. Alviano, Maria Eline Matheus, Angelo R. Antonioli, Sócrates C. H. Cavalcanti, Péricles B. Alves, Celuta S. Alviano, e Patricia D. Fernandes. 2011. «Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil». *Journal of Ethnopharmacology* 134 (3): 725–32. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.027>.
- Reddy, P. Hemachandra, Maria Manczak, Xiangling Yin, Mary Catherine Grady, Andrew Mitchell, Sahil Tonk, Chandra Sekhar Kuruva, et al. 2018. «Protective Effects of Indian Spice Curcumin Against Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's Disease». *Journal of Alzheimer's Disease* 61 (3): 843–66. <https://doi.org/10.3233/JAD-170512>.
- Reinke, V., H. E. Smith, J. Nance, J. Wang, C. Van Doren, R. Begley, S. J. Jones, et al. 2000. «A Global Profile of Germline Gene Expression in *C. Elegans*». *Molecular Cell* 6 (3): 605–16.
- Riddle, Donald L., e Patrice S. Albert. 1997. «Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development». Em *C. Elegans II*, editado por Donald L. Riddle, Thomas Blumenthal, Barbara J. Meyer, e James R. Priess, 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20018/>.
- Ringman, John M., Sally A. Frautschy, Edmond Teng, Aynun N. Begum, Jenny Bardens, Maryam Beigi, Karen H. Gyls, et al. 2012. «Oral Curcumin for Alzheimer's Disease: Tolerability and Efficacy in a 24-Week Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Study». *Alzheimer's Research & Therapy* 4 (5): 43. <https://doi.org/10.1186/alzrt146>.
- Roberson, Erik D., e Lennart Mucke. 2006. «100 Years and Counting: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease». *Science (New York, N.Y.)* 314 (5800): 781–84. <https://doi.org/10.1126/science.1132813>.
- Rosenberg, R. N., W. L. Nyhan, C. Bay, e P. Shore. 1976. «Autosomal Dominant Striatonigral Degeneration. A Clinical, Pathologic, and Biochemical Study of a New Genetic Disorder». *Neurology* 26 (8): 703–14.

- Ross, Christopher A., e Michelle A. Poirier. 2004. «Protein Aggregation and Neurodegenerative Disease». *Nature Medicine* 10 (7): S10. <https://doi.org/10.1038/nm1066>.
- Sangha, Jatinder S., Xiaoli Sun, Owen S. D. Wally, Kaibin Zhang, Xiuhong Ji, Zhimin Wang, Yanwen Wang, Jeffrey Zidichouski, Balakrishnan Prithiviraj, e Junzeng Zhang. 2012. «Liuwei Dihuang (LWDH), a Traditional Chinese Medicinal Formula, Protects against  $\beta$ -Amyloid Toxicity in Transgenic *Caenorhabditis elegans*». *PLoS ONE* 7 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043990>.
- Schöls, Ludger, Peter Bauer, Thorsten Schmidt, Thorsten Schulte, e Olaf Riess. 2004. «Autosomal Dominant Cerebellar Ataxias: Clinical Features, Genetics, and Pathogenesis». *The Lancet. Neurology* 3 (5): 291–304. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00737-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00737-9).
- Senchuk, Megan M., Dylan J. Dues, e Jeremy M. Van Raamsdonk. 2017. «Measuring Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans*: Paraquat and Juglone Sensitivity Assays». *Bio-protocol* 7 (1). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2086>.
- Serrano-Pozo, Alberto, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah, e Bradley T. Hyman. 2011. «Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*: 1 (1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>.
- Shaikat, Md Zeshan Hashib, Md Taleb Hossain, e Md Golam Azam. 2012. «Phytochemical Screening and Antidiarrhoeal Activity of *Hyptis suaveolens*». *International Journal of Applied Research in Natural Products* 5 (2): 1–4.
- Shastri, B. S. 1998. «Molecular Genetics of Familial Alzheimer Disease». *The American Journal of the Medical Sciences* 315 (4): 266–72.
- Shenoy, Chitra, M B Patil, e Ravi Kumar. 2009. «Wound Healing Activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae)». *International Journal of PharmTech Research* 1 (Julho).
- Silva-Fernandes, Anabela, Sara Duarte-Silva, Andreia Neves-Carvalho, Marina Amorim, Carina Soares-Cunha, Pedro Oliveira, Kenneth Thirstrup, Andreia Teixeira-Castro, e Patricia Maciel. 2014. «Chronic Treatment with 17-DMAG Improves Balance and Coordination in A New Mouse Model of Machado-Joseph Disease». *Neurotherapeutics* 11 (2): 433–49. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0255-9>.
- Small, Scott A., e Karen Duff. 2008. «Linking A $\beta$  and Tau in Late-Onset Alzheimer’s Disease: A Dual Pathway Hypothesis». *Neuron* 60 (4): 534–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.007>.
- Sobeh, Mansour, Ahmed Esmat, Ganna Petruk, Mohamed A. O. Abdelfattah, Malak Dmirieh, Daria Maria Monti, Ashraf B. Abdel-Naim, e Michael Wink. 2018. «Phenolic compounds from *Syzygium jambos* (Myrtaceae) exhibit distinct antioxidant and hepatoprotective activities in vivo». *Journal of Functional Foods* 41 (Fevereiro): 223–31. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.055>.
- Sobeh, Mansour, Mona F. Mahmoud, Mohamed A. O. Abdelfattah, Haroan Cheng, Assem M. El-Shazly, e Michael Wink. 2018. «A proanthocyanidin-rich extract from *Cassia abbreviata* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities in vivo». *Journal of Ethnopharmacology* 213 (Março): 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.007>.
- Soto, Claudio. 2003. «Unfolding the Role of Protein Misfolding in Neurodegenerative Diseases». *Nature Reviews Neuroscience* 4 (1): 49. <https://doi.org/10.1038/nrn1007>.
- Staab, Trisha A., Oleg Egrafov, James A. Knowles, e Derek Sieburth. 2014. «Regulation of Synaptic Nlg-1/Neuroigin Abundance by the Skn-1/Nrf Stress Response Pathway Protects against Oxidative Stress». *PLoS Genetics* 10 (1): e1004100. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004100>.

## Capítulo V – Referências Bibliográficas

- Staab, Trisha A., Trevor C. Griffen, Connor Corcoran, Oleg Evgrafov, James A. Knowles, e Derek Sieburth. 2013. «The Conserved SKN-1/Nrf2 Stress Response Pathway Regulates Synaptic Function in *Caenorhabditis Elegans*». *PLoS Genetics* 9 (3): e1003354. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003354>.
- Stack, Cliona, Shari Jainuddin, Ceyhan Elipenahli, Meri Gerges, Natalia Starkova, Anatoly A. Starkov, Mariona Jové, et al. 2014. «Methylene Blue Upregulates Nrf2/ARE Genes and Prevents Tau-Related Neurotoxicity». *Human Molecular Genetics* 23 (14): 3716–32. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu080>.
- Stefani, Massimo, e Christopher M. Dobson. 2003. «Protein Aggregation and Aggregate Toxicity: New Insights into Protein Folding, Misfolding Diseases and Biological Evolution». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 81 (11): 678–99. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0464-5>.
- Stevanin, G., P. S. Sousa, G. Cancel, A. Dürr, O. Dubourg, G. A. Nicholson, J. Weissenbach, et al. 1994. «The gene for Machado–Joseph disease maps to the same 3-cM interval as the spinal cerebellar ataxia 3 gene on chromosome 14q». *Neurobiology of Disease* 1 (1): 79–82. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1994.0010>.
- Suganuma, M., S. Okabe, M. Oniyama, Y. Tada, H. Ito, e H. Fujiki. 1998. «Wide Distribution of [3H](-)-Epigallocatechin Gallate, a Cancer Preventive Tea Polyphenol, in Mouse Tissue». *Carcinogenesis* 19 (10): 1771–76.
- Sulistio, Yanuar Alan, e Klaus Heese. 2015. «Proteomics in Traditional Chinese Medicine with an Emphasis on Alzheimer’s Disease». Research article. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/393510>.
- Sun, Xiaoting, Lan Jin, e Peixue Ling. 2012. «Review of Drugs for Alzheimer’s Disease». *Drug Discoveries & Therapeutics* 6 (6): 285–90.
- Tang, Lanlan, William Dodd, e Keith Choe. 2016. «Isolation of a Hypomorphic Skn-1 Allele That Does Not Require a Balancer for Maintenance». *G3: Genes, Genomes, Genetics* 6 (3): 551–58. <https://doi.org/10.1534/g3.115.023010>.
- Teixeira-Castro, Andreia, Michael Ailion, Ana Jalles, Heather R. Brignull, João L. Vilaça, Nuno Dias, Pedro Rodrigues, et al. 2011. «Neuron-Specific Proteotoxicity of Mutant Ataxin-3 in *C. Elegans*: Rescue by the DAF-16 and HSF-1 Pathways». *Human Molecular Genetics* 20 (15): 2996–3009. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr203>.
- Teixeira-Castro, Andreia, Nuno Dias, Pedro Rodrigues, João Filipe Oliveira, Nuno F. Rodrigues, Patricia Maciel, e João L. Vilaça. 2011. «An Image Processing Application for Quantification of Protein Aggregates in *Caenorhabditis Elegans*». Em *5th International Conference on Practical Applications of Computational Biology & Bioinformatics (PACBB 2011)*, 31–38. Advances in Intelligent and Soft Computing. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-19914-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-19914-1_5).
- Teixeira-Castro, Andreia, Ana Jalles, Sofia Esteves, Soosung Kang, Liliana da Silva Santos, Anabela Silva-Fernandes, Mário F. Neto, et al. 2015. «Serotonergic signalling suppresses ataxin 3 aggregation and neurotoxicity in animal models of Machado-Joseph disease». *Brain* 138 (11): 3221–37. <https://doi.org/10.1093/brain/awv262>.
- Tsai, Chung-Fen, Chuen-Lin Huang, Yun-Lian Lin, Yi-Chao Lee, Ying-Chen Yang, e Nai-Kuei Huang. 2011. «The neuroprotective effects of an extract of *Gastrodia elata*». *Journal of Ethnopharmacology* 138 (1): 119–25. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.08.064>.



- Tullet, Jennifer M. A., Maren Hertweck, Jae Hyung An, Joseph Baker, Ji Yun Hwang, Shu Liu, Riva P. Oliveira, Ralf Baumeister, e T. Keith Blackwell. 2008. «Direct Inhibition of the Longevity-Promoting Factor SKN-1 by Insulin-like Signaling in *C. Elegans*». *Cell* 132 (6): 1025–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.030>.
- Twist, E. C., L. K. Casaubon, M. H. Rutledge, V. S. Rao, P. M. Macleod, J. Radvany, Z. Zhao, R. N. Rosenberg, L. A. Farrer, e G. A. Rouleau. 1995. «Machado Joseph Disease Maps to the Same Region of Chromosome 14 as the Spinocerebellar Ataxia Type 3 Locus.» *Journal of Medical Genetics* 32 (1): 25–31. <https://doi.org/10.1136/jmg.32.1.25>.
- Urban, Nadine, Dimitrios Tsitsipatis, Franziska Hausig, Katrin Kreuzer, Katrin Erler, Vanessa Stein, Michael Ristow, Holger Steinbrenner, e Lars-Oliver Klotz. 2017. «Non-linear impact of glutathione depletion on *C. elegans* life span and stress resistance». *Redox Biology* 11 (Abril): 502–15. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.003>.
- Vera-Arzave, Carlos, Leticia Cruz Antonio, Jesús Arrieta, Gerardo Cruz-Hernández, Antonio Magdiel Velasquez-Mendez, Adelfo Reyes-Ramírez, e María Elena Sánchez-Mendoza. 2012. «Gastroprotection of Suaveolol, Isolated from *Hyptis suaveolens*, against Ethanol-Induced Gastric Lesions in Wistar Rats: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide and Sulfhydryls». *Molecules (Basel, Switzerland)* 17 (8): 8917–27. <https://doi.org/10.3390/molecules17088917>.
- W Kahn, Nate, Shane Rea, Sarah Moyle, Alison Kell, e Thomas E Johnson. 2008. «Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*». *The Biochemical journal* 409 (Fevereiro): 205–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20070521>.
- Wang, Hanqing, Jiaoning Li, Weiwei Tao, Xia Zhang, Xiaojuan Gao, Jingjiao Yong, Jianjun Zhao, Liming Zhang, Yongzhou Li, e Jin-ao Duan. 2018. «*Lycium ruthenicum* studies: Molecular biology, Phytochemistry and pharmacology». *Food Chemistry* 240 (Fevereiro): 759–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.026>.
- Wang, Jian-Zhi, e Fei Liu. 2008. «Microtubule-Associated Protein Tau in Development, Degeneration and Protection of Neurons». *Progress in Neurobiology* 85 (2): 148–75. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.03.002>.
- Wang, L, X-M Qiu, Q Hao, e D-J Li. 2013. «Anti-inflammatory effects of a Chinese herbal medicine in atherosclerosis via estrogen receptor  $\beta$  mediating nitric oxide production and NF- $\kappa$ B suppression in endothelial cells». *Cell Death & Disease* 4 (3): e551. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.66>.
- Wang, Xuelian, Kaixuan Yi, e Yan Zhao. 2018. «Fucoidan Inhibits Amyloid- $\beta$ -Induced Toxicity in Transgenic *Caenorhabditis Elegans* by Reducing the Accumulation of Amyloid- $\beta$  and Decreasing the Production of Reactive Oxygen Species». *Food & Function* 9 (1): 552–60. <https://doi.org/10.1039/C7FO00662D>.
- Wang, Yan-Jiang, Philip Thomas, Jin-Hua Zhong, Fang-Fang Bi, Shanthe Kosaraju, Anthony Pollard, Michael Fenech, e Xin-Fu Zhou. 2009. «Consumption of Grape Seed Extract Prevents Amyloid-Beta Deposition and Attenuates Inflammation in Brain of an Alzheimer's Disease Mouse». *Neurotoxicity Research* 15 (1): 3–14. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9000-x>.
- Wang, Z., X. Zhang, H. Wang, L. Qi, e Y. Lou. 2007. «Neuroprotective effects of icaritin against beta amyloid-induced neurotoxicity in primary cultured rat neuronal cells via estrogen-dependent pathway». *Neuroscience* 145 (3): 911–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.12.059>.

## Capítulo V – Referências Bibliográficas

- Weaver, C. L., M. Espinoza, Y. Kress, e P. Davies. 2000. «Conformational Change as One of the Earliest Alterations of Tau in Alzheimer's Disease». *Neurobiology of Aging* 21 (5): 719–27.
- Wei, Hengyun, Zixiang Gao, Luping Zheng, Cuili Zhang, Zundong Liu, Yazong Yang, Hongming Teng, Lin Hou, Yuling Yin, e Xiangyang Zou. 2017. «Protective Effects of Fucoidan on A $\beta$ 25-35 and d-Gal-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells and d-Gal-Induced Cognitive Dysfunction in Mice». *Marine Drugs* 15 (3). <https://doi.org/10.3390/md15030077>.
- White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson, e S. Brenner. 1986. «The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis Elegans*». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 314 (1165): 1–340.
- Wilson, Mark A, Barbara Shukitt-Hale, Wilhelmina Kalt, Donald K Ingram, James A Joseph, e Catherine A Wolkow. 2006. «Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*». *Aging Cell* 5 (1): 59–68. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00192.x>.
- Wong, Ka H., George Q. Li, Kong M. Li, Valentina Razmovski-Naumovski, e Kelvin Chan. 2011. «Kudzu Root: Traditional Uses and Potential Medicinal Benefits in Diabetes and Cardiovascular Diseases». *Journal of Ethnopharmacology* 134 (3): 584–607. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.02.001>.
- «World Alzheimer Report 2016 | Alzheimer's Disease International». sem data. Acedido 3 de Janeiro de 2018. <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016>.
- Wu, H. Q., L. Xie, X. N. Jin, Q. Ge, H. Jin, e G. Q. Liu. 1989. «[The effect of vanillin on the fully amygdala-kindled seizures in the rat]». *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 24 (7): 482–86.
- Wu, Xueling, Xiaoxiao Li, Shuang Liang, Yanxia Liu, Xueling Dai, Qiusheng Zheng, e Yaxuan Sun. 2017. «Neuroprotective Effect of Anthocyanin Extract from *Lycium Ruthenicum* Murray in A $\beta$ 1–42-Induced Rat Model of AD», Maio. <https://doi.org/10.20944/preprints201705.0144.v1>.
- Wu, Yanjue, Zhixin Wu, Peter Butko, Yves Christen, Mary P. Lambert, William L. Klein, Christopher D. Link, e Yuan Luo. 2006. «Amyloid-Beta-Induced Pathological Behaviors Are Suppressed by Ginkgo Biloba Extract EGb 761 and Ginkgolides in Transgenic *Caenorhabditis Elegans*». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (50): 13102–13. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3448-06.2006>.
- Wu, Z., J. V. Smith, V. Paramasivam, P. Butko, I. Khan, J. R. Cypser, e Y. Luo. 2002. «Ginkgo Biloba Extract EGb 761 Increases Stress Resistance and Extends Life Span of *Caenorhabditis Elegans*.» *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 48 (6): 725–31.
- Xiang, Yanxia, Ju Zhang, Haifeng Li, Qiangqiang Wang, Lingyun Xiao, Huandi Weng, Xiaobin Zhou, et al. 2016. «Epimedium Polysaccharide Alleviates Polyglutamine-Induced Neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans* by Reducing Oxidative Stress». *Rejuvenation Research* 20 (1): 32–41. <https://doi.org/10.1089/rej.2016.1830>.
- Xing, Guihua, Miaoxian Dong, Xiaoming Li, Yu Zou, Li Fan, Xiaoli Wang, Defu Cai, et al. 2011. «Neuroprotective effects of puerarin against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells via a PI3K-dependent signaling pathway». *Brain Research Bulletin* 85 (3): 212–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.03.024>.
- Xu, Xiaohong, Shaomin Zhang, Lei Zhang, Weimin Yan, e Xiaoxiang Zheng. 2005. «The Neuroprotection of Puerarin Against Cerebral Ischemia is Associated with the Prevention of Apoptosis in Rats». *Planta Medica* 71 (07): 585–91. <https://doi.org/10.1055/s-2005-871261>.

- Yang, Xiliang, Peng Zhang, Jizhou Wu, Siqin Xiong, Nanxiang Jin, e Zebo Huang. 2012. «The neuroprotective and lifespan-extension activities of *Damnacanthus officinarum* extracts in *Caenorhabditis elegans*». *Journal of Ethnopharmacology* 141 (1): 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.025>.
- Yao, Ruyu, Michael Heinrich, e Caroline S. Weckerle. 2018. «The genus *Lycium* as food and medicine: A botanical, ethnobotanical and historical review». *Journal of Ethnopharmacology* 212 (Fevereiro): 50–66. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.010>.
- Yu, Man-Shan, Yuen-Shan Ho, Kwok-Fai So, Wai-Hung Yuen, e Raymond Chuen-Chung Chang. 2006. «Cytoprotective Effects of *Lycium Barbarum* against Reducing Stress on Endoplasmic Reticulum». *International Journal of Molecular Medicine* 17 (6): 1157–61.
- Yu, Man-Shan, Sarana Ka-Yan Leung, Sau-Wan Lai, Chi-Ming Che, Sze-Yong Zee, Kwok-Fai So, Wai-Hung Yuen, e Raymond Chuen-Chung Chang. 2005. «Neuroprotective effects of anti-aging oriental medicine *Lycium barbarum* against  $\beta$ -amyloid peptide neurotoxicity». *Experimental Gerontology* 40 (8): 716–27. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.06.010>.
- Zhu, Guoqi, Xuncui Wang, Yuefa Chen, Shu Yang, Hui Cheng, Ning Wang, e Qinglin Li. 2010. «Puerarin Protects Dopaminergic Neurons against 6-Hydroxydopamine Neurotoxicity via Inhibiting Apoptosis and Upregulating Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in a Rat Model of Parkinson's Disease». *Planta Medica* 76 (16): 1820–26. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249976>.
- Zoghbi, H. Y., e H. T. Orr. 2000. «Glutamine Repeats and Neurodegeneration». *Annual Review of Neuroscience* 23: 217–47. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.217>.



# Capítulo VI

## Anexos



## 1. Anexo I

Tabela 11. Quantificação do RNA utilizando NanoDrop, para tratamento com DNAase.

Sample ID	ng/uL	260/280	260/230	ug/uL	Tratamento com DNAase			
					volume to digest 2ug RNA (uL)	buffer+DNAse (uL)	Vol H <sub>2</sub> O (uL)	Vf mix (uL)
N2_ctrl #1	2555,5	2,01	0,94	2,56	0,8	4	15,22	20
N2_ctrl #2	2313,6	1,96	0,83	2,31	0,9	4	15,14	20
N2_ctrl #3	3120,9	1,92	0,99	3,12	0,6	4	15,36	20
AT3q130_ctrl #1	4141,5	1,36	1,31	4,14	0,5	4	15,52	20
AT3q130_ctrl #2	4211,0	1,15	1,34	4,21	0,5	4	15,53	20
AT3q130_ctrl #3	3499,5	1,92	1,21	3,50	0,6	4	15,43	20
AT3q130_ctrl #4	3909,9	1,72	1,31	3,91	0,5	4	15,49	20
AT3q130_HS #1	2461,0	2,00	0,94	2,46	0,8	4	15,19	20
AT3q130_HS #2	1358,4	1,70	0,52	1,36	1,5	4	14,53	20
AT3q130_HS #3	2918,3	1,97	0,96	2,92	0,7	4	15,31	20
AT3q130_HP #1	3344,1	1,89	1,10	3,34	0,6	4	15,40	20
AT3q130_HP #2	3894,8	1,75	1,28	3,89	0,5	4	15,49	20
AT3q130_HP #3	3391,9	1,90	1,13	3,39	0,6	4	15,41	20
AT3q130_HM #1	659,5	1,72	0,30	0,66	3,0	4	12,97	20
AT3q130_HM #2	3628,5	1,83	1,19	3,63	0,6	4	15,45	20
AT3q130_HM #3	1008,6	1,74	0,40	1,01	2,0	4	14,02	20
AT3q130_HM #4	607,7	2,16	0,28	0,61	3,3	4	12,71	20
CK10_ctrl #1	1850,8	1,85	0,65	1,85	1,1	4	14,92	20
CK10_ctrl #2	967,7	2,11	0,51	0,97	2,1	4	13,93	20
CK10_ctrl #3	1325,1	1,77	0,46	1,33	1,5	4	14,49	20
CK10_HS #1	963,9	1,67	0,38	0,96	2,1	4	13,92	20
CK10_HS #2	4093,6	1,03	1,38	4,09	0,5	4	15,51	20
CK10_HS #3	398,2	2,05	2,86	0,40	5,0	4	10,98	20
CK10_HS #4	2416,9	2,00	0,88	2,42	0,8	4	15,17	20
CK10_HP #1	863,8	1,70	0,34	0,86	2,3	4	13,68	20
CK10_HP #2	757,8	1,71	0,31	0,76	2,6	4	13,36	20
CK10_HP #3	264,4	1,95	0,66	0,26	7,6	4	8,44	20
CK10_HM #1	2061,1	1,91	0,71	2,06	1,0	4	15,03	20
CK10_HM #2	2494,9	1,99	0,94	2,49	0,8	4	15,20	20
CK10_HM #3	1067,6	1,92	0,39	1,07	1,9	4	14,13	20

## 2. Anexo II

Tabela 12. Quantificação do RNA utilizando NanoDrop, para síntese de cDNA.

Sample ID	Síntese de cDNA							
	ng/uL	260/280	260/230	ug/uL	volume to synthesise 1 ug of RNA (uL)	volume of buffer + transcriptase (uL)	Vol H <sub>2</sub> O (uL)	Vf mix (uL)
N2_ctrl1	176,4	1,94	0,68	0,18	5,7	5	9,33	20
N2_ctrl2	157,0	1,84	0,54	0,16	6,4	5	8,63	20
N2_ctrl3	185,5	1,91	0,55	0,19	5,4	5	9,61	20
AT3q130_ctrl1	159,3	1,95	0,71	0,16	6,3	5	8,72	20
AT3q130_ctrl2	152,9	1,86	0,53	0,15	6,5	5	8,46	20
AT3q130_ctrl3	148,3	2,00	0,83	0,15	6,7	5	8,26	20
AT3q130_ctrl4	157,6	1,96	0,96	0,16	6,3	5	8,66	20
AT3q130_HS1	143,7	1,68	0,35	0,14	7,0	5	8,04	20
AT3q130_HS2	142,6	1,88	0,49	0,14	7,0	5	7,99	20
AT3q130_HS3	102,8	1,94	1,29	0,10	9,7	5	5,27	20
AT3q130_HP1	257,1	1,91	0,58	0,26	3,9	5	11,11	20
AT3q130_HP2	213,0	1,80	0,48	0,21	4,7	5	10,30	20
AT3q130_HP3	82,3	1,61	0,29	0,08	12,1	5	2,85	20
AT3q130_HM1	101,2	1,62	0,26	0,10	9,9	5	5,11	20
AT3q130_HM2	96,2	1,64	0,29	0,10	10,4	5	4,60	20
AT3q130_HM3	156,3	1,75	0,39	0,16	6,4	5	8,60	20
CK10_ctrl1	108,2	1,67	0,29	0,11	9,2	5	5,75	20
CK10_ctrl2	118,4	2,19	0,49	0,12	8,4	5	6,55	20
CK10_ctrl3	95,0	1,75	0,25	0,09	10,5	5	4,47	20
CK10_HS1	138,4	1,68	0,33	0,14	7,2	5	7,77	20
CK10_HS2	120,2	1,74	0,40	0,12	8,3	5	6,68	20
CK10_HS3	159,4	1,97	0,68	0,16	6,3	5	8,73	20
CK10_HS4	180,0	1,94	0,42	0,18	5,6	5	9,45	20
CK10_HP1	134,0	1,67	0,32	0,13	7,5	5	7,54	20
CK10_HP2	119,6	1,68	0,29	0,12	8,4	5	6,64	20
CK10_HP3	178,0	1,95	0,41	0,18	5,6	5	9,38	20
CK10_HM1	138,9	1,78	0,38	0,14	7,2	5	7,80	20
CK10_HM2	156,1	1,95	0,68	0,16	6,4	5	8,60	20
CK10_HM3	139,4	1,92	0,33	0,14	7,2	5	7,83	20



### 3. Anexo III

Determinação da eficiência dos primers dos genes antioxidantes *gst-10*, *sod-3*, *pmp-3*, *rpb-2* e o factor de transcrição *skn-1a/c*, utilizados neste estudo.

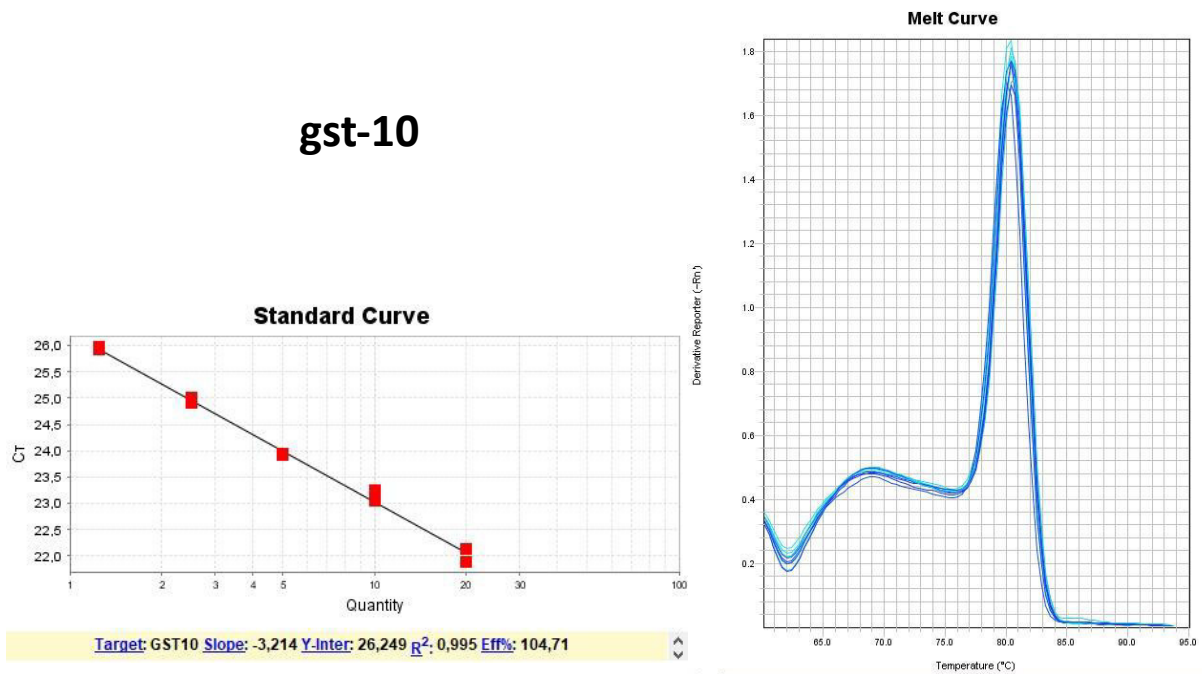


Figura 38. Eficiência do primer *gst-10*.

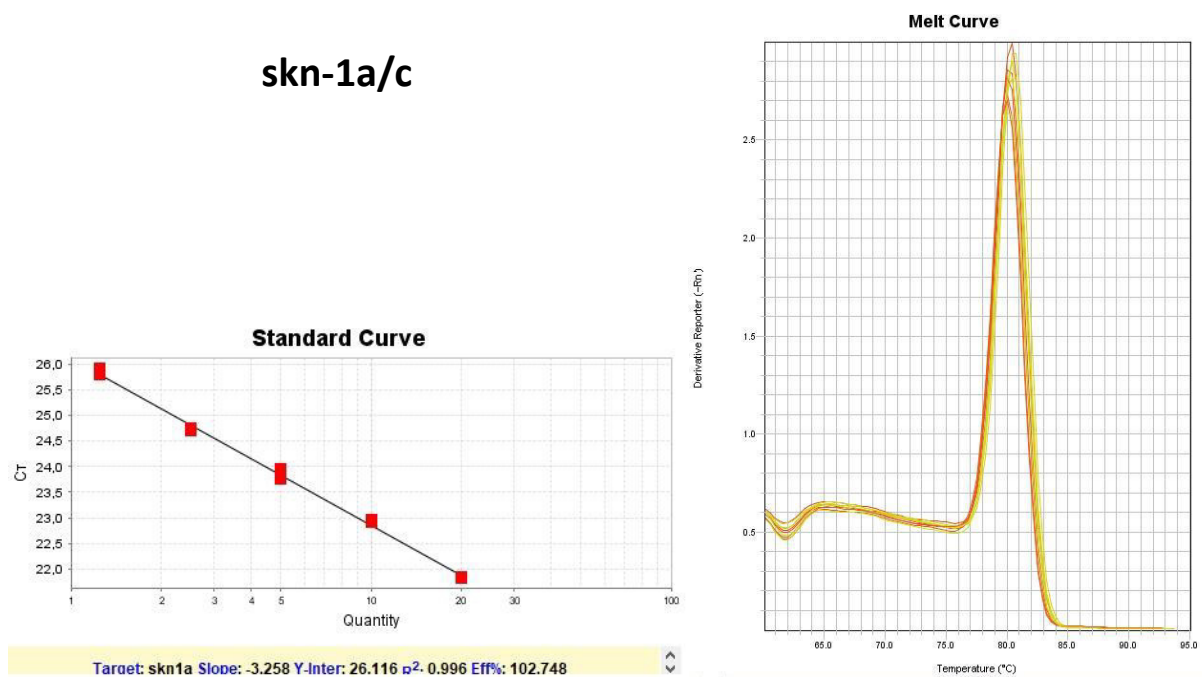


Figura 39. Eficiência do primer *skn-1a/c*.

sod-3

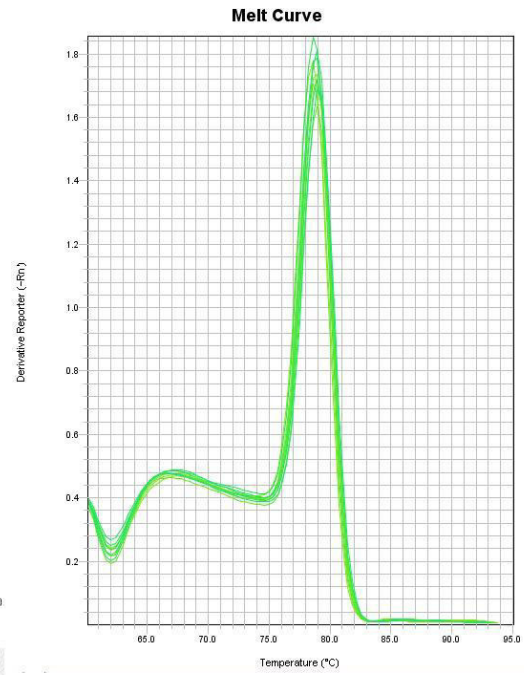
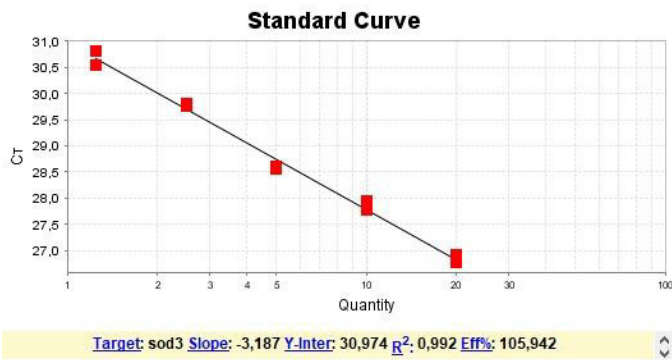


Figura 40. Eficiência do primer sod-3.

pmp-3

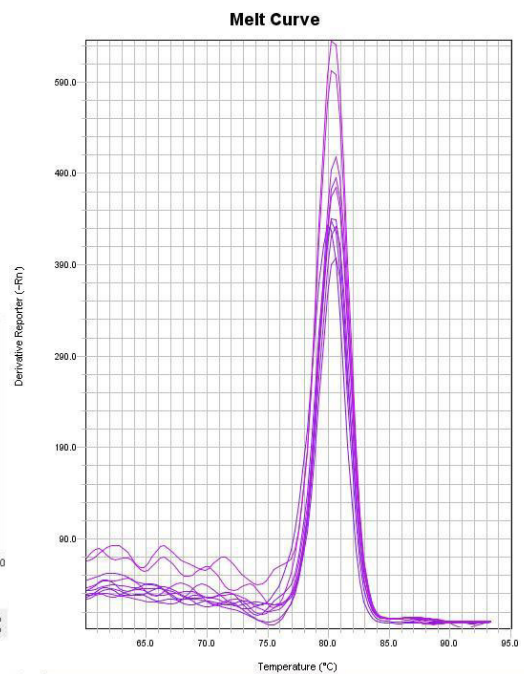
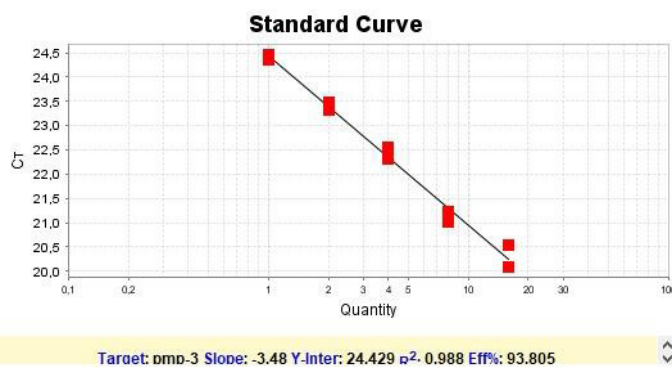


Figura 41. Eficiência do primer pmp-3.

rpb-2

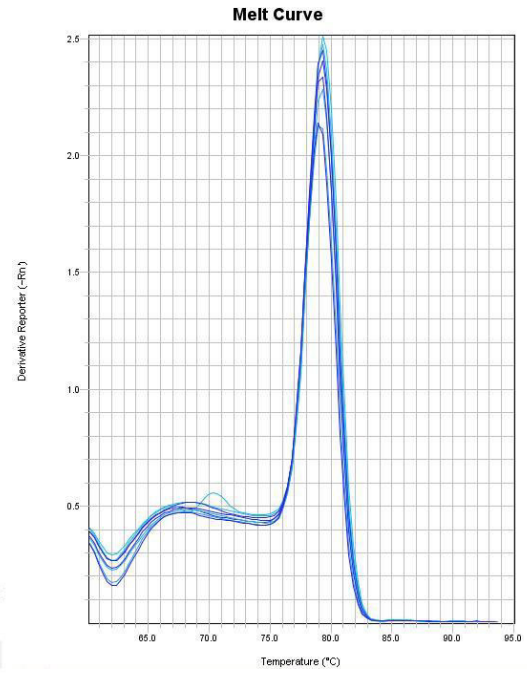
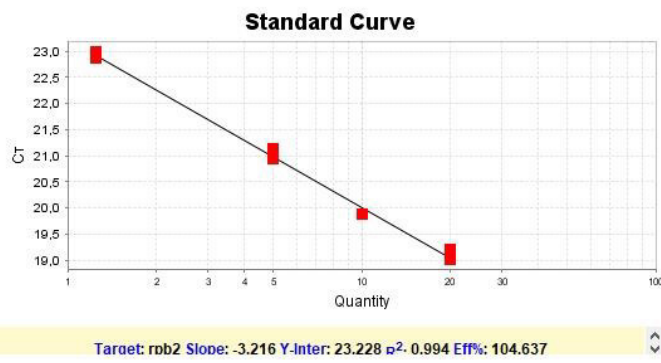


Figura 42. Eficiência do primer rpb-2.