UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

A inibição do esforço reprodutivo e do fator de transcrição SKN-1/Nrf2 diminui a formação de agregados poliglutamínicos no intestino do *Caenorhabditis elegans*

Igor Thadeu Borges Raposo de Paula
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

A inibição do esforço reprodutivo e do fator de transcrição SKN-1/Nrf2 diminui a formação de agregados poliglutamínicos no intestino do *Caenorhabditis elegans*

Igor Thadeu Borges Raposo de Paula

Orientadora

Riva de Paula Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Ouro Preto
2014

P324i Paula, Igor Thadeu Borges Raposo de.
A inibição do esforço reprodutivo e do fator de transcrição SKN-1/Nrf2 diminui a formação de agregados poliglutamínicos no intestino do *Caenorhabditis elegans* [manuscrito] / Igor Thadeu Borges Raposo de Paula. - 2014.
100f.: il., color; grafs.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Riva de Paula Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Homeostase. 2. Microscopia médica. 3. Envelhecimento. 4. Proteínas. I. Oliveira, Riva de Paula. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 612.67:57.087.1

Catalogação: sisbin@sisbin.ufop.br

UFOP

nupeb

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

"A inibição do esforço reprodutivo e do fator de transcrição SKN-1/Nrf2 diminui a formação de agregados poliglutamínicos no intestino do *Caenorhabditis elegans*"

Aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro de 2014, às 15:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno **Igor Thadeu Borges Raposo de Paula**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por .....aprovado..... o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Riva de Paula Oliveira
Presidente (UFOP)

Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira
Examinador (UFOP)

Prof. Dr. Carlos Renato Machado
Examinador (UFMG)

DATA DA DEFESA: **25/02/2014**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

“Os feitos não serão menos corajosos por não serem celebrados”

John Ronald Reuel Tolkien

Agradecimentos

À Professora Dra. Riva de Paula Oliveira, pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos, confiança, paciência e ajuda ao longo deste período de grande aprendizado para mim. Obrigado por tudo.

À professora Dra. Renata Guerra de Sá Cota pela colaboração nos experimentos de análise da atividade proteassômica.

Aos professores Luís Carlos Crocco Afonso, Ieso de Miranda Castro e Silvana de Queiroz Silva, pelo auxílio e concessão do uso de seus laboratórios, equipamentos e reagentes, bem como ao Laboratório de Multiusuários do NUPEB.

Aos professores, funcionários, técnicos e colegas dos demais laboratórios do NUPEB.

À equipe do Laboratório de Genética, Franciny, Larissa, Washington, Patrícia, Daniela, Isabella, Wagney, Renata, e Álvaro pela ótima convivência, auxílio e momentos de insanidade vividos.

Aos alunos de iniciação científica Isabella Santos e Álvaro Torres, pelo acompanhamento e auxílio no desenvolvimento desta dissertação.

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela oportunidade, apoio e incentivo.

À CAPES e ao CNPq pelo incentivo ao desenvolvimento da ciência no país.

À cidade de Ouro Preto e aos amigos que aqui fiz que, com seu companheirismo e parceria, contribuíram para essa inesquecível jornada.

Aos amigos de casa, Milico e Cabeludo, pela amizade, loucura e filosofanças noturnas.

À galera do RPG, por manter a imaginação viva. Agora sim, Dungeon Master!

À Gabi, por estar ao meu lado em todos os momentos. Te amo!

À minha família e amigos, que sempre me apoiaram e incentivaram a seguir meus sonhos e ideais. Mais uma etapa cumprida!

Sumário

Lista de Figuras ix

Lista de Quadros e Tabelas xi

Lista de Abreviaturas xii

Resumo xiii

Abstract xiv

1.Introdução 1

1.1. Síntese e degradação proteica 2

1.1.1. Os principais sistemas de degradação proteica 2

1.1.1.1. O sistema ubiquitina-proteassoma 2

1.1.1.2. O sistema lisossomal-autofágico 3

1.2. Degradação proteica e envelhecimento 7

1.3. Envelhecimento e desordens poliglutamínicas 8

1.4. O nematodo *Caenorhabditis elegans* 10

1.4.1. O *C. elegans* como modelo para pesquisas em desordens poliglutamínicas e longevidade 13

1.5. O fator de transcrição SKN-1 17

1.5.1. Envolvimento de SKN-1 na degradação proteica 18

1.6.Justificativa e hipótese de trabalho 21

2.Objetivos 24

2.1. Objetivo Geral 25

2.2. Objetivos Específicos 25

3. Materiais e Métodos 26

3.1. Linhagens utilizadas 27

3.2. Crescimento e manutenção do *C. elegans* 29

3.3. Sincronização cronológica dos animais 29

3.4. RNA de interferência 30

3.5. Avaliação do padrão de formação de agregados poliglutamínicos 31

3.5.1. Análise da área dos agregados 31

3.5.2. Padrão de agregação poliglutamínico após o tratamento com FUdR.....31

3.6. Análise da atividade do proteassoma 32

3.6.1. Preparo do extrato bruto de proteínas 32

3.6.2. Medida da atividade proteolítica exógena 33

3.7. Análise da expressão gênica.....34

3.7.1. Extração de RNA 34

3.7.2. Quantificação do RNA 35

3.7.3. Verificação da integridade do RNA em gel de agarose.....36

3.7.4. Síntese do DNA complementar (cDNA) 36

3.7.5. Desenho dos iniciadores.....37

3.7.6. PCR quantitativa em tempo real (qPCR) 37

3.7.7. Curvas de calibração e padronização da qPCR 39

3.7.8. Escolha do gene de referência endógena.....39

3.7.9. Análise dos níveis de expressão dos genes por meio do método do C_T comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....39

3.8.1. Padrão de agregação poliglutamínico em condições de inibição de DAF-16 e SKN-1. 40

3.9. Análise estatística.....40

4. Resultados.....41

4.1. Análise do efeito do esforço reprodutivo na formação de agregados poliglutamínicos.....42

4.1.1. Análise da área total dos agregados poliglutamínicos 42

4.1.2. Análise do padrão de agregação PoliQ após o tratamento com FUdR.....42

4.2. Análise do papel de SKN-1 sobre a ativação dos sistemas proteolíticos 47

4.2.1 Efeito do *knockdown* de SKN-1 sobre a expressão de genes de degradação proteica 47

4.2.1.1. Escolha do gene de referência endógena.....47

4.2.1.2. Análise da expressão dos genes da subunidade catalítica/regulatória 20S do proteassoma 48

4.2.1.3. Análise da expressão dos genes da subidade H^+-ATPase vacuolar 51

4.2.1.4. Análise da expressão de outros genes de degradação proteica regulados por SKN-1 51

4.2.2. Efeito do *knockdown* de SKN-1 sobre a atividade proteolítica dependente de ATP-ubiquitina e do proteassoma.....54

4.3. Análise do papel compensatório de outros mecanismos na degradação proteica nos animais *vha-6::Q82*.....57

4.3.1. Efeito da inibição do proteassoma e do lisossoma no padrão de formação de agregados poliglutamínicos.....59

4.3.2. Análise dos efeitos da inibição simultânea de *skn-1* e *daf-16* no padrão de formação de agregados poliglutamínicos.....59

5. Discussão 63

5.1. Correlação entre envelhecimento, esforço reprodutivo e agregação poliglutamínica 64

5.2. O papel de SKN-1 sobre a ativação dos sistemas proteolíticos.....66

5.2.1. Efeito do *knockdown* de *skn*-1 sobre a expressão de genes de degradação proteica.....66

5.2.2. Efeito do *knockdown* de SKN-1 sobre a atividade proteolítica dependente de ATP-ubiquitina e do proteassoma.....67

5.3. Análise do padrão de formação de agregados poliglutamínicos 69

5.3.1. O papel dos sistemas lisossomal-autofágico e ubiquitina-proteassoma na formação de agregados PoliQ em células intestinais 70

5.3.2. Efeitos da inibição simultânea de *skn-1* e *daf-16* no padrão de formação de agregados poliglutamínicos.....71

6. Conclusões.....73

7. Referências Bibliográficas 75

Lista de Figuras

Figura 1: O Sistema Ubiquitina-Proteassoma.....18
Figura 2: O Sistema Lisossomal-autofágico.....20

Figura 3: Patogênese de desordens neurodegenerativas 25

Figura 4: Ciclo de vida do *C. elegans.....26*

Figura 5: Vias de sinalização envolvidas no aumento da longevidade promovido por retardo na agregação PoliQ no *C. elegans.....29*

Figura 6: Diagrama de Venn demonstrando a interseção entre genes ativados por SKN-1 e envolvidos em processos de degradação proteica.....36
Figura 7: Efeito do RNAi para *daf-16 e skn-1* no número médio de agregados proteicos nos animais *vha-6p::Q44::YFP (A); vha-6p::Q64::YFP (B); vha-6p::Q82::YFP (C)* nas fases L4, adulto de quatro e oito dias.....37

Figura 8: Efeito do RNAi para *skn-1* e *daf-16* na medida da área, em micrômetros, dos agregados proteicos em animais *vha-6p::Q82::YFP* adultos de 8 dias.....57

Figura 9: Padrão de expressão PoliQ::YFP dos transgênicos *vha-6p::Q44::YFP*, *vha-6p::Q64::YFP* e *vha-6p::Q82::YFP* tratados ou não com FUdR.....58

Figura 10: Efeito do tratamento com FUdR no número médio de agregados proteicos nos animais *vha-6p::44::YFP* (A)*; vha-6p::64::YFP* (B) e *vha-6p::82::YFP* (C) nas idades adulto de 1, 4 e 8 dias.....60
Figura 11: Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos níveis de expressão dos seis genes de degradação proteica da subunidade catalítica/regulatória do proteassoma 20S regulados por SKN-1 nos animais tipo selvagem e mutante *daf-16*(*mu86*), tratados ou não com RNAi para *skn-1*.....64
Figura 12: Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos níveis de expressão de quatro genes de degradação proteica da subunidade H^+-ATPase vacuolar regulados por SKN-1 nos

animais tipo selvagem e mutante *daf-16*(*mu86*), tratados ou não com RNAi para *skn-1*.....66

Figura 13: Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos níveis de expressão de quatro genes envolvidos em outras vias de degradação proteica regulados por SKN-1 nos animais tipo selvagem e mutante *daf-16*(*mu86*), tratados ou não com RNAi para *skn-1..*67

Figura 14: Taxas de inibição e ativação proteassômica obtidas durante a padronização dos ensaios.....70

Figura 15: Efeito do RNAi para *skn-1* na atividade proteolítica exógena em animais N2 e mutantes *daf-16(mu86)*.....71

Figura16: Efeito do RNAi para *skn-1* na atividade proteolítica exógena em animais N2 e *vha-6p::Q82::YFP*. 73

Figura 17: Efeito dos inibidores do proteassoma (MG-132) e lisossoma (Cloroquina) no padrão de formação de agregados PoliQ em animais *vha::6p::Q82::YFP* adultos de 8 dias tratados com RNAi para *skn-1*.....74

Figura 18: Efeito da inibição simultânea de *skn-1* e *daf-16* no número médio de agregados proteicos nos animais *vha-6p::44::YFP* (A)*; vha-6p::64::YFP* (B) e *vha-6p::82::YFP* (C) nas idades adulto de 1, 4 e 8 dias.....76

Lista de Quadros e Tabelas

Tabela 1: Desordens Neurodegenerativas.....23

Tabela 2: Linhagens de *C. elegans* utilizadas neste trabalho.....42

Quadro 1: Iniciadores utilizados na reação de qPCR, obtidos através do software Primer3.....52

Tabela 3: Valores de C_T para os candidatos à referência endógena 63

Lista de Abreviaturas

ATP – Trifosfato de adenosina

BCA – Ácido Bicinconínico

bZip – Zíper de leucina

CGC – *Caenorhabditis* Genetics Center

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DTT – Ditiotreitol

FoxO – Forkhead Box

FudR – 5-fluoro-2'-deoxiuridina

IIS – Via de sinalização da insulina

MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

Nrf2 – Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PoliQ – Poliglutamina

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em transcriptase reversa

SKN-1 - SKiNhead

UPS – Sistema ubiquitina-proteassoma

YFP – Proteína amarela fluorescente

Resumo

SKN-1, fator de transcrição de *C. elegans,* ortólogo a Nrf1/2/3 em mamíferos, promove resistência contra o estresse oxidativo e longevidade ao ativar enzimas de detoxificação de Fase II e proteínas antioxidantes. Além disso, SKN-1 também contribui para a homeostase proteica, ativando genes relacionados à degradação ou enovelamento de proteínas em resposta à inibição de fatores de iniciação e elongação da tradução de proteínas. Análises conduzidas em animais transgênicos que expressam repetições anormais de poliglutamina (PoliQ), fundidas a uma proteína fluorescente amarela (YFP), demonstraram que o *knockdown* de *skn-1* aumenta a formação de agregados PoliQ em células musculares do *C. elegans*, enquanto diminui a agregação em células intestinais. Há também um aumento progressivo de agregados PoliQ de acordo com a idade do animal. No entanto, o número de agregados nas células intestinais diminui em animais adultos de 8 dias, idade que caracteriza o fim do período reprodutivo do animal. Nesse trabalho, nós buscamos caracterizar a correlação entre o esforço reprodutivo e de SKN-1 com a homeostase de proteínas. Para investigar as possíveis interações do esforço reprodutivo no padrão de agregação de proteínas, animais com expressão PoliQ direcionada para o intestino foram tratados com 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FUdR), uma droga que induz esterilidade parental. Também analisamos a expressão de genes relacionados à degradação proteica e a atividade proteassômica em animais knockdown (RNAi) contra *skn-1*. Nós observamos que todas as linhagens transgênicas tratadas com FUdR mostraram uma redução significativa no número de agregados PoliQ em todas as idades analisadas. A análise dos dados de expressão gênica de animais no estádio larval L4 demonstra que genes que codificam para subunidades proteassômicas e para a fumarilacetoacetase tiveram sua expressão significativamente reduzida em animais *skn-1(RNAi).* Além disso, a atividade proteassômica da quimiotripsina, medida *in vitro* através da utilização de um peptídeo fluorescente de animais *skn-1(RNAi)* também se mostrou reduzida no estádio L4. Além disso, nós investigamos os efeitos da inibição de duas das principas vias de degradação proteica – proteassomal e lisossomal - na formação de agregados PoliQ em animais que expressam 82 repetições poliglutamínicas nas células intestinais, adultos de 8 dias, tratados com *skn-1(RNAi).* Nós verificamos que tanto a inibição proteassômica por MG-132 quanto a inibição lisossômica por cloroquina fez com que o número de agregados PoliQ aumentasse em relação aos grupos não tratados. O *knockdown* simultâneo de *skn-1* e *daf-16*, uma outra via que participa na remoção de agregados proteicos aumentou o número de agregados no intestino dos animais. Estes dados sugerem que a inibição da reprodução e de *skn-1* é capaz de diminuir a taxa de formação de agregados proteicos no intestino do *C. elegans*.

Abstract

SKN-1, the *C. elegans* ortholog of mammalian Nrf1/2/3, promotes oxidative stress resistance and longevity by activating Phase II detoxification enzymes and antioxidant proteins. Besides that, SKN-1 also contributes to protein homeostasis, activating genes related to protein folding and degradation in response to inhibition of protein translation and elongation initiation factors. Analyses performed on transgenic animals that express abnormal repeats of polyglutamine (PolyQ), fused to a Yellow Fluorescent Protein (YFP), showed that the knockdown of *skn-1* increases polyQ aggregates formation in the *C. elegans* muscle cells, while decreasing the aggregation in intestinal cells. There is also a progressive increase of polyQ aggregates according to the age of the animal. However, the number of aggregates decrease in the intestine of 8 day-old adult animals, an age which the animal reaches the end of its reproductive period. In this work, decided to further investigate the correlation between the reproductive effort and SKN-1 with protein homeostasis. To investigate possible interactions between reproduction and protein degradation, animals with polyglutamine expression in the intestine were treated with 5-fluoro-2'-deoxyuridin (FUdR), a drug that induces parental sterility. We also assessed the expression of genes related to protein degradation and the proteasomal activity in *skn-1* knockdown animals. We observed that all transgenic lines treated with FUdR showed a significant reduction in the number of PolyQ aggregates in all analyzed ages. The analysis of gene expression data of animals in the L4 larval stage shows that genes related to proteasomal subunits and fumarilacetoacetasis had their expressions significantly reduced in *skn-1(RNAi)* animals. Besides that, the proteasomal activity, measured *in vitro*, was also decreased in *skn-1(RNAi)* animals in the L4 stage. We also investigated the effects of the inhibition of two major pathways of protein degradation – proteasome and lysosome – in the aggregation pattern of 8 day-old animals that express 82 polyQ repeats in the intestine treated with *skn-1(RNAi)*. We observed that both the proteasome and lysosome inhibition increased the number of polyQ aggregates, when compared to control animals. These data suggest that the inhibition of both the reproduction and *skn-1* can decrease the polyQ aggregation ratio in the intestine of *C. elegans.*

1.Introdução

1.1. Síntese e degradação proteica

No interior das células, as proteínas estão sob constante exposição a moléculas de alta reatividade (como espécies reativas de oxigênio) e a condições que aceleram sua desnaturação. Essas moléculas oxidam as proteínas, causando danos à sua estrutura, levando à necessidade de essas proteínas danificadas serem degradadas, e novas proteínas serem sintetizadas. Em consequência disso, os sistemas proteolíticos estão em constante atividade, degradando proteínas que sofreram danos químicos ou desnaturação após sua síntese (Mortimore *et al.*, 1989; Goldberg, 2003), em um processo conhecido como *turnover* proteico. Este processo, entre outras funções, ajuda a reduzir o tempo que uma determinada proteína fica exposta ao ambiente celular prejudicial e consequentemente, a probabilidade de ser danificada ou alterada. Além disso, o balanço entre síntese e degradação protéica permite que a célula modifique rapidamente os níveis de proteínas de forma a se adaptar a mudanças no ambiente extracelular. A degradação protéica é também essencial para a sobrevivência da célula sob condições de intenso dano celular. A taxa de síntese e degradação de proteínas em diferentes células é diferente e pode ser alterada em resposta a diferentes estímulos e condições. De fato, a ativação do sistema proteolítico intracelular ocorre frequentemente em resposta ao estresse celular. Degradação protéica também é essencial durante os principais processos de remodelamento celular tais como embriogênese e morfogênese e como um mecanismo de defesa contra agentes prejudiciais e patógenos (Klionsky *et al.,* 2005). As vias do sistema ubiquitina-proteassoma e do sistema lisossomal/autofágico compreendem as duas principais rotas para a remoção de proteínas e organelas nas células eucarióticas.

1.1.1. Os principais sistemas de degradação proteica

1.1.1.1. O sistema ubiquitina-proteassoma

O proteassoma é uma estrutura multiproteica em forma de barril, responsável principalmente pela remoção de proteínas nucleares e citosólicas de vida curta (Ciechanover, 2005). O proteassoma mais bem caracterizado, o 26S, compreende um complexo enzimático, formado por um núcleo catalítico 20S flanqueado por duas

subunidades 19S regulatórias, e é altamente conservado entre os eucariotos. Esta via proteolítica ocorre inicialmente através da marcação da proteína-alvo por um complexo enzimático –E1, E2 e E3 -, que se liga a uma ou mais moléculas de ubiquitina, em uma cascata de conjugação ubiquitina-substrato dependente de ATP (Ciechanover, 2005a). A primeira etapa dessa cascata envolve a ativação da ubiquitina, realizada pela enzima ativadora da ubiquitina (E1) com gasto de ATP. A enzima E1 transfere a ubiquitina a um resíduo de lisina de uma enzima carreadora de ubiquitina (E2). Em seguida, a E2 e o susbstrato alvo interagem com a enzima conjugadora de ubiquitina E3 completando a transferência da ubiquitina da E2 para o grupo amino de uma lisina do substrato (Figura 1) (Martinez-Vicente *et al*., 2005). O complexo formado pela ação destas enzimas é então reconhecido por diferentes componentes da subunidade 19S, que induzem modificações conformacionais na estrutura do proteassoma e fornecem a energia que direciona o substrato para o núcleo catalítico/regulatório 20S, para que o mesmo possa ser degradado em peptídeos menores (Pickart & Cohen, 2004; Groll & Huber, 2003).

O sistema ubiquitina-proteassoma contribui para a manutenção da homeostase celular e controle de qualidade proteica, além disso, o seu papel como regulador de processos celulares essenciais, tais como a progressão do ciclo celular (Verma *et al.*, 1997; Kaiser *et al.,* 1999; Bech-Ostchir *et al.*, 2001), regulação transcricional (Bounpheng *et al.*, 1999; Karin *et al.,*2000), apoptose (Buschmann *et al.,* 2000) e sinalização, fazem do funcionamento adequado deste sistema um requerimento essencial para a sobrevivência celular. (Wolf & Hilt, 2004).

1.1.1.2. O sistema lisossomal-autofágico

O sistema lisossomal autofágico é constituído pelos lisossomas, organelas membranosas que contém hidrolases capazes de degradar macromoléculas. A autofagia compreende processos de degradação que ocorrem no interior de vacúolos ou lisossomas, e existem três tipos de autofagia mais comuns e bem caracterizados, que são a macroautofagia, a microautofagia e a autofagia mediada por chaperoninas. A diferença

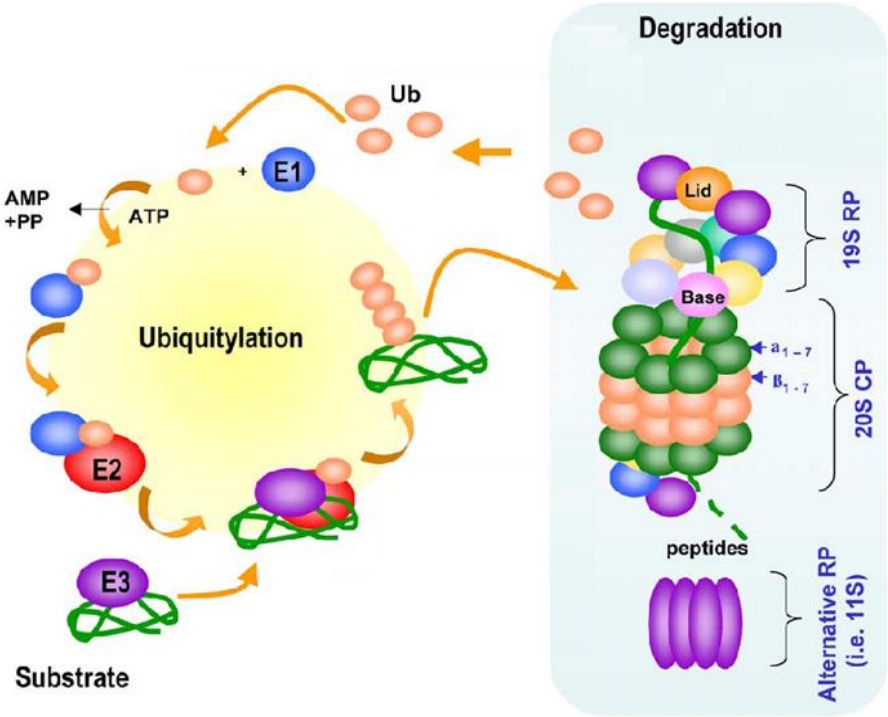


Figura 1: O Sistema Ubiquitina-Proteassoma (Martinez *et al.,* 2005)

entre essas vias consiste na forma de entrega do substrato ao lúmen lisossomal, no tipo de substrato reconhecido e sua forma de atividade e regulação (Martinez-Vicente *et al., 2005).*A macroautofagia é capaz de degradar proteínas solúveis de vida longa e organelas em condições adversas, principalmente estresse nutricional. Ela consiste na internalização do substrato por autofagossomos, que em seguida se fundem ao lisossomo. Na microautofagia, ocorre a participação direta do lisossomo, que degrada principalmente proteínas citossólicas e organelas sem a necessidade de um vacúolo autofágico intermediário. Ela consiste na assimilação do substrato pela membrana lisossomal, que se invagina e o envolve em vesículas intralisossomais. Uma vez que o substrato é internalizado, ocorre sua degradação.

A terceira forma de degradação lisossomal, mais comum em células de mamíferos, consiste na degradação de proteínas citossólicas solúveis por meio da autofagia mediada por chaperoninas. Nela, os substratos são translocados pela membrana do lisossomo sem a necessidade de formação de vesículas intermediárias ou deformação na membrana do lisossomo. Além disso, todos os substratos da autofagia mediada por chaperoninas contêm uma sequência bioquimicamente relacionada com o pentapeptídeo KFERQ, responsável pelo reconhecimento do substrato pelo lisossomo. Esse pentapeptídeo é reconhecido no citossol por chaperoninas e suas co-chaperoninas. O complexo chaperonina-substrato é encaminhado para a membrana lisossomal, onde se liga a um receptor de proteína. A internalização do substrato ocorre seguida por uma rápida degradação no interior do lisossomo (Martinez-Vicente *et al*., 2005) (Figura 2). O controle da degradação lisossomal é mediado por metabolitos (aminoácidos) e hormônios (insulina) (Hamel *et al*., 2004).

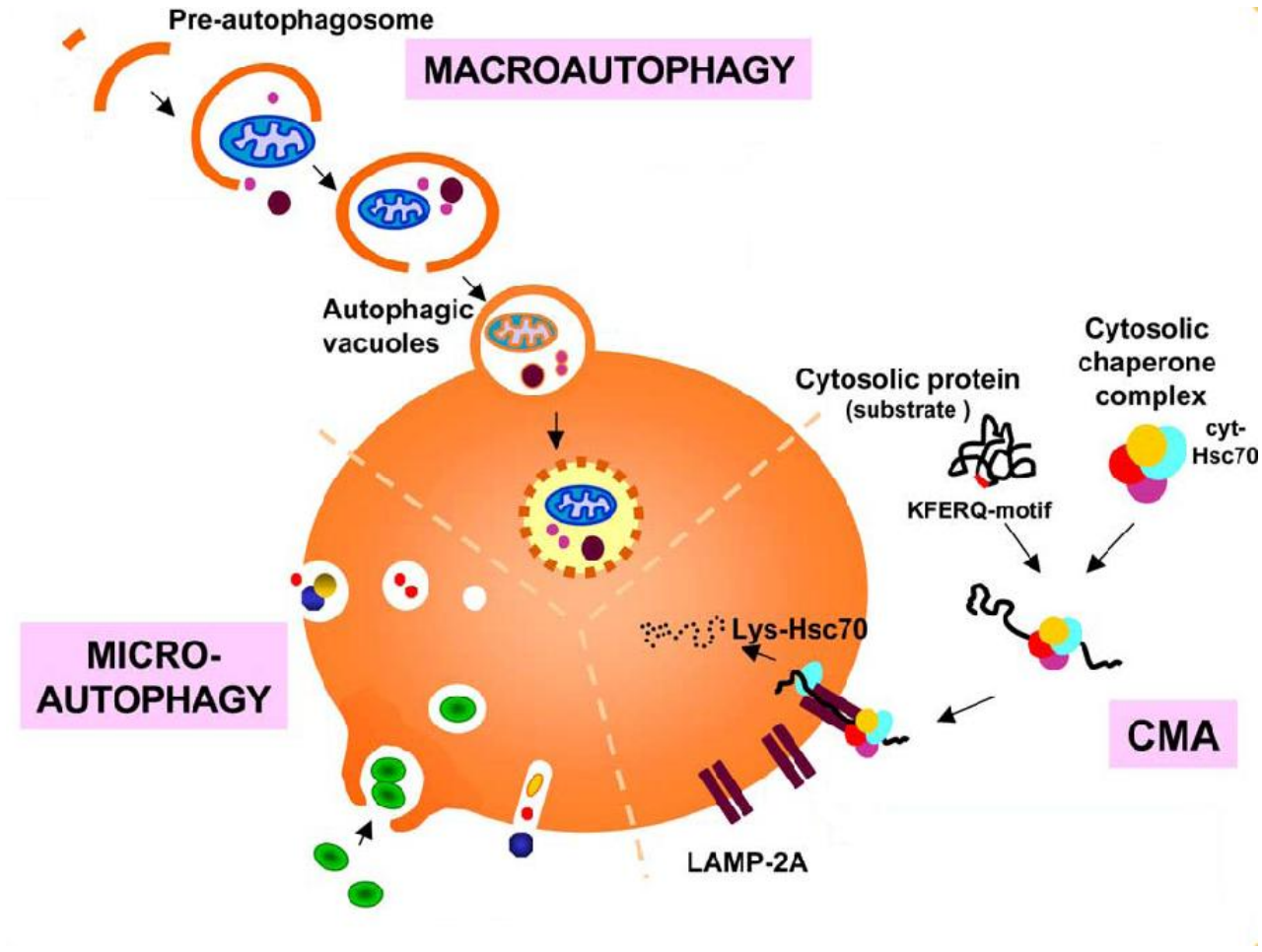


Figura 2: O Sistema Lisossomal-autofágico (Martinez *et al.,* 2005)

1.2. Degradação proteica e envelhecimento

A eficiência dos sistemas de controle de qualidade proteica declinam com o envelhecimento devido às alterações na estrutura das proteínas que ocorrem por modificações oxidativas, mutações e incorporações incorretas de aminoácidos durante a tradução (Haigis & Yankner, 2010). O crosstalk entre vias de controle de qualidade entre diferentes compartimentos celulares não é bem entendido, embora o excesso de proteínas mal conformadas em um compartimento possa afetar globalmente a proteostase e contribuir para o envelhecimento e patogênese de desordens neurodegenerativas (Buchberger *et al*., 2010).

Proteínas com estruturas incomuns ou desnaturadas, quando em grande número no citoplasma, podem exceder a capacidade de degradação da célula, formando agregados proteicos antes que possam sofrer a ação do proteassoma ou do lisossoma. (Sherman & Goldberg, 2001; Klemes *et al*., 1981; Prouty & Goldberg, 1972). Isso ocorre quando os sistemas proteolíticos e chaperoninas moleculares, que normalmente previnem a agregação, como HSP70/40 (Frydman, 2001); (Hartl & Hayer-Hartl, 2002) não conseguem manter a homeostase proteica. Uma característica de proteínas desnaturadas é a tendência a formar agregados proteicos insolúveis devido à tendência que os domínios hidrofóbicos têm de se associarem entre si.

No entanto, o proteassoma é responsável pela degradação de fragmentos menores de agregados proteicos (Venkatraman *et al*., 2004), o que sugere que outro sistema de degradação esteja envolvido na remoção de proteínas maiores. Já foi demonstrado que indutores da autofagia, como a rapamicina, promovem uma atenuação no acúmulo de proteínas com expansões anormais de poliglutaminas em células de mamíferos (Wulsschleger *et al.*, 2006; Berger *et al*., 2006). O *knockdown* de genes que regulam processos autofágicos fez com que a taxa de acumulação dessas proteínas aumentasse em modelos de cultura de células (Iwata *et al.*, 2005; Shibata *et al*., 2006)

A identificação dos mecanismos moleculares do envelhecimento tem sido fundamental para a compreensão de muitos dos processos patológicos envolvidos

nestas doenças. Dentro deste aspecto, o enovelamento incorreto de proteínas, a formação de agregados protéicos e inclusões corpusculares são marcos de uma gama de desordens neurodegenerativas incluindo Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrópica, doenças priônicas e poliglutamínicas.

1.3. Envelhecimento e desordens poliglutamínicas

O declínio na função do proteassoma incorre em um acúmulo precoce de proteínas ubiquitinadas, Isso leva a um declínio na longevidade e aparecimento mais rápido de sinais neurodegenerativos, sugerindo que a manutenção da atividade do proteassoma com o avanço da idade pode suprimir a progressão de desordens neurodegenerativas (Tonoki *et al.*, 2009).

As doenças poliglutamínicas (PoliQ) são uma família de desordens neurodegenerativas que apresentam um progresso lento ainda sem perspectiva de cura que inclui a doença de Huntington (HD), a atrofia muscular bulbo espinhal, várias ataxias espino-cerebrais entre outras (Williams & Paulson, 2008). Em comum, todas estas doenças possuem uma repetição do trinucleotídeo CAG nos respectivos genes produzindo uma proteína contendo um segmento de glutamina (Q) (Jana & Nukina, 2003) (Tabela 1).

Proteínas com expansões PoliQ são propensas a se agregarem e quanto maior a expansão, mais acentuada é a agregação. A severidade da doença também está diretamente relacionada com o tamanho da expansão refletindo tanto na idade de surgimento dos sintomas da doença quanto na extensão da patologia no sistema nervoso central. Ou seja, as manifestações da doença nas pessoas com proteínas com repetições PoliQ maiores iniciam mais cedo e desenvolvem degenerações mais severas. (Williams & Paulson, 2008).

Tabela 1: Desordens Neurodegenerativas (adaptado de Jana & Nukina, 2003)

Doença	Proteína	Peso Molecular (KDa)	Expansão Poliglutamínica	
			Tipo Selvagem	Mutante
HD	Huntintina	348	6-35	36-121
SBMA	Receptor Andrógeno	99	9-36	38-62
DRPLA	Atropina-1	124	3-36	49-88
SCA1	Ataxina-1	87	6-44	40-82
SCA2	Ataxina-2	90	14-32	33-37
SCA3	Ataxina-3	42	12-40	55-86
SCA6	Canal de Ca^+ P/Q	160-250	4-18	21-30
SCA7	Ataxina 7	95	7-17	38-200
SCA17	Proteína TATA	41	29-42	47-55

Várias, mas não todas, doenças poli-glutamínicas são iniciadas por uma clivagem proteolítica que gera um fragmento tóxico (Figura 4). A porção expandida de PoliQ permite a sua transição em uma conformação distinta que pode causar toxicidade de várias formas. O peptídeo pode ser tóxico na forma de monômero ou pode se autoassociar formando oligômeros. Ainda, os oligômeros podem formar agregados maiores e finalmente se depositarem como inclusões macromoleculares intracelulares. O principal efeito tóxico das proteínas com enovelamento anormal pode incluir alterações na transcrição, metabolismo ou comprometimento das vias de proteassoma ou resposta ao estresse. Muitas das doenças poliglutamínicas parecem ter início por uma clivagem proteolítica que gera um fragmento tóxico. Vias moleculares que regulam a homeostase proteica e longevidade também estão envolvidas na progressão dos fenótipos das doenças poliglutamínicas (Shao & Diamond, 2007).

1.4. O nematodo *Caenorhabditis elegans*

Um organismo que ganhou bastante destaque nas últimas décadas em pesquisas relacionadas ao envelhecimento e resistência ao estresse oxidativo é o *Caenorhabditis elegans*. O *C. elegans* é um animal de vida livre, pertencente ao filo Nematoda, que chega a medir cerca de 1mm de comprimento quando atinge a idade adulta (figura 5). Na natureza, o *C. elegans* é encontrado predominantemente na forma hermafrodita (>99%), com baixa incidência de machos. Os hermafroditas se autofecundam e a população pode ser mantida efetivamente isogênica já que um hermafrodita individual produz uma progênie de aproximadamente 300 clones durante a primeira semana de vida adulta.

Diversos estudos utilizam esse animal como modelo, graças ao fato dos genes do *C. elegans* apresentarem cerca de 70% de ortologia com os genes humanos, além

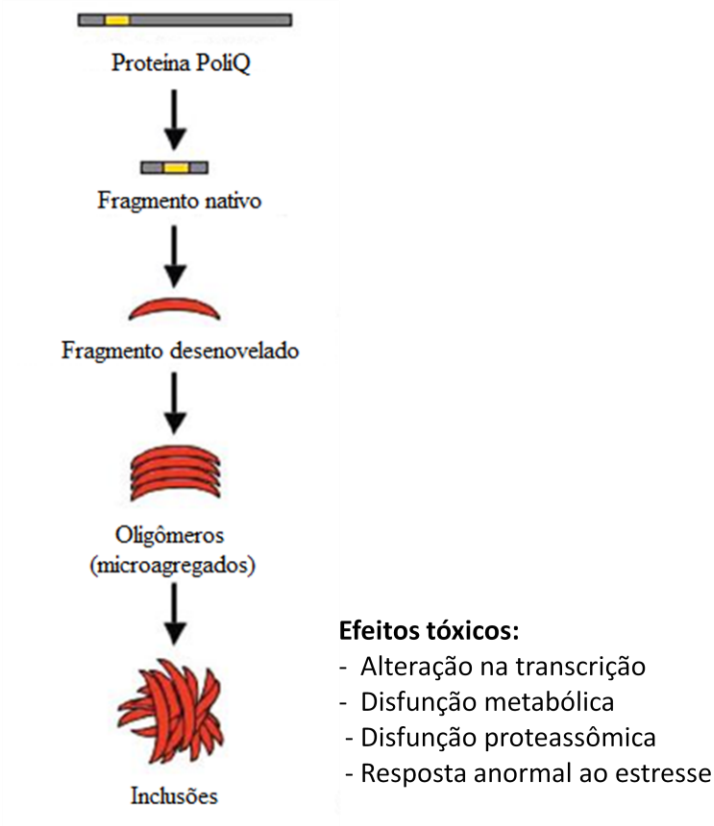


Figura 3: Patogênese de desordens neurodegenerativas (Adaptado de Shao & Diamond, 2007)

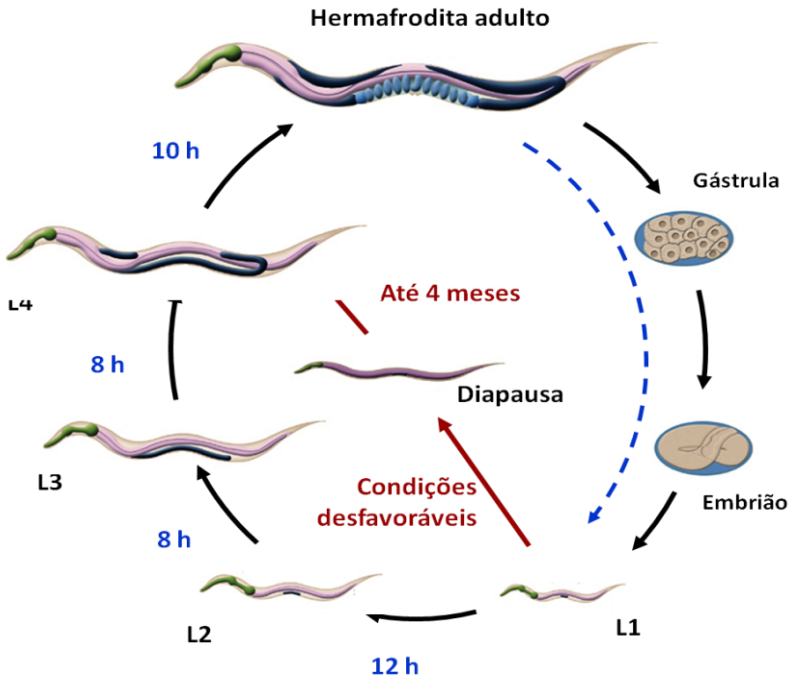


FIGURA 4: Ciclo de vida do *C. elegans* (adaptada do WormAtlas - http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html)

de o nematodo possuir uma forte conservação de diversos princípios moleculares e celulares com mamíferos (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Kaletta & Hengartner, 2006). Diferentemente de análises realizadas utilizando culturas de células e células isoladas, o *C. elegans* permite uma análise em nível de um organismo completo, com tecidos e órgãos (Kaletta & Hengartner, 2006). O ciclo de vida do *C. elegans* é de 2 dias, e o tempo de vida de animais selvagens é de aproximadamente 21 dias a uma temperatura de 20ºC. O animal passa por 4 estádios larvais até atingir a idade adulta (L1, L2, L3 e L4), podendo entrar em um estágio de latência, conhecido como diapausa, caso as condições sejam desfavoráveis ao seu desenvolvimento. Ele pode permanecer nesse estado por cerca de 4 meses, e retoma o desenvolvimento normal quando as condições ideais forem reestabelecidas. Este ciclo e tempo de vida relativamente curtos possibilitam a rápida obtenção de resultados em ensaios biológicos, o que o torna uma ferramenta importante para pesquisas relacionadas à longevidade.

O *C. elegans* também é facilmente cultivável em laboratório, podendo crescer tanto em meio sólido como líquido, e o fato de ser transparente permite a análise de marcadores fluorescentes com o animal vivo. Isto possibilitou a descrição de suas 959 células somáticas. Seu curto tempo de vida permite a obtenção de resultados de uma maneira relativamente rápida, o que favorece a sua utilização em pesquisas relacionadas à longevidade e resistência ao estresse oxidativo.

1.4.1. O *C. elegans* como modelo para pesquisas em desordens poliglutamínicas e longevidade

O *C. elegans* tem também se mostrado um vantajoso modelo para o estudo de doenças polilutamínicas. Já foram construídas linhagens transgênicas de *C. elegans* expressando proteínas de fusão com diferentes expansões poliglutamínicas com proteína amarelo fluorescente (YFP). Esses transgênicos são suficientes para reconstruir as características patológicas das doenças PoliQ, incluindo o surgimento dos agregados proteicos, perda de função e morte celular (Morley *et al.*, 2002). Já foi

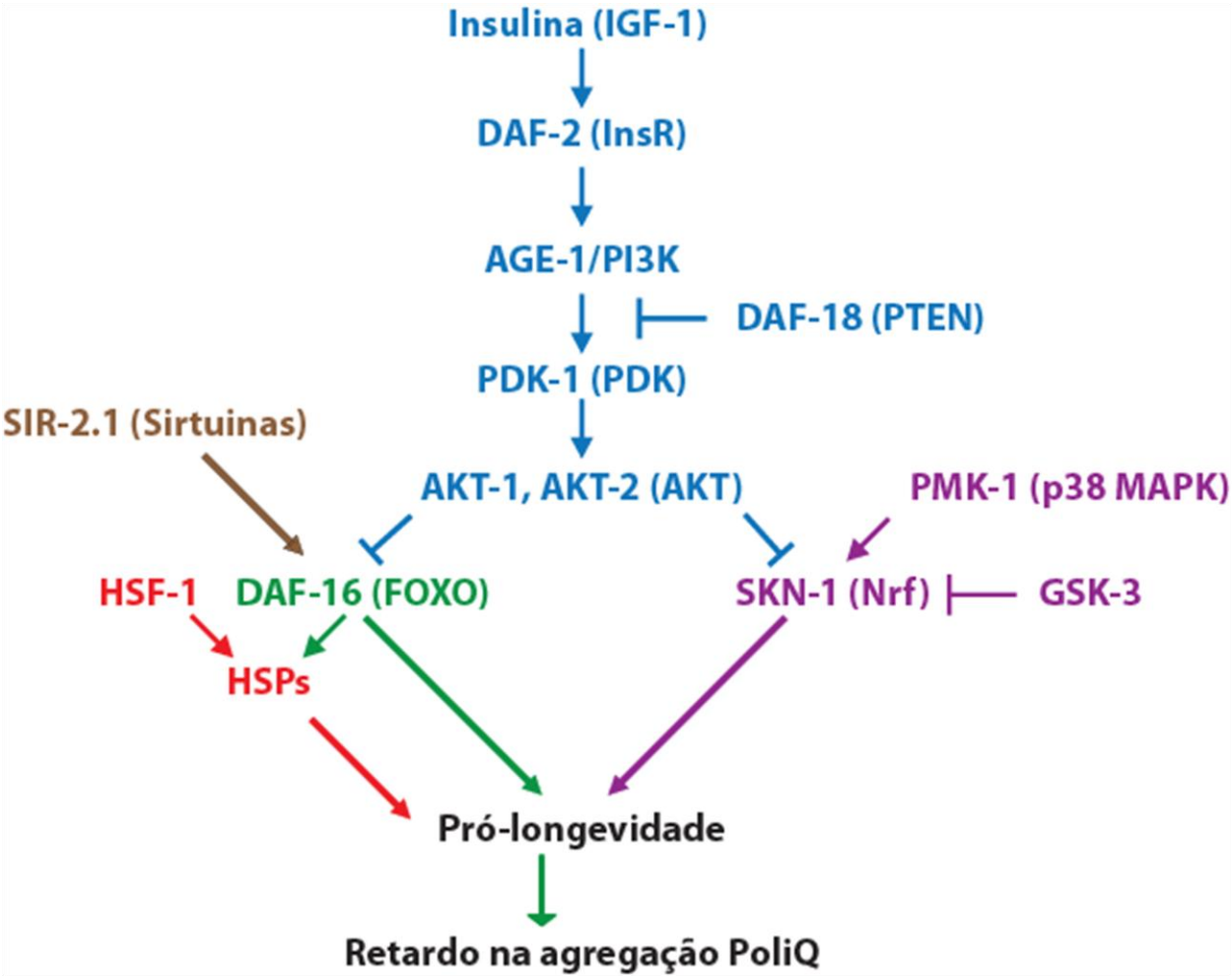
demonstrado em C. elegans que várias vias de sinalização envolvidas nos processos de envelhecimento também influenciam a formação de agregados proteicos.

Em *C. elegans, age-1* codifica uma fosfatidil-inositol-3- quinase (PI3-quinase), que atua na via de sinalização da insulina (IIS) e mutações neste gene dobram o tempo de vida (Guarente & Kenyon, 2000; Morris *et al*., 1996). Nos mutantes *age-1*, tanto o surgimento da agregação como a toxicidade de proteínas PoliQ com 82 repetições foram substancialmente retardadas (Morley *et al*., 2002). Além disso, a supressão da agregação e toxicidade causada pela expansão PoliQ foi inteiramente dependente da atividade de *daf-16*, o gene que codifica o fator de transcrição do tipo FoxO, que atua abaixo de *age-1* na via da IIS e que é necessário para a longevidade aumentada neste (Guarente & Kenyon, 2000; Lin *et al*., 1997)

As sirtuínas são histonas desacetilases NAD dependentes que regulam DAF-16 e que também têm sido associadas ao envelhecimento e toxicidade dos agregados PoliQ (Tang & Chua, 2008). *C. elegans* transgênicos super-expressando *sir-2.1* apresentam uma longevidade maior (Tissenbaum & Guarente, 2001) e apresentam uma menor toxicidade induzida pelas proteínas PoliQ de uma maneira DAF-16 dependente (Parker *et al*., 2005).

Outro mecanismo genético que controla a longevidade em *C. elegans* é exercido pelo fator de transcrição do *heat-shock* (HSF-1) e seus efetores HSPs (Hsu *et al*., 2003; Morley & Morimoto, 2004). Inativação de *hsf-1* ou de *hsp* através do RNAi reduz o tempo de vida do C. elegans e aumenta a agregação de proteínas PoliQ, fornecendo um elo entre envelhecimento e agregação PoliQ através das chaperoninas (Hsu *et al*., 2003; Nollen *et al*., 2004). Estes estudos mostram que os vários mecanismos moleculares envolvidos no controle da longevidade são importantes na formação de agregados e da toxicidade induzida pelas proteínas PoliQ. (Figura 5).

Além disso, a inativação de genes de autofagia acelerou a acumulação de agregados PoliQ, além de aumentar a disfunção muscular induzida por PoliQ em *C. elegans* transgênicos que expressam PoliQ nas células musculares. Quando inativados, esses genes também aceleraram a acumulação de huntintina nos neurônios sensoriais dos animais, resultando em neurodegeneração aumentada (Jia *et al*., 2007)



.

Figura 5: Vias de sinalização envolvidas no aumento da longevidade promovido por retardo na agregação PoliQ no *C. elegans*

Seres vivos sofrem diversos ajustes em sua morfologia, fisiologia, e comportamento ao longo de seu ciclo de vida. O gasto de energia em resposta a eventos diferentes durante esse tempo pode ser previsto (como envelhecimento ou estágio reprodutivo) ou imprevisto (como a exposição a estressores e doenças), e cada um destes eventos influencia a quantidade de energia gasta para a manutenção de outros processos celulares essenciais. A proteção da linhagem de células germinativas é um desses processos, e ocorre ao custo da divisão de recursos direcionados à manutenção das células somáticas (Vilchez *et al*., 2012). Com isso, organismos que sobrevivem ao período pós-reprodutivo apresentam uma deterioração gradual de seus próprios tecidos.

Já foi evidenciado que alterações no ciclo reprodutivo podem afetar a longevidade em diversos organismos (Kenyon, 2010; Partridge *et al.,* 2005), e em *C. elegans* que não apresentam células da linhagem germinativa, ocorre um aumento de 60% na longevidade dos animais, além de seus mecanismos de resistência a estressores ambientais se tornarem mais eficazes (Wang *et al.*, 2008). Outros autores verificaram que em animais cuja esterilidade é induzida por mutação, o redirecionamento de recursos da manutenção da linhagem germinativa para as células somáticas resultou em atividade proteassômica elevada, maior taxa de degradação proteica e longevidade aumentada, associadas à expressão de *rpn-6*, uma subunidade do proteassoma 19S, por meio do fator de transcrição DAF-16 (Vilchez *et al*., 2012), o que sugere potenciais candidatos a investigação para a correção de desordens proteicas correlacionadas à idade. Recentemente, foi sugerido que a inibição da reprodução de maneira química, através do tratamento com 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FUdR), aumentou a resistência a diversas formas de estresse no *C. elegans*, dentre eles o estresse térmico e oxidativo, além de aumentar níveis de expressão de genes relacionados à degradação proteica e auxiliar na proteostase dos animais. No entanto, essa proteção não se mostrou relacionada às vias de reprodução (Feldman *et al*., 2014).

1.5. O fator de transcrição SKN-1

No *C. elegans*, o metabolismo xenobiótico e ativação de enzimas de detoxificação são controlados, em parte, por SKN-1. O SKN-1 é uma proteína bZIP que se liga a sequência WWTRTCAT (Blackwell *et al*., 1994), atuando de forma análoga ao fator Nrf de mamíferos, promovendo resistência ao estresse e longevidade (An & Blackwell, 2003). Em condições normais, SKN-1 é expresso constitutivamente nos dois neurônios ASI que detectam ou regulam a ingestão de comida (YOU *et al*., 2008). Nesses neurônios, SKN-1 é necessário para o aumento da longevidade provocada pela restrição calórica (Bishop & Guarente, 2007).

Na ausência de estresse, a atividade de SKN-1 parece ser controlada tanto no citoplasma quanto no núcleo. No citoplasma, SKN-1 é regulado por várias vias de sinalização. SKN-1 é negativamente regulado através da fosforilação pela enzima glicogênio sintetase quinase (GSK-3) prevenindo sua acumulação no núcleo (An *et al*., 2005). Foi também demonstrado que a via da IIS (via de sinalização da insulina) regula diretamente o fator de transcrição SKN-1. DAF-2 é homólogo ao receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) em mamíferos. DAF-2 ativa as enzimas fosfatidilinosiol 3-quinase AGE-1 (PI3K), PDK-1, e AKT-1/2, quinases que antagonizam o fator de transcrição SKN-1 (Tullet *et al*., 2008), assim como DAF-16, o fator ortólogo de FoxO (Henderson & Johnson, 2001; Hertweck *et al*., 2004; Lee et al., 2003). Assim como nos mutantes *daf-2*, mutações em SKN-1 dirigidas para os sítios de fosforilação da AKT resultam na localização nuclear constitutiva de SKN-1. A deleção de *skn-1* em mutantes *daf-2* suprime os fenótipos da resistência ao estresse oxidativo e a longevidade, associados a este último. Além disso, o envelhecimento é retardado nos animais quando SKN-1 é superexpresso transgenicamente, e quando possuem o sítio de fosforilação para AKT-1/2 mutados na ausência de *daf-16*. Estes dados mostram que a via de IIS inibe diretamente SKN-1 em paralelo a DAF-16 e que SKN-1 contribui para a resistência ao estresse e longevidade, que são observados quando ocorre a redução da atividade de IIS.

Recentemente, foi demonstrado que a via de sinalização ERK MAPK fosforila diretamente SKN-1 e ativa a localização nuclear deste (Okuyama *et al*. 2010). A inibição da expressão dos genes da via ERK diminuem a longevidade de animais tipo selvagem mas não de mutantes *daf-16* e *skn-1* sugerindo que a longevidade controlada pela via ERK MAPK depende de SKN-1 e DAF-16 (Okuyama *et al*. 2010). Choe et al. (2009) sugerem que SKN-1 entra no núcleo constitutivamente mas que em condições normais ela se associa com a proteína WDR-23 e o complexo protéico da ubiquitina ligase CUL-4/DDB-1 sugerindo que SKN-1 deva ser degradado pelo sistema proteassômico (Choe *et al*., 2009). Também foi demonstrado que WDR-23 regula negativamente a expressão de genes de detoxificação de Fase II (Hasegawa & Miwa, 2010).

Já em condições de estresse oxidativo induzido por paraquat ou calor, SKN-1 acumula no núcleo das células do intestino e ativa a transcrição dos genes *gcs-1* (An & Blackwell, 2003). A localização nuclear de SKN-1 requer a sua fosforilação pela PMK-1, uma quinase conservada pertencente da via de sinalização da p38 MAPK (MAPK-Mitogen-Activated Protein Kinase). SEK-1, a MAPK quinase que fosforila PMK-1 é necessária para ativar a translocação de SKN-1 no núcleo e ativar a expressão de *gcs-1* (Inoue et al., 2005). Os mutantes com perda de função *skn-1* e *sek-1* são mais sensíveis ao estresse oxidativo e possuem um tempo de vida reduzido em cerca de 25-30%, o que é consistente com associações feitas entre estresse oxidativo e longevidade (Inoue et al., 2005; An & Blackwell, 2003).

Além da indução de genes da Fase II de detoxificação em condições de estresse, os dados acima implicam que SKN-1 também tem um papel importante no controle da longevidade em condições normais.

1.5.1. Envolvimento de SKN-1 na degradação proteica

Recentemente, foi sugerido que SKN -1 está envolvido em vários processos metabólicos além da resistência ao estresse (Oliveira *et al*., 2009). Através da técnica

de microarranjo, foi identificado que SNK-1 ativa em condições normais a expressão de vários genes envolvidos em processos de detoxificação e resistência ao estresse, atividade lisossômica e proteassômica de degradação proteica, imunidade inata e metabolismo. Um grupo de genes que chamou bastante a atenção foi o dos genes envolvidos em vias lisossômicas e proteassômicas de degradação de proteínas sugerindo que SKN-1 também teria um possível papel na reciclagem de proteínas danificadas (Oliveira *et al*., 2009). Dentro deste grupo, foram encontrados genes que codificam H+ATPases vacuolares que translocam prótons para dentro do lisossomo e outras organelas, serinacarboxipeptidases lisossômica e várias subunidades proteassômicas. Destes genes, 49% apresentaram duas a seis cópias do sítio de ligação de SKN-1 (WWTRTCAT) em 2 kb dos seus promotores indicando que SKN-1 pode estar controlando diretamente a sua expressão (Oliveira *et al*., 2009). Sob diferentes condições de estresse, a expressão de genes de reposta antioxidante e de Glutationa S-Tranferases diminui quando SKN-1 está inibido, o que causa diminuição na defesa contra o estresse oxidativo (Park *et al.*, 2009; Oliveira *et* al., 2009). Também foi demonstrado que a inibição do proteassoma e de enzimas envolvidas no processo de ubiquitinação promovem a localização nuclear de SKN-1 e induzem a expressão de seu gene alvo, *gst-4* (Kahn *et al.,* 2008).

Várias classes de genes envolvidos na homeostase proteica possuem mecanismos de interação com SKN-1. A inibição de um grupo de genes relacionados à homeostase proteica ativa a localização nuclear de SKN-1 e ativa a expressão de seu alvo *gcs-1*. Posteriormente, foi sugerido que SKN-1 é ativado em resposta à inibição de fatores de iniciação da tradução durante a síntese de proteínas. Esta inibição ativa genes de proteção celular e aumenta a resposta ao estresse oxidativo, além de ativar genes diversas classes de genes de proteassoma, como *rpn-12, pas-4* e *pbs-6* em uma resposta compensatória, a fim de manter o funcionamento do sistema ubiquitina-proteassoma no intestino, fortalecendo a ideia de que o fator de transcrição pode atuar de alguma forma na regulação da homeostase proteica do organismo (Li *et al*., 2011)

Outras vias também parecem modular a atividade de SKN-1. A via TOR (Target of Rapamycin), presente em dois complexos funcionais distintos – TORC1 e TORC2 – regulam SKN-1. O primeiro inibe, ao menos parcialmente, a expressão de SKN-1 ao

aumentar a tradução de mRNA. No entanto, quando TORC1 está inibido, SKN-1 age de forma a aumentar a expressão de genes da via TORC1 em resposta. Já TORC2 regula a ocupação nuclear de SKN-1 (Robida-Stubbs *et al*., 2012). Além disso, uma das isoformas de SKN-1, SKN-1A apresenta um domínio transmembrana (Wang & Chan, 2006), o que sugere que SKN-1 também possa estar envolvido em outros tipos de estresse, como o do retículo endoplasmático. De fato, foi sugerido que SKN-1 é regulado pela via da resposta a proteínas não-enoveladas, e, em resposta, controla a expressão de genes e fatores dessa via, além de se fazer presente no retículo endoplasmático e que a sinalização do retículo é importante para a ativação das defesas antioxidantes de SKN-1(Glover-Cutter *et al.*, 2013)

A identificação de genes ativados por SKN-1 relacionados com degradação de proteínas (Oliveira *et al*., 2009) chamou bastante a atenção devido à semelhança desta última classe funcional com os genes identificados em *C. elegans* envolvidos na formação de agregados proteicos com repetições poli-glutamínicas (PoliQ). Comparando o perfil transcricional de SKN-1 (Oliveira *et al*., 2009) com a lista de genes supressores de agregação PoliQ (Nollen *et al*., 2004), identifica-se 13 genes comuns às duas classes (Figura 6): seis destes genes são para degradação proteassômica (*pas-3; pas-4; pbs-2; pbs-3; pbs-4* e *rpt-5)*, outros quatro para genes de degradação lisossômica (*vha-6; vha-8, vha*-12 e *vha-13)*, um para uma serina/treoniaquinase (*nekl-2*), um para fumarilacetoacetase (*fah-1*) e um para uma subunidade F_1F_0 da ATPsintase mitocondrial (*atp-5*). Baseando-se nesta sobreposição é plausível supor que em condições normais SKN-1 ative genes responsáveis pela degradação de proteínas com enovelamento incorreto e possam influenciar a formação de agregados PoliQ em C. elegans.

Em trabalhos anteriores de nosso grupo, verificamos que o *knockdown* de SKN-1 influencia a agregação poliglutamínica no *C. elegans*. Experimentos realizados com animais transgênicos que expressam expansões anormais de poliglutamina nas células da parede muscular dos animais sugerem que, em condições de redução da expressão de SKN-1, o número de agregados tende a aumentar. Entretanto, em animais cuja expressão anormal de poliglutaminas se faz presente nas células intestinais, o *knockdown* de SKN-1 reduziu a formação de agregados em diferentes idades (figura 7)

(Pereira, 2012). Este fato nos chamou a atenção, e neste trabalho nos propusemos a aprofundar os nossos estudos sobre o papel de SKN-1 no perfil de agregação poliglutamínica no *C. elegans*.

1.6.Justificativa e hipótese de trabalho

O entendimento dos processos que regulam a formação e degradação de agregados poliglutamínicos é de suma importância para a compreensão dos mecanismos envolvidos no surgimento e progressão de desordens neurodegenerativas, o que pode levar à identificação de potenciais alvos e estrat;egias terapêuticas para o tratamento destas doenças

De posse das informações citadas anteriormente, dois fatos encontrados no trabalho de Pereira, em 2012, nos chamaram a atenção. O primeiro é a ocorrência da diminuição no número de agregados poliglutamínicos no intestino de *C. elegans* de idades mais avançadas. O segundo fato que nos intrigou foi a diminuição do número de agregados em condições nas quais *skn-1* está inibido. Por isso, elaboramos a hipótese de que a energia gasta em processos reprodutivos pode diminuir a taxa de degradação PoliQ, além de que podem haver mecanismos compensatórios de degradação atuando no intestino do *C. elegans* em condições de ausência de *skn-1*. Por isso, este trabalho se propôs a investigar os efeitos da inibição do esforço reprodutivo e de *skn-1* nos perfis de agregação proteica no *C. elegans.*

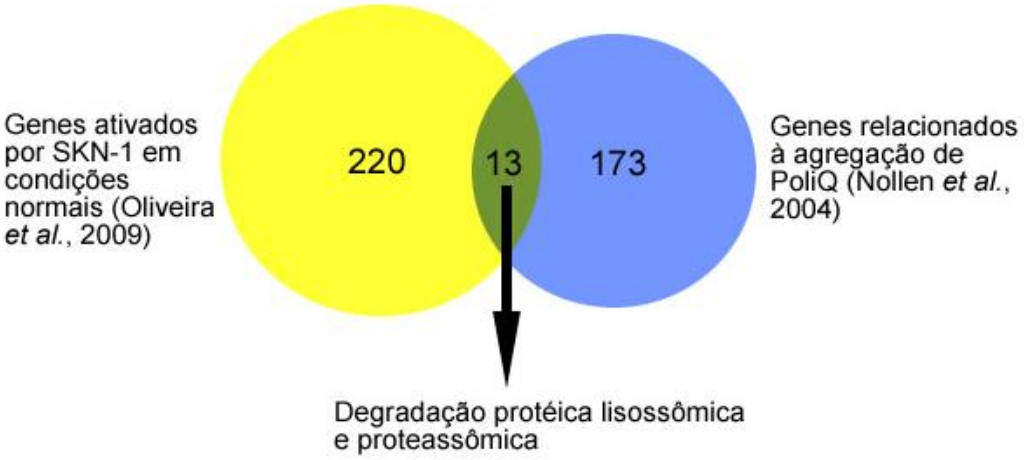


FIGURA 6: Diagrama de Venn demonstrando a interseção entre genes ativados por SKN-1 e envolvidos em processos de degradação proteica (http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi).

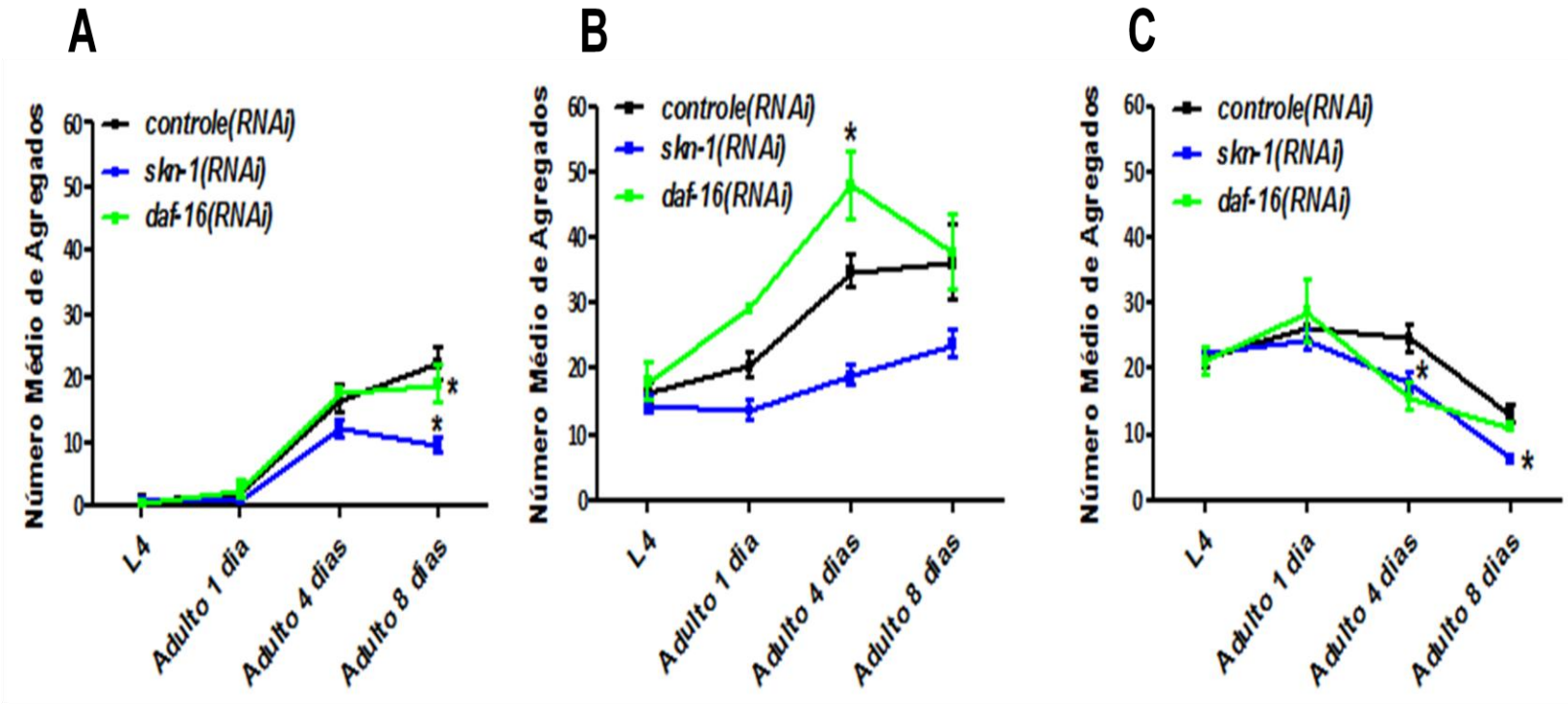


Figura 7: Efeito do RNAi para *daf-16 e skn-1* no número médio de agregados proteicos nos animais *vha-6p::Q44::YFP (A); vha-6p::Q64::YFP (B); vha-6p::Q82::YFP (C)* nas fases L4, adulto de quatro e oito dias.*p<0,05. (Pereira, 2012)

2.Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Verificar o papel de SKN-1 e do esforço reprodutivo sobre o padrão de agregação poliglutamínico no *Caenorhabditis elegans.*

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar a correlação do envelhecimento e esforço reprodutivo sobre o padrão de formação de agregados poliglutamínicos no intestino de animais transgênicos *vha-6p::Q(n)::YFP;*

- Avaliar o efeito do *knockdown* de *skn*-1 sobre a expressão de genes relacionados à degradação proteica regulados por SKN-1 em animais selvagens (N2) e *daf-16(mu86)*, tratados ou não com RNAi contra *skn-1*;

- Avaliar o efeito do *knockdown* de *skn*-1 sobre a atividade proteolítica dependente de ATP-Ubiquitina e do proteassoma em animais selvagens (N2), mutantes *daf-16(mu86),* e transgênicos que expressam expansões PoliQ em células intestinais, tratados ou não com RNAi contra *skn-1;*

- Investigar possíveis mecanismos compensatórios na remoção de agregados poliglutamínicos no intestino de animais transgênicos que expressam expansões PoliQ(n), na idade de adulto de oito dias, em condições de inibição dos sistemas proteolíticos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens utilizadas

As linhagens utilizadas neste trabalho (tabela 2) foram fornecidas pelo *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), fundado pelo NIH National Center For Research Resources (NCRR), University of Minnesota, EUA (http://www.cbs.umn.edu/CGC). Animais *daf-16(mu86)* foram utilizados nos experimentos de análise de atividade proteassômica e análise de expressão gênica como controle positivo, uma vez que já foi demonstrado que a inibição de *daf-16* aumenta a taxa de agregação proteica no *C. elegans* (Nollen *et al*., 2004). Os animais das linhagens GF80, GF83 e GF66 foram utilizados nos experimentos de análise do padrão de agregação de proteínas poliglutamínicas.

Alguns dos experimentos deste trabalho foram realizados com linhagens integradas de GF80, GF83 e GF66. Originalmente, estas linhagens são oferecidas de forma que a fusão da proteína PoliQ e a proteína YFP seja extra-cromossomal, de forma não-integrada, o que faz com que nem todos os seus descendentes apresentem o fenótipo desejado, tornando necessária uma pré-seleção destes animais. Para realizar a integração, animais dessas linhagens foram colocados em uma placa contendo apenas meio NGM (Nematode Growth Medium), sem comida, e irradiados com luz UV a uma energia de 300J por 30 segundos. O dano induzido pela radiação UV faz com que o plasmídeo possa ser fundido ao cromossomo do *C. elegans*, aumentando a frequência com que o fenótipo desejado possa ser transmitido às gerações posteriores. Após isso, os animais foram retrocruzados com animais selvagens (N2) por três gerações, para que outros danos estocásticos ao DNA pudessem sem eliminados.

Também foram usados animais *knockdown* para *skn-1*, obtidos por interferência de RNA (RNAi). A incorporação do RNA fita dupla (dsRNA) nos vermes é feita por meio de um sistema bacteriano. Para tal, um fragmento exônico do gene alvo é clonado no plasmídeo pL4440 (distribuído gratuitamente por Andrew Fire), que é específico para síntese de dsRNA por indução com IPTG (isopropil-3-Dtiogalactopiranosídeo) (Kamath *et al*., 2001).

Tabela 2: Linhagens de *C. elegans* utilizadas neste trabalho

Linhagem	Genótipo	Descrição Geral
N2		Tipo selvagem
CF1038	*daf-16(mu86)*	Mutante de deleção para o gene *daf-16*
GF80	dgEx63[pAMS66(*vha-6p::Q44::YFP*)+pRF4(*rol-6*)]	Transgênico extracromossomal carregando 44 Glutaminas (Q44) fundidas ao gene YFP, sob controle transcricional do promotor do gene *vha-6*
GF83	dgEx63[pAMS56(*vha-6p::Q64::YFP*)+pRF4(*rol-6*)]	Transgênico extracromossomal carregando 64 Glutaminas (Q64) fundidas ao gene YFP, sob controle transcricional do promotor do gene *vha-6*
GF66	dgEx63[pAMS58(*vha-6p::Q82::YFP*)+pRF4*(rol-6*)]	Transgênico extracromossomal carregando 82 Glutaminas (Q82) fundidas ao gene YFP, sob controle transcricional do promotor do gene *vha-6*

3.2. Crescimento e manutenção do *C. elegans*

Os animais utilizados nos experimentos foram cultivados em placas de petri contendo meio NGM (Nematode Growth Medium) (NaCl 3g/L; bactopeptona 2,5g/L; ágar bacteriológico 17g/L; colesterol 1mg; CaCL 1M; $MgSO_4$ 1M; KPO_4 25M (Brenner, 1974), semeadas com *E. coli* OP50, que serve de alimento para os animais. As placas eram mantidas a uma temperatura de 20ºC, o que permite o desenvolvimento normal do embrião até atingir seu estágio adulto. A manutenção das linhagens foi feita transferindo animais em diferentes estágios para novas placas à medida que a camada de bactérias ficava escassa.

3.3. Sincronização cronológica dos animais

Os animais utilizados no presente trabalho tiveram suas idades sincronizadas pelo emprego do tratamento de lise alcalina. A lise alcalina consiste no tratamento de hermafroditas adultos grávidos com solução de lise (50% de hipoclorito de sódio; 2,5 mM NaOH). Os embriões, resistentes a este tratamento, foram coletados e colocados em meio líquido M9 (KH_2PO_4 22 mM; K_2HPO_4 42 mM; NaCl 85,5 mM; $MgSO_4$ 1 mM) de um dia para o outro na ausência de alimento. Isto permite que os embriões eclodam, mas permaneçam estacionários em L1. Os animais L1 foram então transferidos para placas NGM semeadas com *E. coli* OP50 por 48h a 20°C, tempo necessário para o *C. elegans* chegar a L4.

Outra forma de sincronizar os animais é através da ovoposição. Ela consiste em selecionar de 50 a 200 animais adultos, em idade reprodutiva, de uma placa e transferi-los para outra. Os animais então realizam a postura de ovos na placa por aproximadamente seis horas, e após esse tempo são retirados da placa. Dessa forma, os embriões colocados pelos animais estarão sincronizados no mesmo estágio de desenvolvimento para as análises futuras.

3.4. RNA de interferência

Neste trabalho, nós utilizamos a técnica de RNA de interferência (RNAi) por alimentação para reduzir os níveis de expressão de *skn-1* e *daf-16.* Esta metodologia consiste na clonagem, em bactérias *E. coli* HT115, de um plasmídeo pL4440, contendo um fragmento exônico do gene alvo, sintetizando assim o dsRNA pela indução com IPTG.

As bactérias foram crescidas *overnight* em 10 mL de meio Luria-Bertani (LB) (caseína 10g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 10g/L) pH 7.0. No dia seguinte, elas foram diluídas em 70 mL de LB, e tiveram seu crescimento monitorado até que atingissem densidade óptica (OD) 600 nm igual a 1,0. Em seguida, os inóculos foram centrifugados por 30 minutos a 4°C e 4000RPM. Após a centrifugação, o *pellet* de bactérias foi ressuspenso em 7 mL de LB contendo 8,4 µL do antibiótico ampicilina, 14,7 µL de tetraciclina e 21,0 µL de IPTG. Este inóculo foi semeado em placas contendo meio NGM Plus (NaCl 3g/L; Bactopeptona 2,5g/L; Extrato de levedura 0,8 g/L; Agar bacteriológico 17g/L; Colesterol 1mg; CaCL 1M; $MgSO_4$ 1M; KPO_4 25M; 1,20 mL de ampicilina (20 mg/mL); 1,06 mL de tetraciclina (12 mg/mL) e 300 µL de IPTG (200 mg/mL), formando uma camada de bactérias que serviu de alimento para o *C. elegans.*

Os animais, sincronizados em L1, foram crescidos em placas contendo uma camada de HT115 contendo o plasmídeo pL4440 com a sequência exônica de *skn-1* ou *daf*-16 ou em grupo controle (HT115 contendo apenas o plasmídeo pL4440). A confirmação da eficiência do RNA para *skn-1* foi feita ao verificar a ausência de larvas nas placas *skn-1(RNAi)*. Para a confirmação da eficiência do RNAi para *daf-16*, animais transgênicos que expressam *daf-16* fundidos a uma proteína verde fluorescente foram crescidos em placas *daf-16(RNAi)* e tiveram sua fluorescência analisada, com a diminuição da fluorescência indicando o sucesso do RNAi.

3.5. Avaliação do padrão de formação de agregados poliglutamínicos

De acordo com nossas observações anteriores, o número de agregados PoliQ no intestino de *C. elegans* transgênicos aumentou com a idade. No entanto, quando os animais atingiam idades nas quais o período reprodutivo já havia terminado, observamos uma diminuição no número destes agregados, sobretudo nos animais com a maior expansão poliglutamínica, em especial nos tratados com RNAi para *skn-1*. Esse fato nos levou a questionar sobre as possíveis correlações entre envelhecimento, esforço reprodutivo e agregação PoliQ. Uma de nossas hipóteses foi a de que ocorreu uma diminuição no número de agregados, ao mesmo tempo em que estes aumentavam de tamanho, sugerindo formação de placas de agregados PoliQ. Para isso, nós mensuramos a área dos agregados PoliQ do trabalho de Pereira (2102). Outra hipótese foi a de que, em situações nas quais o esforço reprodutivo está ausente, pode ocorrer um redirecionamento de energia para a manutenção da homeostase proteica, fazendo com que a taxa de degradação de proteínas aumente. Para investigar esta hipótese, nós analisamos o padrão de agregação PoliQ em diferentes idades de animais tratados com FUdR, uma droga que, em *C. elegans*, causa esterilidade parental.

3.5.1. Análise da área dos agregados

A área total dos agregados PoliQ dos animais *vha-6p::Q82::YFP* adultos de 8 dias, constantes no trabalho de Pereira (2012) foi medida utilizando o conjunto de ferramentas do software ImageJ.

3.5.2. Padrão de agregação poliglutamínico após o tratamento com FUdR

A análise do padrão de agregados poliglutamínicos foi feita utilizando as linhagens *vha-6p::Q44::YFP, vha-6p::Q64::YFP* e *vha-6p::Q82::YFP* cuja expressão da proteína recombinante PoliQ:YFP é direcionada para o intestino. Estas linhagens

contêm plasmídios extracromossomais que apresentam fusão traducional da sequência genômica do promotor *vha-6* com a sequência do gene de proteínas com expansões de 44, 64 e 82 glutaminas, respectivamente, e com a sequência do gene da proteína amarelo fluorescente (YFP).

Os vermes transgênicos supracitados no estágio larval 1 (L1) foram então cultivados em placas contendo meio NGM e utilizados nos experimentos.

Animais, sincronizados por ovoposição em L1, foram crescidos nas placas por 48 horas, tempo necessário para atingirem o desenvolvimento até o estádio L4, e, em seguida, um grupo foi transferido para placas contendo meio NGM + 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FUdR), em uma concentração final de 12 μg/mL, enquanto outro permaneceu sendo cultivado em meio NGM. O FUdR é uma droga que, em *C. elegans*, induz esterilidade parental. Os animais foram então analisados nos estágios adulto de um dia, quatro dias e oito dias. Cerca de 15 a 20 animais por grupo foram fotografados em um microscópio de fluorescência Zeiss, disponível no Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) da UFOP, usando aumento ocular de 10 vezes e filtro para excitação de 365 nm. Os agregados proteicos foram definidos como estruturas com limites distinguível de fluorescência ao seu redor (Morley *et al*., 2002). As fotos foram renomeadas para que os agregados fossem contados de maneira "cega".

3.6. Análise da atividade do proteassoma

3.6.1. Preparo do extrato bruto de proteínas

Aproximadamente 5000 animais tipo selvagem N2 e mutantes *daf-16(mu86)* foram crescidos em placas *skn-1(RNAi)* e controle(RNAi) por 48h a 20°C, até que atingissem o estádio larval de L4. Para confirmar a redução da expressão de *skn-1*, embriões foram semeados em placas *skn-1(RNAi.)*. Na ausência de *skn-1*, os embriões colocados não eclodem, uma vez que este é um gene de efeito materno, essencial para o desenvolvimento embrionário. Esses animais foram recolhidos por lavagem em tampão M9. Depois de retirado o excesso de M9 foi adicionado um volume do tampão de homogeneização (Tris-HCl 5mM, pH 8.0, glicerol

1%, EDTA 1 mM), correspondendo a 3 vezes o peso úmido dos animais, e 10 µL do coquetel de inibidores de proteases Amresco (código M221). O material foi homogenizado por sonicação, com cinco pulsos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos, em seguida, centrifugado por 30 minutos a 20000G, conforme protocolo estabelecido por Cabreiro *et al.,*2011. Ao sobrenadante, foi adicionado glicerol para uma concentração final de 20%. O extrato foi armazenado a -80° C para análises posteriores. A determinação da concentração proteica presente no extrato bruto foi realizada utilizando o princípio do ácido bicinconínico (BCA), segundo as recomendações do fabricante (QuantiPro^{TM} BCA Assay Kit – SIGMA ALDRICH). O princípio do método BCA se baseia na formação de um complexo proteína-Cu^{2+}, sob condições alcalinas, seguido da redução de Cu^{2+} a Cu^{1+}. A quantidade da redução é proporcional à quantidade de proteínas presentes. O BCA forma um complexo roxo-azulado com o Cu^{1+}, fornecendo então a base para o monitoramento da redução de Cu^{2+} pelas proteínas.

3.6.2. Medida da atividade proteolítica exógena

Para a determinação da atividade peptidásica do proteassoma presente na fração citosólica de vermes foi utilizado o substrato fluorogênico Succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-4-metil-cumaril-7-amida (SLLVT-MCA). Nesses ensaios foram utilizadas 25µg de proteínas totais para cada extrato, o tampão $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1mM, Tris-HCl 50mM pH 8,0 e 13 µM de substrato (para atividade de quimiotripisina) na presença ou não do inibidor MG132 (Cbz-Leu-Leu-Leucinal) 20 µM. O ensaio foi realizado num volume final de 240 µL e a incubação realizada durante 60 minutos a 37°C sendo interrompida pela adição de 1,5 mL de etanol. A seguir, foram feitas leituras fluorimétricas nos comprimentos de onda 380 nm (excitação) e 440 nm (emissão) no espectrofluorofotômetro RF-5301PC (Shimadzu – Tóquio, Japão) e os resultados, expressos em unidades de fluorescência obtidos em 1 minuto por g de proteína, foram transformados em uma razão, dividindo-se o valor encontrado em cada condição pelo valor encontrado na condição N2, Controle(RNAi). Em seguida, subtraiu-se o valor

encontrado nas condições extrato+MG-132 do valor encontrado na condição extrato bruto, obtendo-se a atividade proteolítica relativa do proteassoma.

3.6.3. Padrão de agregação poliglutamínico após a inibição dos sistemas de degradação proteica

Esta análise foi realizada utilizando a linhagem e *vha-6p::Q82::YFP*. Os animais, sincronizados em L1, foram cultivados em placas Controle(RNAi) e *skn-1(RNAi)*, com a adição, ao meio NGM, de 13 μM de MG-132 para a inibição do proteassoma ou 20 mM de cloroquina para a inibição do lisossoma, até atingirem a idade adulta de oito dias. Um número de 15 a 20 animais por grupo foram fotografados em um microscópio de fluorescência Zeiss, disponível no Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) da UFOP, usando aumento ocular de 10 vezes e filtro para excitação de 365 nm. Os agregados proteicos foram definidos como estruturas com limites distinguível de fluorescência ao seu redor (Morley *et al*., 2002). As fotos foram renomeadas para que os agregados fossem contados de maneira “cega”.

3.7. Análise da expressão gênica

3.7.1. Extração de RNA

A extração de RNA total foi feita conforme o método do trizol descrito por Chomczynski & Sacchi, em 2006, adaptado para as condições de trabalho com *C. elegans*. Placas Controle(RNAi) e *skn-1(RNAi)* contendo cerca de 2500 animais tipo selvagem (N2), ou mutantes *daf-16(mu86)*, foram lavadas utilizando água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), substância que inativa as RNAses presentes. Os animais suspensos no meio líquido foram depositados em microtubos estéreis, previamente autoclavados por 40 minutos. Repetiu-se a lavagem três vezes adicionais, a fim de remover o excesso de bactérias. Após tal procedimento, retirou-se o excesso de água DEPC e adicionou 1,5 mL de BRAzol aos microtubos. O BRAzol é um detergente que lisa a parede celular do *C. elegans* e mantém a integridade dos seus ácidos nucleicos, para posterior precipitação. Como o *C. elegans* possui uma cutícula resistente, após a adição do BRAzol, os microtubos foram submetidos à homogeneização em vortex por

30 segundos, a fim de auxiliar no rompimento dessa cutícula. Os microtubos eram então deixados à temperatura ambiente por 10 minutos, para que se realizasse a extração. Em seguida, os microtubos eram centrifugados por 20 minutos a 16000G, a uma temperatura de 4ºC, e o sobrenadante era transferido para outros microtubos livres de RNAses, aos quais foram adicionados 200 µL de clorofórmio UV/HPLC espectroscópico, seguido de homogeneização por 15 segundos em vortex.

Após a homogeneização, os microtubos eram deixados por 3 minutos à temperatura ambiente, para que se iniciasse a separação do homogenato em duas camadas, uma mais cristalina e outra azulada e espessa. Realizou-se a centrifugação dos microtubos, a 16000 a 4ºC por 20 minutos, após a qual se verificava a completa separação das duas camadas. A superior, mais cristalina, foi transferida para novos microtubos livres de RNAses. Aos tubos contendo a camada cristalina, foi adicionado um volume igual de Isopropanol, e eles foram deixados à temperatura ambiente por 10 minutos para precipitação do RNA.

Os microtubos foram então centrifugados por 10 minutos a 13000G e a 4ºC, após a qual verificava-se um pellet de RNA. Retirou-se então o sobrenadante, e lavou-se o pellet com 350 µL de Etanol 70% (feito utilizando água DEPC ou livre de RNAse). Os microtubos foram então centrifugados a 16000G por 5 minutos a uma temperatura de 4ºC, e o sobrenadante de EtOH 70% foi removido. Deixou-se os microtubos secando à temperatura ambiente, para remover qualquer excesso de EtOH, e adicionou-se 24 µL de água DEPC para que ocorresse a ressuspensão dos pellets.

Após a ressuspensão do RNA, os microtubos eram submetidos a banho-maria de 60ºC por 10 minutos, para que ocorresse a completa dissolução do RNA. As amostras foram armazenadas a -80ºC.

3.7.2. Quantificação do RNA

As amostras de RNA extraído tiveram sua concentração e densidade óptica medidas pelo uso do espectrofotômetro NanoVue Plus (General Electric). Apenas as amostras que apresentaram uma razão ácido nucleico/proteína (A_{260}/A_{280}) maior que 1,80 ao comprimento de onda de 600 nm foram submetidos à visualização em gel de agarose 1% para verificação de sua integridade.

3.7.3. Verificação da integridade do RNA em gel de agarose

De cada amostra de RNA extraído, foi retirada uma alíquota contendo 3µg de RNA total. A cada uma destas alíquotas, foram adicionados 2 µL de tampão de coloração de formaldeído 10X (50% glicerol diluído em água DEPC; EDTA 10 mM pH 8,0; azul de bromofenol 0,25% m/v; xileno cianol 0,25% m/v) e 2 µL de brometo de etídio (200µg/mL). As amostras foram então aquecidas a 75ºC durante 10 minutos, para que ocorresse a desnaturação do RNA, e em seguida, foram aplicadas em gel de agarose 1% (agarose 0,50g e TBE 1X 50mL), sendo submetidas à eletroforese por aproximadamente duas horas e meia a 80V. O gel foi submetido a uma pré-corrida, com voltagem de 70Vpor 10 minutos, antes de se aplicar as amostras nas canaletas.

Usou-se TBE 1X como tampão de corrida na eletroforese. Toda a vidraria utilizada nesse processo passou previamente por uma lavagem e posterior aquecimento a 160ºC por 3 horas, e a cuba e demais materiais sofreram tratamento com peróxido de hidrogênio 3 volumes para remoção de quaisquer RNAses que pudessem degradar as amostras carregadas.

Ao término da eletroforese, o gel foi visualizado em um transiluminador UV, no qual foi possível verificar o padrão de bandas de RNA comparado com um peso molecular de DNA. O gel foi fotografado para análise.

3.7.4. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Os cDNAs foram obtidos a partir do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Para a síntese de cDNA por este método, 1500 ng de RNA foram pipetados em um microtubo de 0,2 mL, juntamente com 2,0µL de 10X RTBuffer (tampão de reação), 0,8 µL de 25XdNTPMix, 2,0 µL de iniciadores aleatórios (Random Primers), 1,0 µL da enzima transcriptase reversa Multiscribe. O volume da reação foi completado para 20 µL com H_2O DEPC. Esta solução foi submetida à reação de RT-PCR em um termociclador MG96+ (Biocycler), que consiste em uma etapa a 25°C por 10 minutos, seguida de 37°C por 120 minutos, e 85ºC por 5 minutos. Este cDNA foi diluído para a concentração de 25 ng/µL utilizando-se H_2O DEPC, e armazenado em freezer a –20° até a realização dos estudos de qPCR.

3.7.5. Desenho dos iniciadores

Os iniciadores utilizados nas reações de qPCR para os treze genes foram desenhados com o software primer3 (versão 0.4.0) (http://frodo.wi.mit.edu/primer3), inserindo-se a sequência a ser flanqueada de cada gene e atentando às especificações de temperatura de anelamento (~60ºC) e conteúdo GC máximo (60%). O tamanho especificado para cada iniciador era de no mínimo 100 e no máximo 150 pares de base, o apropriado para a técnica de qPCR empregada nos ensaios. Os iniciadores estão dispostos no quadro 1. Iniciadores para outros doze genes, candidatos a referência endógena, apontados por Hoogewijs *et al*. (2008) (*act-1*, *act-2, actin, cdc-42*, *csq-1*, *ama-1*, *eif-3.C, mdh-1, rbd-1, pmp-3*, *tba-1* e *gpd-2*) foram utilizados.

3.7.6. PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Nas reações de qPCR realizadas no presente trabalho, foi empregada a técnica de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) através do sistema de detecção de seqüência 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) e o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A amplificação por PCR foi realizada em placas de polipropileno “flat-top” para 96 reações (Axygen Scientific) cobertas com tampas para microplacas (Axygen Scientific) e em triplicata, utilizando-se 2,0 µL (50µg) de cDNA, 4,3 µL de H_2O MiliQ, 7,5 µL de SYBR® Green (Applied Biosystems), e 1,2 µL (20 µM) do primer do gene-alvo, para um volume total de reação de 15 µL. As amostras foram mantidas, na etapa inicial, a 95ºC por 10 minutos (desnaturação inicial), na etapa seguinte, 40 ciclos, a 95ºC por 1s (desnaturação) e 60ºC por 1 minuto (anelamento e extensão). O protocolo de dissociação foi realizado alternando a temperatura entre 95ºC (15s), 60ºC (1 minuto), 95ºC (30 segundos) e 60ºC (15 segundos).

Quadro 1: Iniciadores utilizados na reação de qPCR, obtidos através do software Primer3

Gene	Sequência	TM (ºC)	Conteúdo GC (%)	Tamanho do fragmento gerado (pb)
atp-5	5' - acgtcttccgtgaactggtc	62,4	55	143
	3' - gcaaagtcgatcttgggaag	60,4	50	
fah-1	5' - ctcggatttcccaattcaaa	56,3	40	117
	3' - ttggcaatttctgccaagtt	56,3	40	
nekl-2	5' - gacgtggtgcttttggagtt	60,4	50	106
	3' - tctttttcagtcattccgtgag	58,9	40,9	
pas-4	5' - tcccctgatggacacttgtt	60,4	60,4	147
	3'- gattgtgcggtcatcttgaa	58,4	58.4	
pas-6	5' - aagagtgaaacccacgctgt	60,4	50	117
	3'- gagaccagcgatggaaactc	62,4	55	
pbs-2	5' - cccattcacagctcaaggat	60,4	50	148
	3' - gtttcctgaggcgttgtcac	62,4	55	
pbs-3	5'- tgagctacactggtggaacc	62,4	55	100
	3' - gttgcaattgttgtcatctgc	58,7	42,9	
pbs-4	5'- gggaatttccaccgaaaact	58,4	45	134
	3'- ctccgatgcacatcattgtc	60,4	50	
rpt-5	5'- gctgattgaagctgttgtgc	60,4	50	149
	3'- ttgatttagtttgggcagca	56,3	40	
vha-12	5'- ccggacaggttcttgaaatc	60,4	50	136
	3'- agcatgtcttcggaaactgg	60,4	50	
vha-13	5'- tcatttcccaatctctctcca	58,7	42,9	133
	3' - gtgacaccttcgacctccat	62,4	55	
vha-6	5' - ggaacagaatgcgtacacga	60,4	50	138
	3'- gccggaatatgctcatcgta	60,4	50	
vha-8	5'- agccgaggaagaattcaaca	58,4	45	142
	3'- cgtccagcgttgagagagt	62,4	55	

3.7.7. Curvas de calibração e padronização da qPCR

As curvas de calibração foram elaboradas em triplicata, a partir de diluições seriadas de cDNA (500 ng, 50 ng, 5 ng, 0,5 ng e 0,05 ng) dos animais N2 crescidos em condições normais. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito em 3.7.6. A curva de dissociação fornece informações a respeito da amplificação de produtos específicos ou inespecíficos que porventura tenham sido amplificados (como dímeros de iniciadores).

Foram utilizados pelo menos quatro pontos para a construção das curvas-padrão e determinação da eficiência de cada iniciador. Elas obtiveram uma eficiência superior a 95%. Somente foram consideradas curvas-padrão satisfatórias para referência aquelas com *slope* (diferença nos valores de CT entre as diferentes diluições) entre 3,1 e 3,9 (idealmente 3,3).

3.7.8. Escolha do gene de referência endógena

O protocolo para a realização da qPCR das amostras dos genes de referência endógena foi o mesmo descrito em 3.7.6. O nível de expressão de cada gene candidato foi comparado em todas as condições. O gene ideal para a referência endógena é o que apresenta menores variações nos seus níveis de expressão todas as condições analisadas.

3.7.9. Análise dos níveis de expressão dos genes por meio do método do C_T comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

O protocolo para a realização da qPCR das amostras dos genes-alvo foi o mesmo descrito em 3.7.6.

Como os valores C_T são fornecidos de forma exponencial, é recomendável que se transforme tais valores para uma forma linear. O cálculo do $\Delta\Delta C_T$ é feito ao se subtrair a média dos valores do C_T do gene de referência endógena da média do C_T de cada gene-alvo em cada condição. Dessa forma, obtém-se o primeiro Δ. O segundo Δ é obtido ao se subtrair o Δ encontrado na condição controle do gene-alvo do Δ desse mesmo gene nas demais condições. Elevando-se 2 à potência do valor negativo do $\Delta\Delta C_T$, é possível determinar a alteração no nível de expressão de cada gene-alvo,

quando comparado ao gene de referência endógena. O nível de expressão da referência endógena é normalizado em 1,00, uma vez que o seu $\Delta\Delta C_T$ é igual a 0.

3.8.1. Padrão de agregação poliglutamínico em condições de inibição de DAF-16 e SKN-1.

Para avaliar o envolvimento de SKN-1 e DAF-16 no padrão de agregação poliglutamínica, nós analisamos o número de agregados de animais *vha-6p::Q44::YFP; vha-6p::Q64::YFP* e *vha-6p::Q82::YFP* tratados com RNAi para *skn-1* e *daf-16*, conforme protocolos descritos anteriormente. Os animais foram fotografados nas idades de adulto de um, quatro e oito dias, e a contagem dos agregados foi feita de maneira *cega*.

Pereira, em 2012, demonstrou que, em animais que expressam 64 e 82 expansões PoliQ em seus intestinos, a inibição de tanto *skn-1* quanto *daf-16* é capaz de reduzir o número de agregados. Isto é um fato curioso, uma vez que é sugerido que estes fatores de transcrição proporcionem um aumento na longevidade através da degradação de proteínas. No entanto, isso sugere que possa haver um mecanismo de compensação por parte destes dois fatores de transcrição para que a atividade proteolítica seja mantida ou aumentada na ausência de um deles.

Por isso, resolvemos testar a hipótese de que possa haver alguma sinergia entre *skn-1* e *daf-16* na agregação poliglutamínica, realizando ensaios nos animais *vha-6p::Q(n)::YFP* em diferentes idades, tratados com o RNAi contra *skn-1* e *daf-16* simultaneamente.

3.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do teste t de Student, sendo que $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significante. Amostras que não apresentavam distribuição normal foram analisadas utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, sendo $p \leq 0,05$ considerado estatisticamente significante. A área dos agregados foi comparada através do teste de análise de variância (ANOVA) 1-way.

4. Resultados

4.1. Análise do efeito do esforço reprodutivo na formação de agregados poliglutamínicos

Pereira (2012) obsevou que o número médio de de agregados PoliQ no intestino dos animais *vha-6::PoliQ(n)::YFP* declina com o envelhecimento dos animais. Assim, o presente trabalho se propôs a verificar inicialmente a hipótese de que esta diminuição no número de agregados pode estar relacionada a: 1) um aumento no tamanho do agregado; ou 2) influência do esforço reprodutivo.

4.1.1. Análise da área total dos agregados poliglutamínicos

Para avaliar se a redução do número médio de agregados está associada a um aumento no tamanho dos agregados, nós re-analisamos as fotos dos animais *vha-6p::Q82::YFP* adultos de 8 dias de Pereira (2012). A área total dos agregados poliglutamínicos destes animais dos grupos *controle(RNAi)*, *skn-1(RNAi) e daf-16(RNAi)* mediam 11,30 ± 1,526 µm; 12,07 ± 2,268 µm e 15,12 ± 2,440 µm respectivamente. Estes resultados mostram que não existe qualquer diferença significativa no tamanho dos agregados nas diferentes condições analisadas pela autora (Figura 8) sugerindo que não existe um mecanismo compensatório entre a redução do número de agregados pelo seu tamanho.

4.1.2. Análise do padrão de agregação PoliQ após o tratamento com FUdR

Para avaliar se a redução do número médio de agregados está associada a uma redução do esforço reprodutivo, nós comparamos o perfil de agregação poliglutamínica nos animais *vha-6p::Q44::YFP, vha-6p::Q64::YFP* e *vha-6p::Q82::YFP* tratados ou não com FUdR (Figura 9).

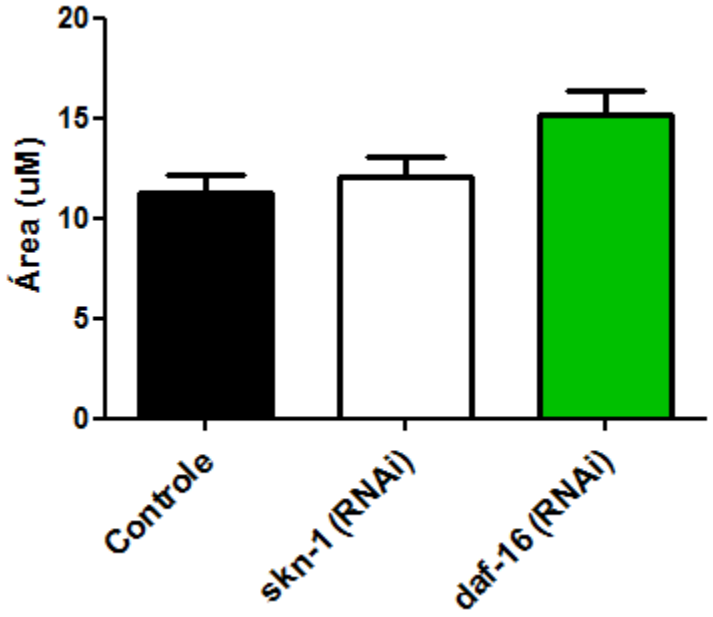


Figura 8: Efeito do RNAi para *skn-1* e *daf-16* na medida da área, em micrômetros, dos agregados proteicos em animais *vha-6p::Q82::YFP* adultos de 8 dias.

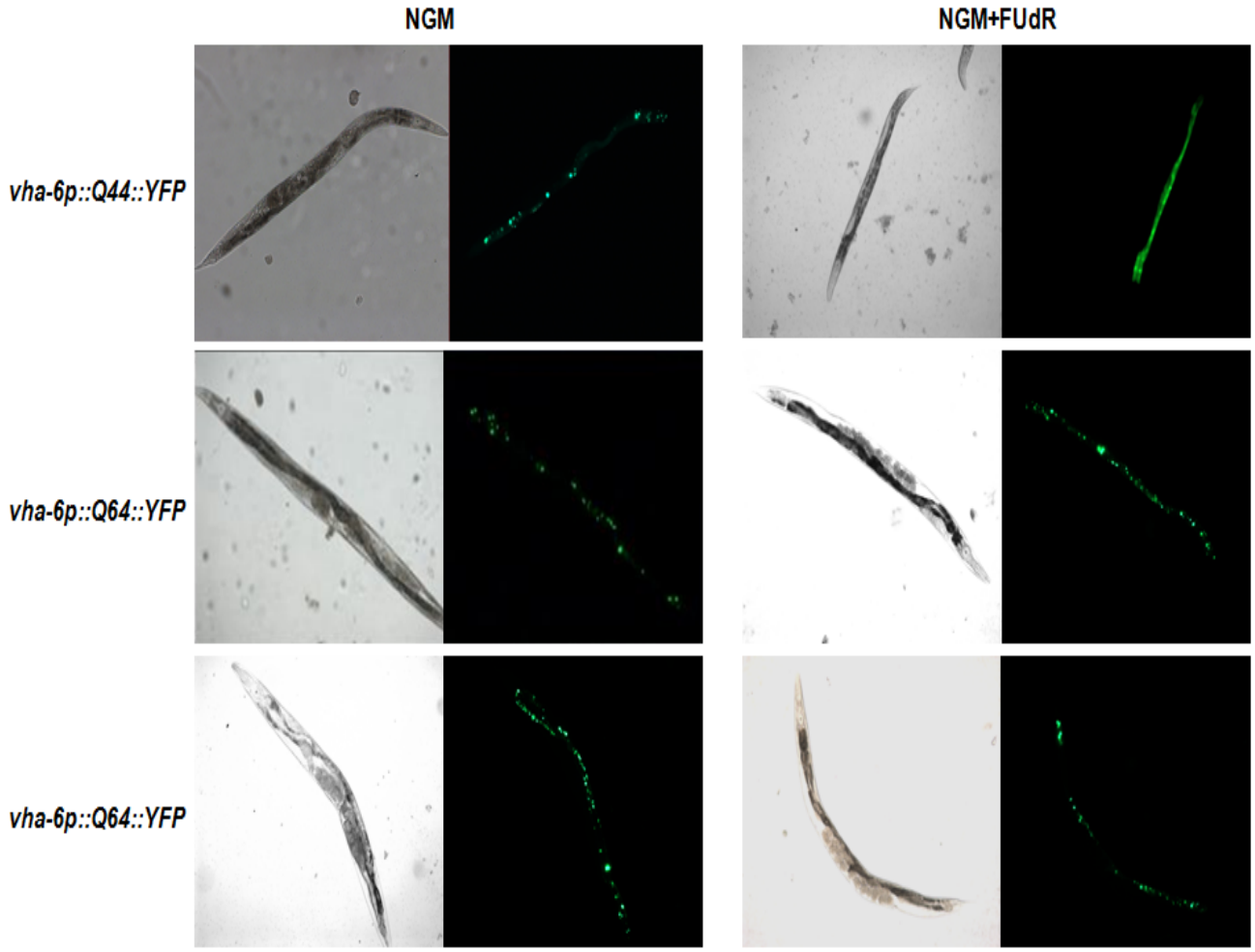


Figura 9: Padrão de expressão PoliQ::YFP dos transgênicos *vha-6p::Q44::YFP*, *vha-6p::Q64::YFP* e *vha-6p::Q82::YFP* tratados ou não com FUdR.

Na linhagem *vha-6p::Q44::YFP*, os animais adultos de 1 dia do grupo controle apresentaram uma média de 0,67 agregados poliglutamínicos. O tratamento com FUdR reduziu significativamente este número para 0,09 agregados. Nós verificamos, conforme o esperado, um aumento no número de agregados entre os animais adultos de 1 dia para os animais adultos de 4 dias. Nos animais adultos de 4 dias, o grupo controle apresentou uma média de 19,84 agregados PoliQ, enquanto que os animais tratados com FUdR apresentaram uma redução significativa do número médio de agregados para 13,06. Com a progressão do envelhecimento, os adultos de 8 dias do grupo controle apresentaram, em média, 42,39 agregados, e aqueles tratados com FUdR apresentaram uma diminuição significativa no número de agregados, para uma média de 30,83 agregados (Figura 10A).

A mesma tendência foi observada na linhagem *vha-6p::Q64::YFP* (Figura 10B). Nos adultos de 1 dia do grupo controle, verificamos uma média de 16,87 agregados PoliQ. O tratamento com FUdR dos animais dessa mesma idade reduziu significativamente o número destes agregados para 12,08. Adultos de 4 dias do grupo controle apresentavam, em média, 38,21 agregados, e, novamente, a indução da esterilidade foi capaz de reduzir significativamente este número para 31,06. Já os animais adultos de 8 dias do grupo controle possuíam, em média, 64,48 agregados PoliQ, enquanto os tratados com FUdR possuíam 44,82 agregados PoliQ, redução que se mostrou novamente significativa (Figura 10B).

A linhagem *vha-6p::Q82::YFP* também apresentou redução significativa no número de agregados de adultos de 1 e 4 dias, quando tratados com FUdR. Enquanto o grupo controle apresentou uma média de 47,87 e 100,6 agregados nas idades adulto de 1 dia e 4 dias, respectivamente, o tratamento com FUdR reduziu significativamente este número para 39,50 e 83,08, respectivamente. Já os animais adultos de 8 dias não tratados apresentaram uma redução no número de agregados quando comparados aos adultos de 4 dias. Os animais do grupo controle apresentaram uma média de 47,29 agregados, e, nestes animais, o tratamento com FUdR não foi capaz de alterar o padrão de agregação, e os animais apresentaram uma média de 54,29 agregados PoliQ (Figura 10C).

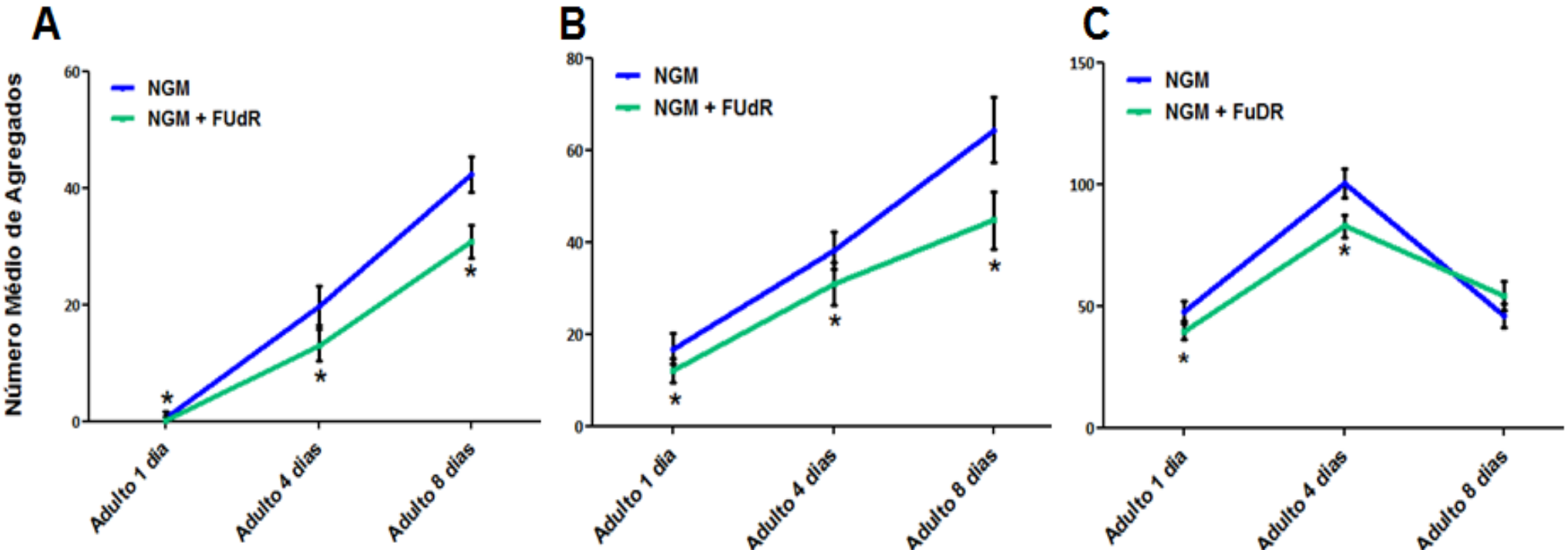


Figura 10: Efeito do tratamento com FUdR no número médio de agregados proteicos nos animais *vha-6p::44::YFP* (A)*;* *vha-6p::64::YFP* (B) e *vha-6p::82::YFP* (C) nas idades adulto de 1, 4 e 8 dias.*p<0,05.

Em conjunto estes resultados sugerem que parte da energia direcionada ao esforço reprodutivo pode afetar a quantidade de energia gasta para a manutenção de outros processos celulares essenciais, no caso deste projeto, a proteostase.

4.2. Análise do papel de SKN-1 sobre a ativação dos sistemas proteolíticos

SKN-1 está envolvido em vias de longevidade e resistência ao estresse em *C. elegans*. Dados mais recentes indicam que este fator de transcrição também participa de vias de degradação de proteínas. Já foi demonstrado que SKN-1 ativa diversos genes relacionados à agregação proteica. Ao comparar esses dados durante a revisão bibliográfica, obsevamos que treze genes envolvidos na agregação proteica, são também ativados por SKN-1 (Figura 6), sendo eles os genes *atp-5, vha-6, vha-8, vha-12, vha-13, pas-4, pas-6, pbs-2, pbs-3, pbs-4, rpt-5, fah-1* e *nekl-1*. Neste projeto, nós também avaliamos o envolvimento de SKN-1 na degradação proteica através da análise: 1) da expressão de genes; 2) da atividade proteolítica dependente de ATP-Ubiquitina e 3) da análise de padrão de agregação poliglutamínica.

4.2.1 Efeito do *knockdown* de SKN-1 sobre a expressão de genes de degradação proteica

4.2.1.1. Escolha do gene de referência endógena

Após confirmar a especificidade e eficiência de todos os genes, nós verificamos qual seria o gene mais adequado para ser usado como referência endógena para as amostras estudadas neste projeto. O gene ideal para a referência endógena é o que apresenta menores variações nos seus níveis de expressão todas as condições analisadas. Dos doze genes testados, o gene *csq-1* apresentou os níveis de expressão mais aproximados em todas as condições, evidenciado pelo ciclo no qual o padrão fluorescente é detectado na reação de qPCR (Ct). Este mesmo gene, também por apresentar um desvio padrão dos CTs menor do que os outros em todas as condições

foi o gene escolhido para ser utilizado como referência endógena no presente trabalho. A tabela 3 apresenta os resultados de seis dos doze genes candidatos à referência endógena.

4.2.1.2. Análise da expressão dos genes da subunidade catalítica/regulatória 20S do proteassoma

Dentre seis genes que codificam para subunidades proteassômicas, verificamos que apenas a expressão de *pbs-4* foi significativamente menor nos animais N2;*skn-1(RNAi)*. Os animais *daf-16(mu86);skn-1(RNAi)* apresentaram os níveis de *pbs-4* aumentados em relação aos animais N2*;skn-1(RNAi)*. (Figura 11). Os mutantes *daf-16(mu86)* apresentam expressão de *pbs-3* aumentada, enquanto animais N2*;skn-1(RNAi)* apresentaram os níveis de expressão deste mesmo gene reduzidos, quando comparados ao mutante *daf-16(mu86)*, embora não em relação aos animais do grupo *controle(RNAi)*. Já em animais *daf-16(mu86);skn-1(RNAi)*, a expressão de *pbs-3* apresentou um aumento em relação aos animais N2*;skn-1(RNAi)*. Também foi possível verificar a diminuição da expressão do gene *pbs-4* em animais N2*;skn-1(RNAi)*, quando comparados ao grupo controle.

Tabela 3: Valores de C_T para os candidatos à referência endógena

Gene	*controle(RNAi)*	*daf-16(mu86);Controle(RNAi)*	N2;*skn-1 (RNAi)*	daf-16(mu86);skn-1 (RNAi)
csq-1	23,008 ± 1,000	23,24 ± 0,338	22,709 ± 0,989	23,355 ± 0,124
act-2	25,945 ± 2,431	26,814 ± 1,426	34,738 ± 0,741	24,962 ± 1,210
actin	22,068 ± 2,350	24,481 ± 2, 461	23,558 ± 1,872	24,534 ± 1,016
eif-3.C	27,432 ± 0,248	25,2 ± 3,481	24,823 ± 1, 473	23,888 ± 2,007
mdh-1	28,63 ± 0,002	27,22 ± 2,843	30,469 ± 2,301	26,793 ± 1,995
rbd-1	28,776 ± 0,497	25,463 ± 2,013	33,316 ± 1,491	26,213 ± 0,838

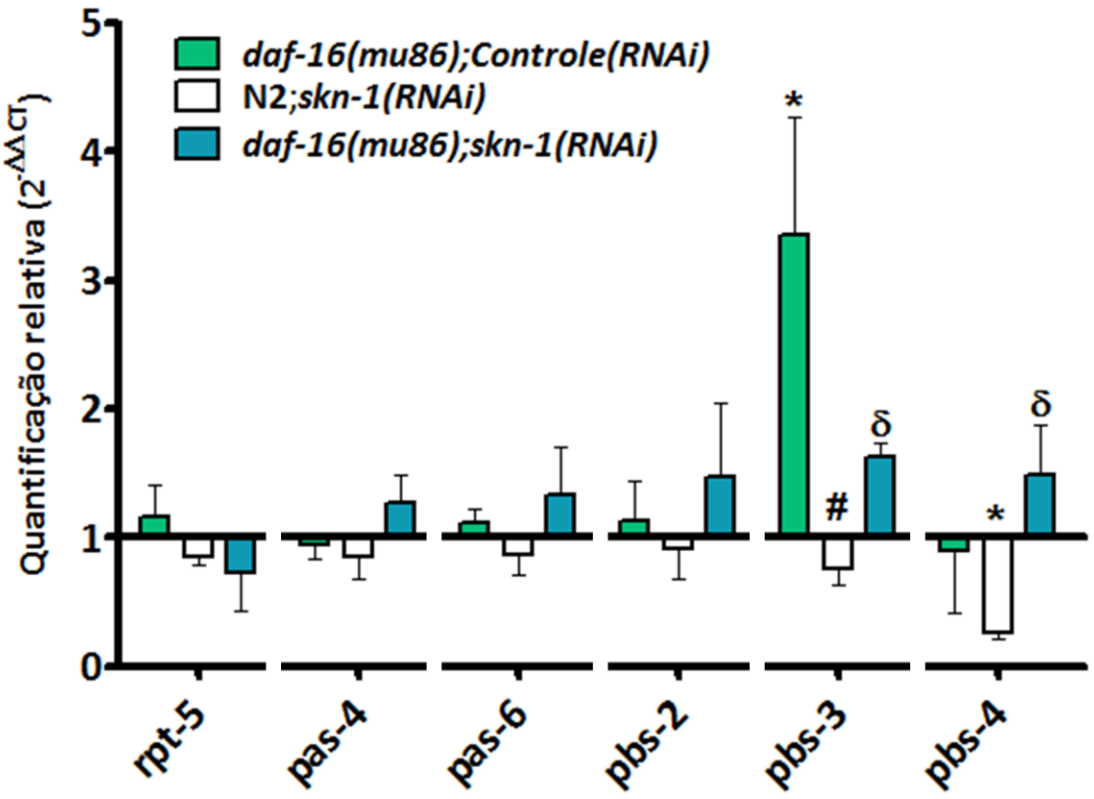


Figura 11: Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos níveis de expressão dos seis genes de degradação proteica da subunidade catalítica/regulatória do proteassoma 20S regulados por SKN-1 nos animais tipo selvagem e mutante *daf-16*(*mu86*), tratados ou não com RNAi para *skn-1*. A normalização foi feita em relação à expressão de *csq-1*(linha padronizada em 1,0) dos animais N2*;controle(RNAi)*. *p<0,05 em relação . #p<0,05 em relação a *daf-16(mu86).* Δ p<0,05 em relação a N2*;skn-1(RNAi)*.

Para todos os demais genes da subunidade catalítica/regulatória 20S do proteassoma, não foram observadas diferenças em suas expressões nos diferentes grupos.

4.2.1.3. Análise da expressão dos genes da subidade H^+-ATPase vacuolar

Já para os genes que codificam para subunidades vacuolares do lisossoma, verificamos mutantes *daf-16(mu86);controle(RNAi)* apresentam níveis de expressão dos genes v*ha-8* e *vha-12* aumentados 242% e 339%, respectivamente, em relação ao animais tipo selvagem do grupo controle. Animais *N2;skn-1(RNAi)*, apesar de não apresentarem alterações na expressão gênica quando comparados ao controle, possuem a expressão de *vha-8* e *vha-12* reduzida em relação aos mutantes *daf-16(mu86)*. Os animais *daf-16(mu86);skn-1(RNAi)* apresentaram níveis de *vha-8* elevados quando comparados aos animais controle e aos animais *N2;skn-1(RNAi)*. (Figura 12)

4.2.1.4. Análise da expressão de outros genes de degradação proteica regulados por SKN-1

Para os demais genes relacionados à degradação proteica regulados por SKN-1, nós verificamos uma diminuição apenas na expressão do gene *fah-1* nos animais *N2;skn-1(RNAi)*. (Figura 13)

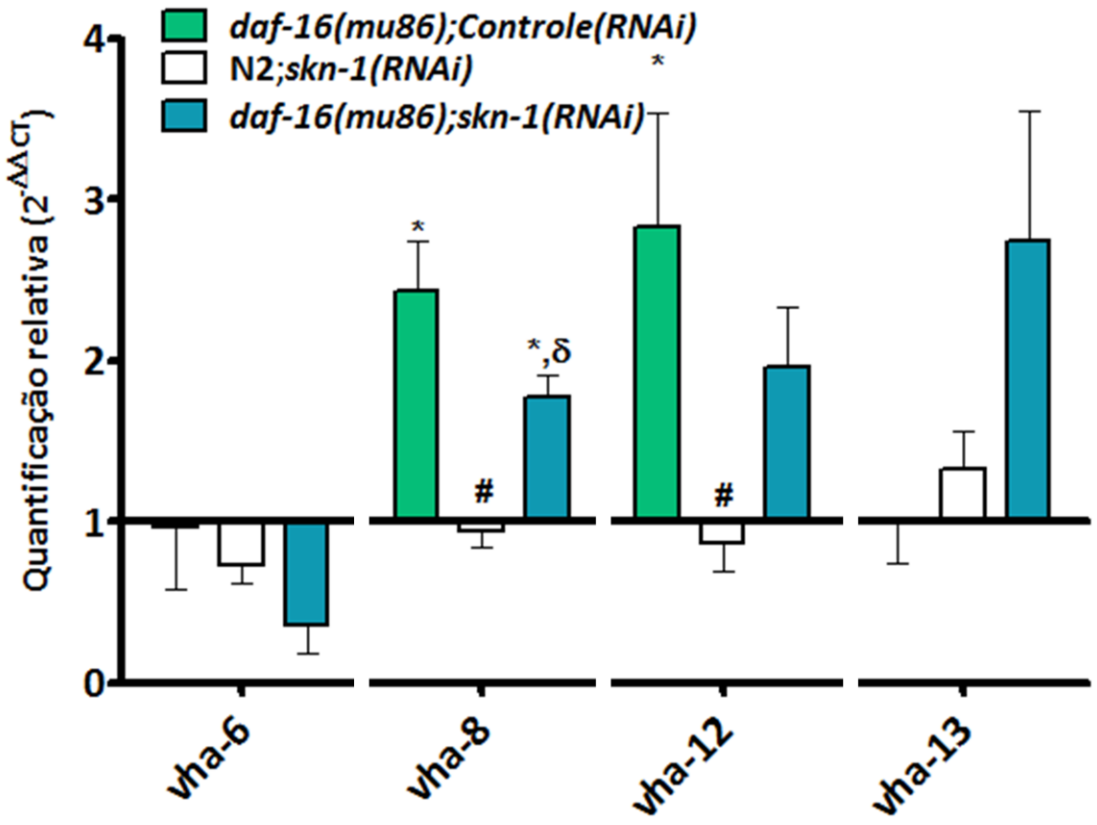


Figura 12: Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos níveis de expressão de quatro genes de degradação proteica da subunidade H^+-ATPase vacuolar regulados por SKN-1 nos animais tipo selvagem e mutante *daf-16*(*mu86*), tratados ou não com RNAi para *skn-1*. A normalização foi feita em relação à expressão de *csq-1*(linha padronizada em 1,0) dos animais *N2;Controle(RNAi)*. *p<0,05. #p<0,05 em relação a *daf-16(mu86);Controle(RNAi).* δp<0,05 em relação a *N2;skn-1(RNAi)*.

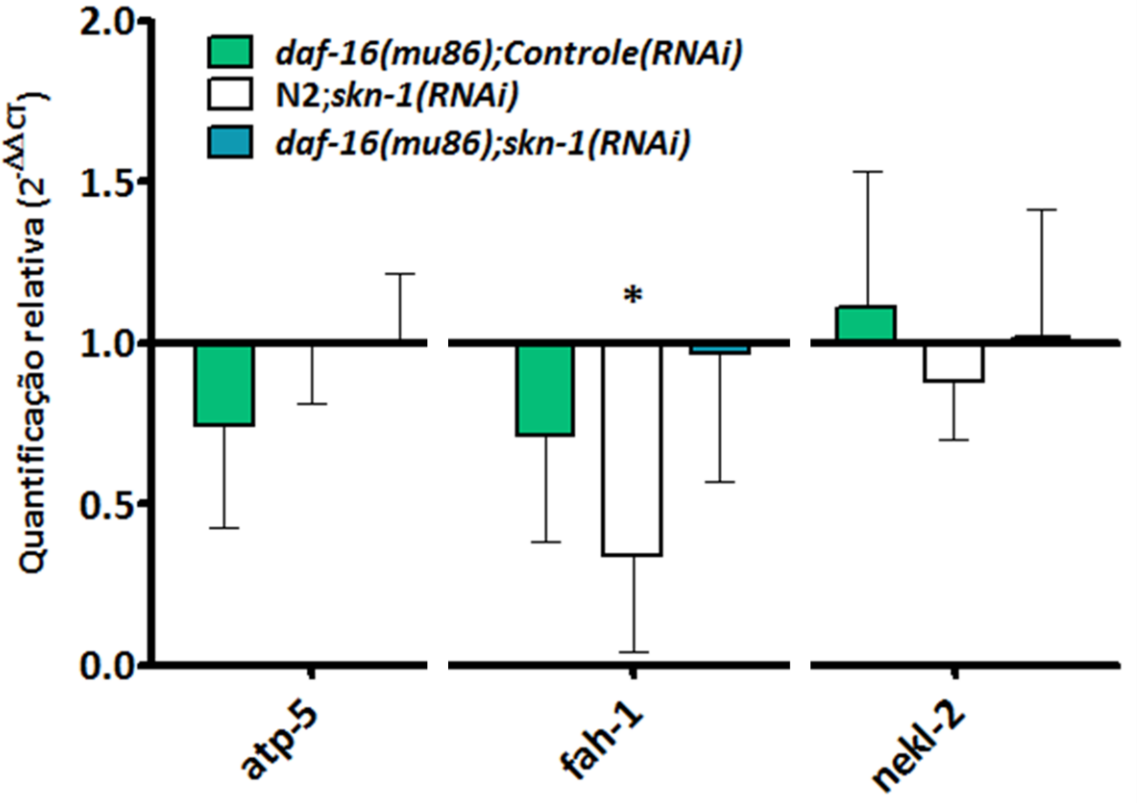


Figura 13: Quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos níveis de expressão de quatro genes envolvidos em outras vias de degradação proteica regulados por SKN-1 nos animais tipo selvagem e mutante *daf-16*(*mu86*), tratados ou não com RNAi para *skn-1*. A normalização foi feita em relação à expressão de *csq-1*(linha padronizada em 1,0) dos animais *N2;Controle(RNAi)*. *p<0,05.

4.2.2. Efeito do *knockdown* de SKN-1 sobre a atividade proteolítica dependente de ATP-ubiquitina e do proteassoma

Outra estratégia adotada para demonstrar o envolvimento do fator de transcrição SKN-1 na degradação proteica foi quantificar a atividade proteassômica em animais tipo selvagem e em mutantes *daf-16* tratados ou não com *skn-1(RNAi)*. Para confirmar a qualidade do extrato proteico bruto utilizamos MG-132 como inibidor específico, e ATP como ativador da atividade proteassômica. A faixa esperada de inibição da atividade proteolítica por MG-132 é de aproximadamente 80%, enquanto a ativação por ATP é de aproximadamente 60% (Lee & Goldberg, 1988). Durante a padronização, foi possível verificar essas taxas de inibição e ativação (Figura 14), indicadores de uma extração bruta de proteínas bem-sucedida. Após essa verificação, utilizamos apenas o MG-132, uma vez que sua taxa de inibição foi satisfatória e sua atividade é específica para proteassoma, enquanto o ATP, apesar de mostrar uma taxa de ativação mais efetiva atua como um ativador inespecífico.

Ao realizar os experimentos, subtraímos o valor encontrado da atividade proteassômica na presença de MG-132 daquela encontrada no extrato bruto, obtendo a medida da atividade proteassômica. Estabelecemos então a atividade relativa do proteassoma, calculando a razão dos valores encontrados em cada grupo em relação ao grupo controle. Nos animais *N2;skn-1(RNAi)* estágio L4, observamos uma redução de 69% em relação ao grupo controle, enquanto nos animais *daf-16(mu86);skn-1(RNAi)*, houve redução de 64% (Figura 15).

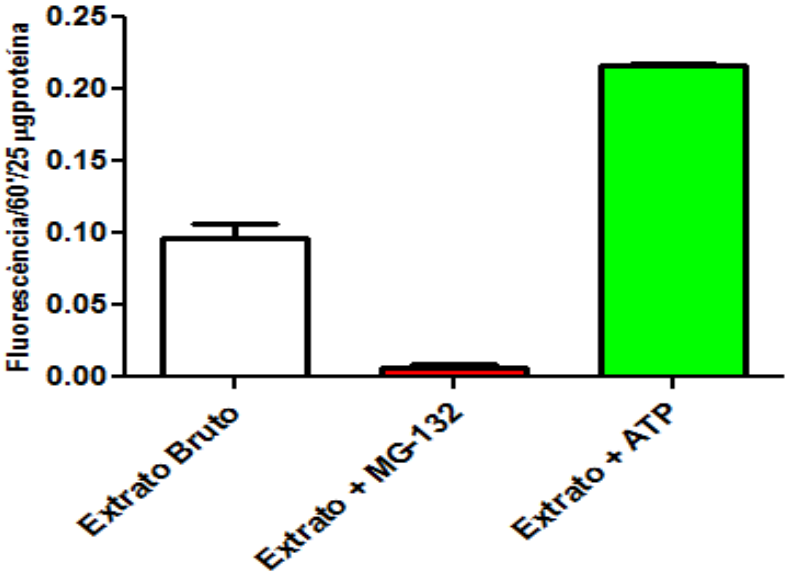


Figura 14: Taxas de inibição e ativação proteassômica obtidas durante a padronização dos ensaios

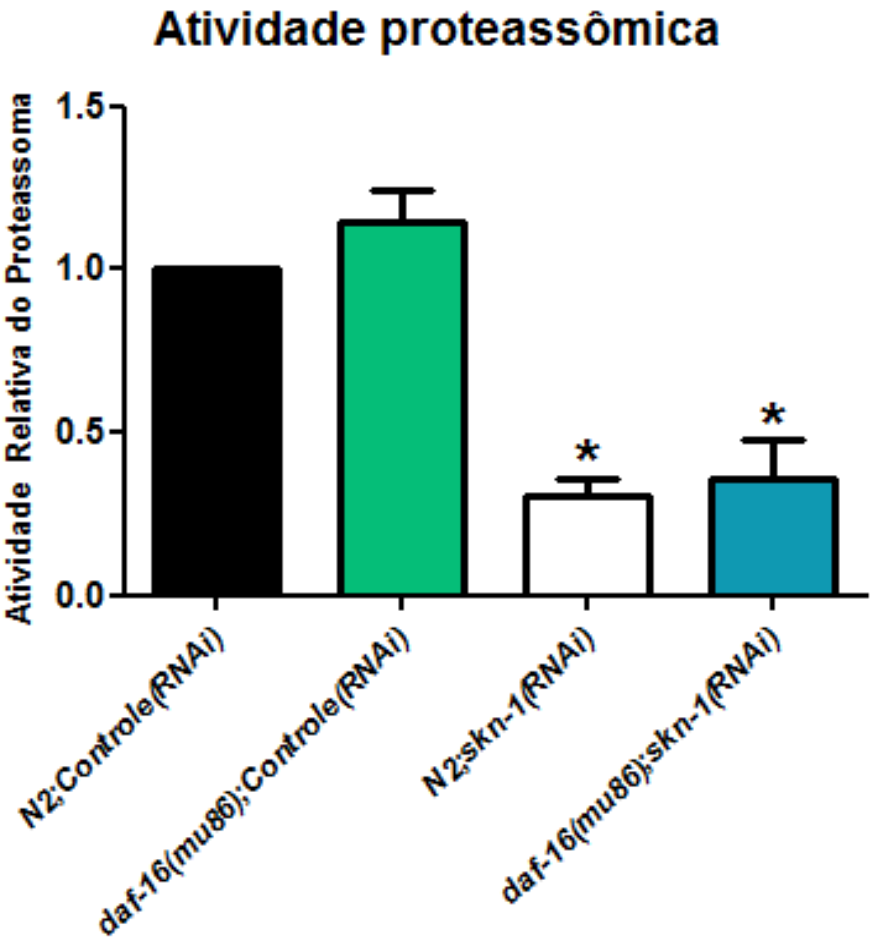


Figura 15: Efeito do RNAi para *skn-1* na atividade proteolítica exógena em animais N2 e mutantes *daf-16(mu86)*. *p<0,05. Colocar itálico nas legendas do eixo do X

organismo. Por isso, resolvemos investigar a participação dos sistemas proteolíticos – lisossoma e proteassoma – e de outro fator de transcrição – no caso, DAF-16 – , em conjunto com a inibição de SKN-1 na degradação de agregados poliglutamínicos no *C. elegans.*

Apesar desta redução da atividade proteassômica nos animais *skn-1(RNAi)*, Pereira (2012) observou uma redução no número de agregados nos animais de 8 dias *vha::Q82::YFP* tratados com *skn-1(RNAi).* Para verificar se a redução do número de agregados nestes animais está correlacionada com um aumento da atividade proteassômica nós analisamos a atividade proteassomica diretamente nestes animais transgênicos. Os resultados mostram que os animais N2;*skn-1(RNAi)* adultos de 8 dias apresentam uma atividade proteassomica signficativamente reduzida em comparação com animais N2*;controle(RNAi)* de maneira semelhante a observada nos animais adultos de 1 dia (Figura 16). Já nos animais adultos de 8 dias N2*:vha-6::Q82* tratados com *skn-1(RNAi),* a atividade proteassômica destes não é diferente dos mesmos transgênicos tratados com *controle(RNAi)* (Figura 16). Estes resultados indicam que nos animais transgênicos *vha-6p::Q82::YFP* adultos de 8 dias a inibição de SKN-1 não altera a atividade proteassomica sugerindo a existência de outros mecanismos compensatórios para aumentar a atividade proteassômica e impedir a formação de agregados poliglutamínicos nestes animais.

4.3. Análise do papel compensatório de outros mecanismos na degradação proteica nos animais *vha-6::Q82*

SKN-1 não é o único fator de transcrição envolvido na degradação proteica em *C. elegans*. DAF-16 também promove longevidade e promove a redução na agregação PoliQ. Além disso, conforme dito anteriormente, o proteassoma não é o único sistema responsável por eliminar proteínas defeituosas ou tóxicas do organismo. Por isso, resolvemos investigar a participação: 1) dos sistemas proteolíticos (lisossoma e

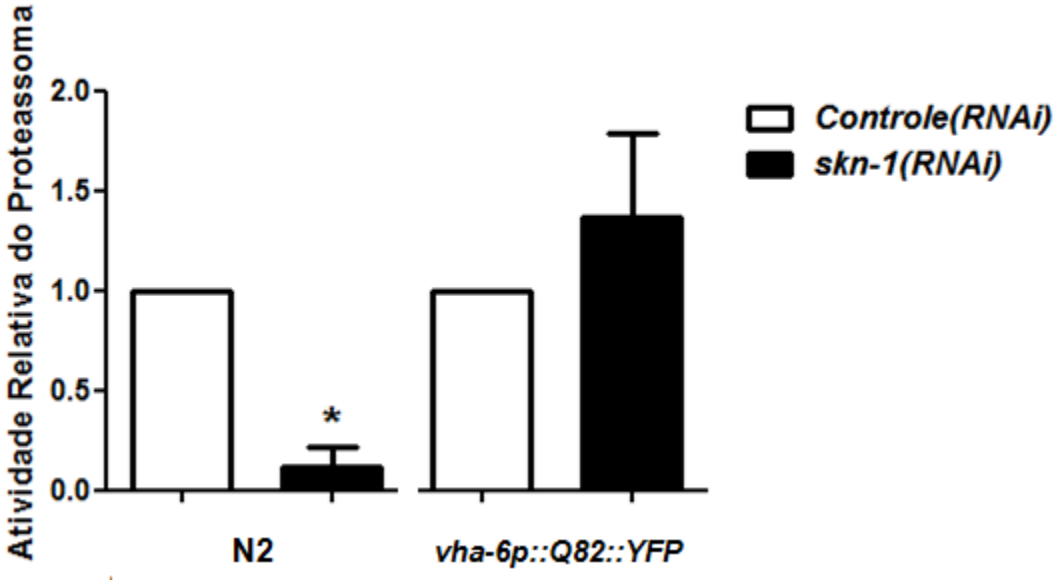


Figura16: Efeito do RNAi para *skn-1* na atividade proteolítica exógena em animais N2 (A) e *vha-6p::Q82::YFP* (B).

proteassoma) e 2) do fator de transcrição DAF-16 na formação de agregados poliglutamínicos nos animais *vha-6p::Q(n)::YFP.*

4.3.1. Efeito da inibição do proteassoma e do lisossoma no padrão de formação de agregados poliglutamínicos

Para avaliar se a diminuição na formação de agregados nos animais *vha-6p::Q82::YFP* adulto de 8 dias tratados com *skn-1(RNAi)* depende da atividade proteassômica ou lisossômica, nós analisamos o número de agregados poliglutaminicos nestes animais com a inibição destes dois sistemas proteolíticos. O *knockdown* de *skn-1*, conforme o esperado, reduziu o número médio de agregados PoliQ dos animais quando comparado aos grupos controle (Figura 17). No entanto, a inibição dos sistemas proteolíticos, tanto proteassomal quanto lisossomal, provocou um aumento significativo na formação de agregados nos animais *skn-1(RNAi)*. Enquanto animais que não tiveram nem o lisossoma nem o proteassoma inibidos apresentavam, em média, 23,57 agregados, os animais tratados com MG-132 apresentaram 40,65 e os tratados com cloroquina apresentaram 34,24 agregados PoliQ. Apesar disso, os animais do grupo *controle(RNAi)* não apresentaram diferenças significativas no padrão de agregação PoliQ. Os animais controle, os que foram tratados com MG-132 e os que receberam tratamento com cloroquina apresentaram médias de 40,96, 47,31 e 41,11 agregados, respectivamente.

4.3.2. Análise dos efeitos da inibição simultânea de *skn-1* e *daf-16* no padrão de formação de agregados poliglutamínicos

Nós também avaliamos se o fator de transcrição DAF-16 estaria atuando de forma compensatória nos animais *vha-6p::Q(n)::YFP.* Para isto nós analisamos o padrão de agregados poligutaminicos nestes animais, submetidos a duplo RNAi para *skn-1* e *daf-16.* Após a inibição simultânea de *skn-1* e *daf-16*, verificamos que o número

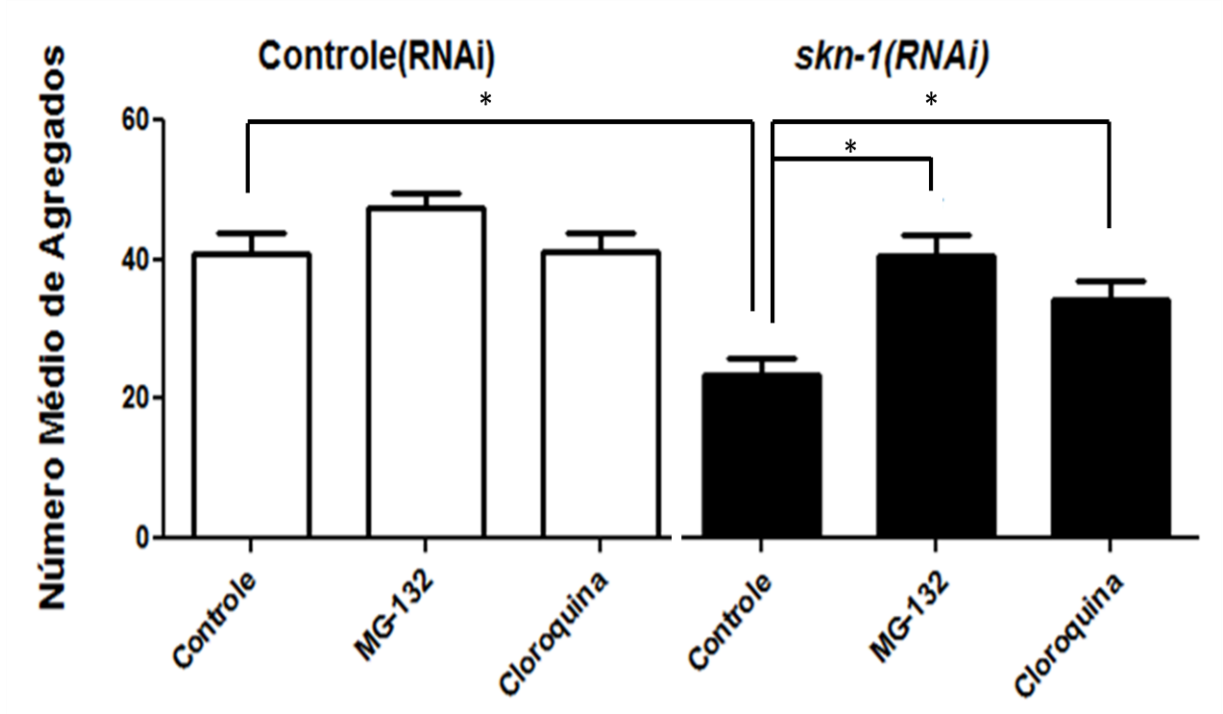


Figura 17: Efeito dos inibidores do proteassoma (MG-132) e lisossoma (Cloroquina) no padrão de formação de agregados PoliQ em animais *vha::6p::Q82::YFP* adultos de 8 dias tratados com RNAi para *skn-1.**p<0,05.

de agregados PoliQ no intestino aumenta significativamente nos animais *vha-6p::Q44::YFP* adultos de quatro e oito dias(Figura 18A): enquanto os animais do grupo controle apresentavam média de 39,76 e 31,36 agregados nas idades respectivas de 4 e 8 dias, os tratados com o duplo RNAi apresentaram 55,18 e 50,75 agregados, respectivamente. Os animais *vha-6p::Q64::YFP* não apresentaram diferença significativa no número dos agregados nos dois grupos. (Figura 18B). Os animais *vha-6p::Q82::YFP* adultos de um dia também apresentaram um aumento de 12,58 agregados do grupo controle para 21,56 agregados para os animais tratados com o duplo RNAi. (Figura 18C). Estes dados sugerem que na ausência de SKN-1, DAF-16 parece estar ativando o sistema proteolítico nos animais *vha-6p::Q(n)::YFP* de maneira compensatória à ausência de *skn-1*.

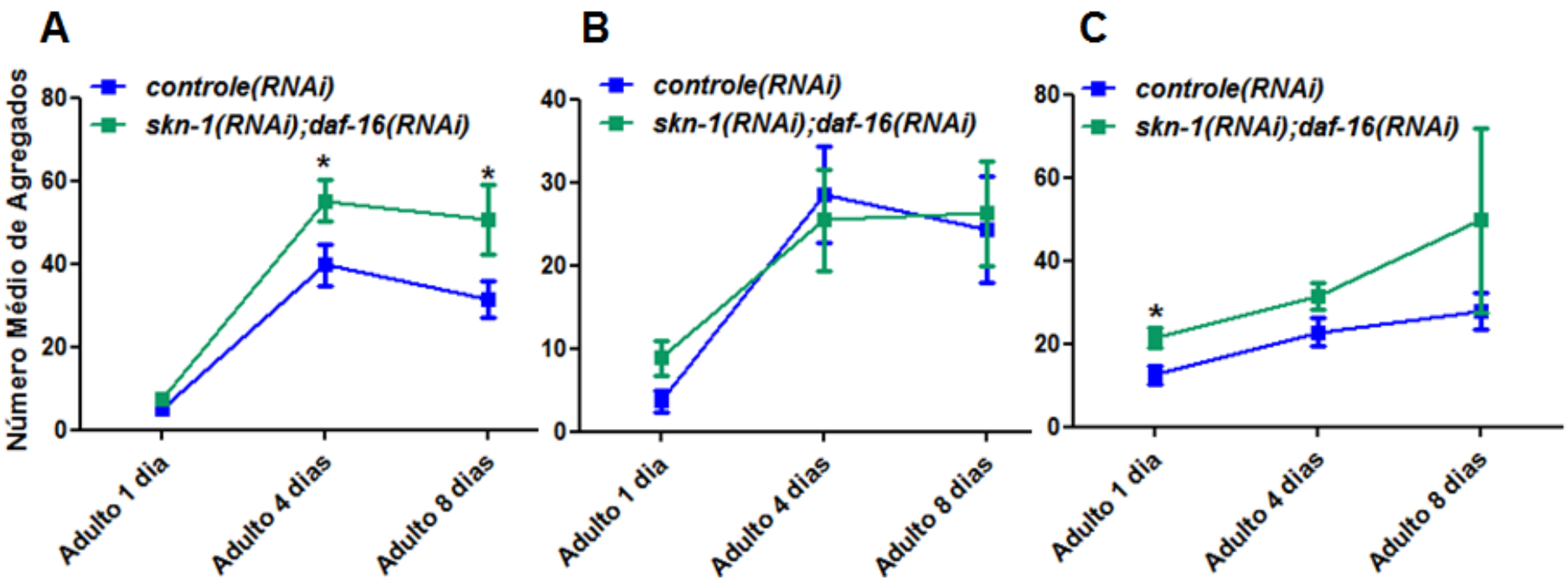


Figura 18: Efeito da inibição simultânea de *skn-1* e *daf-16* no número médio de agregados proteicos nos animais *vha-6p::44::YFP* (A)*; vha-6p::64::YFP* (B) e *vha-6p::82::YFP* (C) nas idades adulto de 1, 4 e 8 dias.*p<0,05. Média de dois experimentos

5. Discussão

5.1. Correlação entre envelhecimento, esforço reprodutivo e agregação poliglutamínica

Pereira (2012) observou que o número médio de agregados PoliQ no intestino dos animais *vha-6::PoliQ(n)::YFP* declina com o envelhecimento. Nas idades mais avançadas, e especialmente quanto maior é o número de repetições poliglutamínicas mais acentuada é a redução do número de agregados após o final do período reprodutivo (Pereira, 2012). Já foi sugerido que a toxicidade induzida por PoliQ está relacionada ao tamanho dos agregados. Agregados menores tendem a causar mais efeitos tóxicos, enquanto placas maiores de agregados são menos tóxicas (Williams & Paulson, 2008). Estas informações nos levaram a questionar se a diminuição do número de agregados nos intestinos de animais em idades avançadas e em condições de *knockdown* de *skn-1* e *daf-16* estaria ligada ao fato de apresentarem toxicidade diferente, graças a um aumento ou diminuição em sua área.

O fato de não termos observado diferenças nas áreas dos agregados PoliQ no intestino de animais transgênicos *vha-6p::Q82::YFP* entre os grupos *controle(RNAi), skn-1(RNAi)* e *daf-16(RNAi)* sugere que para estes animais não existe um mecanismo compensatório entre a redução do número de agregados pelo seu tamanho. Como esta análise só foi realizada nos animais *vha-6p::Q82::YFP* adultos de 8 dias, seria interessante verificar o tamanho da área dos agregados em diferentes estágios do desenvolvimento do animal, uma vez que a formação de placas de agregados maiores ou o aumento da toxicidade causado pela diminuição do tamanho dos mesmos possa ocorrer de maneira gradativa durante o desenvolvimento e ciclo de vida do animal.

Além disso, nossos resultados sugerem que na ausência do esforço reprodutivo ocorre um redirecionamento energético a fim de manter a integridade de outros sistemas fisiológicos e das células somáticas, dentre eles, a proteostase. Uma vez que a reprodução não é possível, a energia que seria gasta neste processo é investida em outros, para que o animal assegure sua própria sobrevivência. De fato, já foi sugerido que em condições nas quais as condições para sobrevivência da prole não sejam ideais, os animais retardam seu período reprodutivo e apresentam uma longevidade maior, como nos casos de restrição calórica, já observado em leveduras,

camundongos, *Drosophila* e *C. elegans*. (Goodrick *et al*., 1990; Mair *et al.*, 2005; Masoro, 2005; Dilova *et al*., 2007; Mair & Dillin, 2008; Piper & Bartke, 2008; Skorupa *et al*., 2008; Onken & Driscoll, 2010).

O tratamento com FUdR, para inibir a reprodução em *C. elegans*, é utilizado em diversas análises de sobrevivência e longevidade (Hosono, 1978; Gandhi *et al*., 1980; Van Raamsdonk & Hekimi, 2011; Aitlhadj, 2010). Recentemente, foi sugerido que essa droga aumenta os níveis de expressão de fatores *heat-shock,* modula a capacidade de enovelamento proteico e aumenta a função de vias protetoras antes, durante e depois do período reprodutivo (Feldman *et al.*, 2014). No entanto, estes mesmos autores sugerem que essa melhora nos níveis de proteção ao dano proteico se dá de maneira independente da inibição da produção de células da linhagem germinativa, uma vez que resultados semelhantes foram observados em mutantes que não apresentam linhagem germinativa ou que apresentam disfunções gonadais, o que sugere que o FUdR module a proteostase por meio de uma via independente da produção de células germinativas.

Contudo, a reprodução também parece exercer influência sobre os mecanismos envolvidos em longevidade e degradação proteica no *C. elegans*. Já foi demonstrado que, em *C. elegans* mutantes que carregam alelos sensíveis à temperatura para a reprodução (*glp-1*), a atividade proteolítica do proteassoma de forma independente do tratamento com FUdR (Vilchez *et al*., 2012). O mecanismo pelo qual isso ocorre aparenta ser graças a um aumento na expressão de genes relacionados a subunidades proteassomais (sobretudo *rpn-6.1*), regulados por DAF-16 (Vilchez *et al*., 2012).

Nossos resultados demonstraram uma diminuição no número de agregados no intestino de animais *vha-6::Qn::YFP* tratados com FUdR em diferentes idades, o que corrobora o efeito protetor da droga na manutenção da proteostase. No entanto, o mecanismo pelo qual a redução no número destes agregados ocorreu ainda não foi caracterizado, o que abre novas possibilidades de investigação.

5.2. O papel de SKN-1 sobre a ativação dos sistemas proteolíticos

5.2.1. Efeito do *knockdown* de *skn*-1 sobre a expressão de genes de degradação proteica

SKN-1 regula diversos genes relacionados à degradação proteica em condições normais (Oliveira *et al.*, 2009). Dentre estes genes, foi possível identificar treze que participam diretamente da supressão de agregados poliglutamínicos (Nollen *et* al., 2004). Seis destes genes (*rpt-5; pas-3; pas-4; pbs-2; pbs-3* e *pbs-4*) codificam para subunidades proteassômicas; quatro (*vha-6; vha-8, vha-12* e *vha-13*) codificam para uma subunidade do sistema lisossomal-autofágico e outros três (*fah-1; nekl-2* e *atp-5)* codificam para outros tipos de degradação promovida por estresses específicos. Sabendo dessa sobreposição, é plausível supor que em condições normais SKN-1 ative genes responsáveis pela degradação de proteínas com enovelamento incorreto e possam influenciar a formação de agregados PoliQ em *C. elegans*.

Os dados obtidos com a análise da atividade proteassômica mostram que, em condições nas quais *skn-1* é menos expresso, a atividade proteassômica é reduzida, o que leva a crer que a expressão de genes que codificam subunidades proteassômicas também possa estar reduzida, uma vez que seis destes genes (*pas-4; pas-6; pbs-2; pbs-3; pbs-4* e *rpt-5)* também são regulados por SKN-1 (Oliveira *et al*., 2009). No entanto, o sistema ubiquitina-proteassoma não é o único responsável por degradar agregados proteicos e proteínas defeituosas. Venkatraman *et al*., em 2004, observaram que o proteassoma é capaz de degradar apenas os agregados e fragmentos de tamanho menor, o que sugere a participação de outras vias metabólicas no processo de degradação.

Além dos genes que codificam para subunidades proteassômicas, *skn-1* também regula quatro genes de subunidades lisossômicas (*vha-6, vha-8, vha-12* e *vha-13)* e outros três genes relacionados à outros tipos de degradação (*fah-1; nekl-2* e *atp-5)* (Oliveira *et al.,* 2009) que aumentam o número de agregados poliglutaminicos (Nollen et al., 2004). Recentemente, foi demonstrado que SKN-1 é pelo menos parcialmente necessário para a modulação da longevidade por meio de alvos da via TOR (alvo da

rapamicina), responsável pela autofagia (Robida-Stubbs *et al*., 2012), além de desempenhar um papel importante na homeostase citosólica por meio de resposta ao estresse do retículo endoplasmático (Glover-Cutter *et al.*, 2013), o que fez com que nossa atenção também se voltasse para estes outros genes regulados por SKN-1 também envolvidos na degradação proteica.

Nossos resultados demonstraram que o *knockdown* de *skn-1* faz com que a expressão de apenas um gene codificante para subunidades proteassômicas (*pbs-4*) e o da fumarilacetoacetase (*fah-1)* fossem reduzidas quando comparado ao grupo *controle(RNAi)*. Li *et al*., em 2011, também verificaram uma redução na expressão dos genes do proteassoma sob condições de ausência de SKN-1. No entanto, animais *daf-16(mu86)* tiveram expressões de *pbs-3, vha-8* e *vha-12* aumentadas em relação ao controle e também aos animais *N2;skn-1(RNAi),* e também apresentaram níveis aumentados de expressão de *pbs-3, pbs-4* e *vha-8*, quando comparados aos animais *N2;skn-1(RNAi)*, o que pode sugerir um mecanismo compensatório que envolva *daf-16* quando *skn-1* tem sua expressão reduzida.

Juntos, estes dados sugerem que SKN-1 contribui, embora não seja aparentemente essencial para a expressão de genes que codificam para diversos sistemas participantes na degradação proteica.

5.2.2. Efeito do *knockdown* de SKN-1 sobre a atividade proteolítica dependente de ATP-ubiquitina e do proteassoma

O fator de transcrição SKN-1 está envolvido em diversas funções metabólicas, sendo uma de suas principais a defesa contra o estresse oxidativo. Estudos já o apontaram como fator importante em vias que promovem longevidade e de resposta ao dano proteico (Oliveira *et al.*, 2009; Li *et al.,* 2011; Wang *et al*., 2011). O fato de SKN-1 regular treze genes relacionados à degradação proteica (Oliveira *et al*., 2009) torna interessante seu estudo para investigar seu papel nos processos de *turnover* proteico, uma vez que a proteostase é vital para a manutenção das funções do organismo e proteção contra alterações ambientais. O desequilíbrio dessa proteostase está

correlacionado ao desenvolvimento de diversas desordens neurodegenerativas (Balch *et al*., 2008).

Seis dos treze genes regulados por SKN-1 analisados neste trabalho são responsáveis por codificar subunidades proteassômicas. Além disso, o ortólogo de SKN-1 em mamíferos, Nrf1, demonstrou modular uma resposta compensatória, na qual a inibição do proteassoma faz com que os genes que codificam para as subunidades proteassômicas sejam ativados (Kraft *et al*., 2006; Radhakrishnan *et al*., 2010; Steffen *et al*., 2010). Além disso, a inibição de fatores de elongação e tradução de proteínas ativa SKN-1, aumentando a expressão de seus genes alvo (Li *et al*., 2011). De posse destas informações, decidimos investigar o papel de SKN-1 sobre a atividade proteolítica do proteassoma.

Em nossos ensaios, utilizamos o MG-132 como inibidor da atividade do proteassoma. O MG-132 consiste em um peptídeo aldeído (Cbz-Leu-Leu-Leucinal) sintético, considerado por muitos o mais eficiente inibidor do proteassoma em culturas de células ou tecidos (Kisselev & Goldberg, 2001). Ele interfere no estado de transição da atividade quimiotripsina do sistema ubiquitina-proteassoma, penetrando rapidamente na célula com um mecanismo de ação reversível. Além disso, o MG-132 é capaz de inibir catepsinas e calpaínas (Lee & Goldberg, 1998). Corroborando nossa hipótese, a adição de MG-132 resultou numa redução significativa da atividade proteolítica em comparação ao extrato proteico na ausência deste inibidor (Figura 14).

Em nossos experimentos de medida de atividade proteolítica exógena, nós verificamos que o *knockdown* de SKN-1 causou uma redução significativa de 69% na atividade proteassômica em comparação com o grupo controle. Já foi descrito que a inibição de SKN-1/Nrf reduz de forma modesta a atividade do proteassoma, no entanto, essa redução apresentou um efeito impactante na atividade do sistema ubiquitina-proteassoma de células intestinais *in vivo* (Li *et al*., 2011). Apesar de animais mutantes *daf-16(mu86)* não apresentarem alteração em sua atividade proteassômica, esta linhagem, quando tratada com o RNAi para *skn-1*, também apresentou uma atividade proteassômica reduzida, o que sugere que SKN-1 possa ter uma maior influência sobre

a atividade proteassômica do que outro fator de transcrição previamente conhecido por promover aumento na degradação de agregados poliglutamínicos (Nollen *et al*., 2004).

Ao avaliar a atividade proteassômica de animais adultos de 8 dias, percebemos que a mesma continua reduzida em animais N2;*skn-1(RNAi)*. Era de se esperar que esta tendência se repetisse nos animais *vha-6p::Q82::YFP*. No entanto, verificamos que a atividade desses animais, tratados com RNAi para *skn-1* não difere dos animais do grupo controle. Este fato nos causou surpresa, embora ofereça uma possível explicação para o fato do número de agregados ser menor em animais *vha-6p::Q82::YFP*;*skn-1(RNAi)*.

No entanto, a causa dessa maior atividade proteassômica na ausência de *skn-1* nestes animais ainda não foi elucidada. Já foi sugerido que, particularmente na linhagem *vha-6p::Q82::YFP*, a formação de agregados poliglutamínicos ocorre de forma mais rápida e em estágios iniciais do desenvolvimento do animal. O RNAi de genes que codificam para uma enzima de ubiquitinação, *ubc-22* e *uev-1*, acelerou ainda mais o processo de formação destes agregados no intestino (Skibinski & Boyd, 2012). Outros autores sugerem que a formação de agregados poliglutamínicos é afetada por no mínimo duas etapas distintas de ubiquitinação: uma na qual o número de agregados é reduzido, mas seu tamanho aumenta, e outra na qual o número de agregados aumenta, e seu tamanho é reduzido (Howard *et al*., 2007).

5.3. Análise do padrão de formação de agregados poliglutamínicos

Dentre as desordens neurodegenerativas causadas por acúmulo de agregados PoliQ, destaca-se a Doença de Huntington, caracterizada pela repetição de mais de 36 glutaminas na molécula da huntintina (Tabela 1). A doença leva à perda de função e morte celular (Zoghbi & Orr, 2000; Margolis & Ross, 2001). Tais consequências derivam-se da toxicidade adquirida pelas proteínas com maiores expansões poliglutamínicas, o que já foi verificado em outros modelos de estudo, como

camundongos e leveduras (Gusella & Macdonald, 2000; Zohgbi & Orr, 2000; Sherman & Muchowski, 2003).

Em humanos, as desordens poliglutamínicas possuem um limiar tóxico que varia de 31 a 45 repetições CAG. Já em *C. elegans*, o limiar para o surgimento de agregados proteicos está entre 35 e 40 expansões poliglutamínicas. Em animais cuja expressão de 35 ou 40 expansões PoliQ esteja direcionada para a parede muscular, a formação dos agregados tem início após o animal atingir a idade adulta, e progride à medida em que o animal envelhece. Animais com expansões PoliQ maiores apresentavam a formação de agregados desde seus estádios larvais (Morley *et al*., 2004).

Resultados de nosso grupo também nos levaram a questionar o papel de SKN-1 sobre a agregação PoliQ em diferentes tecidos, bem como o padrão de formação destes agregados em diferentes condições.

5.3.1. O papel dos sistemas lisossomal-autofágico e ubiquitina-proteassoma na formação de agregados PoliQ em células intestinais

Proteínas com enovelamento incorreto ou expansões anormais de aminoácidos devem ser degradadas e sintetizadas novamente, para que os processos celulares e metabólicos não sejam prejudicados. Para isso, diversas vias e mecanismos atuam na remoção destas proteínas defeituosas, de formas diferentes. O sistema lisossomal autofágico e o sistema ubiquitina-proteassoma estão entre os principais sistemas de degradação e atuam de maneiras distintas na remoção das proteínas. Enquanto no lisossoma, a molécula é normalmente envolta por um vacúolo e encaminhada para a autofagia (Hamel *et al*., 2004; Martinez-Vicente *et al.,* 2005). A degradação proteassômica envolve a marcação da proteína com moléculas de ubiquitina e seu posterior descolamento para um complexo catalítico regulatório, o proteassoma 26S, em um processo que envolve o gasto de ATP (Ciechanover, 2005; Martinez-Vicente *et al*., 2005)

Neste trabalho, decidimos investigar o papel destes dois principais sistemas de degradação na formação de agregados poliglutamínicos, através do tratamento de animais *vha-6p::Q82::YFP* com MG-132, inibidor da atividade proteassômica, e

cloroquina, inibidora da atividade lisossômica, até que atingissem a idade de adulto de 8 dias (quando o número de agregados apresenta um declínio em relação às idades anteriores) tanto em condições normais quanto sob o *knockdown* de *skn-1*.

Nós observamos que a inibição de *skn-1* foi capaz de reduzir o número médio de agregados, conforme já evidenciado por Pereira, em 2012. Embora a inibição do lisossoma e do proteassoma não tenha apresentado qualquer efeito sobre a formação de agregados poliglutamínicos em condições normais, a inibição destes sistemas em condições de ausência de *skn-1* fez com que o número de agregados aumentasse, tanto quando inibimos o proteassoma, como quando inibimos o lisossoma. Estes dados sugerem que na ausência de *skn-1*, os sistemas de degradação proteassômica e lisossômica estão atuando na formação de agregados proteicos dos animais adultos de 8 dias *vha-6::Q82::YFP*. Ainda, estes resultados fornecem mais um indício de que existe um mecanismo compensatório para controle da formação de agregados nestes transgênicos.

5.3.2. Efeitos da inibição simultânea de *skn-1* e *daf-16* no padrão de formação de agregados poliglutamínicos

Diversas vias metabólicas e outros mecanismos exercem influência sobre a degradação proteica no *C. elegans*. As vias da insulina (IIS), das proteínas *heat-shock* e das sirtuínas promovem um aumento na longevidade através da redução na formação de agregados proteicos (Guarente & Kenyon, 2000; Morris *et al*., 1996; Morley *et al*., 2002; Tissenbaum & Guarente, 2001; Parker *et al*., 2005; Nollen *et al*., 2004; Hsu *et al*., 2003). A via de sinalização SKN-1, descrita inicialmente pela sua participação na defesa contra o estresse oxidativo (Blackwell, 1994; An & Blackwell, 2003), tem ganhado destaque em pesquisas recentes graças a evidências que sugerem seu papel em outras vias metabólicas, dentre elas, a degradação de proteínas (Park *et al*., 2009; Oliveira *et al*., 2009). SKN-1 regula vários genes relacionados à degradação proteica, e ativa conjuntos específicos de genes em resposta à inibição de fatores de tradução e elongação de proteínas, além ter sua atividade modulada por outras vias relacionadas à proteção contra o dano proteico, como a via da mTOR

(Robida-Stubbs *et al*., 2012) e estresse do retículo endoplasmático (Glover-Cutter *et al*., 2013).

Nosso grupo de pesquisa já havia relatado que, na ausência de *skn-1*, a formação de agregados poliglutamínicos em células intestinais é reduzida em diversas idades. A inibição de outro fator de transcrição envolvido na degradação proteica, *daf-16*, sobretudo em animais que expressam expansões maiores de poliglutaminas, também fez com que o número de agregados fosse menor, quando comparado a animais que expressavam este fator de transcrição (Pereira, 2012). Estes resultados nos chamaram a atenção, uma vez que já foi descrito que *daf-16* atua de forma a diminuir a formação de agregados poliglutamínicos. Isso nos levou a acreditar que poderia haver algum mecanismo compensatório que, na ausência de *daf-16* ou *skn-1*, fizesse com que as vias de degradação proteica fossem ativadas, de forma a aumentar a taxa de degradação. Portanto, decidimos investigar se a inibição simultânea de *daf-16* e *skn-1* provocaria alguma alteração no padrão de formação de agregados poliglutamínicos em células intestinais, a fim de verificar se uma via poderia estar compensando a ausência da outra.

Nossos resultados sugerem que, em animais que expressam 44 expansões poliglutamínicas, o número de agregados aumenta significativamente nas idades de quatro e oito dias em condições nas quais *daf-16* e *skn-1* são inibidos. Enquanto o padrão de agregação nos animais que expressam 64 expansões PoliQ não diferiu, animais que expressam 82 expansões PoliQ e tratados com o duplo RNAi para *skn-1* e *daf-16* apresentaram um número médio de agregados maior do que os do grupo controle apenas na idade de adulto de um dia. Isso sugere que possa haver uma espécie de integração compensatória entre os dois fatores de transcrição no que diz respeito à remoção de proteínas com enovelamento incorreto. No entanto, devemos ressaltar que, durante a realização destes experimentos, não obtivemos o número suficiente de 60 animais para todos os grupos analisados. Com isso, torna-se necessário a realização de experimentos adicionais para uma melhor compreensão da relação entre *daf-16* e *skn-1* na degradação proteica.

6. Conclusões

- A redução do número de agregados no intestino de animais adultos de 8 dias *vha-6::Qn* tratados com RNAi para *skn-1* não está associado à um aumento do tamanho destes.

- A inibição da reprodução através do tratamento com FUdR diminui a formação de remoção de agregados proteicos no intestino dos animais, tanto durante quanto após o período reprodutivo.

- O *knockdown* de *skn-1* diminui a expressão dos genes *pbs-4* e *fah-1* enquanto que O *knockdown* de *daf-16* aumenta a expressão de *pbs-3, vha-8* e *vha-12.*

- O *knockdown* de *skn-1* também diminuiu a atividade proteolítica dependente de ATP-Ubiquitina e do proteassoma em animais tipo selvagem mas não nos animais *vha-6::Q82::YFP* de 8 dias de idade.

- A inibição dos sistemas proteolíticos lisossomais e proteassomais resultou num aumento no número de agregados proteicos no intestino dos animais *vha-6::Q82::YFP* de 8 dias de idade na ausência de *skn-1*.

- A inibição simultânea de *skn-1* e *daf-16* promoveu um aumento na formação de agregados poliglutamínicos nas células intestinais.

- Esses dados sugerem que dos animais *vha-6::Q82::YFP* de 8 dias de idade na ausência de *skn-1* uma via pode atuar de maneira compensatória à ausência da outra no que diz respeito à degradação proteica.

7. Referências Bibliográficas

AITLHADJ, L.; STÜRZENBAUM, S. R. The use of FUdR can cause prolonged longevity in mutant nematodes. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, n. 5, p. 364–5, 2010.

AN, J. H.; BLACKWELL, T. K. SKN-1 links C. elegans mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. **Genes & Development**, v. 17, n. 15, p. 1882–93, 2003.

AN, J. H.; VRANAS, K.; LUCKE, M.; et al. Regulation of the Caenorhabditis elegans oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. **Sciences-New York**, v. 102, n. 45, 2005.

BALCH, W. E.; MORIMOTO, R. I.; DILLIN, A.; KELLY, J. W. Adapting proteostasis for disease intervention. **Science** v. 319, n. 5865, p. 916–9, 2008.

BECH-OTSCHIR, D.; KRAFT, R.; HUANG, X.; et al. COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 7, p. 1630–9, 2001.

BERGER, Z.; RAVIKUMAR, B.; MENZIES, F. M.; et al. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 3, p. 433–42, 2006.

BISHOP, N. A.; GUARENTE, L.; AL, N. Two neurons mediate diet-restriction- induced longevity in C . elegans. **Nature**, v. 447, n. May, p. 545–550, 2007.

BLACKWELL T.K., BOWERMAN B., PRIESS J.R. & WEINTRAUB H. Formation of a monomeric DNA binding domain by Skn-1 bZIP and homeodomain elements. **Science** 266, 621-628., 1994

BOUNPHENG, M. A; DIMAS, J. J.; DODDS, S. G.; CHRISTY, B. A. Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 13, n. 15, p. 2257–64, 1999.

BRENNER, S. The genetics of Caenorhabditis elegans. **Genetics**, v. 77, p. 71–94, 1974.

BUCHBERGER A., BUKAU B. & SOMMER T. Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. **Molecular Cell** 40, 238-252., 2010

C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282. p 2012-8, 1998.

CABREIRO, F.; ACKERMAN, D.; DOONAN, R.; et al. Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in Caenorhabditis elegans is not caused by decreased oxidative damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 8, p. 1575–82, 2011. Elsevier Inc.

CHOE, K. P.; PRZYBYSZ, A. J.; STRANGE, K. The WD40 repeat protein WDR-23 functions with the CUL4/DDB1 ubiquitin ligase to regulate nuclear abundance and activity of SKN-1 in Caenorhabditis elegans. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 10, p. 2704–15, 2009.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 581–5, 2006.

CIECHANOVER, A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, n. 9, p. 1178–90, 2005.

CIECHANOVER, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 1, p. 79–87, 2005.

DILOVA, I., EASLON, E., LIN, S.J. Calorie restriction and the nutrient sensing signalling pathways, **Cellular and Molecular Life Sciences**.,64, 752-767., 2007

FELDMAN, N.; KOSOLAPOV, L.; BEN-ZVI, A. Fluorodeoxyuridine Improves Caenorhabditis elegans Proteostasis Independent of Reproduction Onset. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. e85964, 2014.

FRYDMAN J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. **Annual Review of Biochemistry**. 70, 603-647., 2001

FUCHS, S. Y.; LEE, C.-G.; PAN, Z.-Q.; RONAI, Z. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. **Cell**, v. 110, n. 4, p. 531, 2002.

GANDHI, S.; SANTELLI, J.; MITCHELL, D. H.; STILES, J. W.; SANADI, D. R. A. O. A Simple Method For Mantaining Large, Aging Populations of Caenorhabditis elegans. **Mechanisms Of Ageing And Development**, v. 12, p. 137–150, 1980.

GLOVER-CUTTER, K. M.; LIN, S.; BLACKWELL, T. K. Integration of the unfolded protein and oxidative stress responses through SKN-1/Nrf. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 9, p. e1003701, 2013.

GOLDBERG, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 895–9, 2003.

GOODRICK, C. L.; INGRAM, D. K.; REYNOLDS, M. A.; J.R., F.; CIDER, N. Effects of Intermittent Feeding Upon Body Weight and Lifespan in Inbred Mice: Interaction of Genotype and Age. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 55, p. 69–87, 1990.

GROLL, M.; HUBER, R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 5, p. 606–616, 2003.

GUARENTE, L.; KENYON, C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. **Nature**, v. 408, n. November, p. 255–262, 2000.

GUSELLA J.F. & MACDONALD M.E. Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. **Nature Reviews on Neurosciences**. 1, 109-115., 2000

HAIGIS, M. C.; YANKNER, B. A. The aging stress response. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 333–44, 2010. Elsevier Inc.

HAMEL F.G., FAWCETT J., BENNETT R.G. & DUCKWORTH W.C. Control of proteolysis: hormones, nutrients, and the changing role of the proteasome. **Current Opinions On Clinical and Nutritional Metabolism Care** 7, 255-258., 2004

HARTL F.U. & HAYER-HARTL M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science** 295, 1852-1858., 2002

HASEGAWA, K.; MIWA, J. Genetic and Cellular Characterization of Caenorhabditis elegans Mutants Abnormal in the Regulation of Many Phase II Enzymes. **PloS One**, v. 5, n. 6, 2010.

HENDERSON, S. T.; JOHNSON, T. E. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode Caenorhabditis elegans. **Current Biology**, v. 11, n. 24, p. 1975–80, 2001a

HERTWECK, M.; GÖBEL, C.; BAUMEISTER, R. C. elegans SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. **Developmental Cell**, v. 6, n. 4, p. 577–88, 2004.

HOOGEWIJS, D.; HOUTHOOFD, K.; MATTHIJSSENS, F.; VANDESOMPELE, J.; VANFLETEREN, J. R. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in C. elegans. **BMC Molecular Biology**, v. 9, p. 9, 2008.

HOSONO, R. STERILIZATION AND GROWTH INHIBITION OF CAENORHABDITIS ELEGANS BY 5-FLUORODEOXYURIDINE. **Experimental Gerontology**, v. 13, p. 369–373, 1978.

HOWARD, R. A; SHARMA, P.; HAJJAR, C.; et al. Ubiquitin conjugating enzymes participate in polyglutamine protein aggregation. **BMC Cell Biology**, v. 8, p. 32, 2007.

HSU, A.-L.; MURPHY, C. T.; KENYON, C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5622, p. 1142–5, 2003.

INOUE, H.; HISAMOTO, N.; AN, J. H.; et al. The C . elegans p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response service The C . elegans p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress re. **Genes & Development**, p. 2278–2283, 2005.

IWATA, A.; CHRISTIANSON, J. C.; BUCCI, M.; et al. Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 37, p. 13135–40, 2005.

JANA N.R. & NUKINA N. Recent advances in understanding the pathogenesis of polyglutamine diseases: involvement of molecular chaperones and ubiquitin-proteasome pathway. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 95-101., 2003

JIA, K.; HART, A. C. Autophagy Genes Protect Against Disease Caused by Polyglutamine Expansion Proteins in Caenorhabditis elegans. **Autophagy**, February, p. 21–25, 2007.

KAHN, N. W.; REA, S. L.; MOYLE, S.; KELL, A.; JOHNSON, T. E. Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in Caenorhabditis elegans. **Biochemical Journal**, v. 213, p. 205–213, 2008.

KAISER, P.; MONCOLLIN, V.; CLARKE, D. J. Cyclin-dependent kinase and Cks / Suc1 interact with the proteasome in yeast to control proteolysis of M-phase targets. **Genes & Development**, p. 1190–1202, 1999.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387–98, 2006.

KAMATH R.S., MARTINEZ-CAMPOS M., ZIPPERLEN P., FRASER A.G. & AHRINGER J. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. **Genome Biology**. 2, 2001

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. P HOSPHORYLATION M EETS U BIQUITINATION : The Control of NF- j B Activity. **Annual Review of Immunology** , p. 621–663, 2000.

KENYON, C. A pathway that links reproductive status to lifespan in Caenorhabditis elegans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1204, p. 156–62, 2010.

KISSELEV, A. F. & GOLDBERG, A. L. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. **Chemistry & Biology**, v. 8, 739–758, 2001.

KLEMES, Y.; ETLINGERG, J. D.; GOLDBERG, A. L. Abnormal Proteins Degraded Rapidly in Reticulocytes. **Biological Chemistry**, v. 256, n. 16, p. 8436–8444, 1981.

KLEMESS, Y.; ETLINGERG, J. D.; GOLDBERG, A. L. Abnormal Proteins Degraded Rapidly in Reticulocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 16, p. 8436–8444, 1981.

KLIONSKY, D. J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. Pt 1, p. 7–18, 2005.

KRAFT D.C., DEOCARIS C.C., WADHWA R. & RATTAN S.I. Preincubation with the proteasome inhibitor MG-132 enhances proteasome activity via the Nrf2 transcription factor in aging human skin fibroblasts. **Annual New York Science Academy** 1067, 420-424., 2006

LEE, D. H.; GOLDBERG, A L. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. **Trends in Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 397–403, 1998.

LEE, S. S.; LEE, R. Y. N.; FRASER, A. G.; et al. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in C. elegans longevity. **Nature Genetics**, v. 33, n. 1, p. 40–8, 2003.

LI, X.; MATILAINEN, O.; JIN, C.; et al. Specific SKN-1/Nrf Stress Responses to Perturbations in Translation Elongation and Proteasome Activity. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 6, p. e1002119, 2011.

LIN, K. daf-16: An HNF-3/forkhead Family Member That Can Function to Double the Life-Span of Caenorhabditis elegans. **Science**, v. 278, n. 5341, p. 1319–1322, 1997.

MAIR, W., DILLIN, A. Aging and Survival: the genetics of life span extension by dietary restriction, **Annual Review of Biochemistry**. 77, 727-754., 2008

MAIR, W.; PIPER, M. D. W.; PARTRIDGE, L. Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in Drosophila. **PLoS Biology**, v. 3, n. 7, p. e223, 2005.

MARGOLIS R.L. & ROSS C.A. (2001) Expansion explosion: new clues to the pathogenesis of repeat expansion neurodegenerative diseases. **Trends on Molecular Medicine**. 7, 479-482., 2010

MARTINEZ-VICENTE M., SOVAK G. & CUERVO A.M. Protein degradation and aging. **Experimental Gerontology**. 40, 622-633, 2005

Masoro, E.J. Overview of caloric restriction and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development** 126, 913-922., 2005

MORLEY, J. F.; BRIGNULL, H. R.; WEYERS, J. J.; MORIMOTO, R. I. The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in Caenorhabditis elegans. **Cell Biology**, v. 99, n. 16, p. 10417–10422, 2002.

MORRIS J.Z., TISSENBAUM H.A. & RUVKUN G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in Caenorhabditis elegans. **Nature** 382, 536-539., 1996

MORTIMORE G.E., POSO A.R. & LARDEUX B.R. Mechanism and regulation of protein degradation in liver. **Diabetes Metabolism Reviews**. 5, 49-70, 1989.

NOLLEN, E. A. A.; GARCIA, S. M.; HAAFTEN, G. VAN; et al. Genome-wide RNA interference screen identifies previously undescribed regulators of polyglutamine aggregation. **Sciences-New York** n. 12, p. 0–5, 2004.

OKUYAMA, T.; INOUE, H.; OOKUMA, S.; et al. The ERK-MAPK Pathway Regulates Longevity through SKN-1 and Insulin-like Signaling in Caenorhabditis elegans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 39, p. 30274 –30281, 2010.

OLIVEIRA, R. P.; ABATE, J. P.; DILKS, K.; et al. Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. **Aging Cell**, v. 8, n. 5, p. 524–541, 2009.

ONKEN, B., DRISCOLL, M Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1 and SKN-1. **PLoS One**, vol.5, Iss. 1, e8758, 2010

PARK, S.-K.; TEDESCO, P. M.; JOHNSON, T. E. Oxidative stress and longevity in *Caenorhabditis elegans* as mediated by SKN-1. **Aging Cell**, Jun. 2009.

PARKER J.A., ARANGO M., ABDERRAHMANE S., LAMBERT E., TOURETTE C., CATOIRE H. & NERI C. Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. **Nature Genetics**. 37, 349-350., 2005

PEREIRA, V. S. O envolvimento de SKN-1 na degradação proteica e formação de agregados poliglutamínicos no *Caenorhabditis elegans*.,2012.

PICKART, C. M.; COHEN, R. E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 3, p. 177–87, 2004.

PIPER, M.D.W, BARTKE, A. Diet and Aging. **Cell Metabolism** 8, pp 99-104., 2008

PROUTY, W. F.; GOLDBERG, A. L. Fate of abnormal proteins in E. coli: accumulation in intracellular granules before catabolism. **Nature New Biology**, v. 240, p. 147– 150, 1972.

RAAMSDONK, J. M. VAN; HEKIMI, S. FUdR causes a twofold increase in the lifespan of the mitochondrial mutant gas-1. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 10, p. 519–21, 2011. Elsevier Ireland Ltd.

RADHAKRISHNAN S.K., LEE C.S., YOUNG P., BESKOW A., CHAN J.Y. & DESHAIES R.J. Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. **Molecular Cell** 38, 17-28., 2010

ROBIDA-STUBBS, S.; GLOVER-CUTTER, K.; LAMMING, D. W.; et al. TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 713–24, 2012. Elsevier Inc

SHAO, J.; DIAMOND, M. I. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. **Human Molecular Genetics**, v. 16 Spec No, n. 2, p. R115–23, 2007.

SHERMAN M.Y. & MUCHOWSKI P.J. Making yeast tremble: yeast models as tools to study neurodegenerative disorders. **Neuromolecular.Medicine**. 4, 133-146., 2000

SHERMAN, M. Y.; GOLDBERG, A L. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. **Neuron**, v. 29, n. 1, p. 15–32, 2001.

SHIBATA, M.; LU, T.; FURUYA, T.; et al. Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 20, p. 14474–85, 2006.

SKIBINSKI, G. A; BOYD, L. Ubiquitination is involved in secondary growth, not initial formation of polyglutamine protein aggregates in C. elegans. **BMC Cell Biology**, v. 13, n. 1, p. 10, 2012. BioMed Central Ltd..

SKORUPA, D.A., DERVISEFENDIC, A., ZWIENER, J., PLETCHER, S.D. Dietary composition specifies consumption, obesity and lifespan in *Drosophila melanogaster*. **Aging Cell**. 7, 478-490., 2008

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. **Science**, v. 273, n. 5271, p. 59–63, 1996.

STEFFEN J., SEEGER M., KOCH A. & KRUGER E. Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop. **Molecular Cell** 40, 147-158., 2010

TANG B.L. & CHUA C.E. SIRT2, tubulin deacetylation, and oligodendroglia differentiation. **Cell Motility and the Cytoskeleton** 65, 179-182., 2008

TISSENBAUM, H. A; GUARENTE, L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans. **Nature**, v. 410, n. 6825, p. 227–30, 2001.

TONOKI, A.; KURANAGA, E.; TOMIOKA, T.; et al. Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 4, p. 1095–106, 2009

TULLET, J. M. A.; HERTWECK, M.; AN, J. H.; et al. Direct Inhibition of the Longevity-Promoting Factor SKN-1 by Insulin-like Signaling in C . elegans. **Cell**, v. 132, p. 1025–1038, 2008.

VENKATRAMAN, P.; WETZEL, R.; TANAKA, M.; NUKINA, N.; GOLDBERG, A. L. Sequences and Release Them during Degradation of Polyglutamine-Containing Proteins. **Molecular Cell** , v. 14, p. 95–104, 2004.

VERMA, R.; ANNAN, R. S.; HUDDLESTON, M. J.; et al. Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 278, n. 5337, p. 455–60, 1997.

VILCHEZ, D.; MORANTTE, I.; LIU, Z.; et al. RPN-6 determines C. elegans longevity under proteotoxic stress conditions. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 263–8, 2012. Nature Publishing Group.

WANG, J.; ROBIDA-STUBBS, S.; TULLET, J. M. A; et al. RNAi screening implicates a SKN-1-dependent transcriptional response in stress resistance and longevity deriving from translation inhibition. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 8, 2010.

WANG, M. C.; ROURKE, E. J. O.; RUVKUN, G. Fat Metabolism Links Germline Stem Cells and Longevity in C. elegans. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 957–960, 2008.

WANG, W.; CHAN, J. Y. Nrf1 is targeted to the endoplasmic reticulum membrane by an N-terminal transmembrane domain. Inhibition of nuclear translocation and transacting function. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 28, p. 19676–87, 2006.

WILLIAMS, A. J.; PAULSON, H. L. Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited. **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 10, p. 521–8, 2008.

WOLF, D. H.; HILT, W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1695, n. 1-3, p. 19–31, 2004

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471–84, 2006.

ZOGHBI H.Y. & ORR H.T. (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. **Annual Reviews on Neurosciences**. 23, 217-247., 2000