

# Níveis de expressão da humanina na doença de Machado-Joseph: um estudo em amostras de sangue periférico

Dissertação de Mestrado

Fátima de Jesus Costa Medeiros

Mestrado em

**Ciências Biomédicas**



# Níveis de expressão da humanina na doença de Machado-Joseph: um estudo em amostras de sangue periférico

Dissertação de Mestrado

Fátima de Jesus Costa Medeiros

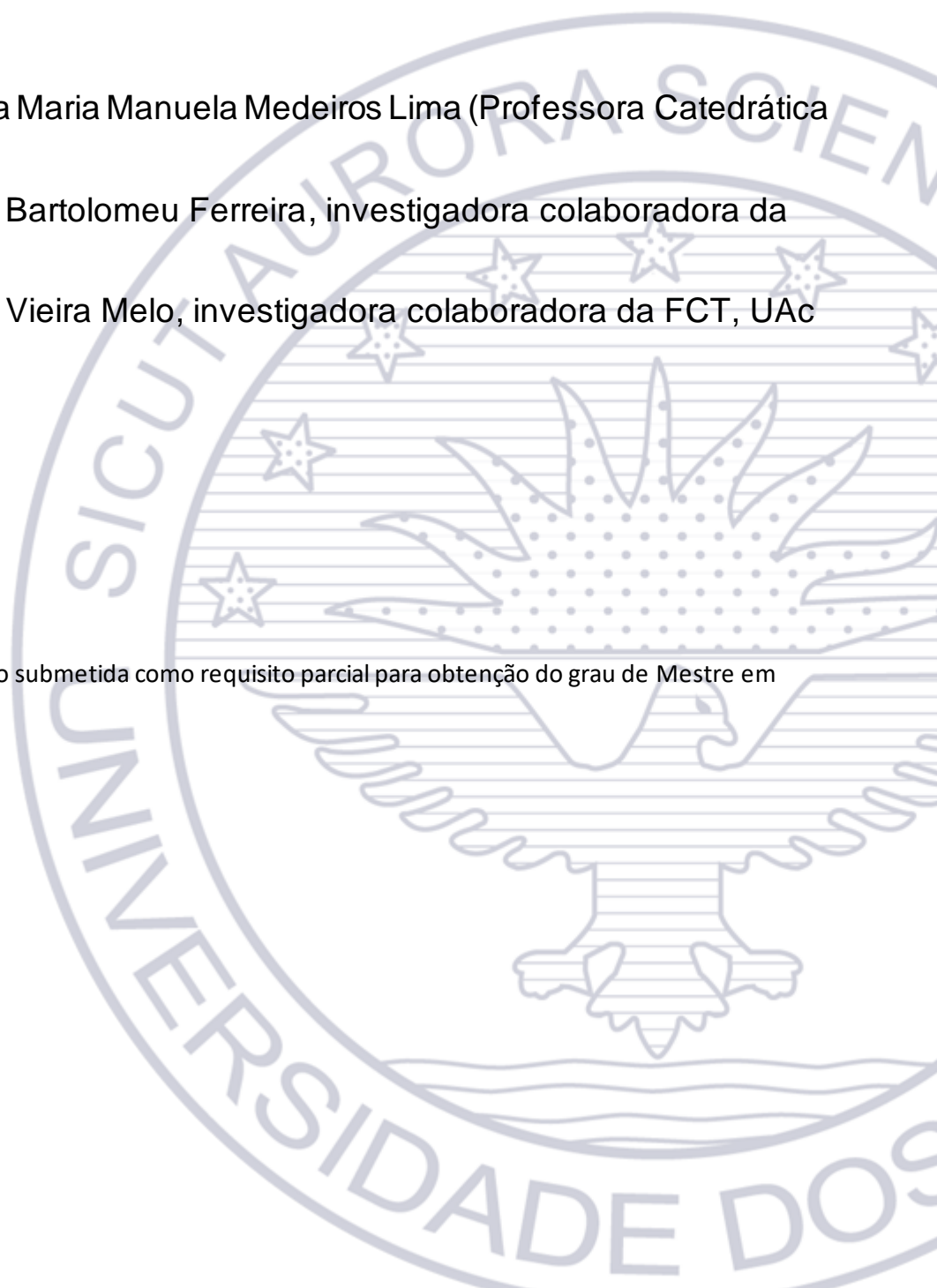
## Orientadoras

Professora Doutora Maria Manuela Medeiros Lima (Professora Catedrática da FCT, UAc)

Doutora Ana Filipa Bartolomeu Ferreira, investigadora colaboradora da FCT, UAc

Doutora Ana Rosa Vieira Melo, investigadora colaboradora da FCT, UAc

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas



“Somewhere, something incredible is waiting to be Known”

Carl Sagan

## **Agradecimentos**

Chegar até aqui foi uma jornada desafiadora e enriquecedora, e gostaria de expressar a minha gratidão a todos que contribuíram para a realização deste projeto e para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Primeiramente, à minha orientadora, Professora Doutora Manuela Lima, agradeço pela paciência, orientação científica e pelas valiosas informações que foram fundamentais para o desenvolvimento da minha dissertação. Agradeço igualmente pelo acolhimento no seu grupo de trabalho e pelos conhecimentos transmitidos.

Às minhas co-orientadoras, Doutora Ana Rosa Melo e Doutora Ana Ferreira, pelo apoio e contributos essenciais ao longo deste projeto. A vossa paciência, disponibilidade e orientação foram fundamentais, tanto no laboratório como em todas as fases do trabalho.

À Doutora Mafalda Raposo, agradeço pela contribuição no laboratório, cuja assistência foi valiosa para a concretização deste trabalho.

Ao Doutorando Luís Teves, agradeço pela orientação e pelas explicações úteis. A sua ajuda foi importante para o desenvolvimento deste trabalho.

Um agradecimento aos meus pais e ao meu irmão, especialmente à minha mãe, Dora, que esteve sempre ao meu lado, oferecendo suporte, compreensão e por acreditar em mim e pelo apoio incondicional.

## Índice

Resumo .....	vi
Abstract .....	viii
Capítulo 1: Introdução .....	1
1.1. Doença de Machado-Joseph (DMJ) .....	2
1.2. Humanina (HN) .....	3
1.2.1. Localização e estrutura .....	5
1.2.2. Análogos sintéticos .....	7
1.2.3. Expressão .....	7
1.2.4. Mecanismo de ação .....	8
1.2.5. Potencial da HN e seus análogos como agentes terapêuticos .....	12
1.3. <i>Humanin-like nuclear</i> (HN-like) .....	15
1.4. Pertinência e objetivos .....	16
Capítulo 2: Sujeitos e métodos .....	18
2.1. Sujeitos e dados clínicos .....	19
2.2. Métodos .....	20
2.2.1. Avaliação da integridade do RNA e da ausência de contaminação das amostras com DNA mitocondrial (mtDNA) .....	21
2.2.2. Tratamento com DNase I .....	22
2.2.3. Retrotranscrição .....	23
2.2.4. PCR quantitativa em Tempo-real .....	23
2.3. Análises de dados .....	24
Capítulo 3: Resultados e discussão .....	26
3.1. Caracterização demográfica das amostras usadas na determinação dos níveis da HN .....	27
3.2. Avaliação da integridade do RNA total e da ausência de contaminação das amostras com mtDNA .....	29
3.3. Tratamento com DNase I .....	31
3.4. Transcrição e experiências de qPCR .....	33
3.5. Análise de expressão diferencial do transcrito da HN .....	34
3.6. Correlações entre os níveis dos transcritos da HN e os dados clínicos e genéticos dos doentes DMJ .....	37
Capítulo 4: Referências bibliográficas .....	41

## Resumo

**Introdução:** A doença Machado-Joseph (DMJ) ou ataxia espinocerebelosa do tipo 3 (SCA3), é uma doença neurodegenerativa autossómica dominante que afeta o sistema nervoso central, particularmente o cerebelo. A DMJ é causada por um número anormalmente elevado de repetições CAG no gene *ATXN3*, o que leva à produção da proteína ataxina-3 mutada. A proteína mutada está envolvida várias vias incluindo a via mitocondrial e a apoptótica, cujas alterações estão associadas à neurodegeneração característica da doença. A DMJ é caracterizada por ataxia progressiva, espasticidade, disfagia e disartria entre outros, estando implicados na doença os sistemas, cerebeloso, piramidal, extrapiramidal, neurónio motor e oculomotor. A Humanina (HN) é um micropeptídeo traduzido a partir de um pequeno gene localizado dentro do gene RNA ribossomal 16S (*MT-RNR2*) no DNA mitocondrial (mtDNA). Desde a sua descoberta, a HN tem sido estudada, pela sua atividade neuroprotetora sabendo-se que está envolvida na regulação da apoptose e proteção celular contra o stress oxidativo. Existem estudos que indicam que os níveis da HN se encontram alterados em várias doenças neurodegenerativas. No entanto, dado que até ao momento, não há estudos que abordem a relação entre a HN e a DMJ, os principais objetivos do presente estudo foram: i) implementar uma metodologia laboratorial para analisar os níveis dos transcritos da HN em amostras de sangue total de doentes DMJ; ii) comparar os níveis de expressão da HN entre doentes DMJ e indivíduos saudáveis (controlos) emparelhados por idade; e iii) analisar a correlação entre os níveis de expressão da HN e os dados demográficos, clínicos e genéticos de doentes DMJ. **Sujeitos e métodos:** Analisaram-se 20 amostras de sangue total de doentes DMJ e 20 amostras de indivíduos controlo, emparelhados por idade. As amostras de RNA total já se encontravam previamente extraídas. A integridade do RNA total foi avaliada através de eletroforese em gel agarose e, a deteção da presença/ausência de mtDNA foi realizada, antes e após o tratamento com DNase I, de modo a garantir que as amostras não estavam contaminadas com DNA genómico. A transcrição reversa foi realizada utilizando o *primer* Oligo(dT)18 para amplificação específica do mRNA. Os níveis dos transcritos

da HN foram determinados, por PCR quantitativa em Tempo-real (qPCR) utilizando um TaqMan Custom Assay Humanin desenhado no âmbito de um projeto liderado pela Doutora Manuela Lima (UAc). **Resultados e discussão:** A estratégia laboratorial desenvolvida resolveu limitações observadas em estudos anteriores, como: i) a purificação do RNA total, garantindo assim a ausência de mtDNA nas amostras de RNA, e ii) e a otimização da determinação dos níveis de transcrito da HN por qPCR ao utilizar um TaqMan Custom Assay Humanin que amplifica apenas a HN. O desenvolvimento de uma metodologia fiável, com medidas para minimizar interferências e otimizar o qPCR, foi importante para garantir a precisão dos resultados. Os níveis dos transcritos da HN estavam significativamente diminuídos nos doentes DMJ (213,03 média  $\pm$  218,12 95% nível de confiança), comparativamente aos controlos (1066,16  $\pm$  1330,86). Não foi encontrada uma correlação entre os níveis de expressão da HN e os dados clínicos (SARA – *Scale of the Assessment and Rating of Ataxia*, INAS – *Inventory of Non-Ataxia Signs*, idade de início e duração da doença) ou genéticos (número de repetições CAG no alelo expandido) dos doentes. A ausência de correlação entre os níveis de HN e a idade de início ou severidade da doença poderá ser consequência do número reduzido de amostras analisado. **Conclusões:** A implementação da metodologia desenvolvida permitiu a obtenção de dados precisos sobre a expressão da HN. Os resultados obtidos realçam a importância de analisar os níveis da expressão da HN, dado que estes estão diminuídos em doentes DMJ. Apesar das alterações nos níveis de expressão da HN observada nos doentes, estes resultados não permitem tirar conclusões sobre a sua relação com a disfunção mitocondrial ou alterações apoptóticas, e o papel da HN na patogénese da doença permanece ainda por esclarecer. Embora não tenha sido identificada uma correlação com dados clínicos e genéticos dos doentes, é essencial que futuros estudos, com um maior número de participantes, explore o papel da HN como um potencial alvo terapêutico.

## Abstract

**Introduction:** Machado-Joseph disease (MJD), also known as spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3), is an autosomal dominant neurodegenerative disorder that affects the central nervous system, particularly the cerebellum. MJD is caused by an abnormally high number of CAG repeats in the *ATXN3* gene, which results in the production of the mutated ataxin-3 protein. This mutant protein is involved in several pathways including the mitochondrial and apoptotic pathways, alterations in which are associated with the neurodegeneration characteristic of the disease. MJD is characterized by progressive ataxia, spasticity, dysphagia, among others, with the cerebellar, pyramidal, extrapyramidal, motor neuron, and oculomotor systems implicated in the disease. Humanin (HN) is a micropeptide translated from a small gene located within the 16S ribosomal RNA gene (*MT-RNR2*) in mitochondrial DNA (mtDNA). Since its discovery, HN has been studied for its neuroprotective activity and involvement in the regulation of apoptosis and cellular protection against oxidative stress. Studies indicate HN levels are deregulated in neurodegenerative diseases. However, given that to date there are no published studies addressing the relationship between HN and MJD, the principal aims of the present study are: i) to implement a laboratory methodology for analyzing the levels of HN transcripts in whole blood samples from MJD patients; ii) to compare the HN expression levels between MJD patients and age-matched controls; and iii) to analyze the correlation between HN expression levels and demographic, clinical and genetic data in MJD patients. **Subjects and methods:** A total of 20 whole blood samples from patients with MJD and 20 age-matched controls were analyzed. Total RNA samples had already been previously extracted. The integrity of total RNA samples was assessed by agarose gel electrophoresis and the presence/absence of mtDNA was detected before and after DNase I treatment to ensure that the samples were not contaminated with genomic DNA. Reverse transcription was performed using Oligo(dT)<sub>18</sub> primer for specific amplification of the mRNA. The levels of HN transcripts were determined by quantitative real-time PCR (qPCR) using a TaqMan Custom Assay Humanin, developed as part of a project led by

Doctor Manuela Lima (UAc). **Results and discussion:** The laboratory strategy developed resolved limitations observed in previous studies, such as: i) the purification of total RNA, thus ensuring the absence of mtDNA in RNA samples, and ii) and the optimization of the determination of levels of HN transcript by qPCR when using a TaqMan Custom Assay Humanin that amplifies only HN. The development of a reliable methodology with measures to minimize interferences and optimize qPCR was important to ensure the accuracy of the results. The levels of HN transcripts were significantly decreased in MJD patients ( $213,03 \pm 218,12$ ) compared to age-matched controls ( $1066,16 \pm 1330,86$ ). No significant correlation was found between HN expression levels and clinical data (SARA – Scale of the Assessment and Rating of Ataxia, INAS – Inventory of Non-Ataxia Signs, age at onset and disease duration) and genetic (number of CAG repeats in expanded allele) of the patients. The Lack of correlation between levels of HN and age of onset or severity of disease may be a consequence of the small number of samples analysed.

**Conclusions:** The implementation of the developed methodology allowed to obtain precise data on the expression of HN. The results obtained highlight the importance of analysing HN expression levels, as they are reduced in patients with MJD. Despite the changes in HN expression levels observed in patients, these results do not allow conclusions to be drawn about its relationship with mitochondrial dysfunction or apoptotic changes, and the role of HN in the pathogenesis of the disease remains to be clarified. Although no correlation with clinical and genetic was found, it is essential that future studies with a larger number of participants explore the role of HN as a potential therapeutic target.

# Capítulo 1: Introdução

## 1. Introdução

### 1.1. Doença de Machado-Joseph (DMJ)

A doença de Machado-Joseph (DMJ), também conhecida como ataxia espinocerebelosa do tipo 3 (SCA3), pertence ao grupo de doenças de poliglutamina (polyQ) [1], que engloba nove doenças neurodegenerativas hereditárias causadas por uma expansão do trinucleótido CAG [2]. A DMJ é a ataxia espinocerebelosa mais prevalente em todo o mundo [3], afetando cerca de 3,1 por 100000 indivíduos em Portugal [4]. Nos Açores, estima-se uma prevalência global de 39 por 100000 indivíduos (1/254); a maior prevalência a nível mundial ocorre na ilha das Flores onde um em cada 158 indivíduos é doente [5].

A DMJ é uma doença neurodegenerativa autossómica dominante, caracterizada por uma progressão lenta dos sintomas [1, 3]. Os sintomas iniciam-se, em média, por volta dos 40 anos de idade [6], e o tempo médio de sobrevida é de 21 anos [6, 7]. Estes sintomas aparecem na idade adulta, e progridem de forma lenta e gradual ao longo do tempo [8]. Esta doença afeta predominantemente o sistema cerebeloso, piramidal e extrapiramidal, sendo os neurónios motores e oculomotores também afetados [9].

A DMJ é causada pela expansão de um trato CAG localizado no exão 10 do gene *ATXN3*, que está localizado no braço longo do cromossoma 14 (14q32.1) [10, 11, 12]. Os alelos normais têm entre 12 e 44 repetições CAG, enquanto os alelos mutados apresentam consensualmente mais de 60 CAGs [6, 13]. A forma não mutada do gene *ATXN3* codifica a ataxina 3 nativa, cuja função principal é atuar como uma enzima desubiquitinadora, tendo um papel importante na via de degradação proteica mediada pelo proteassoma e na regulação da transcrição [1]. A ataxina-3 mutada que contém um trato polyQ expandido, forma agregados insolúveis e oligómeros tóxicos que afetam vários mecanismos celulares, tais como a autofagia, a manutenção das proteínas, a transcrição, a função mitocondrial e a sinalização celular, especialmente nas vias relacionadas com o stress e a apoptose [14].

Clinicamente, a DMJ é caracterizada por uma variedade de sintomas, sendo que a ataxia cerebelosa, a disartria e a disfagia são os principais sintomas neurológicos [9]. Na maioria dos casos o primeiro sintoma é a ataxia de marcha, no entanto alguns doentes podem apresentar outros sintomas iniciais como, por exemplo, a diplopia [9].

Atualmente, a DMJ permanece sem cura ou tratamento eficaz, embora existam algumas abordagens terapêuticas que podem aliviar sintomas específicos e melhorar a qualidade de vida dos doentes [14]. No entanto, estas abordagens ainda não proporcionam uma solução eficaz para a DMJ. Sabe-se que a disfunção mitocondrial e as alterações na expressão de proteínas da família *B cell lymphoma 2* (BCL2) são fatores que contribuem para a progressão da DMJ, facilitando a apoptose [15]. Assim, a limitação das abordagens terapêuticas existentes destaca a necessidade de explorar alternativas para o tratamento da DMJ.

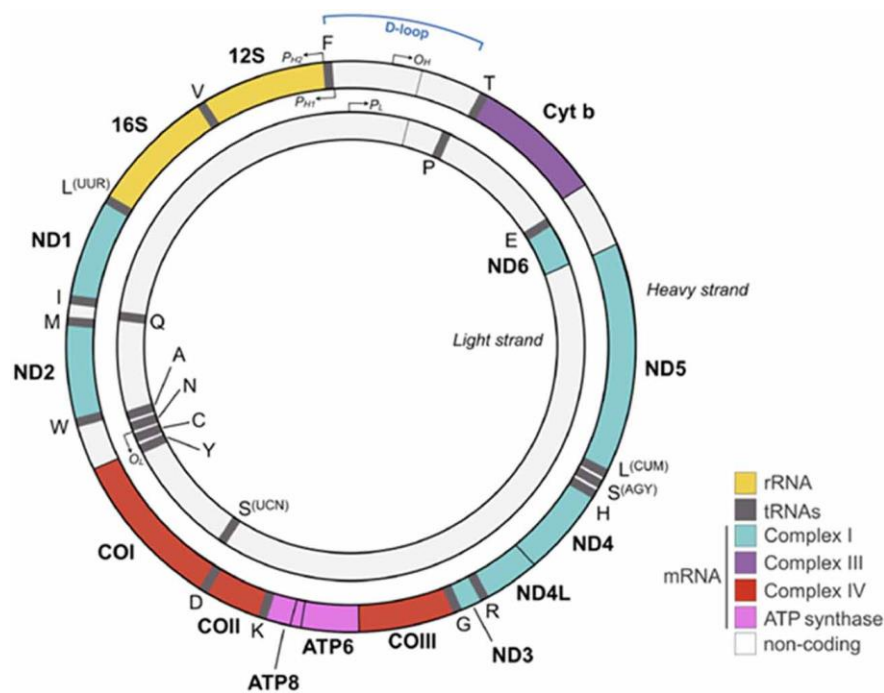
A disfunção mitocondrial, frequentemente associada a doenças neurodegenerativas, tais como a DMJ [16], pode ser mitigada por intervenções que promovam o bom funcionamento das mitocôndrias. A humanina (HN), um micropeptídeo conhecido pelas suas propriedades neuroprotetoras, tem-se destacado como uma promissora candidata para novas abordagens terapêuticas em doenças neurodegenerativas [17, 18]. Vários estudos indicam que a HN possui potenciais aplicações terapêuticas para várias doenças e condições fisiopatológicas, nomeadamente devido à sua capacidade de melhorar a função mitocondrial e reduzir a apoptose [17, 18].

## **1.2. Humanina (HN)**

A mitocôndria, que possui o seu próprio material genético, o DNA mitocondrial (mtDNA), é conhecida principalmente pela sua função na produção de energia celular através da fosforilação oxidativa, desempenhando papéis importantes na manutenção da homeostasia energética, na regulação da apoptose e no controlo da sinalização *redox* [19]. A disfunção da

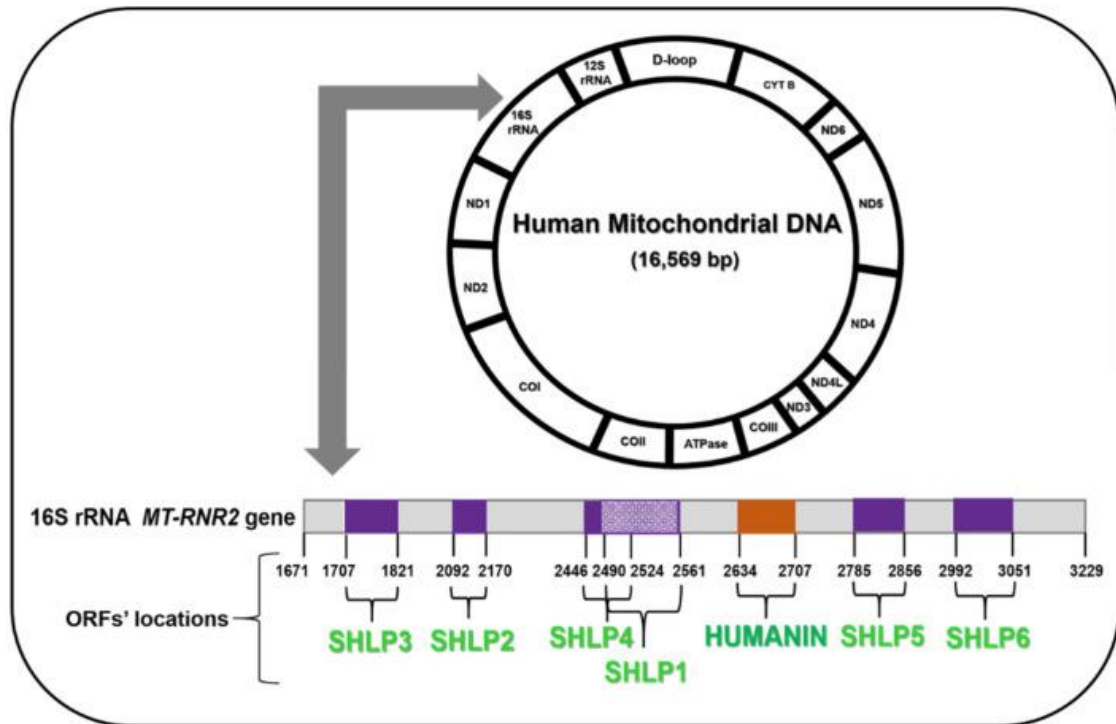
mitocôndria encontra-se associada à patogênese de várias doenças do sistema nervoso, incluindo doenças neurodegenerativas [20].

O mtDNA tem aproximadamente 16,569bp, é circular e de cadeia dupla [21], e codifica um total de 37 genes, dois RNA ribossomais (rRNA, 12S e 16S rRNA), 22 RNAs de transferência (tRNA) e 13 subunidades polipeptídicas dos complexos da cadeia respiratória (Figura 1) [21]. No *D-loop*, uma região não codificante do genoma mitocondrial, encontra-se uma região tripla, constituída pela incorporação estável de uma terceira cadeia curta do DNA conhecida como 7S DNA [22].



**Figura 1:** Representação do DNA mitocondrial humano (mtDNA). O mtDNA é circular e cadeia dupla, cadeia leve (*light strand*) e pesada (*heavy strand*), com origens de replicação designadas por O<sub>L</sub> e O<sub>H</sub>. O mtDNA tem 16,569bp e codifica 37 genes, incluindo 2 RNA ribossomais (12S rRNA e 16S rRNA) e 22 tRNAs de transferência (tRNA). O *D-loop*, uma região não codificante, contém duas regiões hipervariáveis (HVRI e HVRII). Os genes ND1-ND e ND4L formam subunidades do complexo I, CYT b pertence ao complexo III, COX I-COX III codificam as subunidades do complexo IV, e ATPase6 e ATPase8 são subunidades do complexo V (ATP sintase) [23].

O mtDNA contém *open reading frames* (ORFs) que codificam peptídeos derivados da mitocôndria (MDPs) [24]. Os MDPs são codificados a partir da região do 16S do rRNA, e neste está incluída a HN, bem como seis pequenos peptídeos semelhantes à HN (*Small humanin-like peptides* - SHLPs 1-6) (Figura 2) e o MOTS-c localiza-se na região do 12S do rRNA [25].



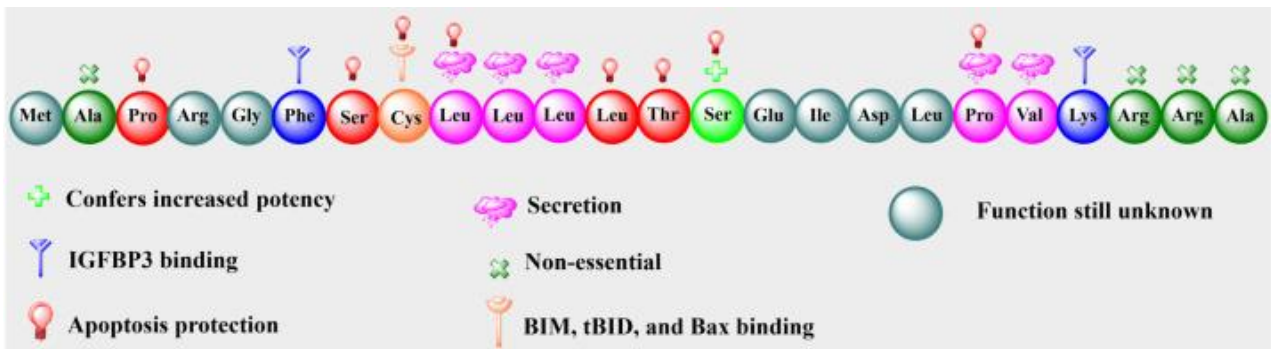
**Figura 2:** A sequência da humanina (HN) localiza-se no gene 16S rRNA do DNA mitocondrial. A HN e outros seis pequenos peptídeos semelhantes à HN (SHLPs) são codificados por *open reading frames* (ORFs) no DNA mitocondrial humano [26].

### 1.2.1. Localização e estrutura

A HN é um micro-peptídeo codificado por um fragmento de 75-base da ORF do gene *MT-RNR2*, que por sua vez, codifica o RNA ribossomal 16S, numa porção de *short open reading frame* (Figura 2) [18, 26, 27, 28]. Este micro-peptídeo foi identificado em 2001, durante um rastreio de expressão funcional que visava a identificação de genes que influenciam a

sobrevivência das células neuronais. Esta técnica avalia a capacidade de genes expressos de produzirem proteínas com funções biológicas específicas [29]. O rastreamento foi realizado utilizando uma biblioteca de cDNA, construída a partir de mRNAs isolados de amostras de *post-mortem* do lobo occipital de um doente com doença de Alzheimer, uma área do cérebro que permanece relativamente preservada nesta doença. A HN demonstrou ser eficaz na inibição da morte neuronal induzida por péptidos neurotóxicos de amiloide- $\beta$  e por mutações em genes associados à doença de Alzheimer familiar [28].

Atualmente, permanece incerto se a tradução da HN ocorre na mitocôndria ou no citoplasma [27]. A sequência da HN é composta por 24 aminoácidos (MAPRGFSCLLLTSEIDL PVKRRRA), com um peso molecular de 2687,26 Da e possui três regiões: uma região N-terminal com carga positiva (MAPR), uma região central hidrofóbica (GFSCLLLTSEIDL) e uma região C-terminal com carga negativa (PVKRRRA) [26, 28, 30]. Um estudo realizado por Yamagishi e colaboradores [31] que analisou as funções específicas dos aminoácidos na região citoplasmática da HN mostrou que os aminoácidos Leu9, Leu10 e Leu11 são essenciais para a função biológica da mesma. Este estudo mostrou ainda que a secreção extracelular da HN depende dos aminoácidos Leu9, Leu 10, Leu11, Pro19 e Val20, enquanto a sua função neuroprotetora envolve os aminoácidos Pro3, Ser7, Cys8, Leu9, Leu12, Thr13, Ser14 e Pro19. A auto-dimerização da HN, necessária para a neuroproteção, requer os aminoácidos Ser7 e Leu9. O estudo de Yamagishi e colaboradores [31] permitiu ainda verificar que os aminoácidos Phe6 e Lys21 estão ligados à interação com *insulin like growth factor binding protein 3* (IGFBP3), e a Cys8 à atividade anti-apoptótica, através da ligação à proteína X associada a BCL2 (BAX) (Figura 3) [31].



**Figura 3:** Estrutura e funções de cada aminoácido da humanina (HN) em humanos [32].

### 1.2.2. Análogos sintéticos

Estão descritos para a HN vinte e um análogos [33, 34, 35], que são variantes sintéticas do peptídeo original e foram desenvolvidas para melhorar as suas propriedades biológicas, particularmente a sua atividade neuroprotetora e citoprotetora [33]. O HN-S14G (HNG), é um dos análogos mais estudados, e resulta da substituição do aminoácido serina na posição 14 por uma glicina, a qual resulta numa atividade neuroprotetora até 1000 vezes superior à da HN [28, 36]. O HNGF6A corresponde a outro análogo da HN e foi desenvolvido através da substituição do aminoácido na posição 6 (A6 por F6) e na posição 14 (S14 por G14), demonstrando um potencial terapêutico em vários modelos experimentais de doenças humanas, como a diabetes [37]. O tHN-C3, é um análogo que foi desenvolvido como uma nova intervenção terapêutica para a doença de Alzheimer, e apresenta uma sequência de clivagem da caspase-3 ampliada [38]. Embora este análogo tenha demonstrado eficácia em modelos animais, prevenindo a morte neuronal induzida por  $H_2O_2$  e  $A\beta_{42}$  solúvel, a sua aplicação em humanos permanece por explorar [38].

### 1.2.3. Expressão

A HN é produzida ativamente em vários tecidos e fluidos do corpo e é libertada para o meio extracelular. A nível da proteica, a HN expressa-se nos rins [39], testículos [40], epitélio

pigmentar da retina [41], e células endoteliais [42]. No fígado, na tiróide e na medula óssea a expressão da proteína da HN é baixa [39]. É ainda possível encontrar a HN em tecidos com alta atividade metabólica, como o cérebro [28] músculo cardíaco e os músculos esqueléticos, uma vez que estes tecidos requerem uma elevada quantidade de energia [39, 43, 44]. A HN está presente também em fluidos circulantes, como o sangue [45], vesículas extracelulares [46], líquido cefalorraquidiano [47], e plasma seminal [40].

#### 1.2.4. Mecanismo de ação

A HN atua em diversas vias de sinalização intracelulares e extracelulares, assegurando múltiplas funções de proteção, como a regulação da autofagia, manutenção da integridade mitocondrial e prevenção da apoptose [48, 49]. A tabela 1 indica os estudos que identificaram as vias de sinalização nas quais a HN intervém assim como os seus análogos.

No meio intracelular, a HN inibe a via apoptótica ao ligar-se às proteínas pro-apoptóticas membros da BCL2, nomeadamente, à BAX, à BCL2 *interacting mediator of cell death* (Bim), à forma truncada *BH3-interacting-domain death agonist BID* (tBid) e à *insulin like growth factor binding protein 3* (IGFBP-3) (Figura 4A) [50, 51, 52, 53]. A HN impede a translocação de proteínas BAX e *caspase-8-cleaved BID* (cBID) (na forma citosólica) para a membrana externa da mitocôndria, bloqueando a formação de poros e a subsequente libertação de citocromo c [53]. Para além disso, a ligação da HN às proteínas BAX, Bim e tBid, na membrana externa da mitocôndria, evita a oligomerização dessas proteínas, bloqueando também a permeabilização da membrana e, assim, prevenindo a ativação da cascata de caspases e a morte celular [18, 53, 54]. A HN impede ainda a oligomerização da proteína *Bcl2 homologous antagonist killer* (BAK) induzida por *Bim-extra long* (BimEL) na mitocôndria, exercendo um efeito antiapoptótico [51]. Ainda no meio intracelular, a HN reduz a atividade de espécies reativas de oxigénio (ROS) [18].

**Tabela 1:** Estudos representativos sobre as vias de sinalização da humanina (HN) e dos seus análogos.

<b>Proteína</b>	<b>Modelos Experimentais</b>	<b>Proteínas envolvidas nas vias de sinalização</b>	<b>Conclusões finais</b>	<b>Referência</b>
<b>S14G-HN (HNG)<sup>1</sup></b>	<i>In vitro</i> : Células HEK293, SH-SY5Y <i>In vivo</i> : C57BL/6	ERK1/2, AKT e STAT3	HN ativa as vias AKT, ERK1/2 e STAT3 através do GP130/IL6ST, com efeitos específicos na fosforilação das proteínas no hipocampo, em função da idade.	[55]
<b>HN, HNG</b>	<i>In vitro</i> : Células CHO	FPRL1 e FPRL2	HN atua como um ligando para os recetores 1 (FPRL1) e 2 (FPRL2), com a forma N-formilada da HN mostrando uma maior potência e eficácia.	[56]
<b>HN</b>	<i>In vitro</i> : neuroblastoma humano SK-N-MC e SK-N-SH, e linha celular de feocromocitoma de rato PC12. <i>In vivo</i> : Monócitos do sangue periférico humano	FPRL1	HN exerce efeitos neuroprotetores ao inibir competitivamente o acesso do A $\beta$ 42 ao recetor FPRL.	[57]
<b>HN, HNG, C8A-HN (HNA)<sup>2</sup></b>	<i>In vitro</i> : Células F11, SH-SY5Y, COS7	CNTFR- $\alpha$ /gp130/WSX-1	A HN protege os neurónios ao ligar-se a um complexo que envolve CNTFR/WSX-1/gp130.	[58]
<b>HN, HNG, HNA, F6A-HN<sup>3</sup>, K21A-HN<sup>4</sup></b>	<i>In vitro</i> : Células A172 glioblastoma, SH-SY5Y neuroblastoma e F11	IGFBP-3	HN interage com a IGFBP-3 de forma pleiotrópica, influenciando processos neurológicos e potenciais alvos terapêuticos.	[59]

<sup>1</sup>Substituição de serina (Ser) na posição 14 por glicina (Gly); <sup>2</sup>Substituição de cisteína (Cys) na posição 8 por Pro; <sup>3</sup>Substituição de fenilalanina (Phe) na posição 6 por alanina (Ala); <sup>4</sup>Substituição de lisina (Lys) na posição 21 por alanina (Ala).

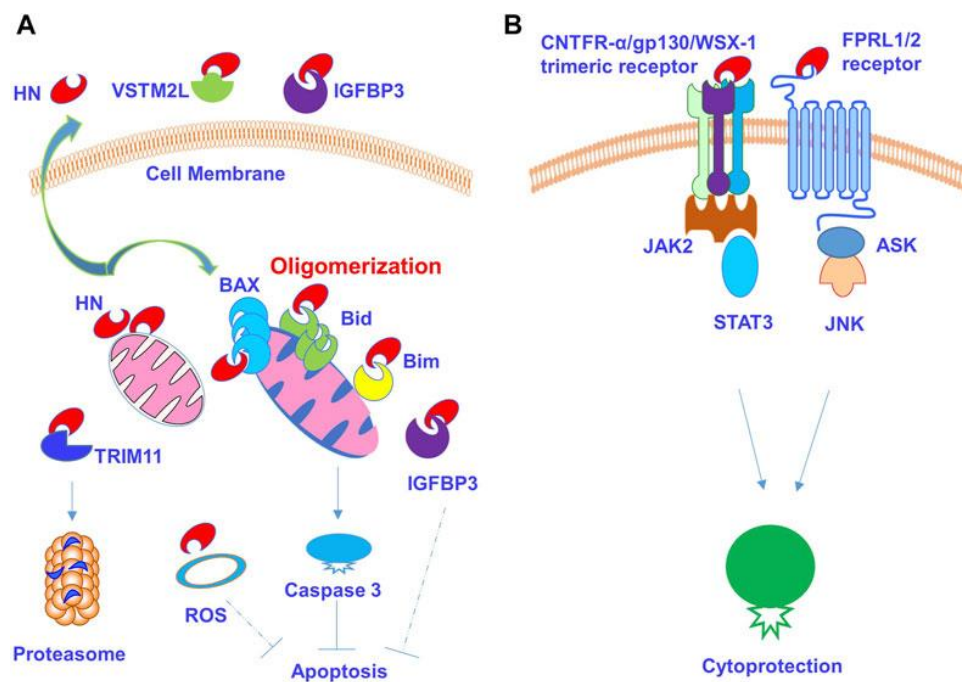
Tabela 1: (cont.).

Proteína	Modelos Experimentais	Proteínas envolvidas nas vias de sinalização	Conclusões finais	Referência
<b>HN, HN-C8P<sup>5</sup></b>	<i>In vitro</i> : Células CSM14.1, HCT116, Cos7, SF268 e PC-3	BAX	HN impede a translocação de BAX para as mitocôndrias e impede a liberação do citocromo c, inibindo assim a via apoptótica..	[53]
<b>HN</b>	<i>In vitro</i> : Células C126S, C3S, C15S, C28S, S76C	Bax and Bid	HN impede a translocação e oligomerização do Bax e tBid nas membranas mitocondriais, inibindo a formação de poros e a liberação de citocromo c.	[60]
<b>HN, HNG</b>	<i>In vitro</i> : Células SH-SY5Y, B16, HEK293 <i>In vivo</i> : ratinho C57BL/6N, <i>C. elegans</i>	Autofagia	HN é um indutor de autofagia.	[61]
<b>HN</b>	<i>In vitro</i> : Células hRPE	Autofagia	HN protege as células hRPE contra a morte celular induzida pelo stress oxidativo e restaura a função mitocondrial.	[41]
<b>HN</b>	<i>In vitro</i> : células COS7, F11, NTG18, yeast-2-hybrid, neurónios primários E-14 e cérebros de ratinho E-14	TRIM11	TRIM11 desempenha um papel na regulação do nível intracelular da HN através das vias de degradação de proteínas mediadas pela ubiquitina.	[62]
<b>HN, HNA e HNG</b>	<i>In vitro</i> : Células HEK293, F11, yeast-2-hybrid <i>In vivo</i> : Rato Wistar	VSTM2L	VSTM2L é um antagonista secretado da HN, desempenha um papel importante na modulação da sua atividade neuroprotetora.	[63]

<sup>5</sup>Substituição de cisteína (Cys) na posição 8 por prolina (Pro).

O nível e a estabilidade da HN são regulados pela proteína *Tripartite Motif Containing 11* (TRIM11), uma ligase E3 ubiquitina. A perda da proteína TRIM11 leva a uma redução nos níveis da HN, sugerindo que a HN é degradada através da via ubiquitina-proteossoma, sendo este processo mediado pelo inibidor de proteossoma (Figura 4A) [62]. Por outro lado, a HN liga-se à proteína IGFBP3 intracelular, um factor pró-apoptótico, e regula a sua interação com a *importina-β1*, mediando a atividade celular induzida pela IGFBP3 (Figura 4A) [52, 59]. A autofagia mediada por *chaperone* é ativada pela HN, que estabiliza a interação entre a *Heat shock protein 90* (HSP90) e os substratos das chaperonas, protegendo as células da apoptose induzida por stress [64].

No meio extracelular, a HN secretada liga-se a recetores da superfície celular, como *G protein-coupled formyl peptide receptor-like-1* (FPRL1/FPRL2) [56, 57], para inibir a morte celular neuronal mediada pela *Apoptosis Signal-Regulating Kinase* (ASK) e pela *c-Jun N-terminal* (JNK), via da sinalização das *MAP kinase* (MAPK) (Figura 4B) [30]. Por outro lado, a HN interage com os recetores triméricos CNTFR-α/gp130/WSX-1 da superfície, promovendo efeitos protetores e ativando as cascatas de sinalização JAK2/STAT3, o que é fundamental para a sua ação neuroprotetora (Figura 4B) [58]. A HN interage também com a proteína IGFBP-3, para diminuir os níveis circulantes de *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) [65]. O IGF-1, por sua vez, parece ter um papel negativo na regulação dos níveis da HN, pois, quando os níveis de IGF-I aumentam, os níveis da HN tendem a diminuir [66]. Em modelos experimentais, foi observado que a ativação da via de sinalização do IGF-I está associada à redução dos níveis da HN, indicando que o IGF-I pode atuar como um inibidor da produção de HN [66]. A HN interage com a proteína *V-set and transmembrane domain containing 2 like* (VSTM2L), que é secretada para o meio extracelular. Embora a HN tenha um efeito neuroprotetor, o VSTM2L atua como um potente antagonista da atividade da HN, inibindo a sua capacidade neuroprotetora nas células neuronais (Figura 4A) [63].



**Figura 4:** Mecanismo de ação da humanina (HN) e as interações nas vias de sinalização. A) a HN está presente de forma intracelular, regulando as vias de sinalização apoptóticas e atividade celular. Ao ligar-se a várias proteínas, incluindo proteínas pro-apoptóticas membros da família *B-cell lymphoma* (BCL2), e à proteína *insulin like growth factor binding protein 3* (IGFBP3) intracelular. A HN é regulada pelo *Tripartite Motif Containing 11* (TRIM11) através da degradação pela via ubiquitina-proteassoma. A HN presente na forma intracelular interage também com proteínas extracelulares como *V-set and transmembrane domain containin 2 like* (VSTM2L) e IGFBP3. B) No meio extracelular, a HN secretada liga-se a recetores na superfície celular, mediando vias de sinalização e promovendo um efeito citoprotector [18].

### 1.2.5. Potencial da HN e seus análogos como agentes terapêuticos

Estudos recentes têm investigado extensivamente o impacto da HN em doenças neurodegenerativas, bem como em outras condições fisiopatológicas relacionadas com a idade, através de modelos *in vitro* e *in vivo* [17, 18, 32]. Estes estudos têm explorado o potencial do micropéptido da HN e dos seus análogos como agentes terapêuticos. As tabelas 2 e 3 apresenta alguns estudos realizados até ao presente, incluindo as intervenções realizadas. No entanto, até ao momento, não há ensaios clínicos em humanos que avaliem a eficácia da HN e dos seus análogos.

**Tabela 2:** Estudos representativos sobre a HN em indivíduos com várias doenças.

<b>Doença</b>	<b>Tipo de amostra em estudo</b>	<b>Métodos analíticos</b>	<b>Referência</b>
Lewy Body diseases, Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer	Sangue total	PCR quantitativa em tempo real	[67]
Doença de Parkinson	Plasma	Elisa e Western Blot	[68]
Doença de Alzheimer e Diabetes de tipo 2	Plasma	ELISA	[69]
Diabetes Mellitus tipo 2 e Doença de Alzheimer	Plasma	ELISA	[37]
Doença de Parkinson	PBMCs ( <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> )	PCR quantitativa em tempo real	[70]
Lewy Body diseases	Tecido <i>post-mortem</i> do córtex temporal	PCR quantitativa em tempo real	[71]
Lewy Body diseases, Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer	Tecido do córtex temporal das sinucleinopatias	Imuno-histoquímica	[67]

**Tabela 3:** Estudos representativos sobre a humanina (HN) e os seus análogos utilizando vários modelos experimentais

HN/ Análogos da HN	Doença	Modelos experimentais	Métodos analíticos	Referência
HN	Atrofia dentatorubro-palidoluisiana	<i>In vitro</i> : células PC12	Western Blot	[72]
HN	Doença de Parkinson	<i>Ex vivo</i> : culturas organotípicas de cérebros	Western Blot	[68]
		<i>In vitro</i> : linha celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y e linha celular de feocromocitoma de ratinho PC12	Western Blot e PCR quantitativa em tempo real	[68]
		<i>In vivo</i> : ratinho C57BL/6-wild type e ratinho C57BL/6-Transgénico	ELISA e Western Blot	[68]
HN	Doença de Alzheimer	<i>In vivo</i> : ratinho Wistar	Western Blot	[73]
HN e S14G-HN (HNG) <sup>1</sup>	Doença inflamatória intestinal	<i>Ex vivo</i> : tecido de placas de crescimento humana, ossos metatarsais fetais de ratinho	Imuno-histoquímica	[74]
		<i>In vivo</i> : linha celular condrocítica humana HCS-2/8	Imunofluorescência, Western Blot e PCR quantitativa em tempo real	[74]
<i>Rattin</i> (rHN), HN, F6A-HN <sup>2</sup> , HNG, HNG-F6A <sup>3</sup>	Diabetes Mellitus tipo 2, Doença de Alzheimer	<i>In vivo</i> : ratinhos Sprague–Dawley	ELISA	[37]
<i>Transducible humanin with an extended caspase-3 cleavage sequence</i> (tHN-C3)	Doença de Alzheimer	<i>In vitro</i> : células SH-SY5Y e dPC12	Western Blot	[38]
		<i>In vivo</i> : ratinho transgénico (Tg2576)	Imunohistoquímica	[38]

<sup>1</sup>Substituição de serina (Ser) na posição 14 por glicina (Gly); <sup>2</sup>Substituição de fenilalanina (Phe) na posição 6 por alanina (Ala); <sup>3</sup>HNG com substituição de fenilalanina (Phe) na posição 6 e serina (Ser) na posição 14 por glicina (Gly).

### 1.3. Humanin-like nuclear (HN-like)

Para além da HN codificada pela mtDNA, foram identificados, através de análises bioinformáticas, treze péptidos *humanin-like nuclear*, codificados por genes nucleares [39]. Estes genes, designados como *MTRNR2L1* a *MTRNR2L13*, que abrangem 24 e 28 aminoácidos e estão localizados em vários cromossomas (Tabela 4) [39]. Os peptídeos *MTRNR2L1*, *MTRNR2L8* e *MTRNR2L9* são altamente expressos no coração, nos rins e nos testículos [39]. Os genes *MTRNR2L8* e o *MTRNR2L12* apresentam o mesmo padrão de expressão que a HN [39]. Embora localizados em cromossomas diferentes, estes genes codificam sequências de aminoácidos idênticas, com uma substituição de serina (Ser) por leucina (Leu) na posição do micropeptídeo da HN [39].

**Tabela 4:** Localização cromossômica, sequências e a composição de aa (aminoácidos) dos genes *humanin-like nuclear* [18]

Gene	Cromossoma	Sequência	aa
<i>MTRNR2L1</i>	17p11.2	M A P R G F S C L L L S T S E I D L P V K R R T	24
<i>MTRNR2L2</i>	5q14.1	M A P R G F S C L L L S T S E I D L P V K R L L S S V F	28
<i>MTRNR2L3</i>	20q13.31	M A T R R F S C L L L S T S E I D L S V K R R I	24
<i>MTRNR2L4</i>	16p13.3	M A T Q G F S C L L L S V S E I D L S M K R Q Y K Q I R	28
<i>MTRNR2L5</i>	10q21.1	M A T P G F S C L L L S T S E I D L P M K R R V	24
<i>MTRNR2L6</i>	7q34	M T P R G F S C L L L P T S E T D L P V K R R T	24
<i>MTRNR2L7</i>	10p11.21	M A T G G F G C L L L L I R E I D L S V K R Q I	24
<i>MTRNR2L8</i>	11p15.3	M A P R G F S C L L L S T T S E I D L P V K R R A	24
<i>MTRNR2L9</i>	6q11.1	M A R R G F S C L L L S T T A T D L P V K R R T	24
<i>MTRNR2L10</i>	Xp11.21	M T T R G F S C L L L L I R E I D L S A K R R I	24
<i>MTRNR2L11</i>	1q42.3	M A T R G F S C L L L V I S E I D L S V K R W V	24
<i>MTRNR2L12</i>	3q11.2	M A P R G F S C L L L S T S E I D L P M A P V K R R A	27
<i>MTRNR2L13</i>	4q26	M D T Q G F S C L L L L I S E I D L S V K R R I	24

#### 1.4. Pertinência e objetivos

A HN tem sido amplamente investigada desde a sua descoberta, revelando propriedades neuroprotetoras, citoprotetoras e anti-apoptóticas em diversos estudos *in vitro* e *in vivo* [17, 18, 33, 75]. Estes estudos indicam que a HN desempenha um papel essencial na regulação da sobrevivência e função celular, especialmente nas células do sistema nervoso, e apresenta assim um potencial para várias aplicações terapêuticas na proteção contra diversas condições fisiopatológicas [17, 18].

Vários estudos reportam níveis diminuídos da proteína HN em diversas doenças, incluindo doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer e a *Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes* (MELAS) [76]; no entanto, essa redução não é observada em outras condições, como por exemplo a doença de Parkinson [68, 70]. De acordo com a literatura disponível, não há estudos publicados que relacionem a expressão da HN com a DMJ, apesar do potencial como agente terapêutico deste micropeptídeo. Considerando que existem vários estudos que reportam a ocorrência de disfunção mitocondrial em indivíduos DMJ, incluindo alterações na expressão de transcritos [15, 77] e proteínas da família BCL2 [15] em amostras de sangue de sujeitos DMJ, torna-se relevante estudar os níveis dos transcritos da HN em amostras de sangue periférico de doentes DMJ, no sentido de caracterizar o seu comportamento nesta doença.

Uma vez que a HN já demonstrou benefícios em outras doenças neurodegenerativas, a sua capacidade de modular a função mitocondrial e reduzir a apoptose pode ser relevante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas para a DMJ. Tendo isso em conta, o presente estudo teve como objetivos:

- i) Implementar o desenho da metodologia para a análise dos níveis dos transcritos da HN, em amostras de sangue total de doentes DMJ;

- ii) Analisar os níveis dos transcritos da HN em amostras de sangue total de doentes DMJ, comparando-os com controlos emparelhados por idade à colheita;
- iii) Correlacionar os níveis dos transcritos da HN com os dados demográficos (idade e sexo), clínicos (idade de início dos sintomas, duração da doença, e pontuação total de duas escalas neurológicas SARA - *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia* - e INAS - *Inventory of Non-Ataxia Signs*) e genéticos (número de repetições CAG no alelo expandido) dos doentes.

# Capítulo 2: Sujeitos e Métodos

## 2. Sujeitos e Métodos

### 2.1. Sujeitos e dados clínicos

Neste estudo foram utilizadas 41 amostras de RNA total, previamente extraído de amostras de sangue total de doentes DMJ de famílias açorianas [78]. Foram também usadas 72 amostras de RNA total, previamente extraído de amostras de sangue total de indivíduos saudáveis de origem açoriana, que foram utilizados como controlos [78].

Os doentes DMJ foram avaliados clinicamente por um neurologista no âmbito do projeto ESMI (*European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative*), (JPCOFUND/0002/2015) tendo todos apresentado uma pontuação total da SARA  $\geq 3$  [79]. A confirmação molecular da presença da mutação no gene *ATXN3* foi efetuada de acordo com o protocolo descrito por Bettencourt e colaboradores [80].

A caracterização demográfica (sexo e idade à colheita), clínica e genética dos doentes foi feita através da informação pseudonimizada disponível na base de dados do consórcio ESMI. A idade de início foi definida como a idade de aparecimento dos primeiros sintomas, referidos pelo doente ou familiar próximo. A duração da doença foi definida como o tempo decorrido entre a idade de início e a idade da avaliação neurológica/colheita de sangue. Estavam também disponíveis as pontuações de duas escalas neurológicas: 1) a escala SARA que é constituída por 8 itens, a qual avalia a severidade da ataxia, apresentando uma pontuação total que varia entre 0 e 40 [81]; e 2) a escala INAS que é composta por 30 itens que avaliam vários sinais não relacionados com a ataxia e com sinais oculomotores cerebelares. A pontuação da INAS avalia a presença ou ausência de 16 sinais não atáxicos, variando entre 0 e 16 pontos [82]. Estava ainda disponível o genótipo dos doentes (número de repetições CAG no alelo normal e expandido).

Neste estudo, foram também usadas 72 amostras de sangue total de indivíduos sem doença de Machado-Joseph (controlos) que foram colhidas no âmbito do projeto REFAZOR. Estes indivíduos foram excluídos para a mutação no gene *ATXN3* de acordo com o protocolo descrito por Bettencourt e colaboradores [80] ou através de um protocolo *in-house* que permite

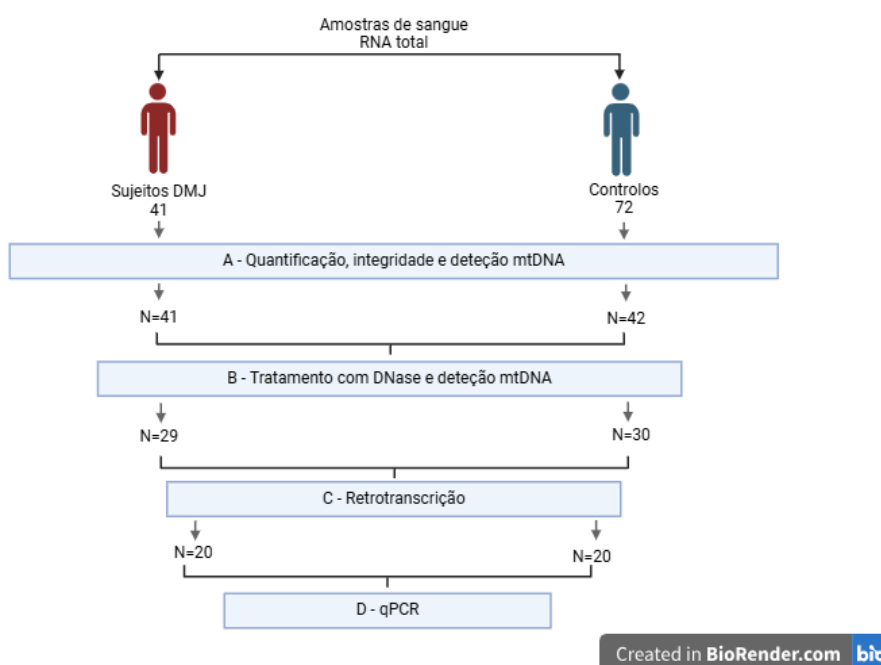
a exclusão da mutação por eletroforese em gel de agarose. Os controlos foram emparelhados por idade com os doentes DMJ.

O RNA total das amostras de sangue dos doentes DMJ e dos indivíduos saudáveis foi previamente extraído e encontra-se armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O projeto ESMI, no qual se insere a presente tese, foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital do Divino Espírito Santo (HDES, Ponta Delgada, Açores, Portugal) e pela Universidade dos Açores (Parecer 01/2021). O estudo incluiu um grupo de controlos, cujas amostras foram obtidas através do projeto REFAZOR, o qual foi igualmente aprovado pela Comissão de Ética da Universidade dos Açores (Parecer 9/2018). Todos os participantes do estudo assinaram um termo de consentimento informado por escrito, conforme os requisitos éticos.

## 2.2. Métodos

O desenho experimental do estudo está representado na Figura 5.



**Figura 5:** Representação esquemática do desenho experimental do estudo. As etapas incluem: (A) Primeiro foi feito o controlo de qualidade das amostras, nomeadamente a quantificação do RNA total, a avaliação da integridade do mesmo, e a deteção da presença/ausência de DNA mitocondrial (mtDNA) nas

mesmas; (B) As amostras em que se observou presença de mtDNA foram tratadas com DNase I e posteriormente foi efetuada nova verificação para confirmar a eliminação do mtDNA. Depois desta etapa, foram selecionadas 20 amostras de doentes DMJ (idade média  $48,20 \pm 12,78$  anos) e 20 amostras de controlos (idade média  $44,15 \pm 10,72$  anos) para as seguintes etapas; (C) Foi feita a retrotranscrição reversa usando um *primer* Oligo (dT); e (D) Determinação dos níveis de expressão dos transcritos da HN através da técnica de PCR quantitativa em tempo-real (qPCR) usando um TaqMan Custom Assay da humanina desenhado pelo grupo liderado pela Doutora Manuela Lima (UAç).

### **2.2.1. Avaliação da integridade do RNA total e da ausência de contaminação das amostras com DNA mitocondrial (mtDNA)**

A quantificação de RNA total de todas as amostras (doentes, n=41 e controlos, n=72) foi efetuada no Nanodrop 2000c (Thermo Scientific), e a sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando um marcador de peso molecular de 1kb (Hyperladder, Thermo Scientific) (Figura 5A). A integridade das amostras foi avaliada pela presença de bandas nítidas de RNA de 28S e 18S no gel de agarose, em que a banda 28S é aproximadamente duas vezes mais intensa que a 18S. Nas amostras que passaram o primeiro passo do controlo de qualidade, foi confirmada a ausência de contaminação de mtDNA. A confirmação da ausência de mtDNA nas amostras é essencial para garantir que o RNA total não apresenta contaminação de mtDNA. Para avaliar a presença/ausência de contaminação, as amostras de RNA total foram amplificadas por PCR (*Polymerase chain reaction*), tendo como alvo o segmento hipervariável I (HVRI) do mtDNA da região controlo utilizando o *primer forward* L15907-F (5'-ATACACCAGTCTTGTAACC-3'), que se liga ao gene mitocondrial *MT-TT* (tRNA-thr) [83], e o *primer reverse* H8-R (5'-GGTTAATAGGGTGATAGACC-3') [84]. A reação de amplificação foi efetuada num volume total de 25 µl usando as seguintes concentrações de reagentes: 1x tampão, 1x DMSO, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3mM dNTPs, 1µM *primer forward* e *reverse* (25uM), 1U de DreamTaq DNA polimerase e aproximadamente 100ng de RNA. A amplificação foi feita num termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems) utilizando as seguintes condições:

desnaturação durante 5' a 94°C, seguida de 34 ciclos de 1' a 94°C, 30'' a 55°C e 1' a 72°C; e por fim uma extensão final de 7' a 72°C. Na PCR foi usado um controlo negativo (NTC- *No-template control*), na qual estavam presentes todos os componentes da PCR exceto a amostra, para detetar possíveis contaminações dos reagentes de PCR. Foi também utilizada uma amostra de DNA genómico como controlo positivo para garantir que o fragmento amplificado era o fragmento mtDNA de interesse. Em seguida confirmou-se a presença/ausência de mtDNA por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando um marcador de peso molecular de 100bp [85]. O fragmento amplificado na PCR tem um tamanho de 690pb, sendo este tamanho que se deteta no gel.

### **2.2.2. Tratamento com DNase I**

Todas as amostras de RNA total que passaram na etapa de avaliação da integridade e onde foi detetada a presença de mtDNA (contaminação), foram tratadas com DNase I, de acordo com o protocolo descrito no kit DNase I, RNase-free (Thermo Scientific) de modo a remover a contaminação de mtDNA (Figura 5B). Este tratamento é fundamental não só para remoção de mtDNA, como também do DNA genómico, pois a sua presença pode interferir na análise de expressão por qPCR resultado em falsos positivos [86]. Após o tratamento com DNase I, foi feita novamente uma PCR, para comprovar a ausência de amplificação do fragmento de mtDNA. O resultado da PCR foi verificado através de uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A PCR e a eletroforese foram realizadas de acordo com o descrito anteriormente no ponto 2.2.1 (Figura 5B). A seguir a esta etapa foram selecionadas 20 amostras de doentes e 20 amostras de controlos emparelhadas por idade, que passaram as duas primeiras etapas (RNA total integro e sem contaminação de mtDNA, para posteriormente analisar da expressão do transcrito da HN por qPCR.

### 2.2.3. Retrotranscrição

Devido à semelhança entre a sequência do *MT-RNR2*, o qual codifica o 16S rRNA e a sequência da HN, originada a partir da *small ORF MT-RNR2*, torna-se fundamental garantir a ausência de transcritos do 16S rRNA nas amostras nas quais se vai quantificar o transcrito da HN. Para tal, foi feita a retrotranscrição reversa nas amostras de RNA total que passaram as duas etapas anteriores (Figura 5A e 5B), utilizando-se o Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific), que usa o *primer* Oligo (dT)18. Este *primer* liga-se à cauda de poli-A presente nos mRNAs, garantindo a amplificação exclusiva do mRNA durante a síntese de cDNA. O volume final de 20 µL de cDNA foi armazenado a -80°C.

### 2.2.4. PCR quantitativa em Tempo-real

Todas as experiências de qPCR (Figura 5D) foram efetuadas utilizando os seguintes reagentes: Taqman Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems), TaqMan Custom Assay Humanin (Applied Biosystems), (*Foward*: 5-GGCATAACACAGCAAGACGAGA-3, *Reverse*: 5-ACTGCTCGGAGGTTGGGTT-3 e sonda: 5-CCCACAGGTCCTAAC-3), e o Taqman Assay *TRAP1* (*TNF receptor associated protein 1*; Hs00972326\_m1) que foi usado como gene de referência [87]. Cada amostra foi analisada em triplicado numa placa de 96 poços, para o gene de interesse e para o gene de referência, tendo as amostras dos doentes DMJ sido processadas na mesma placa que os seus respetivos controlos emparelhados por idade. Foi usado 100ng de cDNA em cada um dos replicados. As experiências de qPCR foram realizadas no *ABI StepOnePlus* (Applied Biosystems) utilizando as condições descritas pelo fabricante: desnaturação inicial de 95°C durante 2' seguida de 40 ciclos de 10'' a 95°C e 20'' a 60°C. Os valores de expressão relativa foram calculados utilizando o método  $2^{-\Delta C_q}$  no *software* DataAssist v3.0 (Applied Biosystems).

### 2.3. Análises de dados

Foi efetuada a análise descritiva dos dados demográficos, clínicos (idade de início da doença, duração da doença, pontuações totais de SARA e de INAS e genéticos (número de repetições do CAG normal e alelo expandido) dos doentes. Esta análise foi também utilizada para fazer a descrição dos dados demográficos dos controlos.

Antes das análises estatísticas, procedeu-se à identificação e remoção de *outliers*. O teste de Mann-Whitney U foi utilizado para confirmar que não existiam diferenças significativas na idade à colheita entre doentes e controlos. Este teste foi usado igualmente para comprovar que não existiam diferenças no rácio homens/mulheres entre os dois grupos biológicos em estudo. Na ausência de diferenças significativas entre os grupos (doentes e controlos) em relação à idade e ao sexo ( $p > 0.05$ ), não foi necessário ajustar essas variáveis na análise de comparação dos níveis dos transcritos da HN entre os dois grupos. Por fim, para determinar se há diferenças nos níveis dos transcritos da HN entre doentes e controlos utilizou-se o teste de Mann-Whitney U.

Para verificar se era necessário ajustar as variáveis idade à colheita e sexo, aquando das análises de correlação entre os níveis de HN e as características clínicas e genéticas dos doentes, analisou-se a correlação entre os níveis dos transcritos da HN e estas duas variáveis na população controlo, utilizando o coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ). Em seguida, analisaram-se as correlações entre os níveis de HN e os dados genéticos (número de repetições CAG no alelo normal e no alelo expandido) e os dados clínicos dos doentes (duração da doença, pontuação total das escalas neurológicas SARA e INAS) utilizando um teste de correlação parcial de Spearman ( $\rho$ ), ajustando para a variável idade à colheita. Uma correlação parcial de Spearman ( $\rho$ ) foi efetuada para analisar a correlação entre os níveis de HN e idade de início dos sintomas, ajustando à idade à colheita e ao número de repetições CAGs no alelo expandido.

Os procedimentos estatísticos foram efetuados com recurso ao programa IBM SPSS Statistics, versão 28 (IBM Corp., Armonk, N.Y., EUA), tendo sido considerado significativo o valor de  $p < 0,05$ . O programa GraphPad Prism version 10 (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA) foi utilizado para identificar os *outliers* (ROUT method  $Q=0,1\%$ ) e para gerar o gráfico.

# Capítulo 3: Resultados e discussão

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Caracterização demográfica das amostras usadas na determinação dos níveis de HN

Um total de 40 sujeitos de origem açoriana (20 doentes DMJ e 20 indivíduos saudáveis, não portadores da mutação da DMJ), foram incluídos no estudo da determinação dos níveis dos transcritos da HN. A caracterização dos doentes e controlos usados neste estudo é apresentada na tabela 5.

O grupo dos doentes DMJ é constituído por 11 indivíduos do sexo masculino e nove indivíduos do sexo feminino. A média do número de repetições do alelo normal (alelo 1) é de  $22,25 \pm 4,32$  [14-28], e do alelo expandido (alelo 2) é de  $73,60 \pm 3,50$  [67-80]. No estudo da coorte açoriana realizado por Lima e colaboradores [88], indicou que o alelo normal mais frequente foi de 23 repetições, com intervalos de 14 a 29, e o alelo expandido foi de 72 repetições, com intervalos de 59 a 77 repetições. Apesar das distintas formas de reportar os dados, os valores observados são semelhantes. Em relação à idade de início dos primeiros sintomas, a média foi de  $34,70 \pm 9,87$  anos, com um mínimo de 16 anos e um máximo de 56 anos. Este resultado é semelhante ao do observado do previamente na coorte dos Açores [88], que relataram uma média de  $36,5 \pm 9,55$ , com limites entre 16 e 60 anos. Na escala SARA (cuja pontuação máxima é 40), os doentes apresentaram uma pontuação que variou entre o 3 e os 29, com uma média de  $12,73 \pm 7,75$ . Estes resultados são semelhantes aos reportados no estudo realizado por Lima e colaboradores [88], em que os doentes DMJ apresentavam uma pontuação que variava entre 3 e 29, e tinham uma pontuação média da SARA de  $14,39 \pm 8,19$ . No caso da escala INAS (cujo máximo de pontuação é 16), as pontuações dos doentes neste estudo variaram entre o 1 e o 9, com uma média de  $4,35 \pm 2,66$ , sendo estes resultados similares os reportados por Lima e colaboradores [88], com uma média de  $4,69 \pm 2,58$ . Relativamente à duração da doença, esta foi de  $13,50 \pm 8,37$  anos, com um mínimo de 1 e um máximo de 32 anos, valores

muito próximos aos observados no estudo de Lima e colaboradores [88], que reportaram uma média de  $11,7 \pm 6,54$  com intervalos de 1 a 31.

O grupo controlo é composto por 13 indivíduos do sexo masculino e sete indivíduos do sexo feminino. O número médio de repetições CAG no alelo 1 neste grupo é de  $18,18 \pm 4,14$  [14-24] e no alelo 2, o número médio de repetições CAG é de  $22,36 \pm 3,53$  [14-27]. Tal como seria expectável, já que o emparelhamento por idades foi um critério de seleção dos indivíduos do grupo controlo, a idade dos indivíduos à colheita são semelhantes entre os dois grupos estudados (teste de Mann-Whitney U;  $p=0,231$ ), variando entre 23 e 68 anos de idade ( $48,20 \pm 12,78$ ) no grupo dos doentes, e entre 25 e 63 anos de idade ( $44,15 \pm 10,72$ ) no grupo dos controlos.

**Tabela 5:** Caracterização demográfica, clínica e genética dos sujeitos incluídos nos dois grupos biológicos estudados (doentes DMJ e controlos).

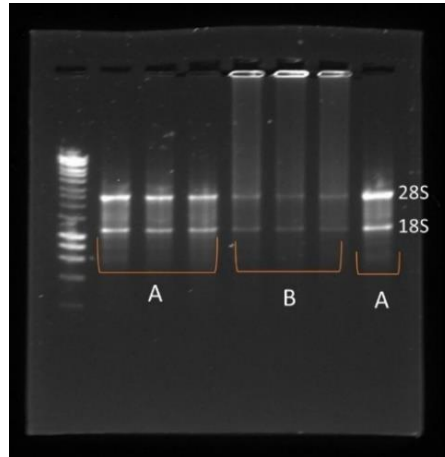
<i>Sujeitos</i>	
<b>DMJ</b>	
<i>N (Masculino; Feminino)</i>	20 (11; 9)
<i>Idade à colheita</i>	$48,20 \pm 12,78$ [23; 68]
<i>Alelo normal</i>	$22,25 \pm 4,32$ [14;28]
<i>Alelo expandido</i>	$73,60 \pm 3,50$ [67;80]
<i>Idade de início</i>	$34,70 \pm 9,87$ [16; 56]
<i>SARA</i>	$12,73 \pm 7,75$ [3,0; 29,0]
<i>INAS</i>	$4,35 \pm 2,66$ [1;9]
<i>Duração da doença</i>	$13,50 \pm 8,37$ [1;32]
<b>Controlos</b>	
<i>N (Masculino; Feminino)</i>	20 (13;7)
<i>Idade à colheita</i>	$44,15 \pm 10,72$ [25; 63]
<i>Alelo 1</i>	$18,18 \pm 4,14$ [14;24]*
<i>Alelo 2</i>	$22,36 \pm 3,53$ [14;27]*

As variáveis quantitativas são apresentadas como média  $\pm$  desvio-padrão [mínimo; máximo]; alelo 1: número de repetições CAG no alelo normal dos controlos; alelo 2: número de repetições CAG no alelo normal dos controlos.

\*Informação disponível para 11 controlos.

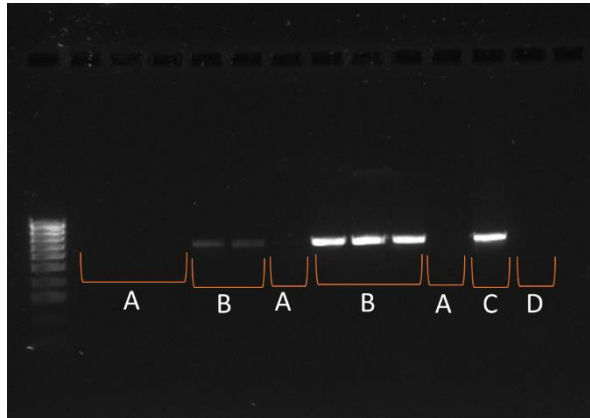
### **3.2. Avaliação da integridade do RNA total e da ausência de contaminação das amostras com mtDNA**

Das 113 amostras de RNA total analisadas (41 de doentes DMJ e 72 de controlos), apenas 83 (41 de doentes e 42 de controlos) foram consideradas como íntegras, com base na análise das bandas dos fragmentos do 28S e 18S, obtidas por eletroforese em gel de agarose. A integridade destas 83 amostras foi confirmada pela presença de duas bandas bem definidas destes dois fragmentos, em que a banda do fragmento 28S apresentava uma maior intensidade, e pela ausência de um arrastamento no gel (Figura 6), o que indica que o RNA total estava íntegro [88]. Em contraste, nas amostras degradadas, as bandas dos fragmentos 28S e 18S apresentavam uma intensidade fraca e semelhante entre si, e também a presença de um arrastamento no gel (Figura 6). Trinta amostras de indivíduos controlos foram também excluídas por indicarem degradação do RNA total, uma vez que apresentavam a presença de um arrastamento no gel e, as bandas dos fragmentos 28S e 18S não apresentarem as condições indicadas acima (Figura 6). Estes resultados demonstram a relevância da avaliação da integridade do RNA total, um passo importante em estudos de expressão génica, pois garante a fiabilidade dos resultados [89, 90]. A degradação do RNA total pode comprometer a eficiência da transcrição reversa e, conseqüentemente, a precisão da quantificação do transcrito da HN. Portanto, as amostras que não cumpriam os critérios de integridade referidos acima como a presença do arrastamento no gel ou ausência de bandas dos fragmentos 28S e 18S nítidas, não passaram para a etapa seguinte.



**Figura 6:** Representação do resultados obtido na avaliação da integridade do RNA total nas amostras estudadas: (A) Amostras que apresentam integridade do RNA total, em que se pode observar bandas bem definidas dos fragmentos 28S e 18S, e em que a banda do 28S é mais intensa; e (B) Amostras que apresentam degradação do RNA total, onde se pode observar a presença de um arrastamento no gel, e as bandas dos fragmentos 28S e 18S pouco definidas. A verificação da integridade do RNA total foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1%, usando um marcador de peso molecular de 1kb.

Na análise da ausência de contaminação das amostras com mtDNA foram analisadas as 41 amostras de doentes DMJ e 42 amostras de controlos consideradas íntegras. Dezasseis amostras (12 de doentes DMJ e 4 de controlos) não apresentavam contaminação com mtDNA, uma vez que não se obteve uma banda com um tamanho de 690pb, fragmento amplificado com as condições de PCR descritas na secção 2.2.1, e observado na amostras de DNA genómico usada como controlo positivo (Figura 7). Em contraste, foi detetada a presença de mtDNA em 67 amostras (29 de doentes DMJ e 38 de controlos), estando presente uma banda com um tamanho de 690 pb no gel semelhante aquela encontrada do controlo positivo usado na PCR (Figura 7).



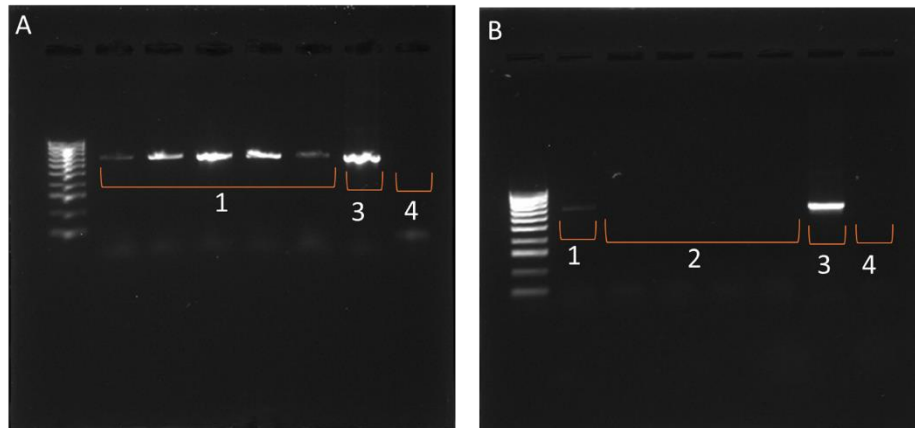
**Figura 7:** Representação do resultados obtido na avaliação da detecção de contaminação por mtDNA nas amostras de RNA total: (A) Amostras de RNA total sem contaminação com mtDNA; (B) Amostras de RNA total com contaminação de mtDNA; (C) Amostra de DNA genómico usada como controlo positivo; e (D) Controlo negativo, reacção de PCR na qual estavam presentes todos os componentes a amostra de RNA total. A verificação da detecção de contaminação por mtDNA foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, usando um marcador de peso molecular de 100bp.

Os resultados obtidos demonstram que a verificação da detecção de contaminação por mtDNA é extremamente importante, pois a presença do mtDNA nas amostras de RNA total pode induzir ao aparecimento de falso-positivos nas análises de expressão por qPCR, comprometendo a interpretação dos dados [86]. Uma vez que os procedimentos de extração de RNA total podem não remover completamente o mtDNA, a verificação da ausência de contaminação de mtDNA torna-se uma etapa crítica para garantir a obtenção de resultados precisos [91]. As 67 amostras que apresentaram contaminação foram submetidas a um tratamento com DNase I.

### 3.3. Tratamento com DNase I

As 67 amostras de RNA com integridade e que mostraram estar contaminadas com mtDNA foram tratadas com DNase I, sendo este tratamento fundamental para remover o DNA genómico e mtDNA, e desde modo assegurar a pureza do RNA [86]. Após o tratamento, verificou-se a eficácia do mesmo utilizando a metodologia descrita na secção 2.2.1, sendo que este foi eficaz em apenas 57 amostras (29 de doentes DMJ e 28 de controlos), nas quais não se

detetou amplificação do fragmento de mtDNA, indicando assim ausência de contaminação (Figura 8). Nas amostras em que o tratamento não foi eficaz, observou-se uma banda com um tamanho de 690pb semelhante à observada no controlo positivo, o que indica a presença de mtDNA (Figura 8).



**Figura 8:** Representação do resultado obtido na avaliação da detecção contaminação de mtDNA, (A) antes do tratamento com DNase I, e (B) depois do tratamento com DNase I: (1) Amostras de RNA total com contaminação de mtDNA; (2) Amostras de RNA total sem contaminação de mtDNA; (3) Amostra de DNA genómico usada como controlo positivo; e (4) Controlo negativo, reacção de PCR na qual estavam presentes todos os componentes a amostra de RNA total. A verificação da detecção de contaminação por mtDNA foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, usando um marcador de peso molecular de 100bp.

Após o tratamento com DNase I, verificou-se que algumas amostras ainda apresentavam contaminação, indicando que o tratamento não foi eficaz. Portanto, estes resultados vem reforçar que a confirmação da ausência da contaminação de mtDNA é uma etapa crítica no processo de purificação do RNA. A confirmação por PCR dos resultados do tratamento com DNase I, não só valida a eficácia do mesmo, mas também é importante para garantir a qualidade dos dados nas análises de qPCR. Embora o tratamento com DNase I de seja um passo fundamental, este nem sempre é eficaz na remoção do DNA genómico [92, 93].

### 3.4. Transcrição reversa e experiências de qPCR

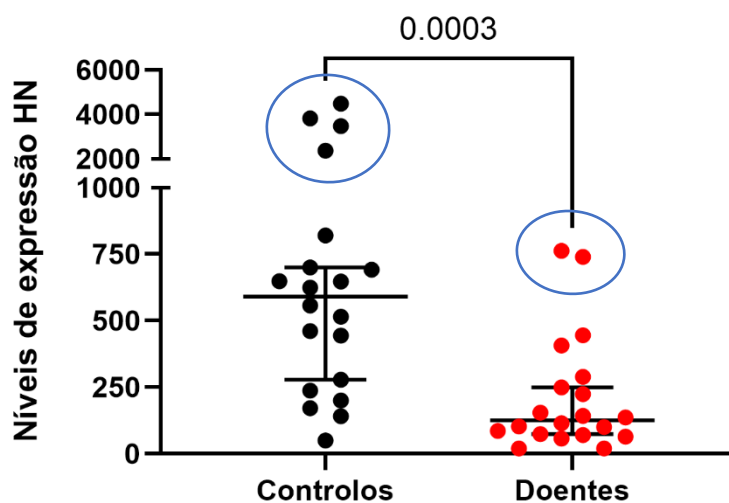
As etapas anteriormente descritas, que incluíram a verificação da integridade do RNA e a ausência de contaminação com mtDNA e o tratamento com DNase I (no caso das amostras que apresentaram contaminação), foram fundamentais para a realização eficaz da transcrição reversa e da análise por qPCR.

Nas experiências de qPCR, usou-se TaqMan Assays porque estes apresentam uma elevada precisão e especificidade comparativamente ao método de Sybr Green, uma vez que utiliza sondas específicas que minimizam o risco de resultados falsos positivos, garantindo assim uma maior fiabilidade nos dados obtidos [94]. Neste estudo utilizou um TaqMan Custom Assay da HN (Applied Biosystems) que foi desenhado no âmbito de um projeto liderado pela Doutora Manuela Lima (UAc). O desenho deste TaqMan Custom Assay foi feito para garantir apenas a amplificação do transcrito da HN, assegurando assim uma elevada especificidade e evitando a amplificação de outros transcritos semelhantes, como os *humanin-like*. Apesar de já existir na literatura um TaqMan Custom Assay da HN desenhado por Salemi e colaboradores [70], verificou-se que este amplifica não só os transcritos da HN, mas também os de *MTRNR2L8* e *MTRNR2L12*, que são expressos no sangue [39, 95, 96]. Daí a necessidade de usar neste estudo, um TaqMan assay que apenas amplifica o transcrito da HN.

A implementação de uma metodologia fiável, desde a parte do controlo de qualidade até à qPCR, foi crucial para garantir a precisão na quantificação dos níveis dos transcritos da HN, e desta forma garantir que os resultados obtidos refletem com precisão a expressão dos transcritos da HN. O desenho metodológico demonstrou ser uma ferramenta valiosa para análise dos níveis dos transcritos da HN, podendo ser aplicada em estudos futuros na DMJ ou em outras patologias que pretendam estudar os níveis dos transcritos da HN.

### 3.5. Análise da expressão diferencial do transcrito da HN

No grupo de 20 doentes analisados, a média dos níveis dos transcritos da HN foi de  $213,03 \pm 218,12$ , com um mínimo 20,00 e um máximo de 762,34. No grupo de 20 controlos, a média dos níveis de expressão da HN foi de  $1066,16 \pm 1330,86$ , com um mínimo de 49,87 e um máximo de 4477,16. Os níveis dos transcritos da HN revelaram-se estatisticamente diferentes entre o grupo dos doentes e dos controlos (teste de Mann-Whitney U;  $p < 0,001$ ), estando estes diminuídos nos doentes (Figura 9). Uma vez que tinham sido inicialmente identificados seis *outliers* (quatro relativos a amostras de controlos e dois a amostras de doentes), a mesma análise foi feita sem os seis *outliers* identificados, verificando-se que não houve alteração dos resultados (teste de Mann-Whitney U;  $p < 0,001$ ), e confirmando-se a diminuição dos níveis dos transcritos da HN nos doentes.



**Figura 9:** Comparação dos níveis dos transcritos da HN entre o grupo de 20 doentes e 20 controlos. Os seis *outliers* identificados (quatro de controlos e dois de doentes) estão delineados por um círculo azul. As barras horizontais representam a mediana e o intervalo de confiança com nível de confiança de 95% dos níveis de expressão para cada um dos grupos. Os círculos pretos correspondem aos indivíduos do grupo de controlo e os círculos vermelhos representam os indivíduos do grupo de doentes DMJ.

A análise comparativa dos resultados do presente estudo com outros estudos é limitada, por um lado, pelo número reduzido de artigos que avaliam os níveis dos transcritos da HN em

doenças neurodegenerativas, e por outro, pelas diferenças metodológicas observadas entre esses estudos. Ao contrário do observado no presente trabalho, os níveis dos transcritos da HN em amostras de sangue total de doentes com doença de Parkinson apresentavam valores semelhantes aos observados nos controlos [67] (Tabela 2). Da mesma forma, num outro estudo realizado pelo mesmo grupo [67], não se observaram diferenças significativas nos doentes com Demência com Corpos de Lewy em comparação com o grupo de controlos. Por outro lado, na doença de Alzheimer, observou-se um aumento nos níveis dos transcritos da HN no sangue dos doentes em relação aos controlos [67]. Num outro estudo sobre a doença de Parkinson [70], foram analisados os níveis dos transcritos da HN em células mononucleares do sangue periférico nos doentes, dado que estes apresentaram uma sobreexpressão dos níveis de HN (Tabela 2), os resultados indicaram um aumento dos níveis dos transcritos da HN em comparação com os controlos. Os resultados obtidos no presente estudo foram diferentes daqueles obtidos nos estudos referidos anteriormente [67, 70].

A constatação de níveis diminuídos de transcrito da HN em doentes DMJ levanta questões sobre a função da HN na patogénese da doença, dado que já foram reportadas alterações na via mitocondrial e via apoptótica em amostras de sangue de sujeitos DMJ [15, 77, 97]. Raposo e colaboradores [77], observaram um aumento significativo na frequência da deleção mtDNA comum (m.8482\_13460del4977) nos doentes DMJ em comparação com indivíduos controlos. Para além disso, outros estudos reportaram que a via apoptótica mitocondrial pode estar alterada em amostras de sangue de doentes DMJ, uma vez que: i) os níveis de transcritos de genes antiapoptóticos, como *BCL2* e *heat shock 27kDa protein 1 (HSPB1)*, estão reduzidos em doentes, havendo uma diminuição progressiva dos níveis de *BCL2* ao longo da duração da doença, o que poderá indicar uma disfunção na resposta ao stress mitocondrial [97]; e ii) [15] os níveis de transcritos do *BCL2* estão diminuídos no sangue de doentes na fase inicial da doença (até 5 anos de duração da doença) em comparação com controlos emparelhados por sexo e idade, o que sugere que a desregulação da via apoptótica mitocondrial pode estar

relacionada com a progressão da DMJ. Vários estudos reportaram dados que suportam o facto das vias mitocondrial e a apoptótica estão alteradas na DMJ [15, 77], contudo o impacto destas alterações nos níveis de HN não está estudado. Uma vez que a HN intervém nestas duas vias e tem uma capacidade neuroprotetora [32, 53, 68], sublinha-se a necessidade de esclarecer relação da HN com a disfunção mitocondrial na DMJ, quer relacionando níveis dos transcritos da HN com “readouts” estabelecidos para a análise da função mitocondrial e da via apoptótica, quer estabelecendo essa relação com os níveis dos péptidos da HN.

Os níveis dos transcritos da HN noutras doenças neurodegenerativas mostraram um padrão variável [67, 70], não tendo sido detectadas diferenças entre doentes de doença de Parkinson e controlos [67], ou detetado níveis mais elevados em doentes de doença de Alzheimer e de doença de Parkinson em comparação com os respetivos controlos [67, 70], contrariamente ao que se observou no presente estudo. Esta diferença nos padrões de expressão, ao nível do transcrito, da HN poderá refletir diferenças existentes entre as doenças estudadas, mas pode também ser devido às diferenças existentes nas metodologias aplicada nos vários estudos acima referidos. O estudo feitos por Domingo e colaboradores [67], apresenta várias limitações que levantam dúvidas sobre a fiabilidade dos resultados: 1) usaram um gene de referência *ACTB* (*β-actin*) que não foi validado para o tipo de amostras usadas, em contraste com o gene *TRAP1* usado como gene de referência neste trabalho [87] ; 2) os níveis de transcrito do gene de referência e da HN foram analisados em placas diferentes nas experiências de qPCR, o que levanta dúvidas sobre a fiabilidade dos resultados; e 3) usaram *Sybr Green* em vez de TaqMan assays, o que pode levar a obtenção de sinais falsos positivos uma vez que este se liga a qualquer DNA de cadeia dupla, incluindo sequências não específicas [94, 98]. Por outro lado, nos estudos realizados por Salemi e colaboradores [70, 99] apresenta outras limitações: 1) não foi realizada a confirmação da contaminação por mtDNA no RNA total, o que pode levar a resultados falsos positivos; e 2) o TaqMan Custom Assay desenhado para amplificar os níveis dos transcritos da HN (*primers* da HN (*primer forward*: *tggctccacgagggttca*; *primer*

*reverse*: tatgcccgcctcttcacg; sonda ttaaccagtgaattgacc) não são específicos, uma vez que também podem amplificar transcritos de genes *humanin-like*, como *MTRNR2L8* [100] e *MTRNR2L12* [101]. Devido à elevada homologia entre a HN e as sequências *humanin-like*, é essencial usar um TaqMan assay (*primers* e sondas) otimizado para amplificar exclusivamente os níveis dos transcritos da HN [39]. De acordo com Bodzioch e colaboradores [39], sem essa precisão, podemos amplificar também transcritos semelhantes de *humanin-like nuclear*, levando a dados contraditórios e, conseqüentemente, a interpretações incorretas da expressão génica.

### **3.6. Correlações entre os níveis dos transcritos da HN e os dados clínicos e genéticos dos doentes DMJ**

Após se verificar que os níveis dos transcritos da HN é significativamente diferente entre o grupo dos doentes e controlos, foi-se analisar se as características clínicas e genéticas dos doentes estavam correlacionadas com os níveis dos transcritos da HN. Para isso, foi preciso antes perceber se a idade e o sexo dos indivíduos tinha influência nos níveis dos transcritos na humana, usando o grupo dos controlos. No grupo dos controlos, foi observada uma correlação positiva forte entre os níveis dos transcritos da HN e a idade à colheita dos indivíduos ( $\rho=0,829$ ;  $p<0,001$ ), indicando que os níveis da HN aumentam com a idade do indivíduo. Estes resultados estão em linha com observados em outros estudos, em que os níveis da HN aumentam com a idade dos indivíduos reforçando a relação nos níveis do péptido da HN em indivíduos saudáveis [69, 102]. No entanto, é relevante sublinhar que os resultados referentes ao transcrito e à proteína não são diretamente comparáveis, pois cada estudo aborda diferentes aspetos da expressão génica. Na população controlo, os níveis dos transcritos da HN não apresentaram uma correlação significativa com o sexo ( $\rho=0,027$ ;  $p=0,909$ ), sendo os níveis dos transcritos da HN semelhantes entre homens e mulheres (teste de Mann-Whitney U;  $p=0,938$ ).

Não foi também observada uma diferença significativa nos níveis dos transcritos da HN entre os sexos no grupo de controlos, contudo não há estudos disponíveis que permitam fazer uma comparação dos resultados obtidos neste trabalho. No estudo feito por Lytvyn e colaboradores [103], não foram observadas diferenças significativas nos níveis do péptido da HN entre os sexos nos controlos, apesar dos níveis em plasma serem numericamente mais baixos no sexo masculino (n=10) comparado com o sexo feminino (n=11), contudo o tamanho da amostra reduzido pode ter sido um fator limitante. Na amostra de 20 doentes estudados, os níveis dos transcritos da HN não correlacionam com a severidade da doença, obtida a partir das escalas neurológicas SARA (n=20, rho=0,036; p=0,884) e INAS (n=20, rho=0,005; p=0,985). Os níveis dos transcritos da HN também não correlacionaram com a duração da doença (n=20, rho= 0,357; p=0,134) e com o número de repetições CAG no alelo expandido (n=20, rho= -0,226; p=0,352). Tal como para as outras variáveis, não se observou uma correlação significativa entre os níveis dos transcritos da HN e a idade de início dos sintomas (n=20, rho=-0,267; p=0,283), ajustando não só à idade à colheita como também ao número de repetições CAG no alelo expandido. A ausência de resultados significativos poderão dever-se ao tamanho amostral reduzido, o que limita a potência estatística.

Em conclusão, apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos moleculares da DMJ, o papel da HN nesta doença ainda é desconhecido. Uma vez que a HN é conhecida pelas suas propriedades neuroprotetoras e citoprotetoras observadas em modelos *in vitro* e *in vivo* de outras doenças neurodegenerativas [17, 18, 32], o presente trabalho teve como um dos seus objetivos, analisar pela primeira vez, os níveis dos transcritos da HN em amostras de sangue de doentes DMJ. De forma a garantir a obtenção de resultados fiáveis, implementou-se uma nova metodologia experimental para analisar de forma rigorosa os níveis dos transcritos da HN, sendo que esta metodologia poderá mais tarde vir a ser usada em futuros estudos de análises de expressão de transcritos da HN. Reportou-se uma diminuição dos níveis dos transcritos da HN em amostras de sangue periférico de doentes DMJ comparativamente aos controlos

emparelhados por idade, o que parece suportar a pertinência de se analisar a possibilidade de intervenções na DMJ usando análogos sintéticos da HN. Contudo, este estudo não permite estabelecer uma relação entre a diminuição nos níveis dos transcritos da HN e a disfunção mitocondrial ou as alterações nas vias apoptóticas na DMJ, permanecendo assim por esclarecer o mecanismo pelo qual a HN influencia a patogênese da doença. Neste trabalho não se observou nenhuma correlação entre os níveis dos transcritos da HN e os dados clínicos e genéticos nos doentes DMJ, embora a ausência de resultados possa dever-se ao número limitado de doentes.

Contudo, é importante reconhecer, que o presente estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas em futuros estudos: 1) A amostra usada no estudo foi relativamente pequena. Em estudos futuros deverão incluir um número maior de participantes (doentes e controlos) para melhorar a robustez dos dados e a fiabilidade das conclusões; 2) A análise focou-se apenas em avaliar os níveis dos transcritos da HN em amostras de sangue, contudo é importante analisar também os níveis do péptido no mesmo tecido, para determinar se a mudança aos níveis dos transcritos se traduz em alterações a nível do péptido, proporcionando assim uma melhor compreensão do papel da HN na DMJ; 3) Foram utilizadas exclusivamente amostras de sangue periférico para a análise dos níveis dos transcritos da HN. No entanto esta abordagem pode não refletir o que acontece no tecido mais afetado pela doença, o tecido cerebral. Seria por isso extremamente necessário analisar os níveis de expressão (transcritos e proteína) da HN em amostras de tecido cerebral *post-mortem*, proporcionando assim uma visão mais detalhada da sua função na DMJ; e 4) Apenas foram usados indivíduos portadores da doença com sintomatologia (doentes). Seria extremamente importante avaliar os níveis de expressão da HN (transcritos e proteína) em indivíduos pré-atáxicos, o que irá permitir analisar o comportamento da HN antes do aparecimento dos sintomas da doença. Portanto este tipo de abordagem poderá fornecer uma visão mais detalhada sobre o papel da HN na patogênese da DMJ, e assim explorar a HN como um potencial

alvo terapêutico na DMJ. Apesar destas limitações, os resultados reportados indicam que a HN pode ter um papel relevante na DMJ.

# Capítulo 4: Referências

#### 4. Referências

- [1] M. M. Evers, L. J. A. Toonen, and W. M. C. Van Roon-Mom, "Ataxin-3 protein and RNA toxicity in spinocerebellar ataxia type 3: Current insights and emerging therapeutic strategies," *Mol Neurobiol*, vol. 49, no. 3, pp. 1513–1531, Nov. 2014, doi: 10.1007/S12035-013-8596-2/FIGURES/2.
- [2] C. A. Stoyas and A. R. La Spada, "The CAG–polyglutamine repeat diseases: a clinical, molecular, genetic, and pathophysiologic nosology," *Handb Clin Neurol*, vol. 147, pp. 143–170, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00011-7.
- [3] T. Klockgether, C. Mariotti, and H. L. Paulson, "Spinocerebellar ataxia," *Nature Reviews Disease Primers 2019 5:1*, vol. 5, no. 1, pp. 1–21, Apr. 2019, doi: 10.1038/s41572-019-0074-3.
- [4] P. Coutinho *et al.*, "Hereditary Ataxia and Spastic Paraplegia in Portugal: A Population-Based Prevalence Study," *JAMA Neurol*, vol. 70, no. 6, pp. 746–755, Jun. 2013, doi: 10.1001/JAMANEUROL.2013.1707.
- [5] M. A. De Araújo, M. Raposo, N. Kazachkova, J. Vasconcelos, and T. Kay, "Trends in the Epidemiology of Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease in the Azores Islands, Portugal," *Portugal. JSM Brain Sci*, vol. 1, no. 1, p. 1001, 2016, Accessed: Jul. 31, 2024. [Online]. Available: <http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/>
- [6] C. Bettencourt and M. Lima, "Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives," *Orphanet J Rare Dis*, vol. 6, no. 1, p. 35, 2011, doi: 10.1186/1750-1172-6-35.
- [7] C. Kieling, P. R. Prestes, M. L. Saraiva-Pereira, and L. B. Jardim, "Survival estimates for patients with Machado–Joseph disease (SCA3)," *Clin Genet*, vol. 72, no. 6, pp. 543–545, Dec. 2007, doi: 10.1111/J.1399-0004.2007.00910.X.
- [8] J. Sequeiros and P. Coutinho, "Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease," *Adv Neurol*, vol. 61, pp. 139–153, 1993, Accessed: Sep. 08, 2024. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8421964/>
- [9] P. Coutinho, "Doença de Machado-Joseph: Tentativa de definição.," Dissertação de Doutoramento, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, 1992.
- [10] Y. Takiyama *et al.*, "The gene for Machado–Joseph disease maps to human chromosome 14q," *Nature Genetics 1993 4:3*, vol. 4, no. 3, pp. 300–304, 1993, doi: 10.1038/ng0793-300.
- [11] Y. Ichikawa *et al.*, "The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene," *Journal of Human Genetics 2001 46:7*, vol. 46, no. 7, pp. 413–422, 2001, doi: 10.1007/s100380170060.
- [12] Y. Kawaguchi *et al.*, "CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1," *Nature Genetics 1994 8:3*, vol. 8, no. 3, pp. 221–228, 1994, doi: 10.1038/ng1194-221.
- [13] M. Lima *et al.*, "Population genetics of wild-type CAG repeats in the Machado-Joseph disease gene in Portugal," *Hum Hered*, vol. 60, no. 3, pp. 156–163, 2005, doi: 10.1159/000090035.

- [14] C. A. Matos, L. P. de Almeida, and C. Nóbrega, "Machado–Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy," *J Neurochem*, vol. 148, no. 1, pp. 8–28, Jan. 2019, doi: 10.1111/JNC.14541.
- [15] A. F. Ferreira *et al.*, "Tissue-Specific Vulnerability to Apoptosis in Machado-Joseph Disease," *Cells*, vol. 12, no. 10, p. 1404, May 2023, doi: 10.3390/CELLS12101404/S1.
- [16] A. Ramos *et al.*, "Differential mtDNA Damage Patterns in a Transgenic Mouse Model of Machado–Joseph Disease (MJD/SCA3)," *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 55, no. 2, pp. 449–453, Feb. 2015, doi: 10.1007/S12031-014-0360-1/FIGURES/2.
- [17] D. Coradduzza *et al.*, "Humanin and Its Pathophysiological Roles in Aging: A Systematic Review," Apr. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/biology12040558.
- [18] S. Zhu, X. Hu, S. Bennett, J. Xu, and Y. Mai, "The Molecular Structure and Role of Humanin in Neural and Skeletal Diseases, and in Tissue Regeneration," *Front Cell Dev Biol*, vol. 10, p. 823354, Mar. 2022, doi: 10.3389/FCCELL.2022.823354/BIBTEX.
- [19] L. Margulis, "Recombination of non-chromosomal genes in Chlamydomonas: Assortment of mitochondria and chloroplasts?," *J Theor Biol*, vol. 26, no. 2, pp. 337–342, Feb. 1970, doi: 10.1016/S0022-5193(70)80023-6.
- [20] V. J. Clemente-Suárez *et al.*, "Mitochondria and Brain Disease: A Comprehensive Review of Pathological Mechanisms and Therapeutic Opportunities," *Biomedicines*, vol. 11, no. 9, Sep. 2023, doi: 10.3390/BIOMEDICINES11092488.
- [21] J. W. Taanman, "The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1410, no. 2, pp. 103–123, Feb. 1999, doi: 10.1016/S0005-2728(98)00161-3.
- [22] T. J. Nicholls and M. Minczuk, "In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA," *Exp Gerontol*, vol. 56, pp. 175–181, Aug. 2014, doi: 10.1016/J.EXGER.2014.03.027.
- [23] A. Hoffmann and D. Spengler, "The mitochondrion as potential interface in early-life stress brain programming," *Front Behav Neurosci*, vol. 12, p. 422206, Dec. 2018, doi: 10.3389/FNBEH.2018.00306/BIBTEX.
- [24] N. Fuku *et al.*, "The mitochondrial-derived peptide MOTS-c: a player in exceptional longevity?," *Aging Cell*, vol. 14, no. 6, pp. 921–923, Dec. 2015, doi: 10.1111/ACEL.12389.
- [25] L. J. Cobb *et al.*, "Naturally occurring mitochondrial-derived peptides are age-dependent regulators of apoptosis, insulin sensitivity, and inflammatory markers," *Aging (Albany NY)*, vol. 8, no. 4, p. 796, 2016, doi: 10.18632/AGING.100943.
- [26] S. Nashine and M. C. Kenney, "Effects of Mitochondrial-Derived Peptides (MDPs) on Mitochondrial and Cellular Health in AMD," *Cells*, vol. 9, no. 5, Apr. 2020, doi: 10.3390/CELLS9051102.
- [27] K. Yen, C. Lee, H. Mehta, and P. Cohen, "The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance," *J Mol Endocrinol*, vol. 50, no. 1, pp. R11–R19, Feb. 2013, doi: 10.1530/JME-12-0203.

- [28] Y. Hashimoto *et al.*, "A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A $\beta$ ," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 11, p. 6336, May 2001, doi: 10.1073/PNAS.101133498.
- [29] D. A. Berthold, P. Stenmark, and P. Nordlund, "Screening for functional expression and overexpression of a family of diiron-containing interfacial membrane proteins using the univector recombination system," *Protein Sci*, vol. 12, no. 1, p. 124, Jan. 2003, doi: 10.1110/PS.0223703.
- [30] B. Zapala *et al.*, "Humanins, the neuroprotective and cytoprotective peptides with antiapoptotic and anti-inflammatory properties," 2010, doi: [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70337-6](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70337-6).
- [31] Y. Yamagishi, Y. Hashimoto, T. Niikura, and I. Nishimoto, "Identification of essential amino acids in Humanin, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-relevant insults," *Peptides (N.Y.)*, vol. 24, no. 4, pp. 585–595, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0196-9781(03)00106-2.
- [32] A. Hazafa *et al.*, "Humanin: A mitochondrial-derived peptide in the treatment of apoptosis-related diseases," Jan. 01, 2021, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.lfs.2020.118679.
- [33] C. E. Karachaliou and E. Livaniou, "Neuroprotective Action of Humanin and Humanin Analogues: Research Findings and Perspectives," *Biology 2023, Vol. 12, Page 1534*, vol. 12, no. 12, p. 1534, Dec. 2023, doi: 10.3390/BIOLOGY12121534.
- [34] T. Chiba *et al.*, "Development of a Femtomolar-Acting Humanin Derivative Named Colivelin by Attaching Activity-Dependent Neurotrophic Factor to Its N Terminus: Characterization of Colivelin-Mediated Neuroprotection against Alzheimer's Disease-Relevant Insults In Vitro and In Vivo," *Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 44, pp. 10252–10261, Nov. 2005, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3348-05.2005.
- [35] Y. Jia *et al.*, "The Effects of Humanin and Its Analogues on Male Germ Cell Apoptosis Induced by Chemotherapeutic Drugs," *Apoptosis*, vol. 20, no. 4, p. 551, 2015, doi: 10.1007/S10495-015-1105-5.
- [36] Y. Hashimoto *et al.*, "Detailed Characterization of Neuroprotection by a Rescue Factor Humanin against Various Alzheimer's Disease-Relevant Insults," *Journal of Neuroscience*, vol. 21, no. 23, pp. 9235–9245, Dec. 2001, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-23-09235.2001.
- [37] R. H. Muzumdar *et al.*, "Humanin: A Novel Central Regulator of Peripheral Insulin Action," *PLoS One*, vol. 4, no. 7, Jul. 2009, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0006334.
- [38] T. Y. Park *et al.*, "Amelioration of neurodegenerative diseases by cell death-induced cytoplasmic delivery of humanin," *Journal of Controlled Release*, vol. 166, no. 3, pp. 307–315, Mar. 2013, doi: 10.1016/J.JCONREL.2012.12.022.
- [39] M. Bodzioch, K. Lapicka-Bodzioch, B. Zapala, W. Kamysz, B. Kiec-Wilk, and A. Dembinska-Kiec, "Evidence for potential functionality of nuclearly-encoded humanin isoforms," *Genomics*, vol. 94, no. 4, pp. 247–256, Oct. 2009, doi: 10.1016/J.YGENO.2009.05.006.
- [40] E. Moretti, V. Giannerini, L. Rossini, M. Matsuoka, L. Trabalzini, and G. Collodel, "Immunolocalization of humanin in human sperm and testis," *Fertil Steril*, vol. 94, no. 7, pp. 2888–2890, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.075.

- [41] P. G. Sreekumar *et al.*, "The Mitochondrial-Derived Peptide Humanin Protects RPE Cells From Oxidative Stress, Senescence, and Mitochondrial Dysfunction," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 57, no. 3, p. 1238, 2016, doi: 10.1167/IOVS.15-17053.
- [42] Y. K. Oh *et al.*, "Humanin preserves endothelial function and prevents atherosclerotic plaque progression in hypercholesterolemic ApoE deficient mice," *Atherosclerosis*, vol. 219, no. 1, pp. 65–73, Nov. 2011, doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2011.06.038.
- [43] S. Kariya, M. Hirano, Y. Furiya, K. Sugie, and S. Ueno, "Humanin detected in skeletal muscles of MELAS patients: a possible new therapeutic agent," *Acta Neuropathologica* 2005 109:4, vol. 109, no. 4, pp. 367–372, Mar. 2005, doi: 10.1007/S00401-004-0965-5.
- [44] T. Kin, K. Sugie, M. Hirano, Y. I. Goto, I. Nishino, and S. Ueno, "Humanin expression in skeletal muscles of patients with chronic progressive external ophthalmoplegia," *J Hum Genet*, vol. 51, no. 6, pp. 555–558, Jun. 2006, doi: 10.1007/S10038-006-0397-2.
- [45] R. J. Widmer *et al.*, "Circulating humanin levels are associated with preserved coronary endothelial function," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 304, no. 3, p. H393, Feb. 2013, doi: 10.1152/AJPHEART.00765.2012.
- [46] F. Delgado-Peraza *et al.*, "Neuron-derived extracellular vesicles in blood reveal effects of exercise in Alzheimer's disease," *Alzheimers Res Ther*, vol. 15, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1186/S13195-023-01303-9.
- [47] Z. Gong, E. Tas, and R. Muzumdar, "Humanin and age-related diseases: A new link?," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 5, no. DEC, p. 118365, Dec. 2014, doi: 10.3389/FENDO.2014.00210/BIBTEX.
- [48] H. Cai, Y. Liu, H. Men, and Y. Zheng, "Protective Mechanism of Humanin Against Oxidative Stress in Aging-Related Cardiovascular Diseases," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 12, Jun. 2021, doi: 10.3389/FENDO.2021.683151.
- [49] C. Lee, K. Yen, and P. Cohen, "Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides?," *Trends Endocrinol Metab*, vol. 24, no. 5, p. 222, May 2013, doi: 10.1016/J.TEM.2013.01.005.
- [50] D. Zhai, F. Luciano, X. Zhu, B. Guo, A. C. Satterthwait, and J. C. Reed, "Humanin binds and nullifies bid activity by blocking its activation of Bax and Bak," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 16, pp. 15815–15824, Apr. 2005, doi: 10.1074/jbc.M411902200.
- [51] F. Luciano *et al.*, "Cytoprotective peptide humanin binds and inhibits proapoptotic Bcl-2/Bax family protein BimEL," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 16, pp. 15825–15835, Apr. 2005, doi: 10.1074/jbc.M413062200.
- [52] E. Njomen, H. G. Evans, S. H. Gedara, and D. L. Heyl, "Humanin Peptide Binds to Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 3 (IGFBP3) and Regulates Its Interaction with Importin- $\beta$ ," *Protein Pept Lett*, vol. 22, no. 10, pp. 869–876, Aug. 2015, doi: 10.2174/0929866522666150728114955.
- [53] B. Guo *et al.*, "Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation," *Nature* 2003 423:6938, vol. 423, no. 6938, pp. 456–461, May 2003, doi: 10.1038/nature01627.

- [54] Z. W. Ma and D. X. Liu, "Humanin decreases mitochondrial membrane permeability by inhibiting the membrane association and oligomerization of Bax and Bid proteins," *Acta Pharmacol Sin*, vol. 39, no. 6, p. 1012, Jun. 2018, doi: 10.1038/APS.2017.169.
- [55] S. J. Kim *et al.*, "The mitochondrial-derived peptide humanin activates the ERK1/2, AKT, and STAT3 signaling pathways and has age-dependent signaling differences in the hippocampus," *Oncotarget*, vol. 7, no. 30, p. 46899, Jul. 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.10380.
- [56] M. Harada *et al.*, "N-Formylated humanin activates both formyl peptide receptor-like 1 and 2," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 324, no. 1, pp. 255–261, Nov. 2004, doi: 10.1016/J.BBRC.2004.09.046.
- [57] G. Ying *et al.*, "Humanin, a Newly Identified Neuroprotective Factor, Uses the G Protein-Coupled Formylpeptide Receptor-Like-1 as a Functional Receptor," *The Journal of Immunology*, vol. 172, no. 11, pp. 7078–7085, Jun. 2004, doi: 10.4049/JIMMUNOL.172.11.7078.
- [58] Y. Hashimoto, M. Kurita, S. Aiso, I. Nishimoto, and M. Matsuoka, "Humanin Inhibits Neuronal Cell Death by Interacting with a Cytokine Receptor Complex or Complexes Involving CNTF Receptor  $\alpha$ /WSX-1/gp130," *Mol Biol Cell*, vol. 20, no. 12, p. 2864, Jun. 2009, doi: 10.1091/MBC.E09-02-0168.
- [59] M. Ikonen *et al.*, "Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no. 22, p. 13042, Oct. 2003, doi: 10.1073/PNAS.2135111100.
- [60] Y. Ma *et al.*, "Comparison of serum concentrations of humanin in women with and without gestational diabetes mellitus," *Gynecological Endocrinology*, vol. 34, no. 12, pp. 1064–1067, Dec. 2018, doi: 10.1080/09513590.2018.1482869.
- [61] S. J. Kim *et al.*, "Humanin-induced autophagy plays important roles in skeletal muscle function and lifespan extension," *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, vol. 1866, no. 1, p. 130017, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.BBAGEN.2021.130017.
- [62] T. Niikura *et al.*, "A tripartite motif protein TRIM11 binds and destabilizes Humanin, a neuroprotective peptide against Alzheimer's disease-relevant insults," *European Journal of Neuroscience*, vol. 17, no. 6, pp. 1150–1158, Mar. 2003, doi: 10.1046/J.1460-9568.2003.02553.X.
- [63] L. Rossini *et al.*, "VSTM2L is a novel secreted antagonist of the neuroprotective peptide Humanin," *The FASEB Journal*, vol. 25, no. 6, pp. 1983–2000, Jun. 2011, doi: 10.1096/FJ.10-163535.
- [64] Z. Gong *et al.*, "Humanin is an endogenous activator of chaperone-mediated autophagy," *J Cell Biol*, vol. 217, no. 2, p. 635, Feb. 2018, doi: 10.1083/JCB.201606095.
- [65] J. Xiao, S. J. Kim, P. Cohen, and K. Yen, "Humanin: Functional Interfaces with IGF-I," *Growth Horm IGF Res*, vol. 29, p. 21, Aug. 2016, doi: 10.1016/J.GHIR.2016.03.005.
- [66] C. Lee *et al.*, "IGF-I regulates the age-dependent signaling peptide humanin," *Aging Cell*, vol. 13, no. 5, p. 958, Oct. 2014, doi: 10.1111/ACEL.12243.

- [67] E. F. Domingo, "Humanin expression in neurodegenerative disorders," Unit of Biological Anthropology (Universitat Autònoma de Barcelona), Barcelona, 2018.
- [68] K. H. Kim, "Intranasal delivery of mitochondrial protein humanin rescues cell death and promotes mitochondrial function in Parkinson's disease," *Theranostics*, vol. 13, no. 10, pp. 3330–3345, 2023, doi: 10.7150/thno.84165.
- [69] M. Conte *et al.*, "Disease-specific plasma levels of mitokines FGF21, GDF15, and Humanin in type II diabetes and Alzheimer's disease in comparison with healthy aging," *Geroscience*, vol. 43, no. 2, p. 985, Apr. 2021, doi: 10.1007/S11357-020-00287-W.
- [70] M. Salemi *et al.*, "Humanin gene expression in subjects with Parkinson's disease," *Mol Biol Rep*, vol. 50, no. 3, pp. 2943–2949, 2023, doi: 10.1007/s11033-022-08132-3.
- [71] R. Navarro, "Expression analysis of Humanin in Lewy Body diseases," Unit of Biological Anthropology (Universitat Autònoma de Barcelona), Barcelona, 2017.
- [72] S. Kariya *et al.*, "Humanin attenuates apoptosis induced by DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches," *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 25, no. 2, pp. 165–169, Feb. 2005, doi: 10.1385/JMN:25:2:165/METRICS.
- [73] G. S. Chai *et al.*, "Humanin attenuates Alzheimer-like cognitive deficits and pathological changes induced by amyloid  $\beta$ -peptide in rats," *Neurosci Bull*, vol. 30, no. 6, p. 923, Dec. 2014, doi: 10.1007/S12264-014-1479-3.
- [74] Y. Zhao, O. Mäkitie, S. Laakso, V. Fedosova, L. Sävendahl, and F. Zaman, "A novel link between chronic inflammation and humanin regulation in children," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 14, p. 1142310, Jan. 2024, doi: 10.3389/FENDO.2023.1142310.
- [75] H. Tajima *et al.*, "Evidence for in vivo production of Humanin peptide, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-related insults," *Neurosci Lett*, vol. 324, no. 3, pp. 227–231, May 2002, doi: 10.1016/S0304-3940(02)00199-4.
- [76] K. Yen *et al.*, "The mitochondrial derived peptide humanin is a regulator of lifespan and healthspan," *Aging*, vol. 12, no. 12, pp. 11185–11199, Jun. 2020, doi: 10.18632/AGING.103534.
- [77] M. Raposo *et al.*, "Accumulation of Mitochondrial DNA Common Deletion Since The Preataxic Stage of Machado-Joseph Disease," *Mol Neurobiol*, vol. 56, no. 1, pp. 119–124, Jan. 2019, doi: 10.1007/S12035-018-1069-X/FIGURES/2.
- [78] M. Raposo *et al.*, "Blood transcriptome sequencing identifies biomarkers able to track disease stages in spinocerebellar ataxia type 3," *Brain*, vol. 146, no. 10, pp. 4132–4143, Oct. 2023, doi: 10.1093/BRAIN/AWAD128.
- [79] "ESMI: European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative - JPND Neurodegenerative Disease Research." Accessed: Oct. 25, 2023. [Online]. Available: <https://neurodegenerationresearch.eu/survey/esmi-european-spinocerebellar-ataxia-type-3machado-joseph-disease-initiative/>
- [80] C. Bettencourt *et al.*, "Segregation distortion of wild-type alleles at the Machado-Joseph disease locus: a study in normal families from the Azores islands (Portugal)," *Journal of Human Genetics* 2008 53:4, vol. 53, no. 4, pp. 333–339, Apr. 2008, doi: 10.1007/s10038-008-0261-7.

- [81] T. Schmitz-Hübsch *et al.*, “Scale for the assessment and rating of ataxia: Development of a new clinical scale,” *Neurology*, vol. 66, no. 11, pp. 1717–1720, Jun. 2006, doi: 10.1212/01.WNL.0000219042.60538.92/SUPPL\_FILE/E1.DOC.
- [82] H. Jacobi *et al.*, “Inventory of non-ataxia signs (INAS): Validation of a new clinical assessment instrument,” *Cerebellum*, vol. 12, no. 3, pp. 418–428, Jun. 2013, doi: 10.1007/S12311-012-0421-3/METRICS.
- [83] S. Anderson *et al.*, “Sequence and organization of the human mitochondrial genome,” *Nature 1981 290:5806*, vol. 290, no. 5806, pp. 457–465, 1981, doi: 10.1038/290457a0.
- [84] C. Santos *et al.*, “Understanding Differences Between Phylogenetic and Pedigree-Derived mtDNA Mutation Rate: A Model Using Families from the Azores Islands (Portugal),” *Mol Biol Evol*, vol. 22, no. 6, pp. 1490–1505, Jun. 2005, doi: 10.1093/MOLBEV/MSI141.
- [85] “HyperLadder™ 100bp | Bionline | Meridian Bioscience.” Accessed: Sep. 14, 2024. [Online]. Available: <https://www.bionline.com/hyperladder-100bp.html>
- [86] Z. Huang, M. J. Fasco, and L. S. Kaminsky, “Optimization of DNase I Removal of Contaminating DNA from RNA for Use in Quantitative RNA-PCR,” *Biotechniques*, vol. 20, no. 6, pp. 1012–1020, 1996, doi: 10.2144/96206ST02.
- [87] A. F. Ferreira, M. Raposo, J. Vasconcelos, M. do C. Costa, and M. Lima, “Selection of Reference Genes for Normalization of Gene Expression Data in Blood of Machado-Joseph Disease/Spinocerebellar Ataxia Type 3 (MJD/SCA3) Subjects,” *J Mol Neurosci*, vol. 69, no. 3, pp. 450–455, Nov. 2019, doi: 10.1007/S12031-019-01374-0.
- [88] M. Lima *et al.*, “The Homogeneous Azorean Machado-Joseph Disease Cohort: Characterization and Contributions to Advances in Research,” Feb. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/biomedicines11020247.
- [89] J. Vermeulen *et al.*, “Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR,” *Nucleic Acids Res*, vol. 39, no. 9, p. e63, May 2011, doi: 10.1093/NAR/GKR065.
- [90] S. Fleige and M. W. Pfaffl, “RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance,” *Mol Aspects Med*, vol. 27, no. 2–3, pp. 126–139, Apr. 2006, doi: 10.1016/J.MAM.2005.12.003.
- [91] L. V. Rump, B. Asamoah, and N. Gonzalez-Escalona, “Comparison of commercial RNA extraction kits for preparation of DNA-free total RNA from Salmonella cells,” *BMC Res Notes*, vol. 3, p. 211, 2010, doi: 10.1186/1756-0500-3-211.
- [92] K. Ivarsson and B. Weijdegård, “Evaluation of the Effects of DNase Treatment on Signal Specificity in RT-PCR and In Situ RT-PCR,” *Biotechniques*, vol. 25, no. 4, pp. 630–638, 1998, doi: 10.2144/98254ST04.
- [93] L. Jaakola, A. M. Pirttilä, J. Vuosku, and A. Hohtola, “Method Based on Electrophoresis and Gel Extraction for Obtaining Genomic DNA-free cDNA Without DNase Treatment,” *Biotechniques*, vol. 37, no. 5, pp. 744–748, 2004, doi: 10.2144/04375BM06.
- [94] D. Rodríguez-Lázaro and M. Hernández, “IDENTIFICATION METHODS | Real-Time PCR,” *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, pp. 344–350, Jan. 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00437-7.

- [95] "GTEx Portal." Accessed: Oct. 25, 2024. [Online]. Available: <https://www.gtexportal.org/home/gene/MTRNR2L8#geneExpression>
- [96] "GTEx Portal." Accessed: Oct. 25, 2024. [Online]. Available: <https://www.gtexportal.org/home/gene/MTRNR2L12#geneExpression>
- [97] M. Raposo, "Predicting and tracking Machado-Joseph disease : biomarkers of diagnosis and prognosis. Universidade dos Açores," 2016.
- [98] C. T. Wittwer, M. G. Herrmann, A. A. Moss, and R. P. Rasmussen, "Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification," *Biotechniques*, vol. 22, no. 1, pp. 130–138, 1997, doi: 10.2144/97221BI01.
- [99] M. Salemi *et al.*, "Humanin gene expression in fibroblast of Down syndrome subjects," *Int J Med Sci*, vol. 17, no. 3, pp. 320–324, 2020, doi: 10.7150/IJMS.39145.
- [100] "Human hg38 chr11:10,508,153-10,508,225 UCSC Genome Browser v470." Accessed: Sep. 04, 2024. [Online]. Available: [https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr11%3A10508153%2D10508225&hgsid=2343025728\\_8XGiVFSdGjCeeQAU5s4yTu0dxQAb](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr11%3A10508153%2D10508225&hgsid=2343025728_8XGiVFSdGjCeeQAU5s4yTu0dxQAb)
- [101] "Human hg38 chr3:96,617,200-96,617,272 UCSC Genome Browser v470." Accessed: Sep. 04, 2024. [Online]. Available: [https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr3%3A96617200%2D96617272&hgsid=2343025728\\_8XGiVFSdGjCeeQAU5s4yTu0dxQAb](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr3%3A96617200%2D96617272&hgsid=2343025728_8XGiVFSdGjCeeQAU5s4yTu0dxQAb)
- [102] M. Conte *et al.*, "Human Aging and Longevity Are Characterized by High Levels of Mitokines," *The Journals of Gerontology: Series A*, vol. 74, no. 5, pp. 600–607, Apr. 2018, doi: 10.1093/GERONA/GLY153.
- [103] Y. Lytvyn, J. Wan, V. Lai, P. Cohen, and D. Z. I. Cherney, "The effect of sex on humanin levels in healthy adults and patients with uncomplicated type 1 diabetes mellitus," <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0401>, vol. 93, no. 4, pp. 239–243, Jan. 2014, doi: 10.1139/CJPP-2014-0401.

**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**  
**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

Rua da Mãe de Deus  
9500-321 Ponta Delgada  
Açores, Portugal