

A inibição da proteína fosfatase-2A altera a comunicação retículo-mitocôndria

Afonso Kopczynski de Carvalho, Luis Valmor Cruz Portela

Laboratório de Neurotrauma, Depto. de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre.

Introdução

A relação entre o retículo endoplasmático (ER) e a mitocôndria exerce fundamental importância na homeostasia de processos como tamponamento de cálcio, bioenergética e sobrevivência celular. Alterações que afetam a interação ER-mitocôndria contribuem para a progressão de doenças neurodegenerativas. A da proteína fosfatase 2A (PP2A) tem papel fundamental na regulação das interações entre ER e mitocôndria, assim sua inibição pode impactar negativamente na função das duas organelas podendo afetar a homeostasia bioenergética e a sobrevivência celular. Nossa hipótese é que a inibição de PP2A hipocampal causaria a ruptura das relações funcionais entre ER-mitocôndria contribuindo para disfunção celular e prejuízos cognitivos.

Materiais e Métodos

Animais: Camundongos CF1 com 90 dias de idade divididos em dois grupos: controle (CT) e ocadáico (OKA, 50ng/mL);

Cânulação intra cérebro ventricular (icv): cirurgia estereotáxica as coordenadas em relação ao bregma: 1mm lateral, 1mm anterior e 1mm de profundidade; cânulas de 7mm;

Reconhecimento de objetos (RO): animais foram treinados para posteriormente avaliarmos as memórias de curta (MCD) e longa duração (MLD);

Eutanásia: animais foram eutanasiados para dissecação do hipocampo para a realização de todas as análises descritas abaixo;

Western Blot: quantificação do imunocônteuo hipocampal de *pEIF2a^{ser51}/EIF2a*, *GRP78*, *CHOP*, *pTau^{ser396}*, *Bax*, *BCL-2*, *Citocromo-c* e *Caspase-3/Caspase-3*;

Ensaio de AmplexRed®: avaliação da produção de H₂O mitocondrial;

Ensaio de Safranina-O : avaliação do potencial de membrana mitocondrial;

Ensaio de viabilidade celular: teste de MTT formazan;

Respirometria de alta resolução em tempo real: análise bioenergética pelo *Oroboros-2K* com protocolo de substratos, inibidores e desacopladores do sistema de transporte de elétrons;

Principal component analysis (PCA): para estimar matematicamente as interações entre as variáveis e a hierarquia dos eventos;

Estatística: foram utilizados o teste t-student e o coeficiente de correlação linear de Pearson. Consideramos estatístico $p < 0,05$;

CEUA: 31443.

Resultados

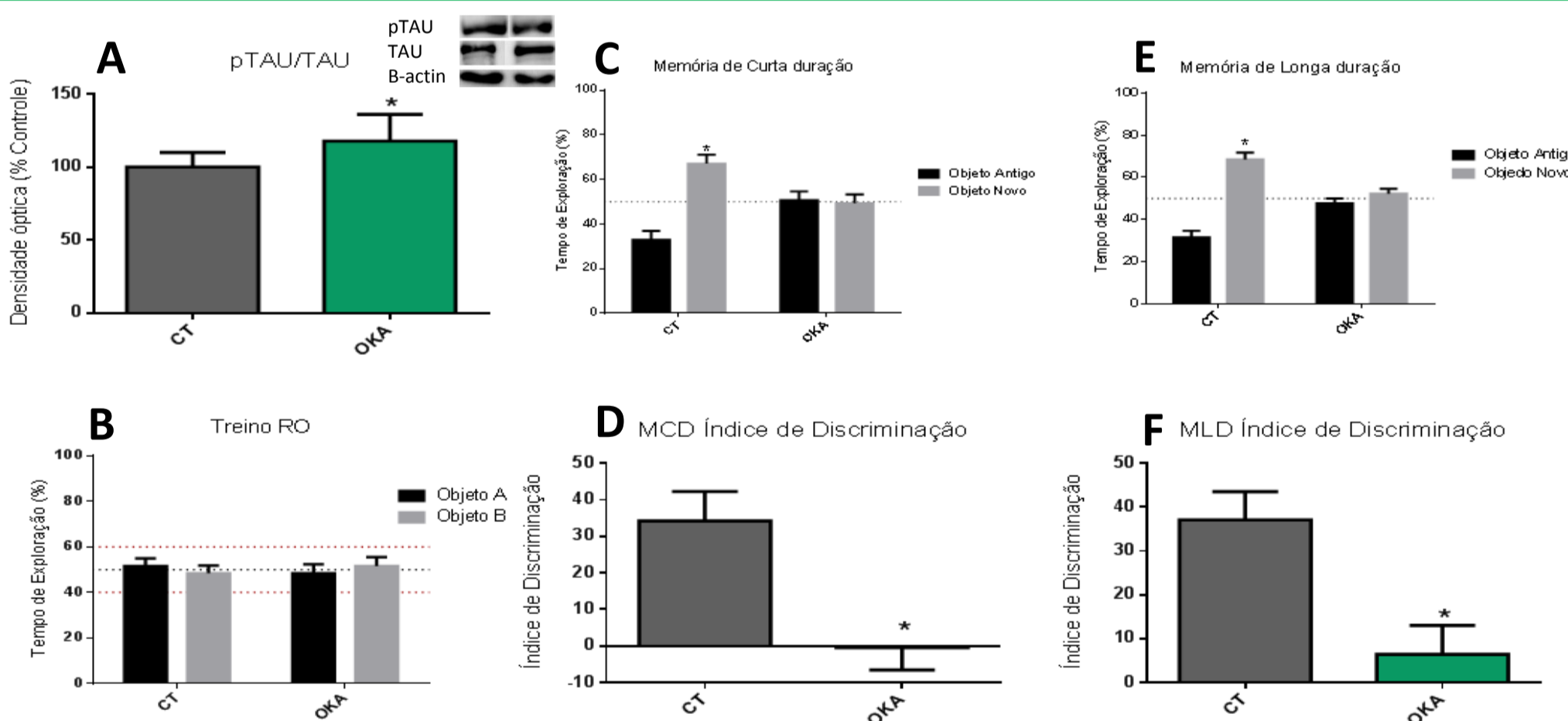


Fig1. (A) Razão entre pTAU^{ser51} e TAU total. (B) Treino do reconhecimento de objetos (RO). (C) Teste de memória de curta duração. (D) Índice de discriminação (ID) da memória de curta duração (MCD) da exploração do objeto novo. (E) Teste de memória de longa duração. (F) ID da memória de longa duração (MLD) da exploração do objeto novo. (* $p < 0,05$).

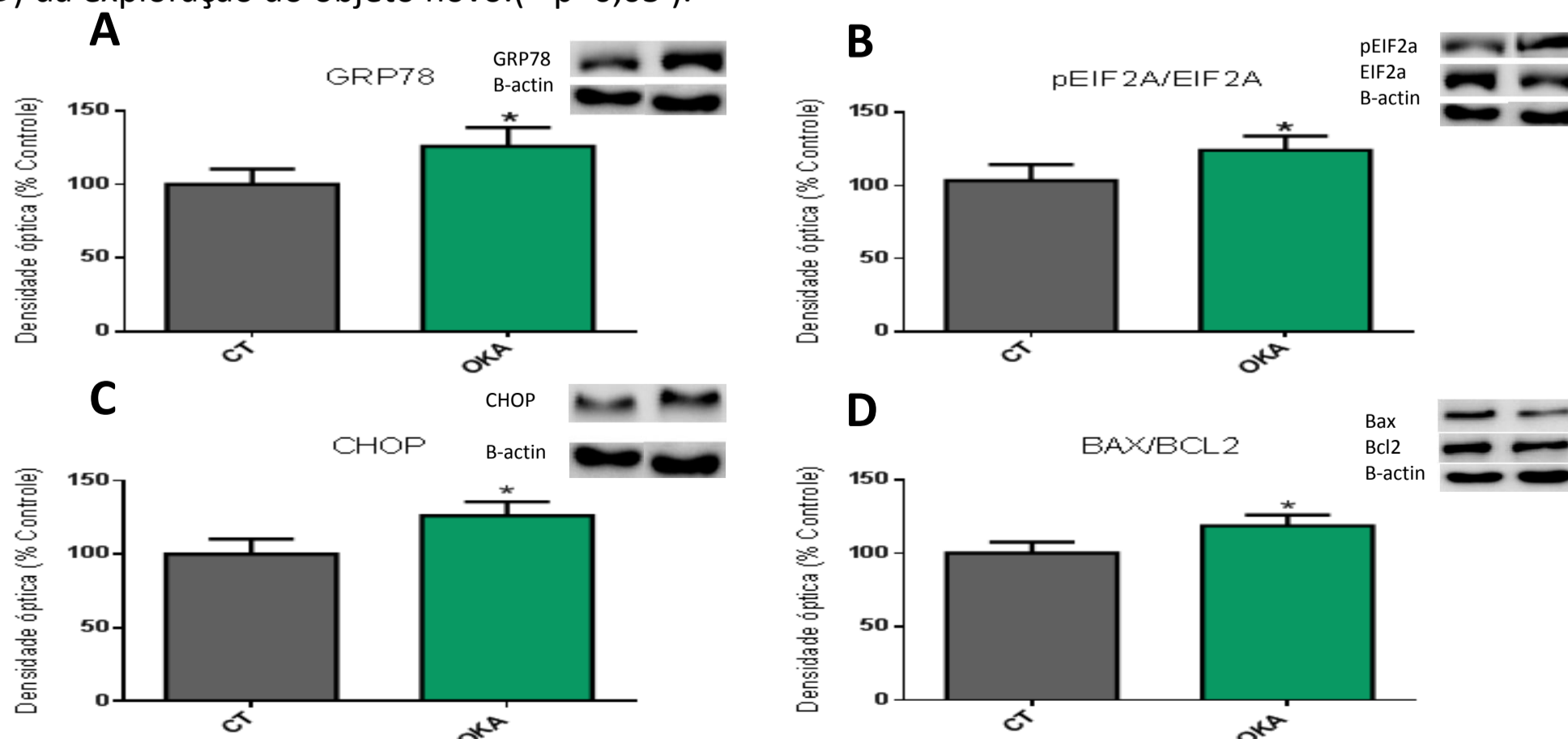


Fig2. (A) Imunocônteuo hipocampal de GRP78. (B) Razão do imunocônteuo hipocampal de pEIF2a^{ser51} por EIF2a total. (C) Imunocônteuo hipocampal de CHOP. (D) Razão do imunocônteuo hipocampal de Bax por Bcl2. (* $p < 0,05$).

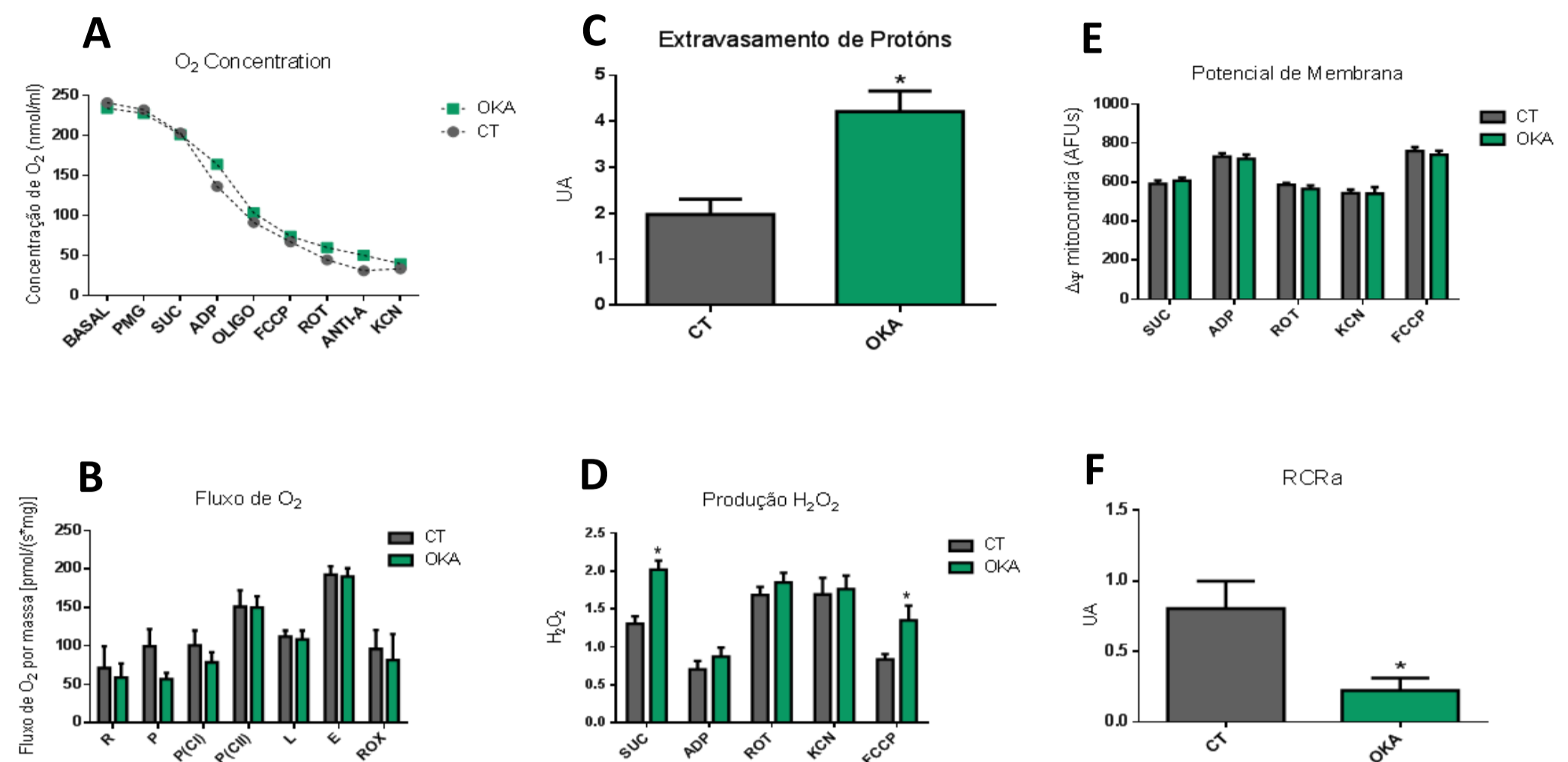


Fig3. (A) Concentração de O₂ disponível na câmara durante a respirometria. (B) Variação do fluxo de O₂. (C) Extravasamento de prótons pela mitocôndria. (D) Produção mitocondrial de H₂O₂. (E) Potencial de membrana mitocondrial. (F) Controle respiratório relacionado à síntese de ATP. (* $p < 0,05$).

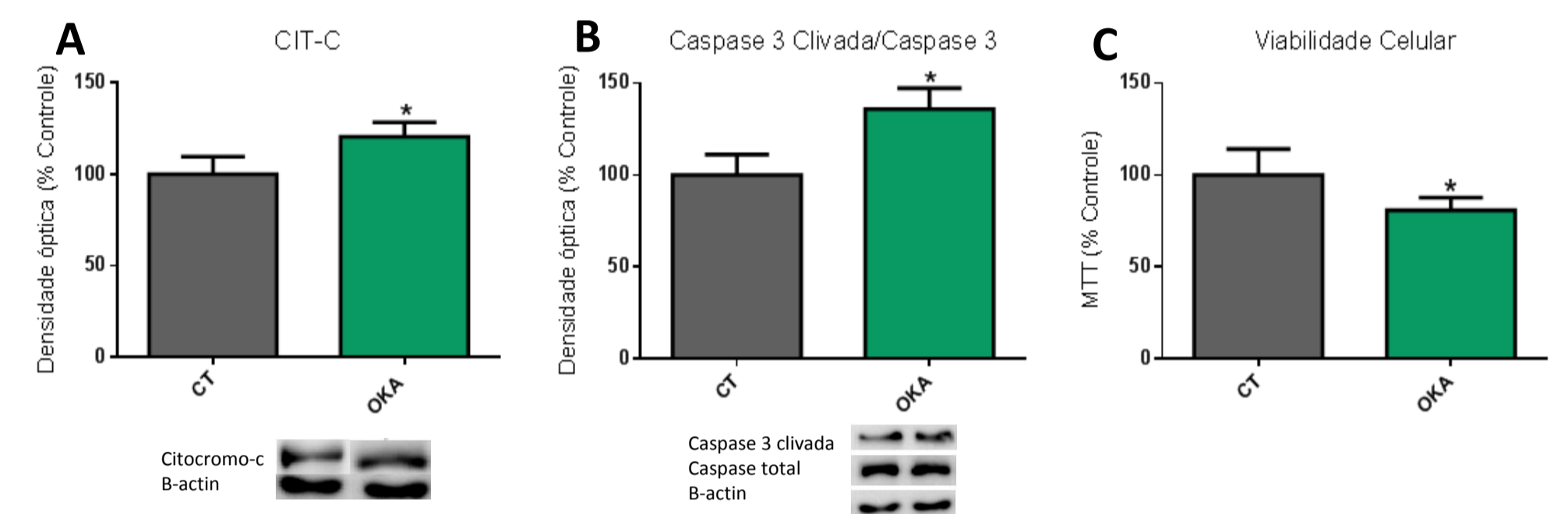


Fig4. (A) Imunocônteuo de citocromo-c. (B) Razão do imunocônteuo de caspase 3 clivada por caspase total. (C) Ensaio de MTT para viabilidade celular. (* $p < 0,05$).

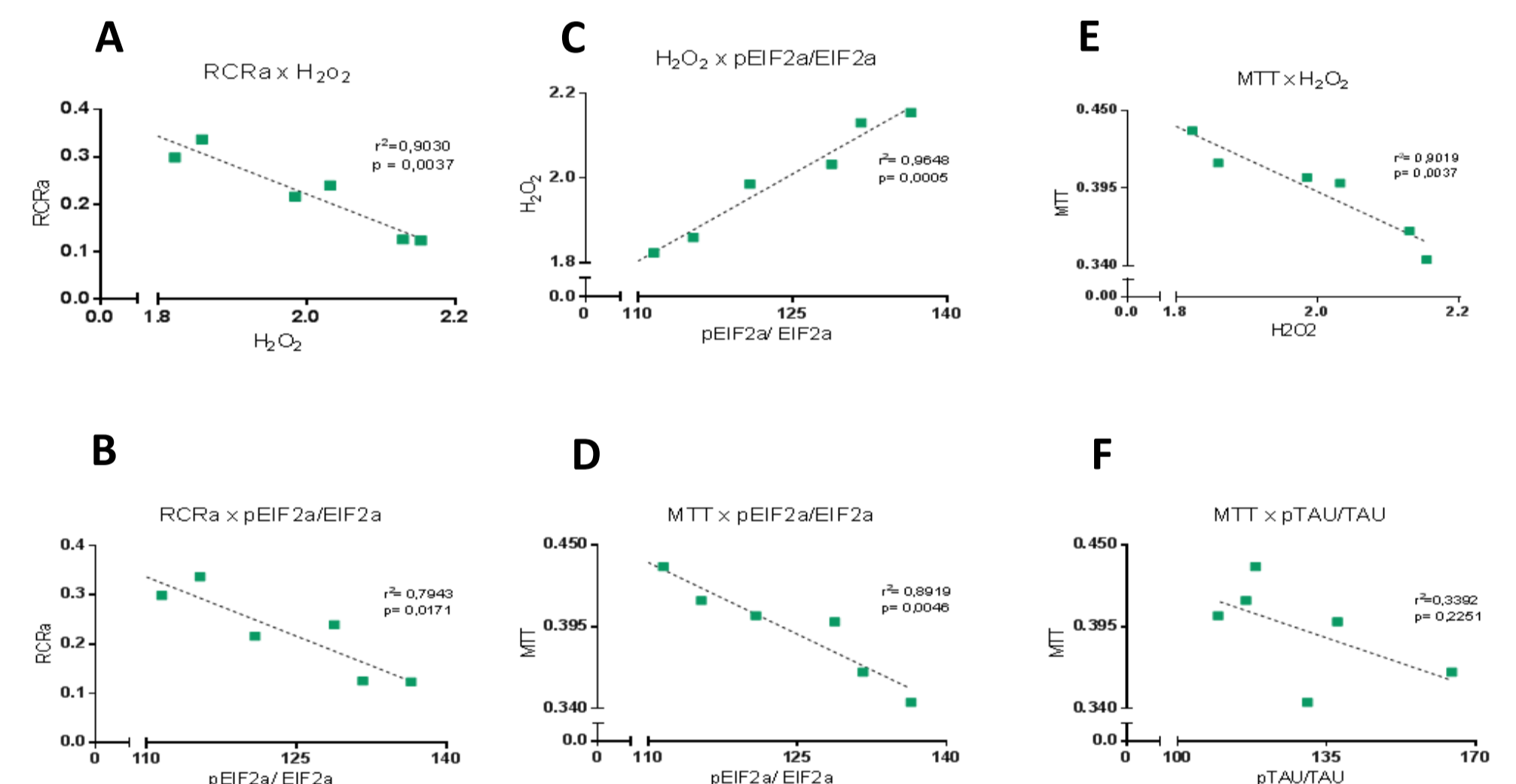


Fig5. Análises de correlações entre parâmetros dos animais OKA. (A) RCRa e H₂O₂. (B) RCRa e pEIF2a^{ser51}/EIF2a. (C) H₂O₂ e pEIF2a^{ser51}/EIF2a. (D) MTT e pEIF2a^{ser51}/EIF2a. (E) MTT e H₂O₂ dos animais OKA. (F) Correlação do MTT e pTAU^{ser396}/TAU dos animais OKA. A magnitude das correlações (r^2) e a significância (p) estão demonstrados no gráfico.

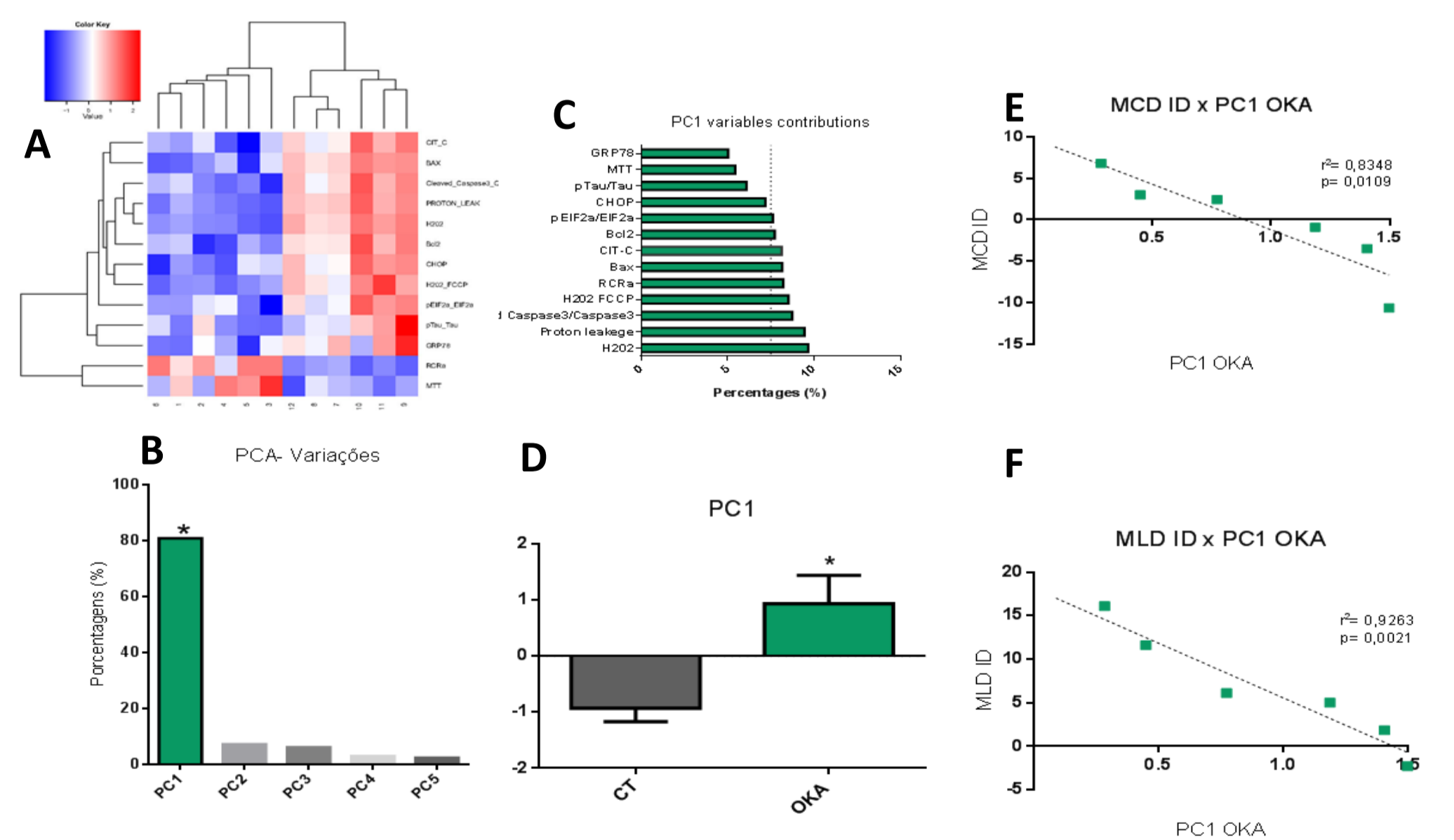


Fig6. (A) Matriz de similaridade das variáveis. (B) Porcentagem dos componentes principais (PCA). (C) Contribuição das variáveis para a constituição da PC1. (D) Comparação entre os grupos CT e OKA pela PC1. (E) Correlação da PC1 com o ID MCD. (F) Correlação da PC1 com o ID MLD. (* $p < 0,05$).

Conclusão

A inibição de PP2A alterou a comunicação ER-mitocôndria por mecanismos envolvendo estresse do retículo e prejuízos na bioenergética mitocondrial. Os nossos resultados sugerem que a disfunção de componentes funcionais da interação ER-mitocôndria são os principais contribuintes para a diminuição da viabilidade celular e déficit de memória.