

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

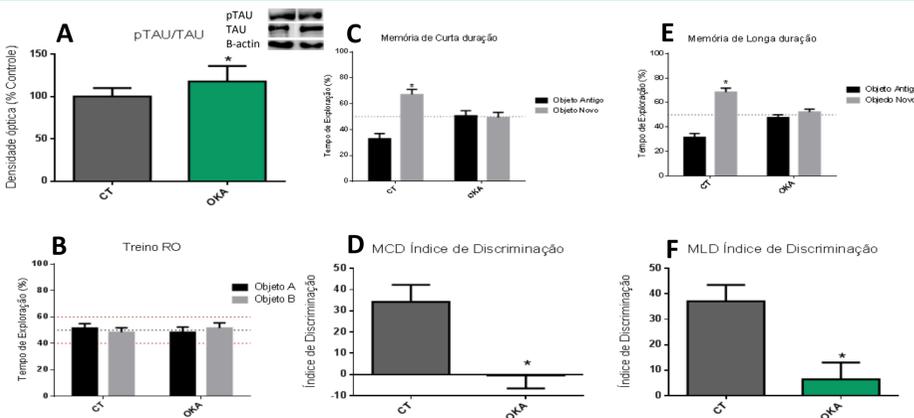


Fig1. (A) Razão entre pTAU^{ser51} e TAU total. **(B)** Treino do reconhecimento de objetos (RO). **(C)** Teste de memória de curta duração. **(D)** Índice de discriminação (ID) da memória de curta duração (MCD) da exploração do objeto novo. **(E)** Teste de memória de longa duração. **(F)** ID da memória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

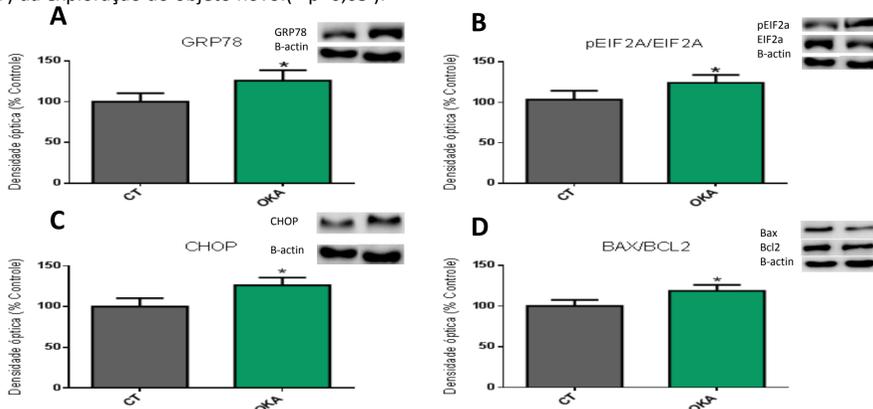


Fig2. (A) Imunocônteuo hipocampal de GRP78. **(B)** Razão do imunocônteuo hipocampal de pEIF2a^{ser51} por EIF2a total. **(C)** Imunocônteuo hipocampal de CHOP. **(D)** Razão do imunocônteuo hipocampal de Bax por Bcl2. (* $p < 0,05$).

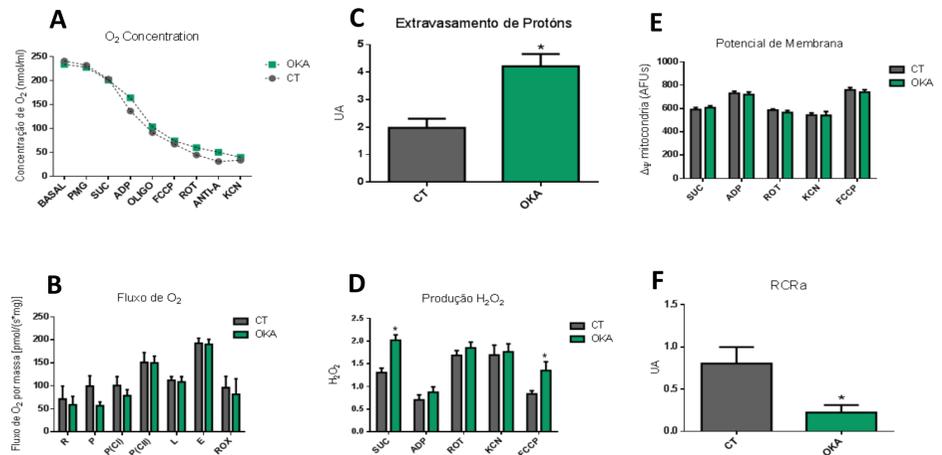


Fig3. (A) Concentração de O₂ disponível na câmara durante a respirometria. **(B)** Variação do fluxo de O₂. **(C)** Extravasamento de prótons pela mitocôndria. **(D)** Produção mitocondrial de H₂O₂. **(E)** Potencial de membrana mitocondrial. **(F)** Controle respiratório relacionado à síntese de ATP.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

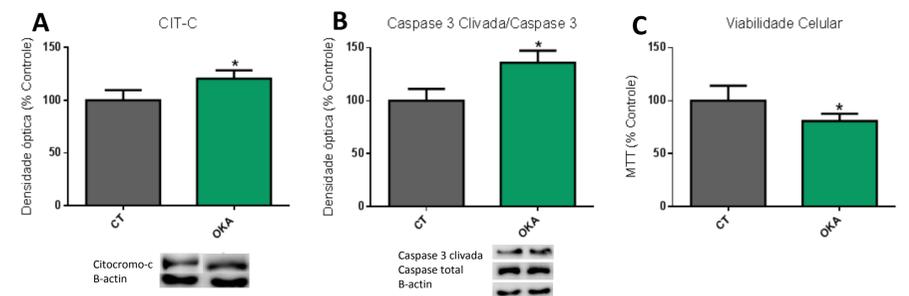


Fig4. (A) Imunocônteuo de citocromo-c. **(B)** Razão do imunocônteuo de caspase 3 clivada por caspase total. **(C)** Ensaio de MTT para viabilidade celular. (* $p < 0,05$).

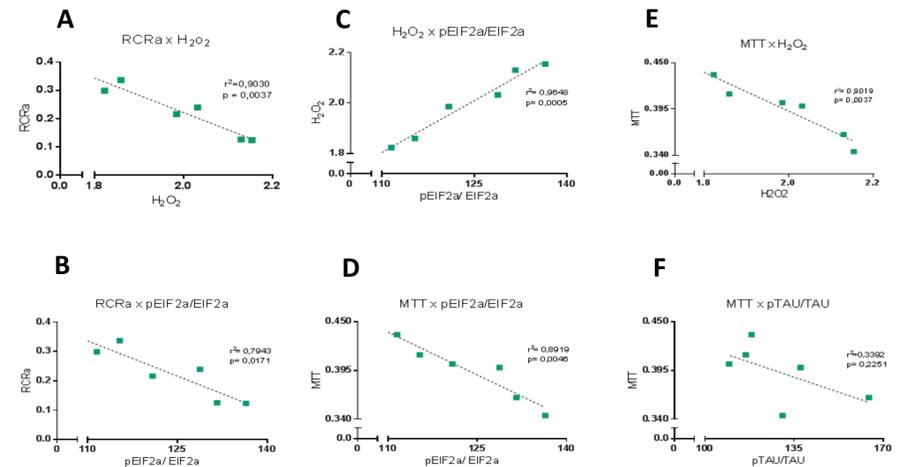


Fig5. Análises de correlações entre parâmetros dos animais OKA. (A) RCRa e H₂O₂. **(B)** RCRa e pEIF2a^{ser51}/EIF2a. **(C)** H₂O₂ e pEIF2a^{ser51}/EIF2a. **(D)** MTT e pEIF2a^{ser51}/EIF2a. **(E)** MTT e H₂O₂ dos animais OKA. **(F)** Correlação do MTT e pTAU^{ser396}/TAU dos animais OKA. A magnitude das correlações (r²) e a significância (p) estão demonstrados no gráfico.

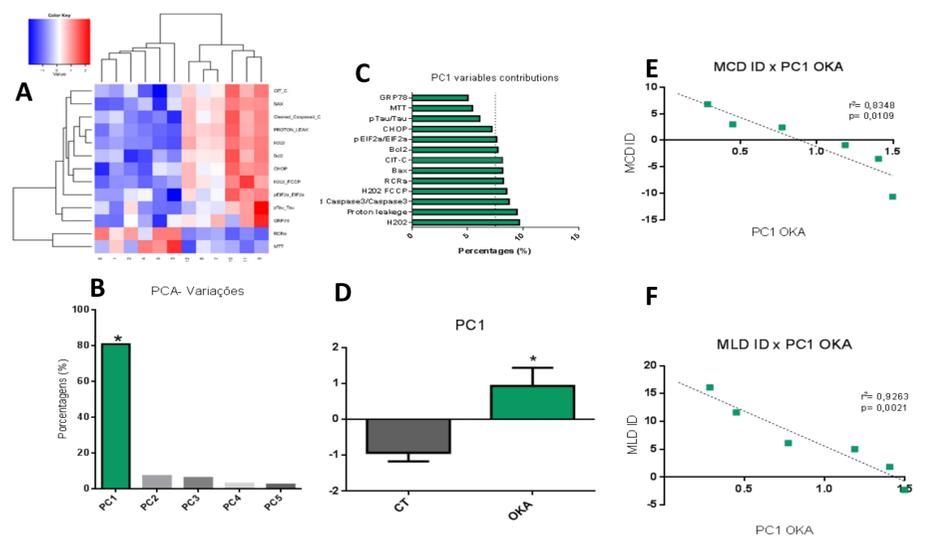


Fig6. (A) Matriz de similaridade das variáveis. **(B)** Porcentagem dos componentes principais (PCA). **(C)** Contribuição das variáveis para a constituição da PC1. **(D)** Comparação entre os grupos CT e OKA pela PC1. **(E)** Correlação da PC1 com o ID MCD. **(F)** Correlação da PC1 com o ID MLD. (*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

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.