

Avaliação da toxicidade de oligômeros do peptídeo β -amiloide em cultura organotípica de hipocampo de ratos



Karoline dos Santos Rodrigues
Christianne Gazzana Salbego

Universidade Federal de Rio Grande do Sul
Departamento de Bioquímica

INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é a desordem neurodegenerativa mais prevalente e a principal causa de demência após os 60 anos [1]. A DA caracteriza-se por um crescente declínio na função mental e memória do paciente. Esses sintomas são acompanhados pela presença de alterações estruturais no tecido cerebral: os emaranhados neurofibrilares constituídos pela proteína tau hiperfosforilada e as placas senis constituídas pelo peptídeo beta-amiloide ($A\beta$) [2].

O peptídeo $A\beta$ tem sido considerado o principal responsável pelos processos de disfunção sináptica, morte neuronal e consequente declínio cognitivo dos pacientes com DA [3]. Evidências sugerem que oligômeros solúveis do peptídeo $A\beta$ ($A\beta$ o) desempenham um papel central na disfunção sináptica e declínio cognitivo na DA [4]. De acordo com a teoria em vigor, $A\beta$ o causam desregulação de vias de sinalização intracelular e disfunção sináptica muito antes da presença das primeiras placas senis e da morte neuronal. Assim, o prejuízo na transmissão sináptica causado por $A\beta$ o tem sido considerado uma fase inicial da neurodegeneração progressiva observada na DA [5,6].

No presente estudo, procuramos caracterizar e avaliar a toxicidade de oligômeros do peptídeo $A\beta$ em cultura organotípica de hipocampo de ratos. Para isso, a morte celular das fatias expostas aos $A\beta$ os foi avaliada através da incorporação do iodeto de propídeo (IP). Os níveis da proteína sináptica sinaptofisina, bem como os níveis de fosforilação das proteínas cinases ativadas por mitógenos ERK 1/2 e JNK 1/2 em fatias expostas aos $A\beta$ os foram determinadas através da técnica de Western Blot.

MÉTODOS

Culturas organotípicas de hipocampo de ratos Wistar machos (6-8 dias) [7] cultivadas durante 21 dias



Tratamento das fatias com $A\beta$ Os (0,5 μ M, 1 μ M e 2 μ M) no 21 dia por 48 horas

Análise da morte celular através da incorporação de IP

Fatias homogeneizadas em tampão de lise

↓
Quantificação de proteínas

↓
Western Blot (Sinaptofisina, p-ERK, ERK, p-JNK e JNK)

Análise dos dados realizadas por ANOVA seguida do teste post-hoc de Tukey

P < 0,05

RESULTADOS

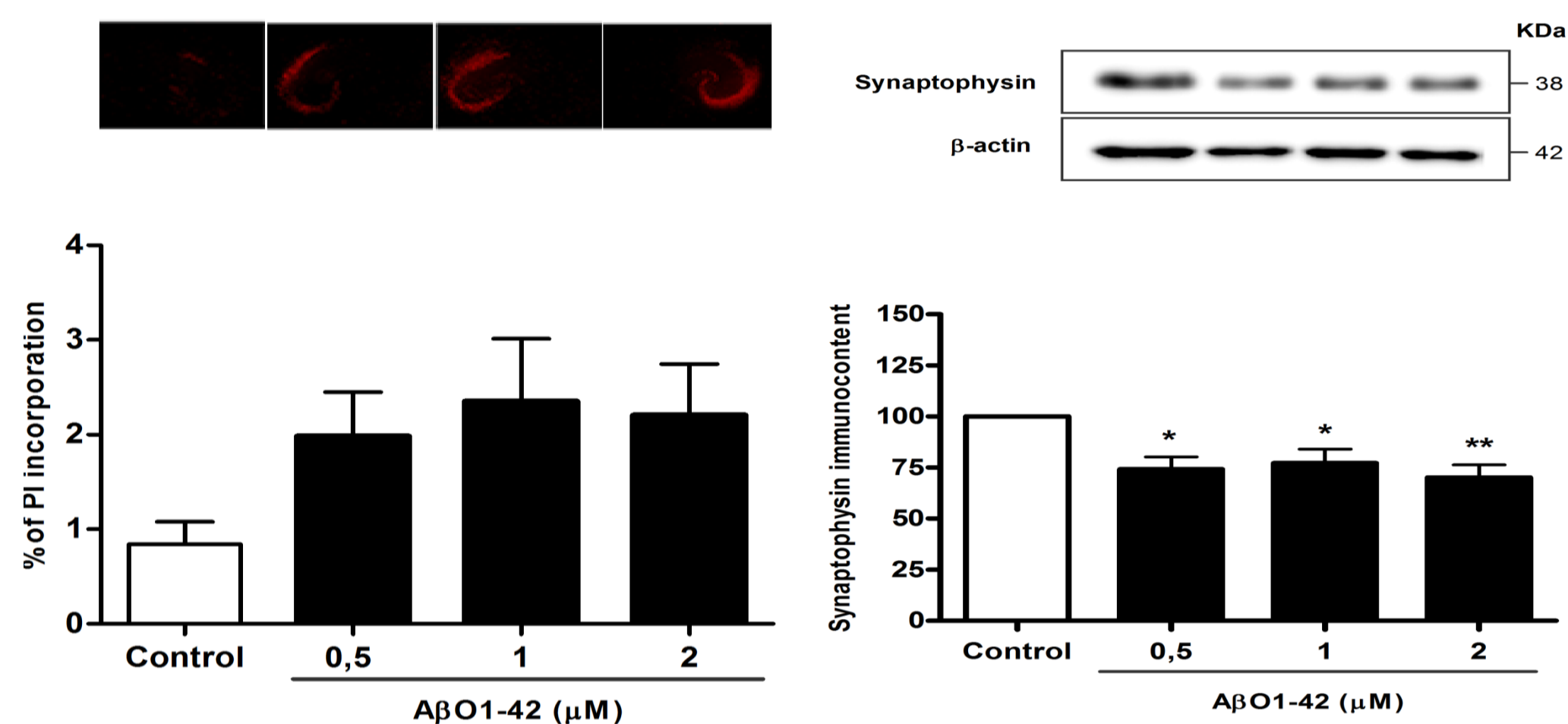


Fig 1. Quantificação da incorporação de iodeto de propídeo em fatias organotípicas de hipocampo após tratamento com $A\beta$ Os por 48 horas (Image J).

Fig 2. Avaliação do imunocontéudo da proteína pré-sináptica sinaptofisina em fatias organotípicas de hipocampo após tratamento com $A\beta$ Os por 48 horas através da técnica de Western blot (*P<0,05 e **P<0,01, ANOVA seguida de Tukey).

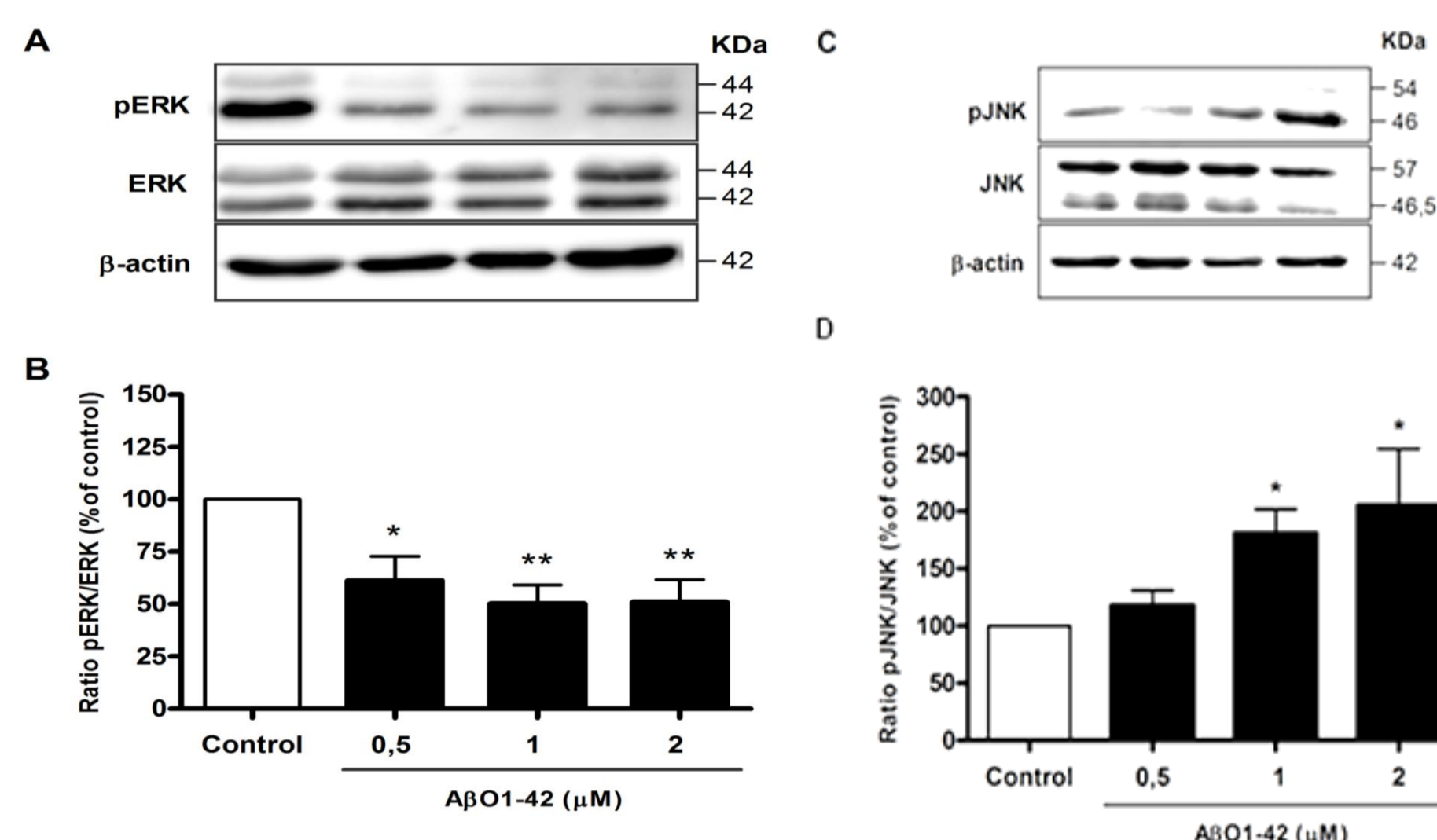


Fig 3. Quantificação da razão p-ERK/ERK em fatias organotípicas de hipocampo de rato após tratamento com $A\beta$ Os por 48 horas (*P<0,05 e **P<0,01, ANOVA seguida de Tukey).

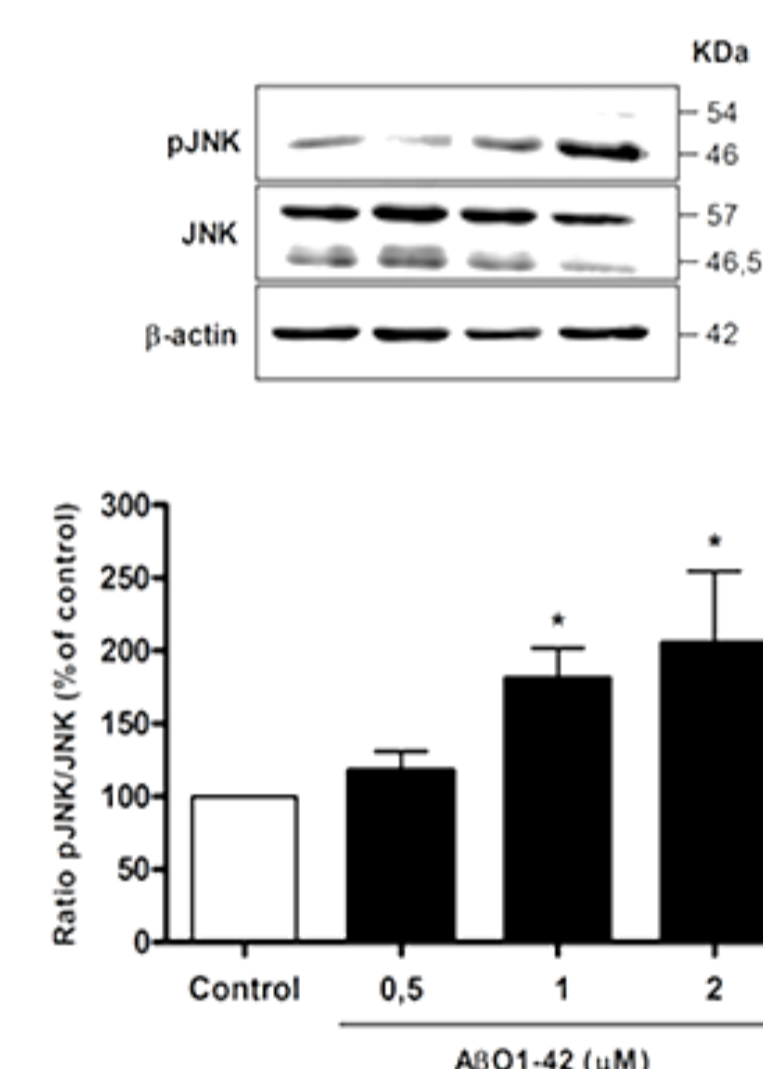


Fig 4. Quantificação da razão p-JNK/JNK em fatias organotípicas de hipocampo de rato após tratamento com $A\beta$ Os por 48 horas (*P<0,05, ANOVA seguida de Tukey).

CONCLUSÕES

- A exposição das culturas as diferentes concentrações de $A\beta$ Os por 48 h não foi capaz de causar um aumento significativo na morte celular de fatias organotípicas hipocampais.
- Entretanto, foi observado um decréscimo nos níveis da proteína sinaptofisina em todas as concentrações testadas.
- Essas alterações, foram acompanhadas pela ativação da proteína JNK e pela inibição da proteína ERK.
- No presente modelo, a toxicidade de $A\beta$ Os foi demonstrada através de distúrbios na sinalização celular da via das MAPK e na disfunção sináptica de fatias organotípicas hipocampais.

REFERÊNCIAS

- Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM. Nat Med 10: 1055-1061, 2004.
- Hardy J, Selkoe DJ. Science 297: 353-356, 2002.
- Selkoe DJ. Science 298: 789-791, 2002.
- Selkoe DJ. Behav Brain Res. 192(1):106-13, 2008.
- Koffie RM, Hyman BT, Spire-Jones TL. Mol Neurodegener. 6(1): 63, 2011.
- Ferreira ST, Lourenco MV, Oliveira MM, et al. Front Cell Neurosci. 9: 191, 2015.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D. J Neurosci Methods 37: 173-182, 1991.