

## **Caracterização de agregados de proteínas num novo modelo genético de deficiência intelectual em camundongos portadores de *Pdia3* mutante**

**Giovanna Rodrigues da Silva**

**Rodolfo Pereira**

**Prof. Dr. Danilo Bilches Medinas**

Instituto de Química, Universidade de São Paulo

E-mail: giovanna\_silva@usp.br

### **Objetivos**

O objetivo central deste projeto é investigar se uma mutação patogênica no gene *PDIA3*, recentemente descrita como causa de deficiência intelectual severa em pacientes [1], promove a formação de agregados proteicos e compromete a homeostase do retículo endoplasmático (RE) em um modelo em camundongo. A proteína PDIA3 atua no RE auxiliando o dobramento de proteínas por meio da formação e reorganização de ligações dissulfeto, sendo essencial para a manutenção da proteostase [2]. Alterações nessa função podem levar ao acúmulo de proteínas mal enoveladas, fenômeno já associado a doenças neurodegenerativas e possivelmente também a distúrbios do neurodesenvolvimento [1, 3].

Neste estudo, pretende-se analisar diferentes regiões cerebrais — como córtex, cerebelo e hipocampo — além do fígado e baço, avaliando a expressão de PDIA3 e de chaperonas relacionadas, como BiP e PDIA4. Além disso, será investigada a presença de agregados de PDIA3.

Com isso, buscamos compreender se a mutação em *Pdia3* de camundongos causa efeitos específicos em diferentes tecidos e se desequilíbrios na proteostase podem estar relacionados aos déficits cognitivos já descritos

no modelo animal. O estudo, portanto, pretende ampliar o entendimento sobre o papel da disfunção do RE não apenas em doenças neurodegenerativas [4, 3], mas também em condições do neurodesenvolvimento, como a deficiência intelectual [1].

### **Métodos e Procedimentos**

Foram utilizados camundongos selvagens (*Pdia3*<sup>WT/WT</sup>) e heterozigotos mutantes (*Pdia3*<sup>C57Y/WT</sup>) com quatro meses de idade, provenientes da mesma ninhada. Os animais foram anestesiados com isoflurano e submetidos à perfusão cardíaca com solução salina a 4°C. Em seguida, os tecidos de interesse foram dissecados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até o processamento. Os extratos totais de proteínas foram obtidos por homogeneização em tampão TEN (Tris-HCl, EDTA e NaCl) suplementado com inibidores de proteases, seguido de sonicação para lise celular e quantificação do teor proteico pelo método BCA. A expressão das proteínas PDIA3, PDIA1, BiP, PDIA4, Calreticulina e Calnexina foi analisada por *Western blot*, no qual as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS–PAGE), transferidas para membranas de PVDF e incubadas com anticorpos específicos, utilizando a  $\beta$ -actina como controle de carregamento. A detecção foi

feita por quimioluminescência e a análise quantitativa das bandas realizada por densitometria. Para avaliar a presença de agregados proteicos insolúveis, aplicou-se a técnica de captura em filtro (*filter-trap assay*), em que os extratos desnaturados foram filtrados em membranas de acetato de celulose com poros de 0,22 µm. As proteínas retidas foram então analisadas por *imunoblot* com anticorpo anti-PDIA3.

### Resultados

Os resultados preliminares indicam que o impacto da mutação no gene *Pdia3* varia de acordo com o tecido analisado. No córtex, observou-se redução nos níveis de PDIA3 e BiP. No cerebelo, também foram detectadas alterações de PDIA3. No hipocampo, foram identificadas alterações em PDIA4, sugerindo um possível efeito compensatório ou vulnerabilidade específica da região. No fígado, verificaram-se mudanças tanto em BiP quanto em PDIA3, indicando que as alterações de proteostase não se restringem ao sistema nervoso central. Até o momento, a captura em filtro não mostrou acúmulo significativo de agregados contendo PDIA3, mas novos experimentos são necessários para confirmar esses achados.

### Conclusões

Os dados iniciais sugerem que a mutação em *Pdia3* afeta a proteostase do retículo endoplasmático de maneira específica para cada tecido, promovendo respostas moleculares distintas no córtex, cerebelo, hipocampo, fígado e baço. Embora ainda não haja evidências claras de formação de agregados de PDIA3, as alterações observadas na expressão de chaperonas e nos níveis de PDIA3 apoiam a hipótese de que a mutação compromete os mecanismos de controle de qualidade proteica. Estudos bioquímicos e histológicos adicionais serão fundamentais para esclarecer como essas alterações contribuem para os déficits cognitivos observados nos animais mutantes.

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Todos os autores aprovaram a versão final do resumo.

### Referências

- [1] Bilches, D., Malik, S., Yıldız-Bölükbaşı, E., Borgonovo, J., Saaranen, MJ., Urra, H., Pulgar, E., Afzal, M., Contreras, D., Wright, MT., et al. Mutation in protein disulfide isomerase A3 causes neurodevelopmental defects by disturbing endoplasmic reticulum proteostasis. *The EMBO Journal*, 2022. DOI: 10.15252/emboj.2020105531.
- [2] Walter, A., Atkin, J. Mechanisms of Neuroprotection by Protein Disulphide Isomerase in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology Research International*, 2011. DOI: 10.1155/2011/317340.
- [3] Osinalde, N., Duarri, A., Ramirez, J., Barrio, R., Nanglares, G., Mayor, U. Impaired proteostasis in rare neurological diseases. Elsevier, 2018. DOI:10.1016/j.semcd.2018.10.007.
- [4] Kaushik, S., Cuervo, A. Proteostasis and aging. *Nature America*, 2015. DOI: 10.1038/nm.4001.