PERFIL DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ADAM23 EM CÉLULAS DE LINHAGEM PC12 TRATADAS COM FORBOL-12-MIRISTATO-13-ACETATO (PMA).

Viviane Aparecida Wurum (BIC/FA), Michele Dietrich Moura Costa (Orientador), e-mail: mi_dietrich@hotmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Biologia Molecular, Estrutural e Genética.

Área: Morfologia/ Subárea: Citologia e Biologia Celular

Palavras-chave: Diferenciação, feocromocitoma de rato, expressão proteica.

Resumo

ADAM (**A** **D**isintegrin **a**nd **M**etalloprotease) é uma família de proteínas transmembrana, compostas por um pró-dominio, um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, uma região rica em cisteína, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal, uma região transmembrana e cauda citoplasmática. Dentre os membros desta família, a ADAM23 é expressa predominantemente no encéfalo é o objeto de estudo deste trabalho. O objetivo principal deste trabalho foi analisar o perfil de expressão de ADAM23 frente à diferenciação de células de feocromocitoma de rato (PC12) tratadas com forbol-12-miristato-3-acetato (PMA) durante três dias. As células foram então processadas e os complexos proteicos obtidos foram submetidos à técnica de Western Blotting usando anticorpo monoclonal específico para ADAM23 (anti-ADAM23). Foi possível observar que não houve diferença na expressão de ADAM23 após três dias de diferenciação em comparação com o grupo controle.

Introdução

ADAM (**A** **D**isintegrin **a**nd **M**etalloprotease) é uma família de proteínas transmembrana, as quais executam suas funções através da sua topografia única, contendo um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, uma região rica em cisteína, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal, região transmembrana e cauda citoplasmática (Seals & Courtneidge, 2003; EDWARDS et al., 2008). Membros desta família atuam em diversos eventos relacionados ao desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Estas proteínas podem atuar na migração, diferenciação e sobrevivência neuronal, no crescimento axonal, na sinaptogênese e na mielinização (NOVAK, 2004; YANG et al., 2006).

Poucos trabalhos demonstram o papel biológico exercido pela ADAM23. Sendo assim, este trabalho se propõe avaliar o perfil de expressão de ADAM23 em células PC12 tratadas com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), composto utilizado para a diferenciação da linhagem PC12 em células com características neuronais.

Material e Métodos

Com o intuito de analisar a expressão de ADAM23 frente à diferenciação, células de feocromocitoma de rato (PC12) tratadas com forbol-12-miristato13-acetato foram divididas em um grupo controle com 10% SFB (soro fetal bovino), um grupo de células em meio 1% SFB tratadas com DMSO (veículo da solução de PMA) e um grupo de células em meio 1% SFB tratadas com 80 nM de PMA diluído em DMSO. Após três dias de tratamento, as células retiradas da cultura e foram então processadas em tampão de lise como descrito por Costa e colaboradores (2009) para obtenção dos extratos proteicos. Os extratos foram submetidos à separação

eletroforética e eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose, sendo tais membranas submetidas à reação com anticorpo monoclonal anti ADAM23 (BORGONOVO et al., 2018) para análise da proteína ADAM23 e anti-SYP (1:8000, Santa Cruz) para análise do processo de diferenciação. Como normalizador da quantidade de proteína aplicada foi utilizado o anticorpo anti-actina (1:2000, Sigma-Aldrich). As membranas foram reveladas por técnica quimioluminescente (COSTA et al., 2009).

Resultados e Discussão

Inicialmente as células PC12 foram mantidas a 1% de SFB e 0% de SFB por um período de três dias para saber se as células poderiam ser mantidas nestas condições sem morte celular e sem alteração de ADAM23. Esse ensaio foi necessário pois o tratamento com PMA precisaria ser realizado em meio sem soro fetal bovino ou no máximo com 1% de SFB.

Foi possível observar que a linhagem de feocromocitoma de rato (PC12) não apresentou diferença na expressão de ADAM23 quando submetida a diferentes concentrações de SFB como observado na (Figura 1). Também não houve morte celular aparente quando as células foram mantidas em quantidade reduzida a 1% de soro fetal bovino (dados não mostrados).

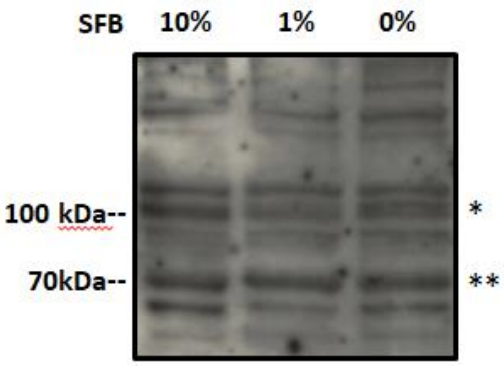


Figura 1: Padrão de expressão de ADAM23 em células de feocromocitoma de rato (PC12). * Banda que corresponde a massa de 100 kDa representa ADAM23 em sua forma imatura. ** Banda de aproximadamente 70 kDa corresponde a ADAM23 em sua forma madura.

A retirada do soro fetal bovino (SFB) em meio de cultura normalmente é um estímulo para a célula interromper a proliferação e iniciar o processo de diferenciação (HU et al., 2018). Mas nessas condições, não houve alteração no padrão de expressão de ADAM23. Sendo assim, o próximo passo seria a diferenciação das células PC12 com forbol-12-miristato13-acetato (PMA), composto este usado em ensaios de diferenciação celular.

As células foram então tratadas com 80 nM de PMA por 3 dias. Pode-se observar que não houve uma alteração na expressão de ADAM23 após três dias de diferenciação em comparação com o grupo controle com DMSO, (Figura 2 a).

Como marcador de diferenciação neuronal foi utilizado o anticorpo anti –sinaptofisina (anti-SYP). No entanto não houve marcação da proteína sinaptofisina (Figura 2 b). Como normalizador da quantidade de proteína, pode-se observar a reação com o anti-actina (Figura 2 c).

ISSN 1676-0093

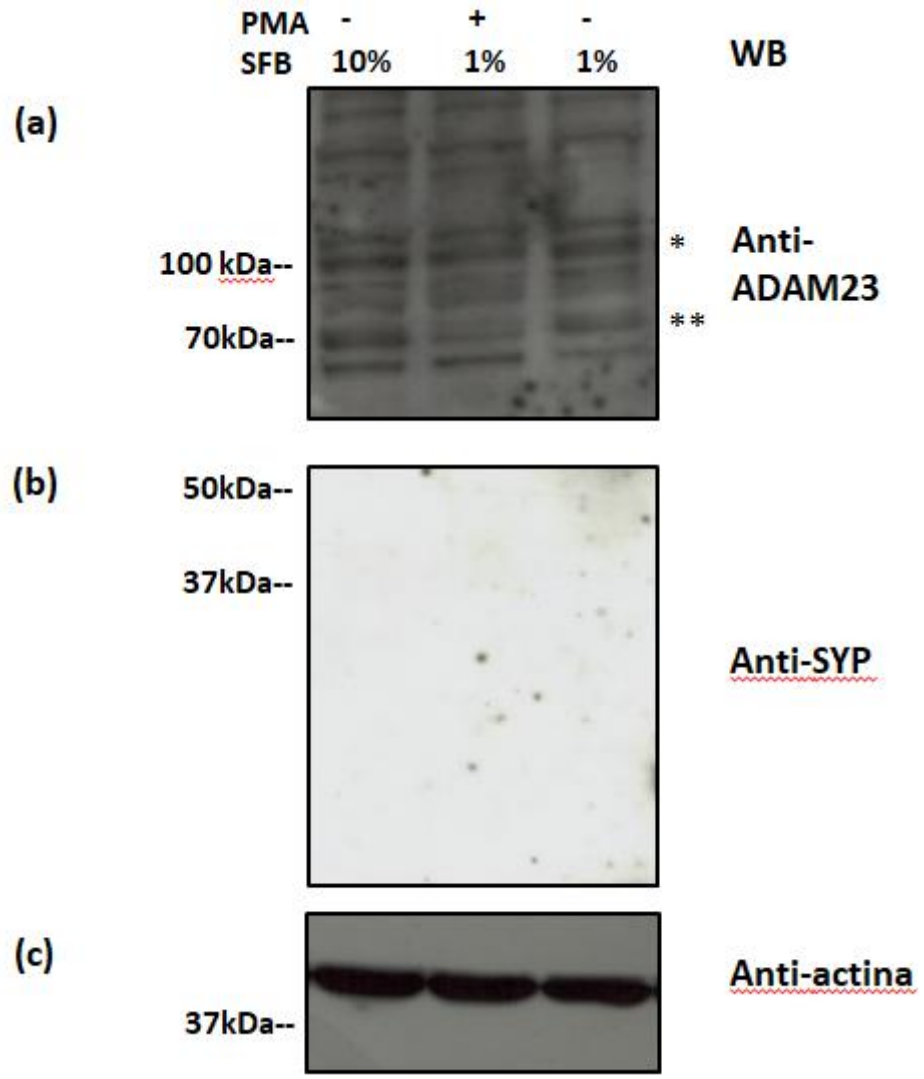


Figura 2: (a) Padrão de expressão de ADAM23 em células de feocromocitoma de rato (PC12) tratadas com PMA (80 nM). **(b)** Revelação da membrana com anticorpo anti-sinaptofisina (Anti-SYP) usado como marcador de diferenciação neuronal. **(c)** Revelação da membrana com anticorpo anti-actina usado como normalizador da quantidade de proteína usada de cada condição.

Hu e colaboradores (2018) mostraram que o uso de diferentes meios de cultivo celular e ou variações nos níveis de soro fetal em PC12 em combinação com fator de crescimento de nervo podem levar a alterações no crescimento de neuritos. Porém, essa alteração é tempo dependente, ou seja, as células apresentavam um comprimento maior dos neuritos quando expostas à um tempo superior a 6 dias. Sendo assim, pode ser que o tratamento de três dias não tenha sido suficiente para se observar uma diferença na expressão de ADAM23 frente à diferenciação, uma vez que nem a proteína marcadora sinaptofisina foi observada sendo expressa pelas células com três dias de tratamento.

Das e colaboradores (2004) demostraram que a diferenciação de PC12 induzida por NGF, a neurotrofina clássica usada como modelo de diferenciação nesta linhagem, apresenta um aumento progressivo na expressão da proteína associada ao crescimento axonal 43 (GAP-43) e da proteína sináptica sinapsina I, que aumenta lentamente nos primeiros dias de diferenciação aumentando rapidamente depois de 5 a 7 dias de cultura, demonstrando o fator tempo dependente para diferenciação,

indicando que o tratamento com PMA por um período de três dias não seja o suficiente para avaliação da expressão de ADAM23 frente à diferenciação.

Conclusão/ões

Através do experimento para observação do padrão de expressão de ADAM23 frente à diferenciação de células de feocromocitoma de rato (PC12) tratadas com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), não foi possível observar uma alteração no padrão de expressão de ADAM23 em comparação com os grupos controles.

Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária pelo apoio financeiro, através da concessão de bolsa de Iniciação Científica. Agradeço a minha orientadora Doutora Michele Dietrich Moura Costa por todo apoio na realização deste subprojeto e aos meus colegas de laboratório pela ajuda.

Referências

BORGONOVO, Z. L. M.; RIBEIRO, C. F.; COSTA, M. D. N.; SOUZA, I. L. M.; ROSSI, G. R.; ALCANTARA, M. V.; INGBERMAN, M.; BRAGA, L. G.; MERCADANTE, A. F.; NAKAO, L. S.; ZANATA, S. M. Monoclonal Antibody DL11C8 Identifies ADAM23 as a Component of Lipid Raft Microdomains. **Neuroscience**, 2018.

COSTA, M.D.M; PALUDO, K.S.; KLASSEN, G.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; MARTINS, V.R.; CAMARGO, A.A.; NAKAO, L.S.; ZANATA, S.M. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters.** 2009.461:16-20.

DAS, K. P.; FREUDENRICH, T. M.; MUNDY, W. R. Assessment of PC-12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. **Neurotoxicology and Teratology**. v. 26, p. 397-406, 2004.

EDWARDS, D.R.; HANDSLEY, M.M.; PENNINGTON, C.J. The ADAM metalloproteinases. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 29, p. 258-289, 2008.

HU, R.; CAO, Q.; SUN, Z.; CHEN, J.; ZHENG, Q.; XIAO, F. A novel method of neural differentiation of PC12 cells by using Opti-MEM as a basic induction medium. **International Journal of Molecular Medicine**. v.41, p. 195-201, 2018.

NOVAK, U. ADAM proteins in the brain. **Journal of Clinical Neuroscience**. 2004. 11: 227-235.

SEALS, D.F. & COURTNEIDGE, S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins functions**. Genes & Development.** 2003. 17: 7-30.

YANG, P.; BAKER, K.A.; HAGG, T. The ADAMs family: Coordinators of nervous system development plasticity and repair. **Progress in Neurobiology**. 2006. 79:73-94.