PERFIL DE EXPRESSÃO DA METAPROTEASE E DESINTEGRINA ADAM23 EM LINHAGENS DE NEUROBLASTOMAS E GLIOBLASTOMAS

Natalia Heloisa de Oliveira (BIC/Fundação Araucária/UEPG), Michele Dietrich Moura Costa (Orientadora), e-mail: mi_dietrich@hotmail.com, Rubens Gomes Júnior (Co-orientador)

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do CNPq: Morfologia, Citologia e Biologia Celular.

Palavras-chave: cultivo celular, diferenciação celular, Retinal, Neuro-2a, ADAM23.

Resumo

ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) é uma família de proteínas caracterizada por possuir um domínio metaloprotease e um domínio desintegrina em uma única cadeia polipeptídica transmembrana. A ADAM23 é um membro desta família expressa predominantemente no encéfalo durante o desenvolvimento embrionário e na fase adulta. O objetivo deste trabalho foi observar o perfil de expressão da proteína ADAM23 em linhagens de neuroblastomas diferenciados e não diferenciados e em glioblastomas. Com o intuito de avaliar a expressão de ADAM23 frente à diferenciação, células de neuroblastoma murino (Neuro-2a) foram diferenciadas durante quatro e sete dias com Retinal. 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 um aumento na expressão de ADAM23 após a diminuição da concentração do Soro Fetal Bovino, independente do tratamento com Retinal (2µM), em comparação com o grupo controle.

Introdução

ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) é uma família de proteínas transmembrana, que apresentam 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. SEALS; COURTNEIDGE, 2003; EDWARDS et al., 2008). O domínio metaloprotease ativo confere as ADAMs funções proteolíticas e o domínio desintegrina possibilita aos membros da família atuarem como proteínas de adesão. (REISS; SAFTIG, 2009).

As ADAMs podem atuar na promoção da clivagem do ectodominio de proteínas da superfície celular e na regulação da migração, adesão e sinalização celular, participando em funções celulares de extrema importância, como reações inflamatórias, fertilização, neurogênese e miogênese (REISS; SAFTIG, 2009).

A proteína ADAM23 é expressa predominantemente no encéfalo, sendo encontrada em maior quantidade no hipocampo e no cerebelo. (GOLDSMITH et al., 2004; NOVAK, 2004).

Camundongos nocautes para o gene *adam23* apresentam tremores e ataxia, embora não apresentem má formação no cérebro, morrem em aproximadamente duas semanas após o nascimento, sugerindo um papel fundamental para essa proteína no desenvolvimento do sistema nervoso (MITCHELL et al., 2001).

Na ausência de ADAM23 o crescimento de neuritos mediada por LGI1(Leucine rich glioma inactivated) e a arborização dendrítica são reduzidos drasticamente *in vitro*. Esse dado indica que ADAM23 pode atuar na diferenciação de neurônios durante o desenvolvimento (OWUOR et al., 2009).

Com o intuito de entender o papel da ADAM23 no desenvolvimento do sistema nervoso, o perfil de expressão de ADAM23 em neuroblastomas submetidos a diferenciação foi avaliado.

Materiais e Métodos

Expressão de ADAM23 frente à diferenciação de células de neuroblastoma murino (Neuro-2a). Com o intuito de analisar a expressão de ADAM23 frente à diferenciação, células de neuroblastoma murino (Neuro-2a) foram divididas em 5 grupos, um grupo controle com 10% SFB (soro fetal bovino), dois grupos de células 1% SFB mais veículo (DMSO) e dois grupos de células em meio 1% SFB contendo All-trans Retinal (2µM). Após quatro dias um grupo de células 1% SFB e um grupo células em meio 1% SFB contendo All-trans Retinal (2µM) foram retiradas da cultura, os grupos restantes foram retirados após 7 dias de experimento. O meio de cada grupo foi trocado a cada 2 dias. As células foram então processadas em tampão de lise contendo inibidores de proteases e inibidores de fosfatases como descrito por Costa e colaboradores (2009).

Quantidades iguais de extrato proteico (80µg) foram submetidos à técnica de Western Blotting, resolvidos por separação eletroforética e eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose, sendo tais membranas submetidas à reação com anticorpo monoclonal anti-ADAM23 e reveladas por técnica quimioluminescente (COSTA et al., 2009). A quantidade de proteína aplicada nos géis foi normalizada usando o anticorpo policlonal anti-actina (Sigma, 1:3000).

Resultados e Discussão

Visando analisar a expressão de ADAM23 frente à diferenciação, células da linhagem de neuroblastoma murino (Neuro-2a) foram tratadas com All-trans Retinal (10 µM) como descrito por Cheung e colaboradores (2009) durante 24, 48 e 72 horas. Os grupos submetidos ao tratamento com All-trans Retinal apresentaram alta taxa de morte celular inviabilizando a obtenção de amostras para a realização dos ensaios propostos no projeto.

Devido ao alto índice de morte celular durante dos grupos tratamento com Retinal (10 µM) nos experimentos de expressão de ADAM23 frente à diferenciação de células de neuroblastoma, foi realização uma análise da viabilidade celular pelo teste colorimétrico do MTT. A partir deste teste foi possível observar uma taxa elevada de morte celular na concentração de 10 µM de Retinal, concentração

proposta inicialmente no projeto. No experimento subsequente optou-se pelo tratamento com concentração de 2 µM.

O experimento que visava observar o padrão de expressão de ADAM23 frente à diferenciação de células de neuroblastoma murino (Neuro-2a) foi realizado através do tratamento desta linhagem com a solução de Retinal (2 µM). Após o ensaio de *western blotting* usando o anticorpo anti-ADAM23, foi possível observar um aumento na expressão de ADAM23 com a diminuição da concentração de Soro Fetal Bovino, resultado condizente com a literatura (PAN et al, 2010). O aumento na expressão de ADAM23 foi independente do tratamento com Retinal (2µM), Devido à alta taxa de morte celular não foi possível realizar a técnica de *western blotting* com o grupo de células cultivas durante sete dias em meio 1% SFB contendo retinal (2 µM).

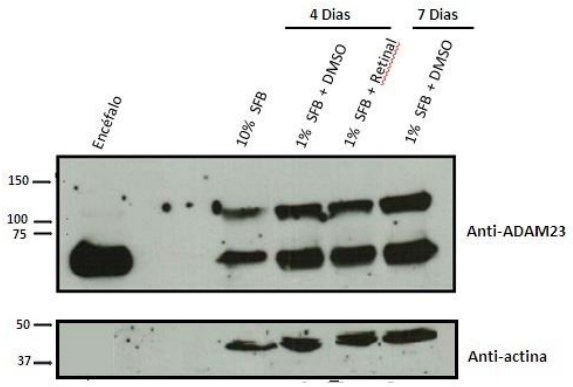


Figura 1 - Padrão de expressão de ADAM23 em células de neuroblastoma murino (Neuro-2a) frente à diferenciação.

Como alternativa a criopreservação das linhagens celulares em container de nitrogênio líquido, devido à ausência de custeio para a carga do mesmo, as diferentes linhagens celulares foram mantidas em freezer – 80°C sujeito a problemas elétricos, que ocorrem com muita frequência no Setor de Ciências Biológicas e da Saúde. Durante um evento de queda de energia a linhagem de glioblastoma (T98) foi perdida, impossibilitando a realização dos experimentos de diferenciação com essa linhagem.

Conclusões

Com a realização do experimento para a obtenção do padrão de expressão de ADAM23 frente à diferenciação de células de neuroblastoma murino (Neuro-2a) foi possível observar um aumento na expressão de ADAM23 após a diminuição da concentração de soro fetal bovino, independente do tratamento com All-trans Retinal (2µM).

Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária pelo apoio financeiro, através da concessão de bolsa de Iniciação Científica. Ao CNPq por financiar o projeto de pesquisa ao qual este subprojeto faz parte.

Referências

CHEUNG, Y. T. et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. **NeuroToxicology**. v. 30, n. 1, p. 127-135, nov. 2009.

COSTA, M. D. M. et al. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters**. v. 461 n. 1 p.16-20, maio. 2009.

EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 29, n.5, p. 258-289, out. 2008.

GOLDSMITH, A. P.; GOSSAGE, S. J.; FFRENCH-CONSTANT, C. ADAM23 is a Cell-Surface Glycoprotein Expressed by Central Nervous System Neurons. **Journal of Neuroscience Research**. v. 78, n. 5, p. 647-658. dez. 2004.

MITCHELL, K.J. et al. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nature Genetics.** v. 28, n. 3, p. 241-249. jul. 2001.

NOVAK, U. ADAM proteins in the brain. **Journal of Clinical Neuroscience**. v. 11, n. 3, p. 227- 235, abr. 2004.

OUWOR K. et al. LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23- dependent neuronal morphology. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v. 42, n. 4, p. 448-457, dez. 2009.

PAN, Q.; YANG, S.; WEI, Y.; SUN, F.; Li, Z. SP1 acts as a key factor, contributes to upregulation of ADAM23 expression under serum deprivation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.401, n. 2, p. 306-312. Out. 2010.

REISS, R.; SAFTIG, P. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. v. 20, n. 2, p. 126-137, nov. 2008.

SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs Family of metalloproteases: multidomain proteins functions. **Genes & Development**. v. 17, n. 1 p. 7-30. Jan. 2003.