AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE ADAM23 EM ANIMAIS EXPOSTOS A RADIAÇÃO IONIZANTE

Eduardo Mariosi Vasconcelos (PIBIC/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 Molecular, Estrutural e Genética.

Área e subárea do conhecimento: 2.06.00.00-3 Morfologia

Palavras-chave: ADAM23, radiação, expressão proteica.

Resumo

ADAM (***A Disintegrin And Metalloprotease***) é uma família de proteínas transmembranas que possui um domínios desintegrina e metaloprotease, os quais desempenham as funções de adesão e proteólise, respectivamente. ADAM23 é um membro dessa família, e é expressa predominantemente no sistema nervoso, desde o período embrionário do indivíduo até a sua fase adulta. Animais nocautes para *Adam23* desenvolvem tremores e ataxia e não sobrevivem mais que 15 dias após o nascimento, sugerindo que esta proteína tem um papel importante no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Como não há muitos dados sobre o papel de ADAM23 na manutenção do sistema nervoso, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do perfil de expressão de ADAM23 em ratos expostos à radiação X. As amostras de encéfalos foram analisadas quanto a alteração na expressão da proteína ADAM23 pela técnica de *western blotting* usando anticorpo monoclonal anti-ADAM23. A análise dos resultados não indicou diferença estatística significativa na expressão de ADAM23 entre animais controle e expostos a radiação.

Introdução

ADAM (***A Disintegrin And Metalloprotease***) é uma família de proteínas transmembranas caracterizadas pela presença dos domínios metaloprotease e desintegrina. Estes domínios conferem a estas proteínas a capacidade de clivar moléculas da superfície celular, assim como mediar a adesão celular (BLACK; WHITE, 1998). Dessa maneira, as ADAMs participam de processos como neurogênese, miogênese, migração neuronal e crescimento axonal, entre outros (YANG; BAKER; HAGG, 2006). ADAM23 é um membro desta família expressa durante o desenvolvimento embrionário até fase adulta, com expressão predominante no sistema nervoso central (GOLDSMITH; GOSSAGE; FFRENCH-CONSTANT, 2004).

Esta proteína se difere de outros membros da família pelo fato de não possuir a sequência necessária de aminoácidos no sítio catalítico do domínio metaloprotease o que torna esse domínio inativo, sugerindo que essa proteína desempenhe suas funções por interação com outras moléculas pelo domínio desintegrina (SAGANE et al., 1999). O domínio desintegrina de ADAM23 já foi

demonstrado interagir com integrina αvβ3 assim promovendo adesão em células de origem nervosa (CAL et al., 2000).

Camundongos nocautes para o gene *adam23* desenvolvem ataxia e tremores e morrem em até duas semanas após nascimento. Embora não tenha sido observada má formação tecidual no córtex dos animais nocautes, os neurônios provenientes destes animais possuem arborização dendrítica reduzida, evidenciando a importância dessa proteína no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso (MITCHELL et al., 2001; OWUOR et al., 2009). Ainda assim, sua função permanece desconhecida.

Darmanto et al (2000) demonstraram que filhotes provenientes de ratas grávidas expostas à radiação X apresentaram alterações morfológicas do cerebelo, órgão do sistema nervoso central intimamente ligado ao movimento corporal. Os trabalhos que abordam o efeito de radiação ionizante no período pós-embrionário ainda são escassos, o que justifica o aprofundamento de estudos sobre morfofisiologia de moléculas que podem estar envolvidas na manutenção das atividades do sistema nervoso central quando este está sujeito a injúrias. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de radiação ionizante sobre a expressão de ADAM23 em encéfalos de ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar.

Materiais e Métodos

Trinta ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) foram divididos em seis grupos, entre animais controle e animais expostos à radiação ionizante na cabeça na dose de 15.75cGy. Os animais expostos foram divididos em cinco grupos: 4, 9, 14, 25 e 60 dias após a exposição. Os animais foram mantidos no biotério da UEPG com ciclos de claro e escuro de 12 horas, e ração e água livre.

Para a extração dos órgãos, os animais foram anestesiados com cloral hidratado 10% e mortos por deslocamento cervical. Os cérebros e cerebelos dos animais foram extraídos, seccionados com um corte sagital mediano, e os hemisférios foram lavados em PBS e armazenados em freezer - 80°C para processamento e obtenção do extrato proteico.

O cérebro e cerebelo de todos os animais foram processados em tampão RIPA (50 mM tris HCl; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% Triton; 0,5 % Desoxycolato; 0,1% SDS) contendo inibidores de proteases (Fenantrolina, PMSF, NEM e EDTA). A maceração do tecido foi realizada em gelo (4ºC) por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 25 min a 7500 rpm (4ºC) e o sobrenadante foi coletado (correspondente ao extrato proteico). O precipitado proveniente desta centrifugação foi ressuspendido em tampão RIPA e homogeneizado por 30 minutos, e as amostras foram centrifugadas novamente por 25 minutos a 7500 rpm (4ºC). O sobrenadante foi coletado e unido ao primeiro, sendo então dosado pelo método de Bradford (1976).

As amostras foram separadas por eletroforese em gel desnaturante de 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE), após a separação, os complexos proteicos foram então eletrotransferidos para uma membrana de nitrocelulose, esta então foi bloqueada em TBS-T contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). A membrana foi incubada com anticorpo monoclonal DL11C8 (anti-ADAM23) por 16 h a 4 °C. Após este tempo, a membrana foi incubada com anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado a HRP (horseradish peroxidase) na diluição de 1:6000 por 1 h a temperatura ambiente. Como normalizador das reações foi utilizado o anticorpo policlonal anti-actina (Sigma), na diluição de 1:3000 e, o secundário para este

anticorpo foi o anti-IgG de coelho acoplado a HRP. As membranas foram reveladas usando a técnica de quimioluminescente.

Os resultados foram escaneados e quantificados usando o software ImageJ 1.51s (ImageJ 1.51s, National Institutes of Health, USA). Para determinar significância estatística foi utilizado o software GraphPad Prism v7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Análise de variância de uma via (ANOVA One-Way) foi usada para determinar significância entre os grupos com 5 animais. $P<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais da UEPG, processo CEUA 036/2016.

Resultados e Discussão

A expressão de ADAM23 no cérebro e cerebelo dos animais foi avaliada por *western blotting* usando o anticorpo anti-ADAM23. Foi possível observar que o anticorpo reconheceu a proteína ADAM23 na sua forma madura (70 kDa) tanto em amostras de cérebro (Figura 1) quanto em amostras de cerebelo (dados não mostrados). A análise estatística dos resultados, tanto de cérebro (gráfico 1) quanto de cerebelo (dados não mostrados), não apresentou diferença na expressão de ADAM23 entre controle e os tempos de recuperação após a exposição à radiação.

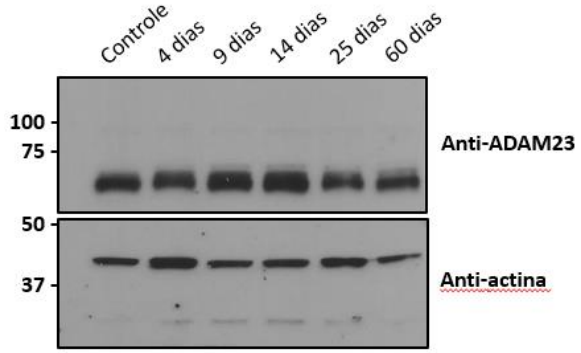
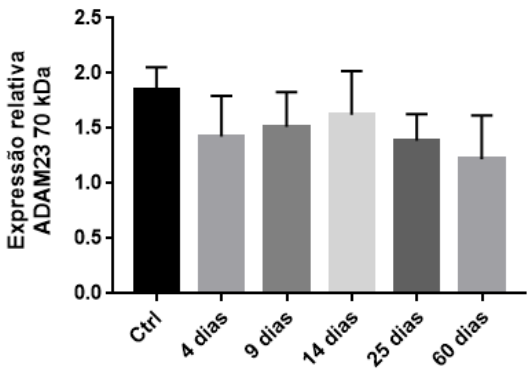


Figura 1 – Ensaio de *western blotting* utilizando amostras de cérebro de animais expostos a radiação. Nota: Controle indica os animais não submetidos a radiação e, os demais dias indicam o período de recuperação após a exposição à radiação. Para a reação, utilizou-se como anticorpos primários: anti-ADAM23 (2:3) e anti-actina (1:3000), e como secundários anti-IgG de camundongo (1:6000) e anti-IgG de coelho (1:3000), respectivamente. Ensaio representativo de um dos cinco grupos analisados.

GRÁFICO 1 – Expressão Relativa de ADAM23 70 kDa em cérebros de ratos (Rattus norvegicus), variedade Wistar.



Conclusões

A análise dos resultados apontou que o efeito da radiação ionizante em ratos períodos pós-embrionários não influenciou a expressão de ADAM23 70 kDa.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Michele Dietrich Moura Costa pela orientação acadêmica, ao Mestrando Rubens Gomes Junior pela paciência e auxílio para realização do trabalho e à Fundação Araucária pelo fomento.

Referências

BLACK, R. A.; WHITE, J. M. ADAMs: focus on the protease domain**. Current opinion in cell biology**, v. 10, n. 5, p. 654-659, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAL, S. et al. ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the αvβ3 integrin through an RGD-independent mechanism. **Molecular biology of the cell**, v. 11, n. 4, p. 1457-1469, 2000.

DARMANTO, W. et al. Derangement of Purkinje cells in the rat cerebellum following prenatal exposure to X-irradiation: decreased Reelin level is a possible cause. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 59, n. 3, p. 251-262, 2000.

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, 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, 2001.

OWUOR, K.; HAREL, N.Y.; ENGLOT, D.C.; HISAMA, F.; BLUMENFELD, H.; STRITTMATTER, S.M. LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v. 42, n. 4, p. 448-457, 2009.

SAGANE, K.; YAMAZAKI, K.; MIZUI, Y.; TANAKA, I. Cloning and chromosomal mapping of ADAM11, ADAM22 and ADAM23. **Gene**. v.236, p. 79-86, 1999.

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