

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

RUBENS GOMES JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE ADAM23 DURANTE O
PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL**

PONTA GROSSA

2018

RUBENS GOMES JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE ADAM23 DURANTE
O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do título de mestre na
área de Biologia Celular e Molecular pelo
Programa de Pós-graduação em Ciências
Biomédicas da Universidade Estadual
de Ponta Grossa

Orientadora: Prof.^a Dr^a Michele Dietrich Moura Costa

PONTA GROSSA

2018

G633 Gomes Júnior, Rubens
Avaliação do perfil de expressão de ADAM23 durante o processo de diferenciação neuronal/ Rubens Gomes Júnior. Ponta Grossa, 2018.
62 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas – Área de concentração – Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa

1. ADAM23. 2. Diferenciação neuronal. 3. Sistema nervoso. I. Costa, Michele Dietrich Moura. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa- Mestrado em Ciências Biomédicas. III. T.

CDD : 611.8

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia F. Bertholino dos Santos– CRB9/986



**Universidade Estadual
de Ponta Grossa**

Programa de
Pós Graduação
em Ciências Biomédicas



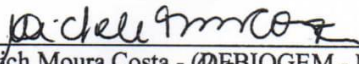
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, NÚMERO DA ATA 11/2018, DO MESTRANDO RUBENS GOMES JUNIOR REALIZADO NO DIA 19 DE OUTUBRO DE 2018, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

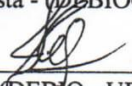
Aos dezenove dias de outubro de dois mil e dezoito, às 14hs00min, no Auditório de Pós-Graduação em Odontologia, sala 14, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da **Professora Michele Dietrich Moura Costa** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas do mestrando **Rubens Gomes Junior** na linha de pesquisa; Biologia Celular e Molecular do Desenvolvimento e dos Processos Patológicos, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professora Dra. Iriane Eger (UEPG/PR)** e **Professor Dr. Silvio Marques Zanata (UFPR/PR)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE ADAM23 DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO NEURONAL.”** Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como APROVADO considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. O aluno deverá entregar uma cópia da versão final, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____


Michele Dietrich Moura Costa - (DEBIOGEM - UEPG) - Presidente


Iriane Eger - (DEBIO - UEPG) – Titular


Silvio Marques Zanata - (Departamento de Patologia Básica/UFPR) – Titular

Ponta Grossa, 19 de Outubro de 2018.

Aos meus pais Rita e Rubens por todo
o apoio e palavras de incentivo
nos momentos mais difíceis

À minha orientadora Michele Dietrich Moura Costa
pela orientação, dedicação e pela amizade
verdadeira

Agradecimentos

Aos meus pais pelo amor, incentivo, e palavras de apoio nos momentos em que mais precisava.

À minha orientadora Michele por tamanha paciência capaz de suportar meu erros e desesperos desde o 1º ano de graduação até hoje.

Às Professoras Katia Paludo e Iriane Eger minhas co-orientadoras informais que sempre me ajudaram a resolver algum problema que encontrava no caminho.

Ao Professor Silvio Marques Zanata por nos ceder anticorpos utilizados neste trabalho.

À Prof Marcia Appel por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Herbert, Bruno, Thiago, Diego e Maximilian por todas as vezes que me ajudaram a aliviar o estresse para poder seguir em frente.

Às minhas amigas persistentes da graduação que sempre me apoiaram durante minha formação, Roberta Zapszalka e Gessica da Costa.

A todos os meus colegas do Laboratório de biologia celular e protozoologia pelas conversas científicas e não científicas.

Aos alunos do Laboratório de cultivo celular e histopatologia da UEPG por toda a ajuda durante o desenvolver deste trabalho.

Ao Adriano Barbosa (*in memoriam*) por ter estado presente nos momentos de difíceis escolhas e sempre ter me apoiado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Uma mente necessita de livros da
mesma forma que uma espada
necessita de uma pedra de
amolar, se quisermos que
se mantenha afiada.”

(Tyrion Lannister – As Crônicas de Gelo e Fogo)

Resumo

A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) é uma família de proteínas transmembranas capaz de mediar adesão celular, assim como clivagem de moléculas da superfície celular. ADAM23 é um membro desta família predominantemente expressa no sistema nervoso durante o desenvolvimento até a fase adulta. Camundongos nocautes para o gene *adam23* desenvolvem problemas neurológicos como tremor e ataxia e morrem logo após o nascimento, sugerindo que esta proteína possui papel fundamental no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Sendo assim, a análise do padrão de expressão da proteína ADAM23 no processo de diferenciação pode contribuir no entendimento do seu papel biológico no contexto do desenvolvimento do sistema nervoso. Primeiramente foi avaliado se as linhagens celulares de neuroblastoma (SHSY-5Y e Neuro2a), feocromocitoma (PC-12) e glioblastoma (T98G) expressavam ADAM23. Em todas as linhagens foi possível observar a proteína ADAM23. Para avaliar se a expressão de ADAM23 era alterada em eventos de diferenciação, as linhagens celulares de neuroblastoma e feocromocitoma foram usadas como modelos de diferenciação neuronal. Em PC-12 não houve alteração na expressão de ADAM23 quando as células foram tratadas com fator neurotrófico derivado de encéfalo. A linhagem celular de neuroblastoma humano, SHSY-5Y, também não apresentou alteração na expressão da proteína de interesse quando tratada com all-trans ácido retinóico. Os ensaios utilizando o neuroblastoma murino, Neuro2a, não mostraram alteração na expressão de ADAM23 nos grupos tratados com all-trans ácido retinóico ou all-trans retinal. Entretanto, nesta linhagem houve aumento da forma não processada de ADAM23 (100 kDa) nos grupos em que o soro fetal bovino foi reduzido a 1%, independente do tratamento ácido retinóico e do retinal. Ainda foi investigado um possível papel protetor de ADAM23 frente ao estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações e tempos em Neuro2a, mas nenhuma alteração na expressão foi observada. Estes dados sugerem que ADAM23 pode estar envolvida no processo de diferenciação neuronal em Neuro2a desencadeado pela redução do soro fetal bovino, entretanto mais estudos são necessários para elucidar este mecanismo.

Palavras-chave: ADAM23; diferenciação neuronal; sistema nervoso

Abstract

A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) is a family of transmembrane proteins able to mediate cell adhesion, as well as cleavage of cell surface molecules. ADAM23 is a member of this family predominantly expressed in nervous system during development until adulthood. Mice knockouts for adam23 gene develop neurological problems, such as tremor and ataxia and die soon after birth, suggesting that protein plays a key role in development and maintenance of nervous system. Therefore, evaluation of expression profile of ADAM23 protein in the differentiation process may contribute to understanding of its biological role in context of the development of nervous system. First, it was evaluated whether cell lines of neuroblastoma (SHSY-5Y and Neuro2a), pheochromocytoma (PC-12) and glioblastoma (T98G) expressed ADAM23. In all lineages it was possible to observe the ADAM23 protein. To assess whether ADAM23 expression was altered in differentiation events, neuroblastoma and pheochromocytoma cell lines were used as models of neuronal differentiation. PC-12 cells showed no change in ADAM23 expression when they were treated with brain-derived neurotrophic factor. The human neuroblastoma cell line, SHSY-5Y, also showed no change in the expression of the protein of interest when they were treated with all-trans retinoic acid. Assays using murine neuroblastoma, Neuro2a, showed no change in ADAM23 expression on groups treated with all-trans retinoic acid or all-trans retinal. However, in this lineage presented an increase of the unprocessed form of ADAM23 (100 kDa) on group, which the fetal bovine serum was reduced to 1%, independent of retinoic acid or retinal treatment. A possible protective role of ADAM23 against oxidative stress caused by hydrogen peroxide at different concentrations and times in Neuro2a was still investigated, but no change in expression was observed. These data suggest that ADAM23 may be involved in the neuronal differentiation process in Neuro2a triggered by the reduction of fetal bovine serum, however more studies are needed to elucidate this mechanism.

Keywords: ADAM23; neuronal differentiation; nervous system.

Sumário

1 Introdução	11
2 Objetivos	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 Revisão de literatura	13
3.1 A família ADAM	13
3.2 ADAM23	20
4 Materiais e método	24
4.1 Linhagens celulares	24
4.2 Anticorpos	24
4.3 Análise da expressão de ADAM23 em linhagens celulares	25
4.4 Análise da expressão de ADAM23 em linhagem de feocromocitoma (PC-12) tratada com fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF)	26
4.5 Análise da expressão de ADAM23 em linhagens de neuroblastoma tratadas com ácido retinóico	27
4.6 Análise da expressão de ADAM23 em Neuro2a tratada com retinal	28
4.6.1 Análise da citotoxicidade de Retinal por 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)	28
4.6.2 Análise da expressão de ADAM23 em Neuro2a tratada com retinal	28
4.7 Ensaio de estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em Neuro2a	29
4.7.1 Ensaio de citotoxicidade usando diferentes concentrações de H ₂ O ₂	29
4.7.2 Ensaio tempo-dependente	29
4.7.3 Ensaio concentração dependente	30

5 Resultados	31
5.1 Teste anticorpos.....	31
5.2 Expressão de ADAM23 nas linhagens celulares.....	32
5.4 Expressão de ADAM23 em PC-12 induzida a diferenciação por BDNF	34
5.5 Expressão de ADAM23 em PC-12 induzida a diferenciação por NGF	36
5.6 Expressão de ADAM23 nas linhagens de neuroblastomas tratadas com all-trans ácido retinóico	38
5.7 Expressão de ADAM23 em Neuro2a tratadas com all-trans retinal	40
5.8 Avaliação de expressão de ADAM23 em Neuro2a submetida a estresse oxidativo	43
6 Discussão	47
7 Conclusão	54
8. Referências Bibliográficas	55

1. Introdução

ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*) é uma família de proteínas transmembranas pertencentes à superfamília de proteases dependentes de zinco. Esta família é caracterizada por possuir os domínios desintegrina e metaloprotease que dão nome a referida família. Sabe-se que as ADAMs fazem parte de diversos processos biológicos como de fusão de membrana, liberação de citocinas e fatores de crescimento, adesão, migração celular, assim como desenvolvimento de músculos, fertilização e diferenciação (REISS; SAFTIG, 2009; SEALS; COURTNEIDGE, 2003).

ADAM23 ou MDC3 (*Metalloproteinase-like, Disintegrin-like, Cysteine-rich protein*) é um membro da família ADAM altamente expressa no sistema nervoso, durante a fase embrionária até a adulta (SAGANE et al, 1998; GOLDSMITH et al., 2004; DHAUNCHAK et al., 2010). ADAM23 possui alterações na sequência do sítio catalítico no domínio metaloprotease, o que mantém sua atividade proteolítica inativa, sugerindo que esta proteína exerça seu papel através do domínio desintegrina (EDWARDS et al., 2008).

Camundongos nocautes para *adam23* desenvolvem tremores e ataxia, não sobrevivendo por mais do que duas semanas, evidenciando que a proteína ADAM23 tem um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da função do sistema nervoso (MITCHELL et al., 2001; KEGEL et al., 2014). ADAM23 ainda mostrou participar do processo de formação de neuritos e da arborização dendrítica em neurônios, sugerindo que esta proteína participa da formação da rede neural, apesar de camundongos ADAM23^{-/-} não apresentarem má formação tecidual (OWUOR et al., 2009).

Estes dados sugerem que a proteína ADAM23 está envolvida no desenvolvimento e/ou manutenção do sistema nervoso, sendo que a função desempenhada por esta proteína não pode ser compensada por outros membros da família ADAM expressos no mesmo tecido. Até o momento seu papel e mecanismo de ação ainda não foram elucidados, devido a este fato, trabalhos envolvendo ADAM23 e processos de diferenciação e maturação neuronal são necessários para um melhor entendimento da proteína.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a expressão de ADAM23 durante a diferenciação de linhagens celulares de origem neuronal

2.2 Objetivos específicos:

- Padronizar o uso do anticorpo monoclonal DL11C8 (anti-ADAM23)
- Avaliar a expressão de ADAM23 em linhagem de neuroblastoma (SH-SY5Y; Neuro2A) e feocromocitoma (PC-12) e glioblastomas (T98G)
- Analisar a expressão de ADAM23 na linhagem de feocromocitoma tratada com fator de crescimento derivado de encéfalo (BDNF).
- Analisar a expressão de ADAM23 nas linhagens de neuroblastomas tratadas com ácido retinóico e retinal.
- Analisar a expressão de ADAM23 na linhagem Neuro2a submetida à estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio.

3. Revisão de literatura

3.1 A família ADAM

ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*) é uma família de proteínas transmembranas pertencentes à superfamília de proteases dependentes de zinco. Esta família é caracterizada por possuir os domínios desintegrina e metaloprotease que dão nome a referida família, sendo que os primeiros membros a serem isoladas desta família foram as ADAMs 1 e 2, também denominadas de fertilinas α e β respectivamente. Estas proteínas foram isoladas a partir da superfície de espermatozoides de porquinho-da-índia. Anteriormente estas proteínas foram descritas como um complexo chamado de PH-30 que apresentava duas subunidades α e β que atuavam juntas no processo fusão de espermatozoide e óvulo (PRIMAKOFF; HYATT; TREDICK-KLINE, 1987; PRIMAKOFF; MYLES, 2000; WOLFSBERG et al., 1993;).

Essas proteínas perdem seu domínio metaloprotease durante seu processamento, assim expondo diretamente seu domínio desintegrina na superfície celular. Inicialmente foi mostrado que este domínio desintegrina interagiu com integrinas ($\alpha 6 \beta 1$) presentes na superfície do óvulo, sendo esta interação essencial para a fertilização (CHEN; SAMPSON, 1998; CHO, et al., 1998). Membros da família ADAMs descritas posteriormente foram propostas como participantes do processo de fusão de membranas na fertilização, baseado no fato destas proteínas ADAM 1, 2, 3, 4, 5 e 6 serem expressas em órgãos reprodutivos masculinos de mamíferos, como testículos e epidídimo (Revisado por GIEBELER, 2016).

Novas descobertas mostraram que a mediação do processo de fertilização feito por ADAM 1 e 2 era crítico, mas não dependia de seu potencial adesivo ou fusogênico. A deficiência na expressão de ADAM 1 e 2 revelou uma interação indireta no processo de fertilização, pois a ausência destas proteínas (*in vivo*) gera uma migração imperfeita do espermatozoide do útero para o oviduto, porém o processo de adesão célula-célula e fusão foi pouco alterado (YAMAGUCHI et al., 2009).

Por analogia as metaloprotease de veneno de cobra (SVMPs), que também possuem um domínio metaloprotease e desintegrina, foi sugerido que algumas ADAMs poderiam atuar na clivagem de componentes da matriz extracelular. Chantry e

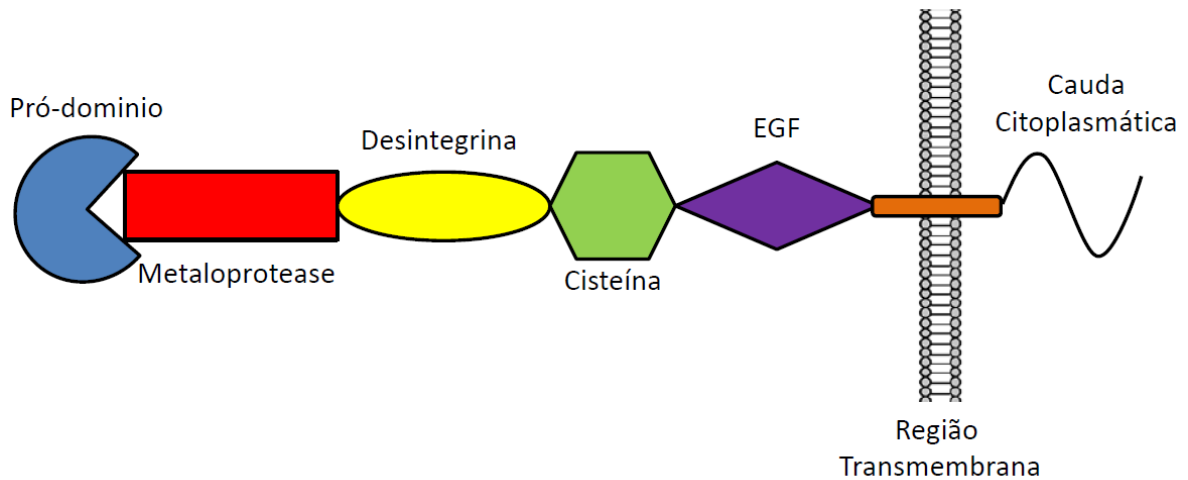
colaboradores em 1989 encontraram em preparações de membrana cerebral, moléculas com atividade proteolítica que degradava proteína básica de mielina (MBP). Nos anos seguintes, a protease responsável por essa degradação foi clonada e nomeada como MAMD (ADAM 10) (HOWARD et al., 1996). Ao mesmo tempo dois grupos de pesquisadores identificavam a metaloprotease participante do processo de liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF α), nomeada como ADAM 17 ou TACE (TNF α -converting enzyme) (BLACK et al., 1997; MOSS et al., 1997). ADAM 10 foi também identificada em *Drosophila* como requisito para clivagem do ligante Delta da superfície celular, liberando fragmentos extracelulares capazes de se ligarem ao receptor Notch atuando na ativação desta via de sinalização durante o desenvolvimento neural (QI et al., 1999).

Entre os processos biológicos que tem sido descrito envolvendo as ADAMs estão inclusos fecundação, diferenciação celular, migração, direcionamento axonal, desenvolvimento de músculos e em respostas imunes. As ADAMs ainda estão envolvidas em alguns processos fisiopatológicos como doenças inflamatórias e cânceres (EDWARD et al., 2008; SAFTIG; REISS, 2009).

A expressão de proteínas desta família tem sido encontrada em diversas espécies desde de *Caenorhabditis elegans* até vertebrata, porém não houve indícios dessas proteínas em eucariotos unicelulares ou plantas. Até o momento 40 membros da família ADAM foram identificados no genoma de mamíferos, dos quais 37 são expressos em camundongos e 20 são expressos em humanos (TAKEDA et al., 2016).

Os membros da família ADAM compartilham uma estrutura comum que consiste em um pró-domínio, um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, um domínio rico em cisteína (*Cysteine-rich*), um domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (*EGF-like*), uma região transmembranas e uma cauda citoplasmática (figura 1). Embora esta topografia única não seja encontrada em outras moléculas de adesão ancoradas a membrana ou a moléculas proteolíticas, as ADAMs se assemelham as SVMPs pertencentes a família de proteínas de veneno de cobra solúveis (WOLFSBERG et al., 1995).

Figura 1: Estrutura comum dos membros da família ADAM.



Nota: Na porção extracelular estão expostos o pró-domínio, domínio metaloprotease, domínio desintegrina, região rica em cisteína, domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal, um domínio transmembranas terminando em uma cauda citoplasmática. Fonte: o autor

O pró-domínio das ADAMs tem como sua função primária manter o domínio metaloprotease inativo, isto se deve aos resíduos de cisteína presentes no pró-domínio que isolam o zinco requisitado pelo sítio catalítico, deste modo mantendo o domínio metaloprotease em uma conformação inativa. Enzimas pró-convertases podem clivar o pró-domínio do resto da proteína em um motivo conservado, assim liberando o sítio catalítico para ligação com o zinco gerando um domínio cataliticamente ativo. A clivagem do pró-domínio ocorre durante a passagem da proteína do aparato de Golgi para a membrana e pode ser bloqueado por inibidores da via secretora (NOVAK, 2004;SEALS; COURTNEIDGE, 2003).

Uma função secundária do pró-domínio é promover o dobramento correto da proteína, em especial do domínio metaloprotease (SEALS; COURTNEIDGE, 2003). Este fato tem sido descrito por estudos em ADAM17, onde a remoção do pró-domínio resulta em um domínio metaloprotease inativo (MILLA et al., 1999). Similarmente foi mostrado que a construção da ADAM10 com ausência do pró-domínio resulta numa proteína cataliticamente inativa *in vitro*, contudo a expressão do pró-domínio de ADAM10 como um polipeptídeo independente restaura a atividade proteolítica de ADAM10 que tiveram seu pró-domínio deletado (ANDERS et al., 2001).

O domínio metaloprotease possui atividade proteolítica e este domínio tem se mantido altamente conservado entre os membros da família (REISS; SAFTIG, 2009). As construções cristalográficas do domínio metaloprotease de alguns membros da família Metzincins, incluindo a ADAM17, foram cruciais para o melhor entendimento do mecanismo de ação deste domínio e mostraram que apesar da sequência de aminoácidos apresentarem alta variabilidade, suas conformações permanecem muito semelhantes (SEALS; COURTNEIDGE, 2003; TAKEDA et al., 2016).

Este domínio possui um sítio ativo com uma sequência consenso (HExGHxxGxxHD) que contém moléculas de água e átomos de zinco que são necessários para a atividade proteolítica, além disso este domínio possui uma *Met-turn* (metionina 1,4- β -turn), sendo essas as características que dão o nome ao domínio metaloprotease (GIEBELER; ZIGRINO, 2016; GOMIS-RÜTH, 2003; SEALS; COURTNEIDGE, 2003).

Entre os membros desta família, algumas ADAMs possuem diferentes sequências no sítio ativo que não permitem a ligação do zinco, conseqüentemente gerando um domínio sem atividade, sugerindo que o domínio metaloprotease possua um papel durante o dobramento ou agindo como sítio de ligação para outras proteínas (EDWARD et al., 2008).

Proteases de superfície de membrana possuem um importante papel no desenvolvimento biológico, pois a clivagem de ectodomínios tem sido descrita presente em processos de sinalização, diferenciação, proliferação e em processos patogênicos. (BLACK; WHITE, 1998; YANG et al., 2006).

O processo de clivagem mediado por ADAMs é tanto constitutivo como induzido por receptores acoplados a proteína G, proteína cinase C, níveis intracelulares de Ca^{2+} , composição da membrana, entre outros estímulos. A modulação da atividade deste domínio também é realizada através de mudanças pós-traducionais na região da cauda citoplasmática e por interação com outras proteínas, além também da remoção do pró-domínio como dito anteriormente (KLEIN; BISCHOFF, 2011; SAFTIG; REISS, 2009).

As ADAMs melhores caracterizadas em relação a atividade proteolítica do domínio metaloprotease tem sido as ADAMs 10 e 17. Isto se deve ao fato destas proteínas possuírem os maiores números de substratos descritos e por estarem presentes em

diversos processos fisiológicos necessários para o desenvolvimento de diversos tecidos (GIEBELER; ZIGRINO, 2016; SAFTIG; REISS, 2009)

Kuzbanian (ADAM 10) foi identificada como uma proteína necessária para o desenvolvimento neuronal em *Drosophila*. Esta ADAM participa da clivagem de Delta, um ligante de Notch. Notch é um receptor de superfície de membrana conhecido por participar da sinalização de inibição lateral, um dos processos responsáveis por regular a diferenciação celular durante o desenvolvimento. O papel da ADAM10 mostrou não ser compensado por outras proteínas, sendo que células com mutação no gene *Kuz* não recebem este sinal inibitório desregulando a diferenciação destas células (BLACK; WHITE, 1998; PRIMAKOFF; MYLES, 2000).

ADAM 17 ou TACE foi identificada como uma protease que cliva $\text{TNF}\alpha$. $\text{TNF}\alpha$ é uma citocina pleiotrópica sintetizado como uma proteína de 26 kDa ancorada a membrana que possui um domínio extracelular de 17 kDa que se torna ativo após sua liberação por proteases que é rapidamente induzida em respostas a infecções e injúrias teciduais e possui um importante papel na resposta imune adaptativa para essas condições (BLACK; WHITE, 1998; PRIMAKOFF; MYLES, 2000).

Até o momento a ADAM17 é descrita, dentro da família, como a proteína com maior variedade de substratos, como citocinas ancoradas a membrana, moléculas de adesão celular, receptores, ligantes, e enzimas como $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\alpha$ (*transforming growth factor alpha*), L-selectina, angiotensina-convertase tipo 2, entre outros. Estudos em camundongos nocautes para Adam17 mostraram defeitos durante o desenvolvimento de cérebro, coração, pulmão, pele, ossos e sistema imune, resultando na morte do animal entre o dia 17,5 do período embrionário até o primeiro dia após o nascimento (XU et al., 2016).

Em alguns membros da família ADAM ocorre diferentes construções para a sequência do sítio de ligação no domínio metaloprotease, o que acaba por gerar uma proteína sem atividade proteolítica. Isto sugere que sua principal atividade seja direcionada a sinalização célula-célula pela interação com outras proteínas através de seu domínio desintegrina (YANG et al., 2006).

Membros da família ADAM são as únicas proteínas de superfície de membrana que possuem um domínio desintegrina na sua construção (WHITE, 2003). Devido à alta

similaridade deste domínio com as desintegrinas presentes em SVMP este domínio também pode ser denominado como semelhante à desintegrina (disintegrin-like) (WORLDENBERG, 1998).

Desintegrinas de SVMP possuem este nome devido a sua interação com receptores integrinas plaquetárias, esta interação se dá através de uma região do domínio desintegrina, formado por 14 amino ácidos que possui um motivo RGD de ligação a integrinas. Esta interação entre o domínio desintegrina de SVMP e plaquetas impede a associação da plaqueta com seu ligante, ocasionando um bloqueio da agregação plaquetária, assim desenvolvendo hemorragias (EDWARDS et al., 2008).

Dentro da família ADAM apenas a ADAM 15 mostrou possuir o motivo RGD em seu domínio desintegrina e se ligar a integrina $\alpha v \beta 3$ dependente deste motivo, enquanto que outras ADAMs possuem um motivo ECD que possui potencial de ligação com outras integrinas (YANG et al., 2006; ZHANG et al., 1998).

Cal e colaboradores (2000) mostraram que o domínio desintegrina de ADAM 23 interage com a integrina $\alpha v \beta 3$ promovendo a adesão. No mesmo período foi descrito a interação das ADAMs 1,2,3,9,12 e 15 com $\alpha 9 \beta 1$ (ETO et al., 2000; ETO et al., 2002). Em 2004 foi demonstrado que as ADAMs 12 e 17 interagem com as integrinas $\alpha 5 \beta 1$ e $\alpha 7 \beta 1$ respectivamente, ambas promovendo adesão celular (BAX et al., 2004; ZHAO et al., 2004).

Apesar destes trabalhos demonstrarem uma interação *in vitro* do domínio desintegrina com as integrinas, este modelo é muito criticado, pois a cristalografia da proteína indutora de apoptose vascular 1 (VAP1) uma SVMP, demonstrou que a região ECD no domínio desintegrina da proteína em sua forma nativa é coberto pela região rica em cisteína, assim indisponibilizando sua interação com outras proteínas (TAKEDA et al., 2006).

O domínio rico em cisteína é caracterizado pela alta porcentagem de resíduos de cisteína dispostos em uma sequência distinta. Entende-se que este domínio pode influenciar no papel desempenhado por outros domínios, promovendo adesão celular e regulando a ação proteolítica (EDWARDS et al., 2008; STONE et al., 1999).

Estudos mostraram que células mesenquimais utilizam de sindecams como receptor inicial para o domínio rico em cisteína de ADAM12 mediando a adesão celular e

que esta interação resulta também na ativação de integrinas $\beta 1$, a qual está envolvida no espraiamento celular (IBA et al., 2000). Gaultier e colaborador (2002) mostraram a interação do domínio desintegrina e a região rica em cisteína de ADAM13 com fibronectina, e que esta interação resultava numa maior adesão celular.

O domínio citoplasmático das ADAMs é a região com maior variabilidade em tamanho e sequência entre os membros da família, podendo variar entre 11 aminoácidos em ADAM11 até 231 em ADAM19. Este domínio ainda possui grande quantidade de prolina, serina, ácido glutâmico e lisina, e as sequências não se assemelham a nenhuma outra proteína já descrita, possuindo potencial de atuar em conjunto com os domínios EGF-like e transmembrana como transdutor de sinalização celular (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; WOLFSBERG et al., 1996).

Muitas ADAMs possuem um ou mais motivos PxxP, podendo interagir com proteínas que possuem domínio SH-3 ou resíduos de serina, treonina e tirosina, que são sítios potenciais para fosforilação por diversas cinases. Estes indícios sugerem que este domínio pode atuar na regulação da função proteolítica da proteína em resposta a eventos de sinalização intracelular, ou também ele pode estar envolvido na transdução de sinal (EDWARDS et al., 2008).

Entre as 40 ADAMs descritas, 17 são expressas no sistema nervoso. Entre estas apenas as ADAMs 17 e 10 possuem a atividade catalítica, podendo atuar tanto na clivagem de proteínas como na interação com integrinas, enquanto que as demais não possuem o sítio ativo no domínio metaloprotease sugerindo que estas proteínas atuam no processo de adesão e sinalização célula-célula por ligação a outras proteínas pelo domínio desintegrina (YANG et al., 2006).

Muitas ADAMs que possuem seu domínio metaloprotease inativo são expressas em testículos e epidídimo, onde atuam no processo de fertilização e na fusão celular. Entretanto há três ADAMs que não possuem atividade proteolítica e são predominantemente expressas no sistema nervoso, que é o caso das ADAMs 11, 22 e 23 (KÄRKKÄINEN et al., 2000; NOVAK et al., 2004; YANG et al., 2006)

ADAM 11 é uma proteína paróloga as ADAMs 22 e 23 e descrita apenas em vertebrados. Estudos utilizando *Northern blot* e hibridização *in situ* mostraram que o gene *adam11* é expresso durante o desenvolvimento até a fase adulta em camundongos.

Animais nocaute para *adam11* mostraram uma redução do comportamento de dor induzido por formalina e não apresentam nenhuma má formação relevante nos órgãos em que essa proteína deveria ser expressa. Estes dados sugerem que a ADAM 11 possui importante papel na transmissão de dor e em mecanismos de regulação inflamatória (TAKAHASHI et al., 2006).

ADAM 22 e ADAM 23 são proteínas homólogas em seus domínios extracelulares, e os animais nocautes para um destes genes apresentam ataxia e tremores, causando letalidade logo após o nascimento (MITCHELL et al., 2001). No caso do animal nocaute para *adam22* ocorre também uma hipomielinização dos nervos periféricos, já animais com deficiência de ADAM23 não apresentam má formação tecidual (OWUOR et al., 2009; SAGANE et al., 2004).

3.2 ADAM23

ADAM23 também denominada de MDC3 é um membro da família ADAM expressa predominantemente no encéfalo, sendo descrita pela primeira vez e clonada junto com ADAM22 por Sagane e colaboradores (1998). Neste trabalho foi observado a alta similaridade entre essas proteínas com a já descrita ADAM11 (MDC), entretanto estas novas ADAMs não possuíam o sitio ativo no domínio metaloprotease que é essencial para a atividade proteolítica. O mesmo grupo de pesquisadores mapeou o gene *adam23* humano que está localizado no cromossomo 2q33-34 enquanto que as ADAMs 11 e 22 provem de outros cromossomos (SAGANE et al., 1999).

Cal e colaboradores (2000) descreveram o potencial adesivo da ADAM23 mostrando que células de neuroblastoma humano (NB-100, SHSY-5Y) plaqueadas em uma superfície com o domínio desintegrina de ADAM23 imobilizado apresenta similar índice de adesão quando comparado ao mesmo tipo de célula plaqueada em fibronectina.

A interação específica da ADAM23 com integrina $\alpha\beta 3$ pode ser observada quando uma linhagem celular que expressava exclusivamente $\alpha\beta 3$ apresentou maior adesão quando comparada a células que expressavam outras formas de integrinas, sendo que esta adesão pôde ser inibida com o uso de anticorpos anti- $\alpha\beta 3$ (CAL et al., 2000). Trabalhos posteriores mostraram que ADAM23 possui a capacidade de modular

negativamente a integrina $\alpha\beta3$, pois células que tiveram a expressão de ADAM23 reduzida apresentaram maior índice de ativação de $\alpha\beta3$, com isso um maior potencial adesivo e migratório, sendo possível bloquear este aumento de potencial usando anticorpos para $\alpha\beta3$ (VERBISCK et al., 2009).

Foi demonstrado que células dendríticas de camundongo silenciadas para *adam23* apresentam uma diminuição no potencial proliferativo e uma diminuição na produção e ativação de citocinas, bem como na ativação destas citocinas. Esse mesmo fenótipo pode ser induzido bloqueando a integrina $\alpha\beta3$ com anticorpos, sugerindo que a interação entre essas moléculas possui um importante papel na modulação da sinalização intracelular (ELIZONDO et al., 2016)

Sun e colaboradores (2004) descreveram duas isoformas de ADAM23 além da já denominada ADAM23 α (SAGANE et al., 1998), as isoformas β e γ . A ADAM23 β possui alta similaridade a ADAM23 α , diferenciando-se em alguns aminoácidos no domínio transmembrana. ADAM23 γ se difere de suas outras isoformas em dois aspectos, estruturalmente devido à ausência do domínio transmembrana, indicando que esta possa ser uma isoforma secretada da proteína e em relação à sua expressão temporal, esta isoforma é expressa apenas no período embrionário e neonatal decaindo drasticamente após o nascimento. Assim, foi sugerido que as isoformas ADAM23 α e β atuem na manutenção do sistema nervoso, enquanto que a isoforma ADAM23 γ atua durante a formação da rede neuronal que é um dos eventos mais importantes do desenvolvimento do SNC (SUN et al., 2004).

ADAM23 é uma proteína expressa predominantemente no sistema nervoso e possui altos níveis de expressão em regiões específicas, no hipocampo sendo expressa nas áreas CA1 e CA3, assim como nos giros denteados pelos neurônios piramidais. No cerebelo há uma maior expressão nas células de Purkinje e nas células granulares cerebelares além de estar presente em todo o córtex cerebral (GOLDSMITH et al., 2004). O mesmo grupo verificou que células granulares cerebelares em cultura, sintetizam duas formas de ADAM23, uma com massa aproximadamente de 100kDa representando a proteína em sua forma imatura e outra com 70kDa correspondente a forma madura da ADAM23, havendo a ausência do pró-domínio (GOLDSMITH et al., 2004; SEALS; COURTNEIDGE, 2003).

Costa e colaboradores (2005) verificaram que o gene *adam23* possui um maior nível de metilação em células cancerígenas quando comparado com células cerebrais normais, e esta metilação resultava no silenciamento desse gene.

ADAM23 é descrita como uma molécula potencialmente adesiva e mediadora de interações célula-célula e, o silenciamento desse gene causado pela metilação pode resultar numa interação anormal entre as células favorecendo a migração celular e a progressão de tumores. Trabalhos posteriores mostram que *adam23* é um gene frequentemente silenciado em tumores gástricos, intestinais, pulmonares, mamários, epiteliais e cerebrais, entretanto possui uma maior expressão em células endoteliais derivadas de tumores comparadas a células endoteliais normais (CALMON et al., 2007; CHOI et al., 2009; COSTA et al., 2004; COSTA et al., 2005; FRIDRICOVA et al., 2015; GHILARD et al., 2008; OTA et al., 2016; TAKADA et al., 2005).

ADAM23 foi demonstrada importante para a diferenciação neuronal em células de carcinoma de camundongo (P19). Esta linhagem possui a capacidade de transformar em células neuronais quando tratadas com ácido retinóico. Durante este processo houve alterações dos níveis de transcrição de *adam23* semelhante às alterações observadas durante o desenvolvimento embrionário de encéfalo em camundongo. Além disso, o silenciamento de ADAM23 nesta linhagem foi o suficiente para induzir as células à diferenciação na ausência de ácido retinóico (SUN et al., 2007).

Sagane e colaboradores (2008) descreveram dois parceiros moleculares para ADAM23, LGI1 (*Leucine-rich glioma inactivated 1*) e LGI4. Entretanto esta interação não é exclusiva, já que tanto LGI1 e LGI4 interagem com ADAM11 e 22.

LGI1 é uma proteína secretada no SNC, mutações neste gene estão ligadas a epilepsia parcial autossômica dominante com características auditivas. LGI1 possui maior afinidade a ADAM23 quando comparado as ADAMs 11 e 22. LGI1 também mostrou induzir o crescimento de neuritos através da ADAM23, sendo que células nocautes para *adam23* possuem esse crescimento significativamente reduzido. Também foi observado que os animais nocautes para *adam23* apesar de não apresentarem má formação tecidual, possui uma redução na arborização dendrítica (OWUOR et al., 2009).

Interação entre LGI1 e ADAM22 atua na regulação de receptores de alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) que são mediadores da transmissão

sináptica através da PSD-95 (*postsynaptic density protein 95*), devido ao fato do nocaute de ADAM22 e 23 em camundongo gerar similar fenótipo letal, especula-se que LGI1, ADAM22 e ADAM23 participem de um complexo proteico da nano coluna trans-sináptica (FUKATA; FUKATA, 2017).

ADAM23 foi descrita participando da via de diferenciação em preadipócitos (3T3-L1), servindo como receptor para a proteína LGI3. Silenciamento de ADAM23 ou LGI3 resulta no aumento do processo de adipogênese nestas células. Além do fato de tratamento com LGI3 atenuar a diferenciação em adipócitos e este efeito ser reverso em células silenciadas para *Adam23*, indicando que esta interação regula esta via de diferenciação (KIM et al., 2012).

Costa e colaboradores (2009) mostraram a interação *in vitro* entre ADAM23 e Proteína Príon Celular (PrP^c), que é uma proteína expressa no cérebro que está envolvida com doenças neurodegenerativas.

Até o momento pouco se sabe sobre o papel de ADAM23 no desenvolvimento do sistema nervoso. Sendo assim, a avaliação da expressão de ADAM23 em células de origem nervosa bem como a possibilidade desta proteína estar envolvida em processo de diferenciação pode contribuir no entendimento do seu papel biológico no contexto de sistema nervoso.

4 Materiais e Métodos

4.1 Linhagens celulares

As linhagens de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC – CRL2266) e murino Neuro2a (ATCC – CCL131), feocromocitoma adrenal de rato PC-12 (ATCC – CRL-1721) e glioblastomas humano T98G (ATCC – CRL-1690), obtidas a partir da *American Type Culture Collection* (ATCC) e a linhagem HEK 293T transfectada com pcDNA3.1-ADAM23-HA descrita por Costa e colaboradores (2009) foram utilizadas em colaboração com o Professor Dr. Sílvio Marques Zanata, Laboratório de Neurobiologia da Universidade Federal do Paraná. As linhagens foram cultivadas em meio DMEM – *High Glucose* (Gibco) contendo penicilina (100 U.I./ml) e estreptomicina (100µg/ml) (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (Gibco) em concentração de 10% para Neuro2a, PC-12 e T89G e em 15% para SHSY-5Y. As células foram manipuladas no laboratório de Biologia Celular e Protozoologia e mantidas em incubadora úmida com 5% de CO₂ a 37°C no laboratório de Cultivo Celular e Histopatologia do programa de Pós-Graduação em Odontologia, ambos na UEPG.

4.2 Anticorpos

O anticorpo monoclonal anti-ADAM23 (DL11C8), recém descrito (BORGONOV0 et al., 2018), foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e cedidos pelo Prof. Dr. Sílvio Marques. A fonte do anticorpo anti-ADAM23 foi o sobrenadante de cultivo do hibridoma produtor do monoclonal (denominado DL11C8) sem qualquer purificação. Foram ainda utilizados, policlonal anti-actina produzido em coelho A2066 (Sigma) na diluição de 1:3000, monoclonal anti-SYP produzido em camundongo sc-17750 (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:8000, monoclonal anti-p-erk1/2 produzido em camundongo M8159 (Sigma) na diluição de 1:5000, monoclonal anti-erk1/2 produzido em camundongo M3807 (Sigma) na concentração de 5µg/ml, anticorpo policlonal produzido em camundongo anti-PrPc (cedido pelo professor Sílvio Marques Zanata-UFPR) na diluição de 1:2000. Como

anticorpos secundários foram utilizados anti-IgG de camundongo A4416 (Sigma) na diluição de 1:4000, anti-IgG de coelho (Sigma) na diluição de 1:3000, ambos acoplados a *horseradish peroxidase* (HRP).

4.3 Análise da expressão de ADAM23 em linhagens celulares através de *Western blot*

Extratos de diferentes linhagens celulares (SYSH-5Y, Neuro2A, PC-12, T98G) foram processados como descrito por Costa e colaboradores (2009). As células foram lisadas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,2% de deoxicolato de sódio, pH 7,4) acrescido de inibidores de proteases (1mM PMSF, 1mM fenantrolina, 1mM NEM e 1mM EDTA) e inibidores de fosfatase (1 mM Na₃VO₄ e 1mM NaF), deixadas em banho de gelo por 40 minutos e submetidas a ciclos de passagem por seringa de insulina (BD Ultra-Fine® II, agulha 0,25mm de calibre). Após a incubação em gelo, os lisados foram centrifugados a 13000 rpm durante 15 minutos a 4° C. Os sobrenadantes correspondentes aos extratos proteicos foram coletados e dosados pelo método de Bradford (1976). Os complexos proteicos (80µg) foram separados por eletroforese em gel desnaturante de 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE), com aplicação de campo elétrico vertical segundo Sambrook & Russel (2001) usando o equipamento MiniVE (GE Healthcare Life Sciences do Brasil). Após a separação eletroforética, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose Hybond-C Extra Amersham Biosciences (GE Healthcare) durante 70 minutos sob voltagem de 25 V em tampão de transferência gelado (192 mM glicina, 25 mM Tris, 20% metanol). As membranas foram coradas com Ponceau (0,1% de Ponceau em ácido acético) para análise da eficiência da transferência e então, bloqueadas durante 1 a 2 horas com TBS-T (150 mM NaCl; 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). As membranas foram incubadas com o anticorpo primário apropriado (anticorpo monoclonal anti-ADAM23) diluído em tampão de bloqueio, por 16 horas à 4°C sob agitação. Após a incubação, as membranas foram lavadas cinco vezes de três minutos com TBS-T e em seguida foi adicionado o anticorpo secundário adequado (anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho), conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*). As

membranas foram incubadas com o anticorpo secundário durante 1 hora à temperatura ambiente. Um novo ciclo de lavagem foi realizado. Então, foi adicionado o substrato adequado à membrana para a reação quimioluminescente empregando-se o kit *ECL Prime Western blotting detection* (GE Healthcare), a revelação foi realizada usando filme radiográfico apropriado (Hyperfilm, GE Healthcare) ou *Medical X-ray Green* (Carestream)

4.4 Análise da expressão de ADAM23 em linhagem de feocromocitoma (PC-12) tratada com fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF)

A linhagem de feocromocitoma de rato (PC-12) foi cultivada em meio DMEM-*High Glucose* contendo penicilina (100 U.I./ml) e estreptomicina (100µg/ml), suplementado com 10% de SFB (Gibco). Foram plaqueadas 2×10^6 células/ placa (100 mm de diâmetro, Kasvi), totalizando 10 placas. Após 24 h do plaqueamento, as placas foram separadas em cinco grupos experimentais (2 placas por grupo): células mantidas em condição normal de cultivo com 10% SFB; grupo controle 1% de SFB mantido por três ou seis dias; grupo 1% SFB acrescido de 50 ng/ml BDNF mantido por três ou seis dias. O grupo controle 10% SFB foi retirado da cultura no mesmo dia que iniciou a retirada de SFB e a adição de fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) (Sigma). Nos grupos controles e tratados de seis dias o meio foi trocado no 3º dia e acrescido novamente com 50 ng/ml de BDNF, concentração sugerida por Ryu e colaboradores (2015). Após o tratamento as células foram retiradas da cultura, processadas e submetidas a técnica de *Western blot* como descrito no item 4.3. Foram usados os seguintes anticorpos: anti-ADAM23, para verificar a expressão desta proteína durante o tratamento e anticorpo policlonal anti-actina (Sigma) como normalizador, para avaliar se a quantidade de proteínas (80 µg) usado em cada amostra foi a mesma. Anti-SYP e anti-PrP^C foram usados como marcadores de diferenciação neuronal.

4.5 Análise da expressão de ADAM23 em linhagem de feocromocitoma (PC-12) tratada com fator de crescimento de nervo (NGF)

A linhagem de feocromocitoma de rato (PC-12) foi cultivada em meio DMEM-*High Glucose* contendo penicilina (100 U.I./ml) e estreptomicina (100µg/ml), suplementado com 10% de SFB (Gibco). Foram plaqueadas 2×10^6 células/ placa (100 mm de diâmetro, Kasvi), totalizando 10 placas. Após 24 h do plaqueamento, as placas foram separadas em cinco grupos experimentais (2 placas por grupo): células mantidas em condição normal de cultivo com 10% SFB; grupo controle 1% de SFB mantido por três ou seis dias; grupo 1% SFB acrescido de 50 ng/ml NGF mantido por três ou seis dias. O grupo controle 10% SFB foi retirado da cultura no mesmo dia que iniciou a retirada de SFB e a adição de fator de crescimento de nervo (NGF) (Sigma). Nos grupos controles e tratados de seis dias o meio foi trocado no 3º dia e acrescido novamente com 50 ng/ml de NGF, concentração sugerida por Ryu e colaboradores (2015). Após o tratamento as células foram retiradas da cultura, processadas e submetidas a técnica de *Western blot* como descrito no item 4.3. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-ADAM23, para verificar a expressão desta proteína durante o tratamento e anticorpo policlonal anti-actina (Sigma) como normalizador, para avaliar se a quantidade de proteínas (80 µg) usado em cada amostra foi a mesma. O Anti-SYP foi usado como marcador de diferenciação neuronal.

4.6 Análise da expressão de ADAM23 em linhagens de neuroblastoma tratadas com ácido retinóico

As linhagens de neuroblastoma (SH-SY5Y e Neuro-2a) foram cultivadas em meio DMEM-*High Glucose* contendo penicilina (100 U.I./ml) e estreptomicina (100 µg/ml), suplementado com 10% de SFB (Gibco) para Neuro2a e 15% para SH-SY5Y. Foram plaqueadas 2×10^6 células/ placa (100 mm de diâmetro, Kasvi), totalizando 10 placas. Após 24 h do plaqueamento, as placas foram separadas em cinco grupos experimentais (2 placas por grupo): células mantidas em condição normal de cultivo com 10% SFB ou 15% SFB dependendo da linhagem; grupo controle mantido em 1% de SFB e

dimetilsulfóxido (DMSO) por quatro ou sete dias; grupo 1% SFB acrescido de 10 μ M all-trans ácido retinóico (atAR) (*Laboratori Mag – S.P.A.*) mantido por quatro ou sete dias conforme sugerido por Cheung e Colaboradores (2009). O grupo 10% SFB foi retirado da cultura no mesmo dia que iniciou a retirada de SFB e a adição de atAR. Houve troca de meio a cada 48 horas em todos os grupos. As células foram retiradas do tratamento após 4 ou 7 dias, processadas e submetidas a técnica de *western blot* como descrito no item 4.3. Para as reações foi utilizado anti-ADAM23, para verificar a expressão desta proteína durante a diferenciação neuronal e anti-actina como normalizador, para confirmar a quantidade total de proteínas (80 μ g) usada em cada amostra. 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 usado o software GraphPad Prism v7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Análise de variância de uma via (ANOVA One-Way) foi usado para determinar significância entre os grupos em 3 ou mais experimentos independentes. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.7 Análise da expressão de ADAM23 em Neuro2a tratada com retinal

4.7.1 Análise da citotoxicidade de Retinal por 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)

A linhagem de neuroblastoma murino (Neuro2a) foi cultivada como descrito anteriormente. As células foram semeadas em densidade de 10^4 células em cada poço de uma microplaca de 96 poços (NEST) e incubadas por 24h a 37°C, 5% CO₂. Então, o meio foi retirado e adicionado meio DMEM (1% SFB) contendo all-trans retinal (Sigma) nas concentrações de 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 8 μ M e 10 μ M, o qual foi mantido por 48h. Após a incubação o meio contendo retinal foi retirado e adicionado 50 μ L de solução de MTT (Sigma Aldrich) em concentração de 0,5 mg/ml diluído em PBS e incubado por 3 horas. Após a incubação, foi adicionado 100 μ L de DMSO (Synth) para solubilizar os cristais de formazan. A leitura foi feita em leitora de microplacas BioTek (laboratório de Histopatologia e Cultivo Celular – Pós-graduação em Odontologia da UEPG) em

comprimento de onda de 570nm, descontando o valor do branco manualmente. Para determinar significância estatística foi usado o software GraphPad Prism v7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Análise de variância de uma via (ANOVA One-Way) foi usado para determinar significância entre os grupos em 3 ou mais experimentos independentes. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.7.2 Análise da expressão de ADAM23 em Neuro2a tratada com retinal

A linhagem Neuro2a foi cultivada como descrito anteriormente. O tratamento com 2 μM de retinal (Sigma Aldrich) foi feito como descrito no item 4.5. As células foram retiradas do tratamento após 4 ou 7 dias, posteriormente processadas e submetidas a técnica de *western blot* como descrito anteriormente. Foi usado anti-ADAM23, para verificar a expressão desta proteína durante a diferenciação neuronal, anti-actina como normalizador. Para determinar se o tratamento com retinal alterou a via de sinalização ERK foi usado o anticorpo anti-p-erk-1/2 para visualização da proteína Erk fosforilada e anti-Erk-1/2 para verificar Erk total presente nas amostras.

4.8 Ensaios de estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em Neuro2a

4.8.1 Ensaio de citotoxicidade usando diferentes concentrações de H_2O_2

A linhagem de neuroblastoma (Neuro2a) foi cultivada de acordo como descrito anteriormente. As células foram então semeadas em densidade de 1×10^4 células em cada poço de uma microplaca de 96 poços (NEST) e incubadas por 24h a 37C, 5% CO_2 . Então, o meio foi retirado e adicionado meio DMEM (1%SFB) contendo H_2O_2 (Merk) nas seguintes concentrações 50 μM , 100 μM , 200 μM , 300 μM , 400 μM , 500 μM , 750 μM e 1mM. A placa foi incubada por 48 horas e após a incubação o meio contendo H_2O_2 foi retirado e adicionado 50 μL de solução de MTT em concentração de 0,5 mg/ml diluído em PBS e incubado por 3 horas. Após a incubação, foi adicionado 100 μl de DMSO para solubilizar os cristais de formazan. A leitura foi feita em leitora de microplacas BioTek em comprimento de onda de 570nm, descontando o valor do branco manualmente. Para

determinar significância estatística foi usado o software GraphPad Prism v7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Análise de variância de uma via (ANOVA One-Way) foi usado para determinar significância entre os grupos em 3 ou mais experimentos independentes. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.8.2 Ensaio tempo-dependente

Com a intenção de promover estresse oxidativo, as células foram mantidas em meio DMEM (1%SFB) contendo H_2O_2 a 50 μM por até 72 horas. As células foram retiradas do tratamento a cada 24 horas, posteriormente foram processadas e submetidas a técnica de *Western blot* como descrito no item 4.3. Foi usado o anticorpo anti-ADAM23, e anti-actina como normalizador. As bandas foram quantificadas e analisadas como descrito anteriormente

4.8.3 Ensaio concentração dependente

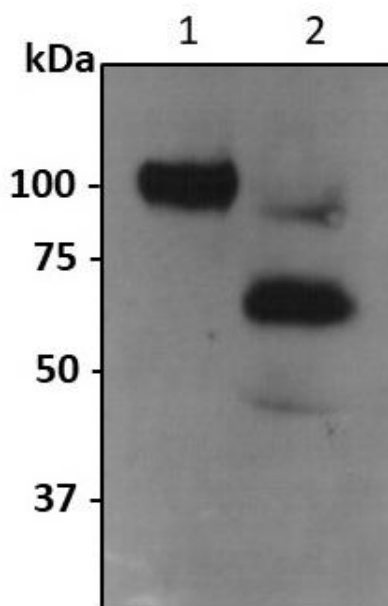
As células foram mantidas em meio DMEM (1%SFB) contendo H_2O_2 nas concentrações de 100, 200, 300, 400 μM por 48 horas. As células foram retiradas do tratamento após 48 horas, posteriormente foram processadas e submetidas a técnica de *Western blot* como descrito no item 4.3. Foi usado o anticorpo anti-ADAM23, e anti-actina como normalizador. As bandas foram quantificadas e analisadas como descrito anteriormente

5. Resultados

5.1 Teste do anticorpo monoclonal anti-ADAM23

O anticorpo monoclonal DL11C8 (anti-ADAM23) cedido pelo Prof. Dr. Silvio Zanata foi testado por *western blot*. Para este fim, foram utilizadas como amostras extrato proteico da linhagem HEK 293T que superexpressa ADAM23 e extrato de encéfalo de camundongo (figura 2). Na linha 1 observa-se uma banda com massa de 100 kDa correspondendo a forma imatura de ADAM23 com presença do pró-domínio (designada como ADAM23^{100kDa}) e na linha 2 é possível observar a presença de 2 bandas, uma com massa de 100 kDa que corresponde a ADAM23^{100kDa} e uma com massa de aproximadamente 70 kDa que corresponde a forma madura de ADAM23 com ausência do pró-domínio (designada como ADAM23^{70kDa}). Assim, verificou-se que o anticorpo reconheceu de maneira específica a proteína ADAM23 em sua forma madura (ADAM23^{70kDa}) e imatura (ADAM23^{100kDa}) podendo assim ser utilizado nos ensaios de análise de expressão de ADAM23.

Figura 2. Ensaio de *Western blot* para testar o anticorpo monoclonal anti-ADAM23.



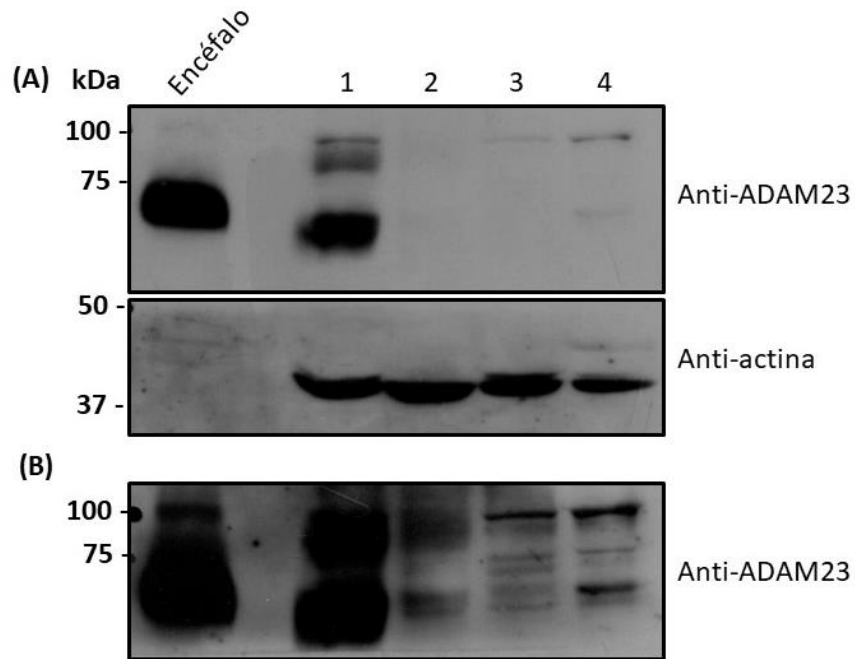
Nota: Linha 1 corresponde a 70 µg de extrato de HEK 293T que superexpressam ADAM23; Linha 2 corresponde a 50 µg de encéfalo de camundongo. Banda de aproximadamente 70 kDa corresponde a ADAM23 em sua forma madura, enquanto que a banda que corresponde a massa de 100 kDa representa ADAM23 em sua forma imatura.

5.2 Expressão de ADAM23 nas linhagens celulares

Para avaliar o perfil de expressão de ADAM23 nas linhagens celulares Neuro2a (neuroblastoma murino), SH-SY5Y (neuroblastoma humano), T98G (glioblastoma humano) e PC-12 (feocromocitoma adrenal de rato) foram preparados extratos celulares e estes submetidos a técnica de *western blot* usando o anticorpo monoclonal anti-ADAM23.

De acordo com a figura 3, a linhagem Neuro2a (linha 1) apresentou alta expressão de ADAM23^{100kDa} (forma imatura), assim como ADAM23^{70kDa} (forma madura). Nas linhagens SH-SY5Y (linha 2) e T98G (linha 3) não foi possível observar a expressão de ADAM23^{100kDa} ou ADAM23^{70kDa} quando o filme radiográfico foi exposto à reação por até 5 minutos (figura 3A). Entretanto, quando o filme Hyperfilm foi exposto a reação por mais tempo (20 minutos) foi possível verificar a presença de ADAM23^{100kDa} e ADAM23^{70kDa} nas duas linhagens (figura 3B). Na linhagem PC-12 (linha 4) foi possível observar a presença de ADAM23^{100kDa} e ADAM23^{70kDa} em ambos os tempos de exposições. Sendo assim, foi possível observar a expressão de ADAM23 em ambas as formas em todas as linhagens em diferentes quantidades.

Figura 3. Análise da expressão de ADAM23 por *Western blot* em linhagens celulares.



Nota: As linhagens celulares Neuro2a (linha 1), SH-SY5Y (linha 2), T98G (linha 3) e PC-12 (linha 4) foram submetidas à técnica de *western blot* usando o anticorpo anti-ADAM23. Para controle positivo da reação foi usado extrato de encéfalo de camundongo. O anticorpo anti-actina foi usado como um normalizador para indicar que a mesma quantidade de proteína (80 μ g) foi adicionada em todos os poços. (B) Mesma membrana em maior exposição (20 min) utilizando Hyperfilm.

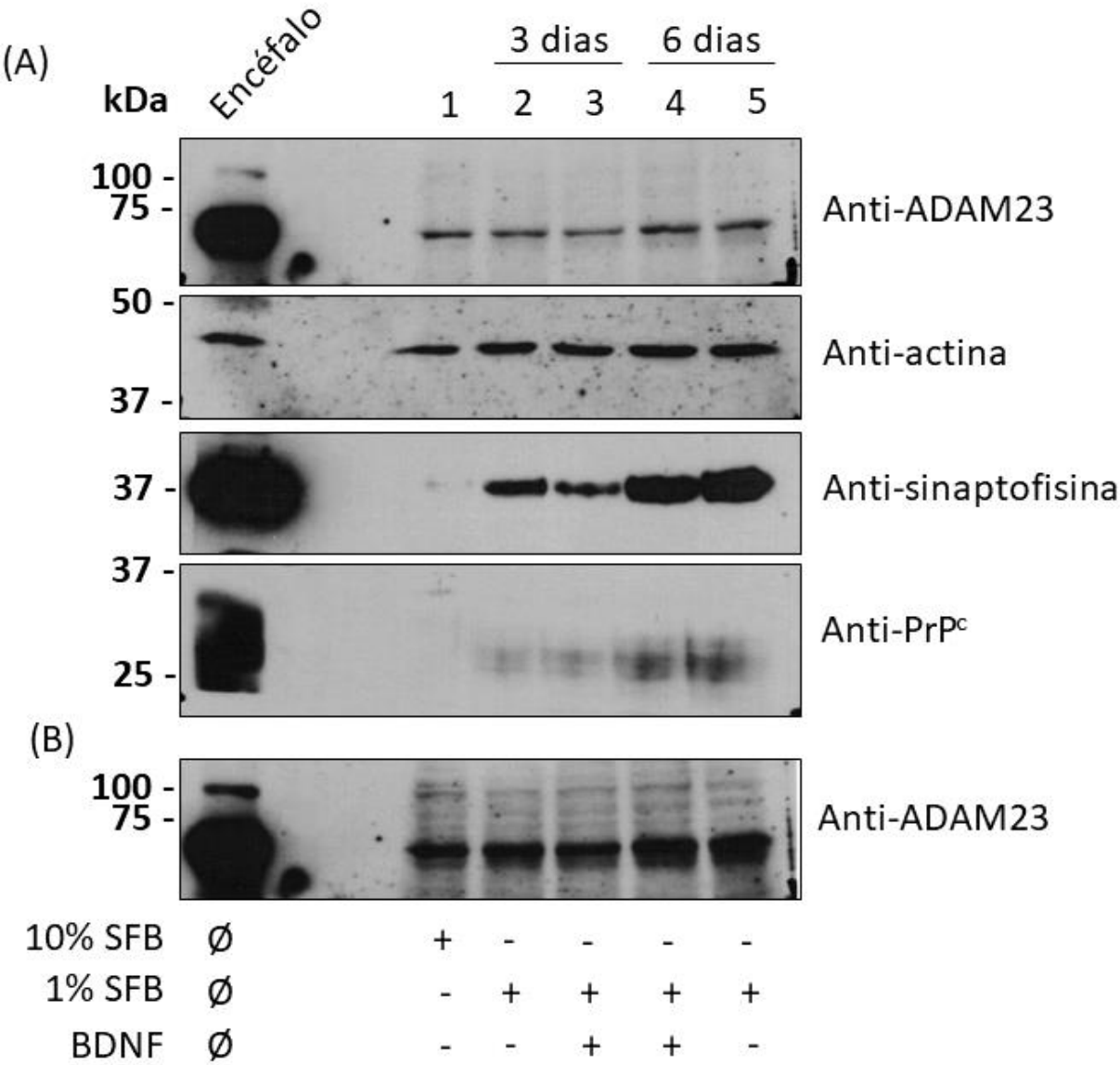
5.4 Expressão de ADAM23 em PC-12 induzida a diferenciação por BDNF

A linhagem de feocromocitoma de rato (PC-12) foi tratada com 50 ng/ml de BDNF em 1% de soro fetal bovino por 3 ou 6 dias. Após o tempo do tratamento as células foram processadas e submetidas a técnica de *western blot*.

Os experimentos de diferenciação com a linhagem PC-12 tratada com BDNF estão representados pela figura 4. Como é possível observar, não houve alteração da expressão de ADAM23^{100kDa} ou ADAM23^{70kDa} nos grupos tratados com BDNF (linha 3 e 4) em relação a seus respectivos controles em 1% de soro fetal bovino (SFB) (linha 2 e 5) ou com as células mantidas em condições normais de cultivo (10% SFB) (linha 1).

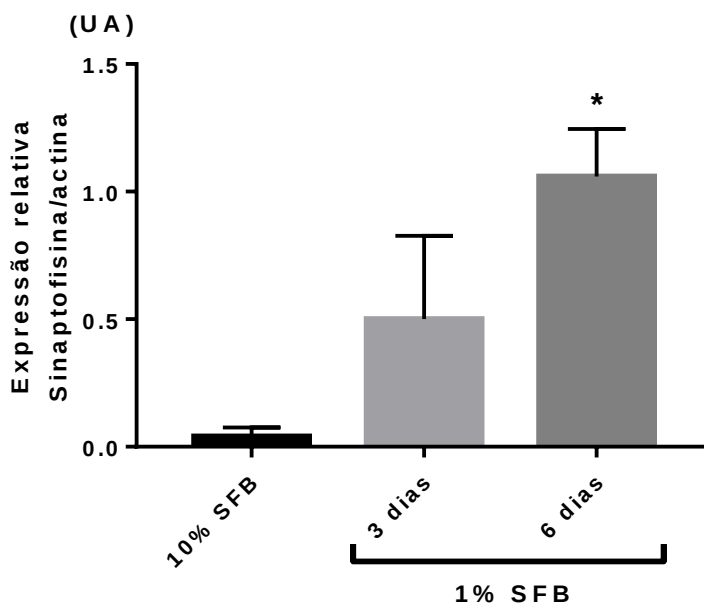
Para atestar que as células tratadas com BDNF estavam em processo de diferenciação foi analisada a expressão de dois marcadores para neurônios maduros, a proteína sinaptofisina que é uma glicoproteína de vesículas sinápticas presentes em neurônios maduros e a proteína príon celular (PrP^c) descrita tendo expressão aumentada na linhagem PC-12 diferenciada por neurotrofina. Para ambos os marcadores os grupos tratados com BDNF (linha 3 e 4) não apresentaram diferença em relação a seus respectivos controles em 1% de SFB (linha 2 e 5). Entretanto, houve aumento destes marcadores em todos os grupos que tiveram o SFB reduzido a 1% (linhas 2 a 5) quando comparados com as células mantidas em condições normais de cultivo a 10% SFB (linha 1). Este aumento nas proteínas marcadoras para neurônio mostrou ser dependente do tempo em que as células eram mantidas em 1% de SFB, visto que houve um aumento da expressão destes marcadores quando comparado 3 e 6 dias com redução de SFB (gráfico 1).

Figura 4. Ensaio de diferenciação em PC-12 tratadas com BDNF.



Nota: (A) A linhagem PC-12 foi tratada por 3 ou 6 dias com BDNF em 1% de SFB. Linha 1 corresponde as células mantidas em condição normal de cultivo (10% SFB). Linhas 2 e 5 correspondem aos controles do tratamento mantidos em 1% de SFB por 3 e 6 dias respectivamente. Linhas 3 e 4 correspondem as células tratadas com BDNF por 3 e 6 dias respectivamente. Para as reações foram usados como primários: anti-ADAM23, anti-actina, anti-SYP e anti-PrP^c. (B) Mesma membrana em maior exposição (20 min) utilizando Hyperfilm. Western blot representativo de 2 ensaios independentes.

Gráfico1. Expressão do marcador neuronal sinaptofisina em PC-12



Nota: Representação gráfica da expressão de sinaptofisina em PC-12 durante redução de soro fetal bovino. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo 10% SFB; $n=2$)

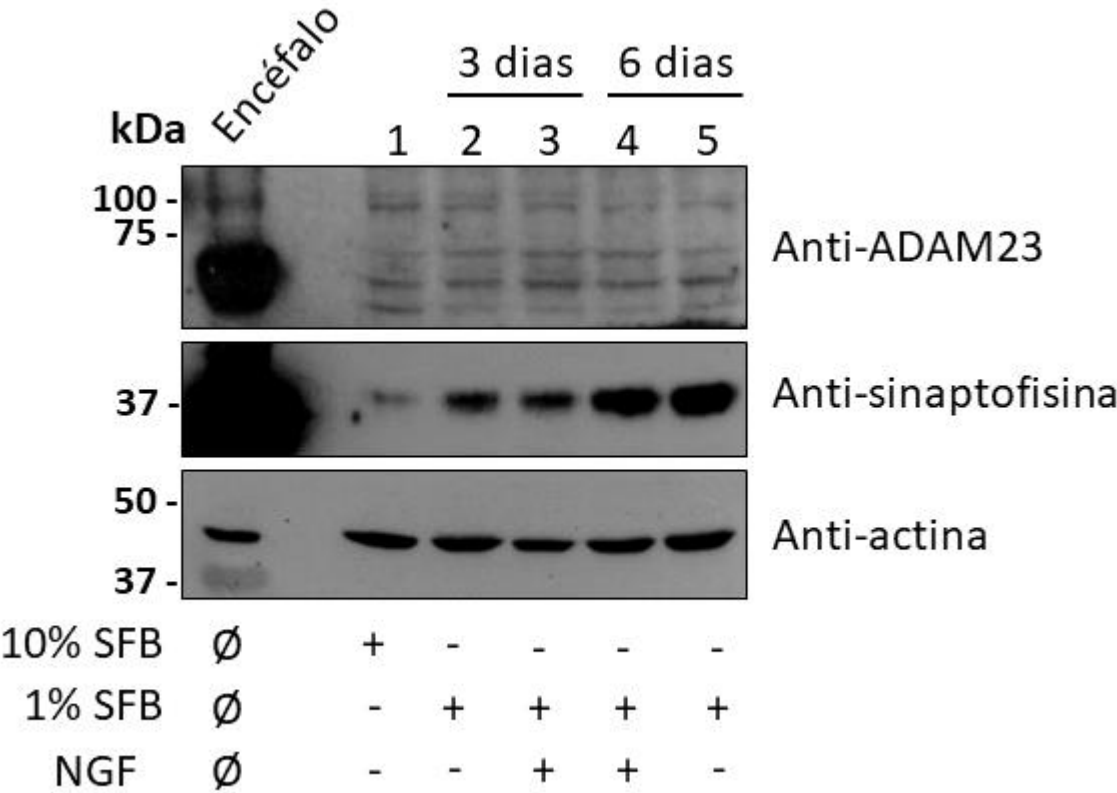
5.5 Expressão de ADAM23 em PC-12 induzida a diferenciação por NGF

Com o intuito de verificar se apenas a redução dos níveis de soro feral bovino é suficiente para induzir o aumento da expressão do marcador sinaptofisina em PC-12, estas células foram tratadas com 50 ng/ml de NGF em 1% SFB por 3 ou 6 dias, sendo este o modelo clássico de diferenciação neuronal para esta linhagem. Após o tempo do tratamento as células foram processadas e submetidas a técnica de *western blot*.

Os experimentos de diferenciação com a linhagem PC-12 tratada com NGF estão representados pela figura 5. Não foi possível detectar alterações na expressão de ADAM23^{100kDa} ou ADAM23^{70kDa} nos grupos tratados com NGF (linha 3 e 4) em relação a seus respectivos controles em 1% de soro fetal bovino (SFB) (linha 2 e 5) ou com as células mantidas em condições normais de cultivo (10% SFB) (linha 1).

Assim como no ensaio utilizando BDNF, não foi possível detectar diferença na expressão de sinaptofisina entre os grupos tratados com NGF (linha 3 e 4) em relação a seus respectivos controles em 1% de SFB (linha 2 e 5). Entretanto, houve aumento destes marcadores em todos os grupos que tiveram o SFB reduzido a 1% (linhas 2 a 5) quando comparados com as células mantidas em condições normais de cultivo a 10% SFB (linha 1) e novamente este aumento mostrou ser dependente do tempo em que as células eram mantidas sob redução de SFB.

Figura 5. Ensaio de diferenciação em PC-12 tratadas com NGF.

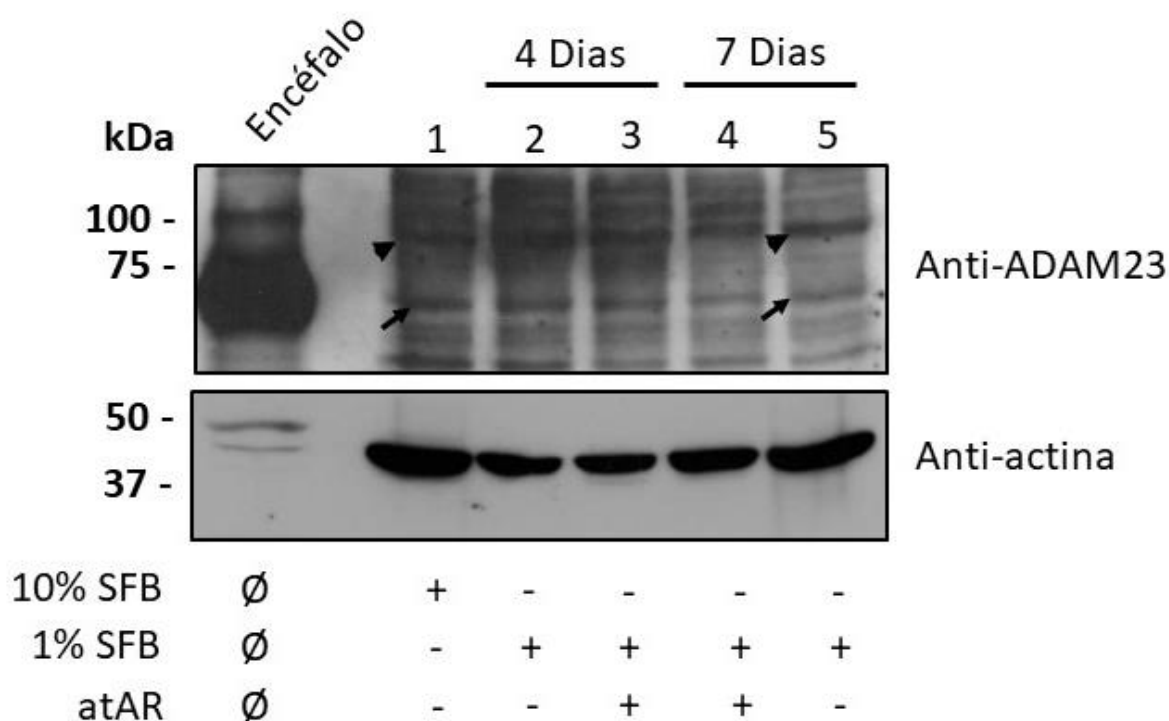


Nota: A linhagem PC-12 foi tratada por 3 ou 6 dias com NGF em 1% de SFB. Linha 1 corresponde as células mantidas em condição normal de cultivo (10% SFB). Linhas 2 e 5 correspondem aos controles do tratamento mantidos em 1% de SFB por 3 e 6 dias respectivamente. Linhas 3 e 4 correspondem as células tratadas com NGF por 3 e 6 dias respectivamente. Para as reações foram usados como primários: anti-ADAM23, anti-actina, anti-SYP.

5.6 Expressão de ADAM23 em neuroblastoma tratadas com all-trans ácido retinóico

As linhagens SH-SY5Y e Neuro2a foram tratadas com all-trans ácido retinóico por 4 ou 7 dias. As células foram processadas e submetidas a técnica de *western blot*. De acordo com a figura 6, não foi possível observar alterações no perfil de expressão de ADAM23^{100kDa} ou ADAM23^{70kDa} na linhagem SH-SY5Y entre os grupos tratados (linha 3 e 4) em relação aos controles em 1% de SFB (linha 2 e 5) e as células mantidas em condições normais (linha 1). Como as reações de *western blot* usando como amostra a linhagem SH-SY5Y e o anticorpo anti-ADAM23 frequentemente apresentavam reações de fundo, as quais dificultavam a sua quantificação das bandas correspondente, optou-se por realizar os ensaios de diferenciação com a ácido retinóico e retinal apenas com a linhagem Neuro2a.

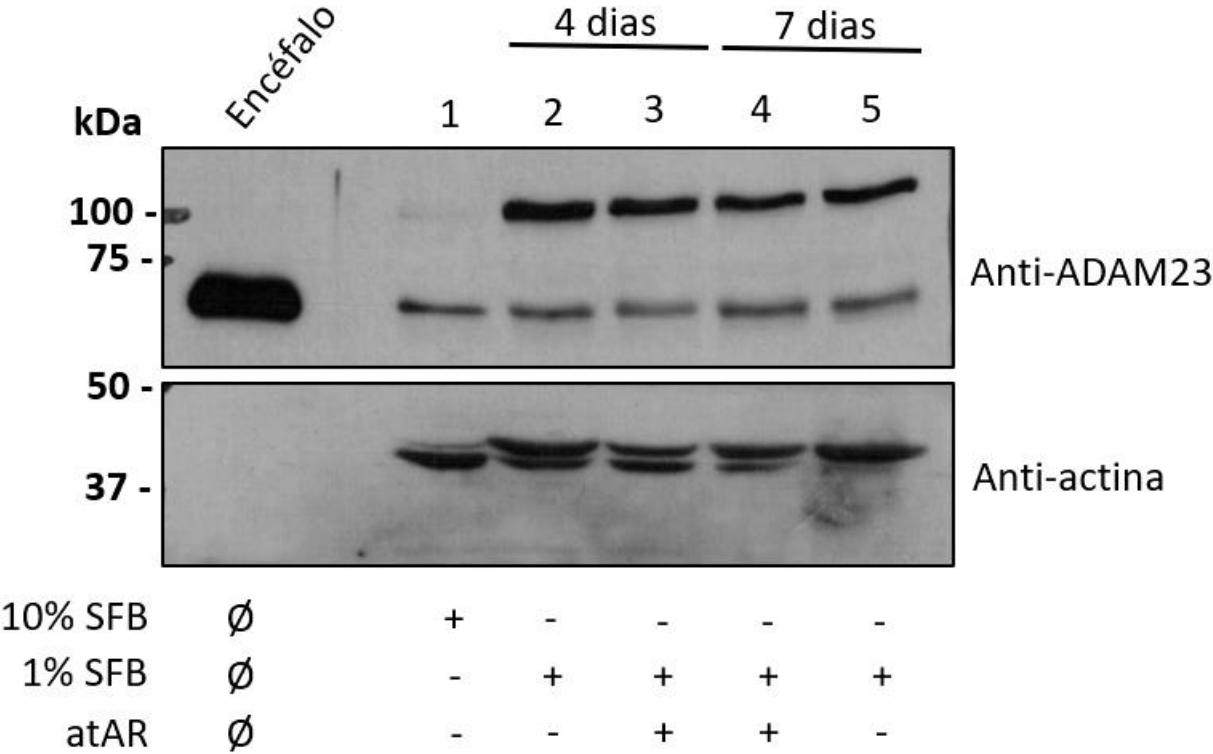
Figura 6. Perfil de expressão de ADAM23 em SH-SY5Y tratadas com ácido retinóico.



Nota: Células SHSY-5Y foram tratadas com atAR por 4 ou 7 dias. Linha 1 corresponde as células mantidas em condições normais de cultivo (15% SFB). Linhas 2 e 5 correspondem aos controles do tratamento mantidos em 1% de SFB por 4 e 7 dias respectivamente. Linhas 3 e 4 correspondem as células tratadas com atAR por 4 e 7 dias respectivamente. A reação foi feita com anti-ADAM23 e anti-actina. Cabeça de seta indica banda correspondente a ADAM23^{100kDa}, seta indica banda correspondente a ADAM23^{70kDa}.

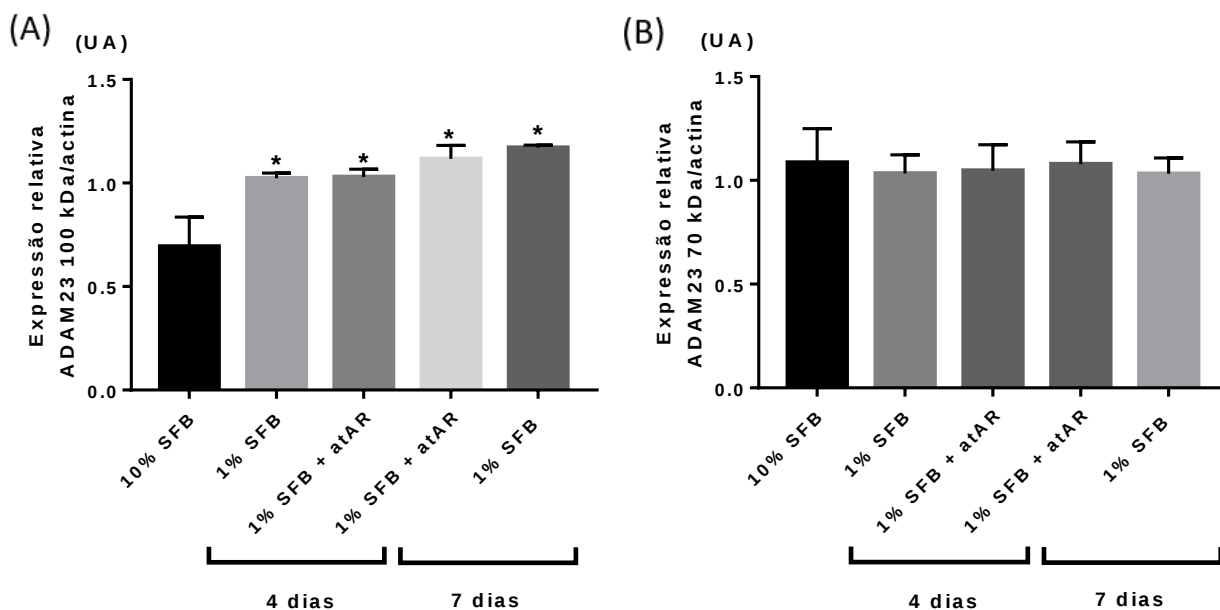
Como mostrado na figura 7 e gráfico 2, nos ensaios utilizando a linhagem Neuro2a não houve diferença na expressão de ADAM23^{100kDa} e ADAM23^{70kDa} entre os grupos tratados com all-trans ácido retinóico (linha 3 e 4) e seus respectivos controles em 1% SFB (linha 2 e 5). Entretanto, os grupos que tiveram redução de SFB (linha 2, 3, 4 e 5) apresentaram aumento da expressão da proteína ADAM23^{100kDa} em relação as células mantidas em condição normal de cultivo (linha 1, gráfico 2 A), enquanto que a expressão de ADAM23^{70kDa} se manteve inalterada em todos os grupos (gráfico 2 B). Sendo assim apenas a redução de SFB foi o suficiente para aumentar a expressão de ADAM23^{100kDa}.

Figura 7. Perfil de expressão de ADAM23 em Neuro2a tratadas com ácido retinóico.



Nota: As células foram tratadas com atAR por 4 ou 7 dias. Linha 1 corresponde as células mantidas em condições normais de cultivo (10% SFB). Linhas 2 e 5 correspondem aos controles do tratamento mantidos em 1% de SFB por 4 e 7 dias respectivamente. Linhas 3 e 4 correspondem as células tratadas com atAR por 4 e 7 dias respectivamente. A reação foi feita com anti-ADAM23 e anti-actina. Western blot representativo de 3 ensaios independentes.

Gráfico 2. Expressão de ADAM23 em Neuro2a tratada com all-trans ácido retinóico.



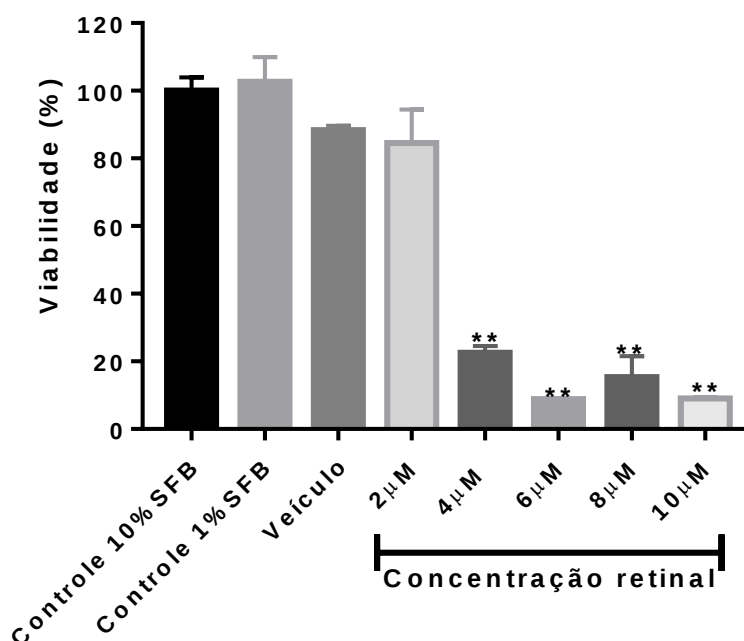
Nota: (A) Representação gráfica da expressão de ADAM23^{100kDa} em Neuro2a durante ensaio de diferenciação utilizando atAR. (B) Representação gráfica da expressão de ADAM23^{70kDa} em Neuro2a durante ensaio de diferenciação utilizando atAR. (*p<0,05 em relação ao grupo 10% SFB; n=3)

Para dar continuidade aos experimentos houve a necessidade da compra de um reagente novo (all-trans ácido retinóico), mas como a agência nacional de vigilância sanitária não permite a importação deste reagente, optou-se pelo reagente retinal.

5.7 Expressão de ADAM23 em Neuro2a tratadas com all-trans retinal

Em teste preliminar o atRL mostrou propriedades citotóxicas quando usado na mesma concentração que atAR (dados não mostrados). Sendo assim, foi necessário avaliar a viabilidade das células expostas ao retinal para encontrar uma concentração ideal para os ensaios de diferenciação. Foram realizados ensaios de citotoxicidade usando a técnica de MTT com diferentes concentrações de all-trans retinal e calculado a viabilidade da linhagem Neuro2a (gráfico 3). Este ensaio mostrou que concentrações iguais ou superiores a 4 μ M foram suficientes para induzir a morte celular, diminuindo a viabilidade a menos de 30%. Assim, os ensaios de diferenciação foram realizados utilizando a concentração de 2 μ M de retinal.

Gráfico 3. Viabilidade de Neuro2a tratadas com retinal.



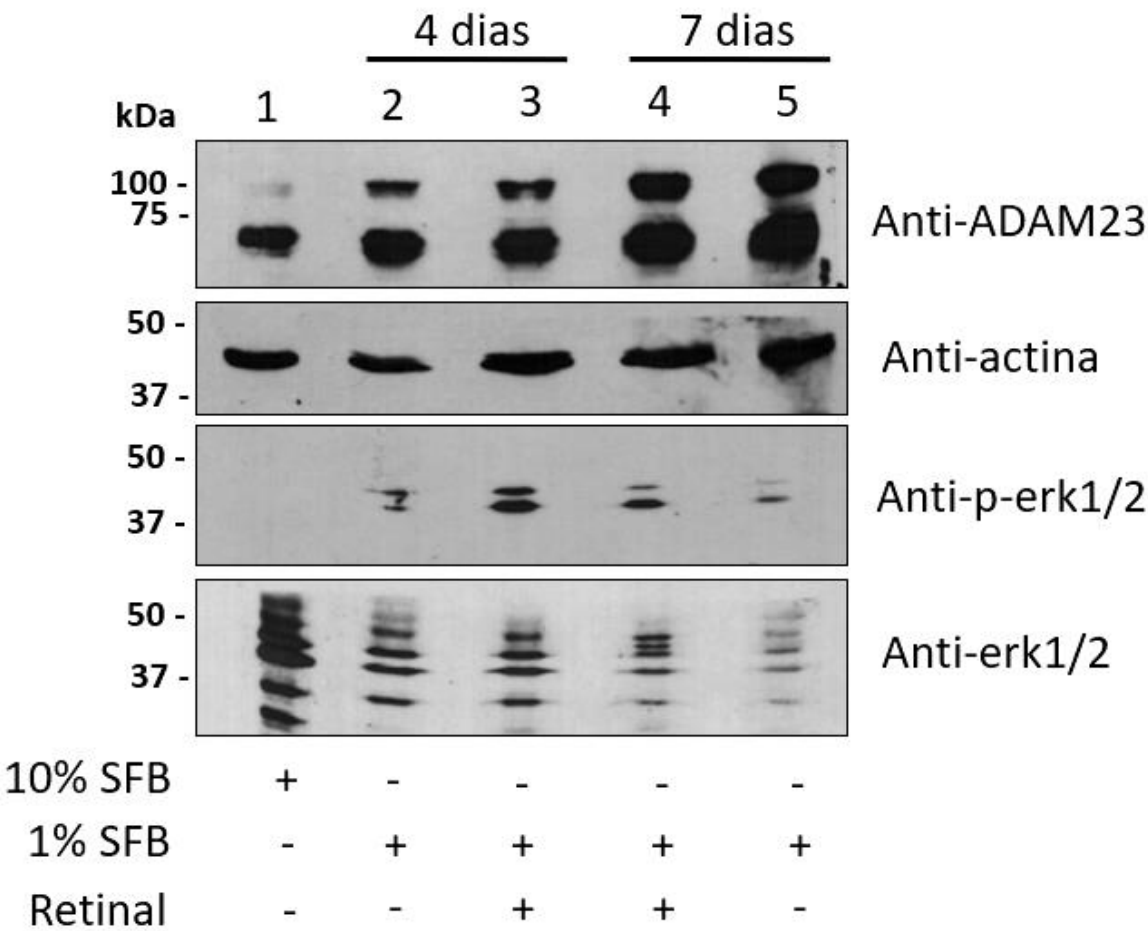
Nota: Ensaio de viabilidade pelo método do MTT de Neuro2a expostas em diferentes concentrações de all-trans retinal por 48 horas. (**p<0,005 em relação ao controle 1%SFB; n=3)

A linhagem Neuro2a foi tratada com atRL (2μM) nas mesmas condições dos ensaios anteriores utilizando atAR. Como pode ser observado na figura 8, os grupos tratados com atRL (linha 3 e 4) não apresentaram alterações na expressão de ADAM23 em relação aos seus respectivos controles (linha 2 e 5). Como esperado, os grupos que tiveram redução de SFB (linha 2, 3, 4 e 5) apresentaram aumento da expressão da proteína ADAM23^{100kDa} em relação as células mantidas em condição normal de cultivo (linha 1), enquanto que a expressão de ADAM23^{70kDa} se manteve inalterada em todos os grupos. Os ensaios utilizando atRL mostraram o mesmo padrão de expressão de ADAM23 dos ensaios utilizando atAR, este aumento de ADAM23^{100kDa} mostrou ser significativo como demonstrado no gráfico 4.

Para atestar que esta linhagem foi suscetível ao tratamento com all-trans retinal e que o tratamento alterou as sinalizações intracelulares, foi avaliado a ativação da sinalização via Erk através da análise de Erk fosforilada. O resultado usando o anticorpo que reconhece Erk fosforilada (anti-p-erk-1/2) mostrou maior nível de fosforilação de Erk

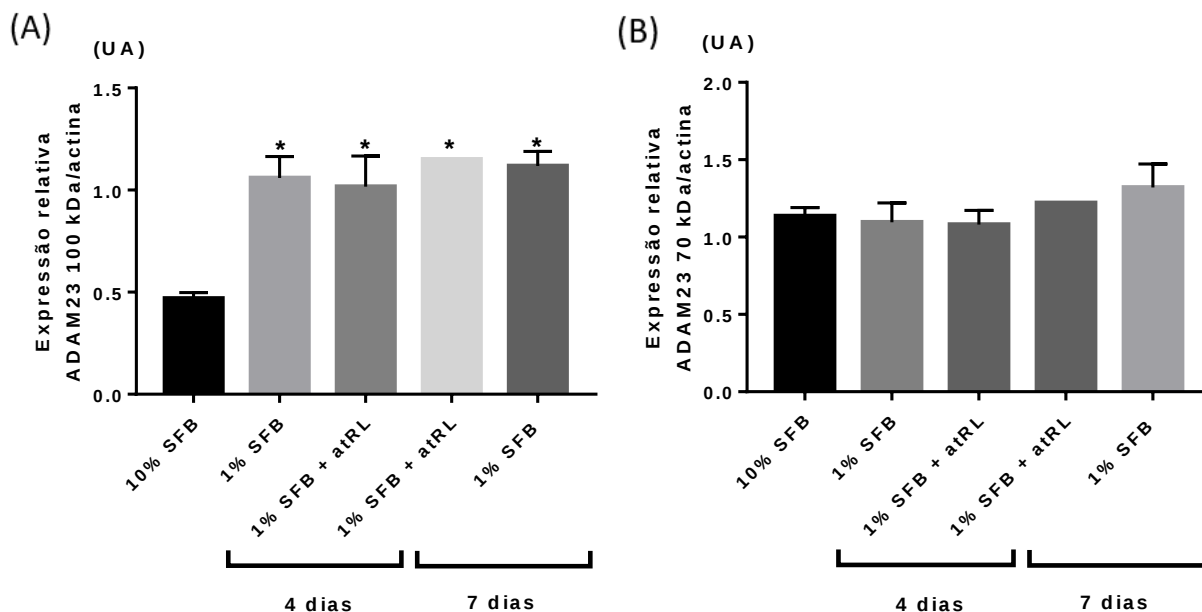
nos grupos tratados com atRL (linha 3 e 4) em relação a seus respectivos controles (linha 2 e 5). Também foi possível observar que os controles com redução de SFB (linha 2 e 5) apresentaram maior intensidade na banda correspondente a Erk fosforilada quando comparado com o grupo mantido em condições normais (linha 1), indicando assim que a redução de SFB pode ativar esta via de sinalização mesmo na ausência da molécula indutora.

Figura 8. Expressão de ADAM23 em Neuro2 tratadas com retinal.



Nota: As células foram tratadas com atRL por 4 ou 7 dias. Linha 1 corresponde as células mantidas em condições normais de cultivo (10% SFB). Linhas 2 e 5 correspondem aos controles do tratamento mantidos em 1% de SFB por 4 e 7 dias respectivamente. Linhas 3 e 4 correspondem as células tratadas com atRL por 4 e 7 dias respectivamente. A reação foi feita usando anti-ADAM23 para detecção de ADAM23, anti-actina foi usado como normalizador, anti-p-erk-1/2 foi usado para detectar Erk fosforilada e anti-erk-1/2 para visualizar Erk total presente nas amostras. *Western blot* representativo de 2 ensaios independentes.

Gráfico 4. Expressão de ADAM23 em Neuro2a tratada com retinal.



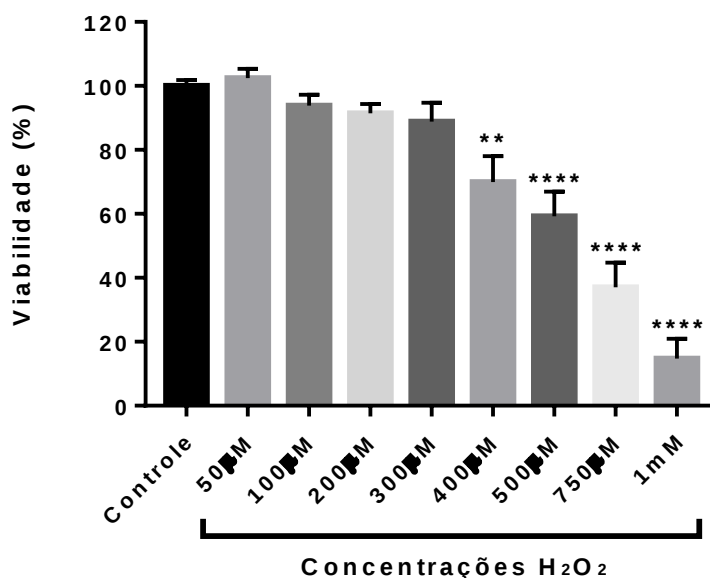
Nota: (A) Representação gráfica da expressão de ADAM23^{100kDa} em Neuro2a durante ensaio de diferenciação utilizando atRL. (B) Representação gráfica da expressão de ADAM23^{70kDa} em Neuro2a durante ensaio de diferenciação utilizando atRL. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo 10% SFB; $n=2$)

5.8 Avaliação de expressão de ADAM23 em Neuro2a tratada com peróxido de hidrogênio

Após a obtenção dos resultados que mostraram o aumento da expressão de ADAM23^{100kDa} em Neuro2a devido à redução de SFB e, considerando que redução de SFB gera estresse oxidativo em células, levantou-se a hipótese de ADAM23^{100kDa} estar envolvida em eventos de neuroproteção frente ao estresse oxidativo.

Para isto, primeiramente foi necessário verificar quais as concentrações ideais de H₂O₂ para os tratamentos com a linhagem Neuro2a. Ensaios de MTT foram realizados usando diferentes concentrações de H₂O₂ e então calculada a viabilidade das células. Como demonstrado no gráfico 5, a viabilidade celular da linhagem Neuro2a foi reduzida quando as células foram expostas a concentrações acima de 400 μ M de H₂O₂.

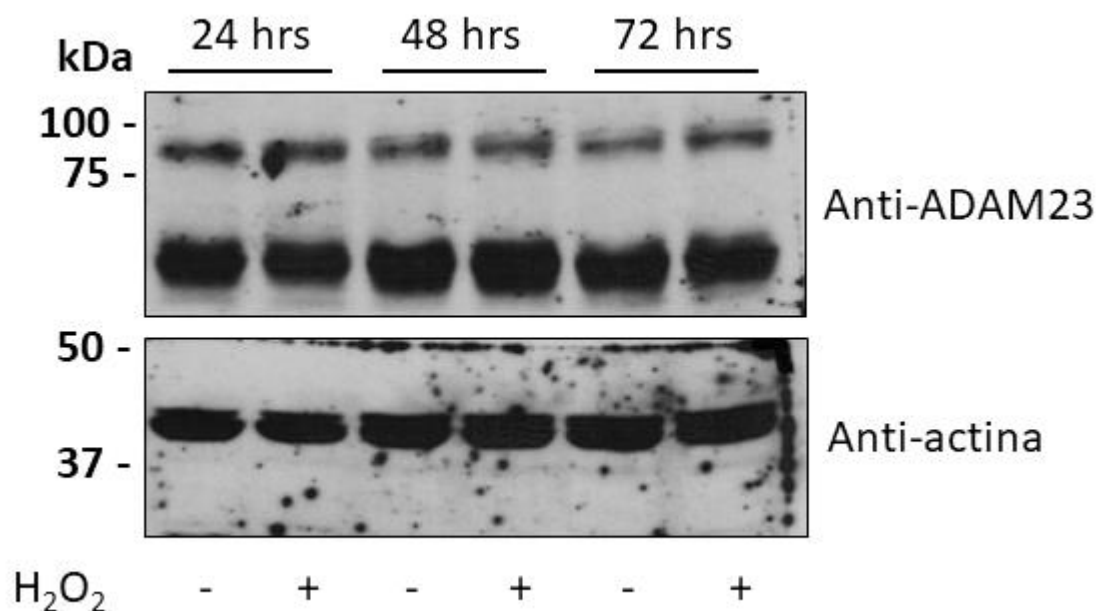
Gráfico 5. Viabilidade da linhagem Neuro2a expostas a diferentes concentrações de H₂O₂.



Nota: Demonstração gráfica da viabilidade da linhagem Neuro2a expostas a H₂O₂ em diferentes concentrações em 48 horas. (**p<0,01; ****p<0,0001; comparações feitas em relação ao controle sem adição de H₂O₂, n=3)

Para avaliar se a expressão de ADAM23 em Neuro2a tratada com H₂O₂ era dependente de tempo foi escolhido a concentração de 50 μM de H₂O₂, visto que nesta concentração não houve alteração da viabilidade, além disso não foi observado presença de morte celular por microscopia (dado não mostrado). A linhagem Neuro2a foi tratada com H₂O₂ na concentração de 50 μM por 24, 48, 72 horas, em seguida as células foram processadas e submetidas a técnica de *western blot*. De acordo com a figura 9, a linhagem Neuro2a tratada com H₂O₂ não apresentou alterações na expressão de ADAM23^{100kDa} ou ADAM23^{70kDa} em nenhum um dos tempos em relação ao controle.

Figura 9. Expressão de ADAM23 em Neuro2a tratadas com H₂O₂ em diferentes tempos

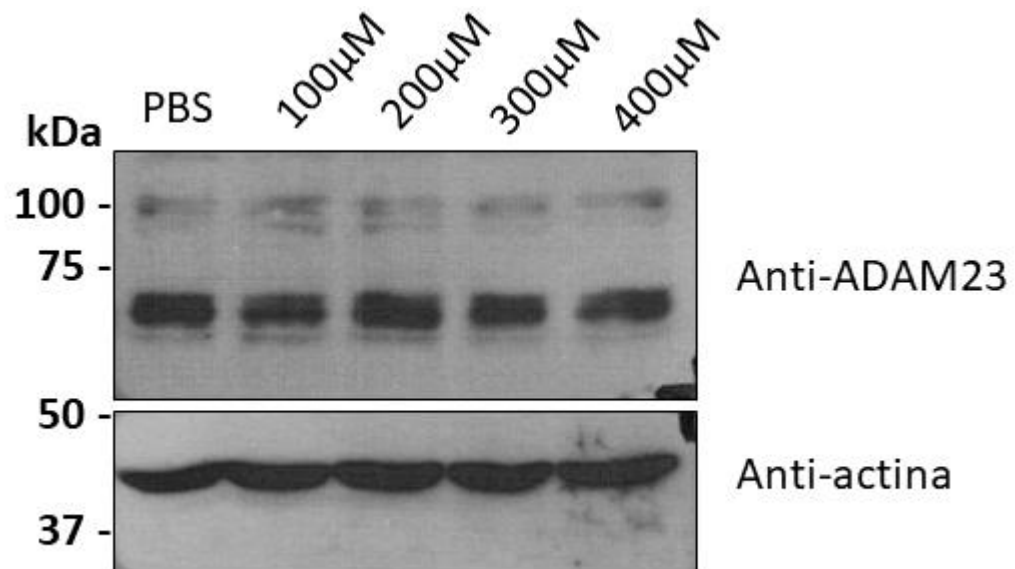


Nota: As células mantidas em 1% de SFB foram expostas a 50 μ M de H₂O₂ por 24, 48 e 72 horas. A reação foi feita utilizando anti-ADAM23 e anti-actina como normalizador. *Western blot* representativo de 2 experimentos independentes.

Para avaliar se concentrações maiores de H₂O₂ poderiam alterar a expressão de ADAM23, foram realizados experimentos nos quais a linhagem Neuro2a foi tratada por 48h com as seguintes concentrações de H₂O₂: 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M e 400 μ M.

Como mostrado na figura 10, não foi possível observar alterações no perfil de expressão de ADAM23^{100kDa} ou ADAM^{70kDa} em células tratadas com diferentes concentrações de H₂O₂.

Figura 10. Expressão de ADAM23 em Neuro2a em diferentes concentrações de H_2O_2



Nota: As células foram tratadas com diferentes concentrações de H_2O_2 por 48 horas. A reação foi feita utilizando anti-ADAM23 e anti-actina como normalizador. *Western blot* representativo de 2 ensaios independentes.

6. Discussão

ADAM23 é uma glicoproteína pertencente à família ADAM, expressa predominantemente no sistema nervoso central e periférico. Ao longo dos anos tem sido demonstrado a importância desta proteína durante o desenvolvimento neural. Mitchell e colaboradores (2001) mostraram que camundongos nocaute para o gene *Adam23* desenvolvem tremores e ataxia e acabam morrendo em até duas semanas. Logo em seguida foi descrito dois novos transcritos de ADAM23, denominados *Adam23 β* e *Adam23 γ* sendo este último expresso apenas durante a fase embrionária e desaparecendo após o nascimento, sugerindo que esta proteína possua algum papel no desenvolvimento do sistema nervoso central (SUN, 2004). O mesmo grupo mostrou que o silenciamento de ADAM23 na linhagem de carcinoma embrionário (P19) induz a diferenciação em células neuroectodérmicas, enquanto que a presença de ADAM23 suprime a diferenciação pela inibição de P27KIP1 pelo domínio desintegrina (SUN et al., 2007; WANG et al., 2012). Em contrapartida, Owuor e colaboradores (2009) demonstraram que cultura primária de neurônios provenientes de camundongos ADAM23^{-/-} apresentam arborização dendrítica reduzida e impedem a formação de neuritos induzidos por LGI1, processos esses essenciais para a diferenciação neural. Recentemente foi descrito que a superexpressão de ADAM23 em células progenitoras neurais humanas (hNPCs) induz o crescimento de neuritos, enquanto que o silenciamento nestas células desencadeia apoptose e inibe a diferenciação (MARKUS-KOCH et al., 2017). Esses dados indicam que ADAM23 possui importante papel durante a diferenciação neural com mecanismos de ação que ainda não estão bem elucidados, assim necessitando de mais estudos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de expressão de ADAM23 em modelos clássicos de diferenciação neural. Para fazer esta análise foi necessário o uso de anticorpo que reconheça a proteína ADAM23 em ensaios de *western blot*. Sendo assim, o monoclonal anti-ADAM23 produzido no laboratório de neurobiologia da UFPR. Devido ao fato de o grupo não ter trabalhos publicados com a descrição do anticorpo até o início deste projeto, foi necessário à validação do anticorpo nas condições experimentais que seriam usadas ao longo deste trabalho. Conforme mostra a figura 2, o anticorpo monoclonal anti –ADAM23 (DL11C8) reconheceu especificamente a proteína

ADAM23 tanto sua forma processada (70kDa) como sua forma não processada (100kDa) presente no encéfalo. Em HEK 293T transfectada com pcDNA3.1 ADAM23-HA, o anticorpo reconheceu apenas a proteína ADAM23^{100kDa}, provavelmente devido ao processamento do pró-domínio desempenhado pela célula não acompanhar a superexpressão da proteína.

Em seguida foi avaliado a expressão de ADAM23 nas linhagens celulares disponíveis, SH-SY5Y (neuroblastoma humano), Neuro2a (neuroblastoma murino), T98G (glioblastoma humano) e PC-12 (feocromotocoma de rato). A figura 3 mostrou que todas as linhagens expressam ADAM23, porém em diferentes quantidades. Este resultado corrobora com outros autores que haviam descrito a expressão de ADAM23 em SH-SY5Y, Neuro2a e em células da glia (COSTA et al., 2009; DHAUNCHAK et al, 2010). Interessantemente foi observado diferença entre as linhagens de neuroblastoma humano e murino. Esta diferença de ADAM23 observada entre as linhagens de neuroblastoma pode ser justificada pelo fato de que a linhagem SH-SY5Y derivada da linhagem SK-N-SH (ATCC HTB-11), a qual foi estabelecida a partir de células metastáticas, enquanto que a linhagem Neuro2a que apresenta maior expressão de ADAM23 não possuem características metastáticas (BIEDLER, 1973; ROSS, 1975). Verbisck e colaboradores (2009) mostraram que o silenciamento do gene *adam23* por hipermetilação do promotor está associado com alto índice de metástase em pacientes com tumor de mama.

Para averiguar se ADAM23 participa do processo de diferenciação neuronal, foram usados dois modelos experimentais. Como primeiro modelo foi usado a linhagem de PC-12 tratada com fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF). BDNF é membro da família de neurotrofinas, é uma molécula importante na manutenção e desenvolvimento do sistema nervoso e tem mostrado atuar na sobrevivência e diferenciação de diversas classes de neurônios *in vitro*, incluindo células da crista neural (AHMED et al., 1995; HUANG; REICHARDT, 2001; WATERHOUSE et al., 2012). PC-12 tratada com fator de crescimento de nervo (NGF) é usado como modelo clássico para diferenciação (CHEN, 2012; NAKAFUKU, 1992; RYU, 2015). NGF e BDNF são proteínas pertencentes à mesma família de neurotrofinas, apesar de BDNF ainda não ter sido descrito promover diferenciação em PC-12, esta molécula é uma neurotrofina usada para promover diferenciação neuronal tanto em linhagens celulares como em células de cultivo primário

(AHMED, 1995; IGLESIAS, 2000; LOUHIVOURI, 2011; RUMAJOGEE, 2002; WATERHOUSE et al., 2012). Gupta e colaboradores (2014) e Jiang e colaboradores (2015) observaram que o BDNF altera vias de sinalizações intracelulares em células PC-12, indicando a presença do receptor desta neurotrofina nesta linhagem. Visto que BDNF foi descrito alterando vias de sinalizações intracelulares em PC-12 e pelo fato de o grupo ter essa neurotrofina disponível, optou-se pelo uso desta molécula como neurotrofina sinalizadora.

Células PC-12 tratadas com BDNF (Figura 4) não apresentaram alterações no perfil de expressão de ADAM23. Para verificar se o BDNF promovia a diferenciação nesta linhagem, duas proteínas marcadoras de neurônios diferenciados foram analisadas. A proteína sinaptofisina que é uma glicoproteína das vesículas sinápticas presentes em neurônios maduros e comumente utilizado como biomarcador (GINGRAS, 2007; WEN, 2010). A proteína PrP^c foi utilizado como segundo marcador, células PC-12 induzidas a diferenciação por NGF, neurotrofina da mesma família que BDNF, apresenta aumento da expressão de PrP^c (GRANER et al., 2000; ZAWLIK et al., 2006). Todavia não houve diferença na expressão destes marcadores entre o grupo tratado com BDNF e o grupo controle (com redução de soro fetal bovino sem BDNF). Estes resultados sugerem que talvez PC-12 não seja suscetível a indução à diferenciação por BDNF como demonstrado em outras linhagens, o que corrobora com alguns autores que descrevem a ausência do principal receptor (TrkB) nesta linhagem, contradizendo autores citados anteriormente (OGURA, 2014; SHIH, 2013). No entanto, a redução do soro na linhagem PC-12 aumentou a expressão de ambos marcadores quando comparado com o controle mantido em 10% de SFB. Este aumento também mostrou ser dependente do tempo em que a célula era mantida com redução do soro (gráfico 1). Recentemente Hu e colaboradores (2018) mostraram que o uso de diferentes meios de cultivo celular e ou variações nos níveis de soro fetal em PC-12 já é o suficiente para observar alterações no crescimento de neuritos, explicando assim o aumento destas duas proteínas quando o soro fetal foi reduzido a 1%.

Para verificar se apenas a redução do soro é o suficiente para aumentar a expressão do marcador de neurônio maduro sinaptofisina, foi realizado um ensaio de diferenciação em PC-12 utilizando NGF (figura 5), neurotrofina clássica usada como

modelo de diferenciação nesta linhagem (DAS et al., 2004). Assim como no ensaio utilizando BDNF o aumento detectado do marcador foi independente do tratamento, seja BDNF ou NGF. Indicando que apenas a redução de soro fetal bovino é o suficiente para induzir o aumento de marcadores de neurônio maduro sem a necessidade de uso de fatores neurotrófico.

Como segundo modelo foram usadas as linhagens de neuroblastomas (Neuro2a e SH-SY5Y) tratadas com all-trans ácido retinóico (atAR). Neuroblastomas estimulados com atAR tem sido bem descrito como um modelo de diferenciação neuronal, resultando na inibição da proliferação e indução a diferenciação, adquirindo características de neurônio maduro (CHEUNG et al., 2009; EDSJÖ et al., 2007; MORI et al., 2013). Assim, as linhagens SH-SY5Y e Neuro2a foram tratadas com atAR (Figura 6, 7). Apesar da linhagem humana ser a mais usada como modelo para diferenciação neuronal (XIE, 2010), esta linhagem apresentou problemas para a visualização de ADAM23 pela técnica de *western blot*, o que acabou por dificultar as quantificações das bandas. Devido a este fato, os demais ensaios foram realizados com a linhagem de neuroblastoma murino Neuro2a, já que ensaios de *western blot* utilizando extrato desta linhagem quase não apresentava reação de fundo, assim facilitando sua quantificação.

A linhagem Neuro2A não apresentou diferença na detecção nos níveis de ADAM23 em sua forma madura (70 kDa), entretanto, houve aumento na detecção de sua forma não processada (100 kDa) (gráfico 2) quando as células eram mantidas a 1%SFB, independente do tratamento com all-trans ácido retinóico, indicando um aumento na expressão de ADAM23.

Para continuidade dos experimentos optou-se pelo uso de outra molécula indutora de diferenciação. All-trans retinal (atRL) ou Retinal, é um composto com grupamento aldeído, precursor de retinóides ativos, intracelularmente o retinal é convertido em all-trans ácido retinóico (atRA) que se liga á receptores nucleares (RARs; RXRs), estes receptores atuam no núcleo como fatores de transcrição para diversos genes (KAM et al., 2013). O atRL tem sido descrito promovendo diferenciação em linhagem de células de leucemia promielocítica (HL-60) (RUSSO, 2002).

A linhagem Neuro2a foi então tratada com atRL, para este ensaio optou-se pelo uso de atRL na concentração de 2 μ M devido a sua citotoxicidade (gráfico 3). Neuro2a já

foi descrita em protocolos utilizando 2 μ M de ácido retinóico para induzir a diferenciação nesta linhagem (MORI et al., 2013). As células de neuroblastoma murino expostas ao atRAL (Figura 8, gráfico 4) não apresentaram alteração na detecção de ADAM23 em sua forma madura (70kDa), contudo houve aumento de detecção da forma não processada (100kDa) independente do tratamento, corroborando com os ensaios nos quais foi usado all-trans ácido retinóico. Para atestar se o tratamento com retinal levou a alteração em vias de sinalização e possivelmente levando ao processo de diferenciação nesta linhagem foi verificado a presença de ERK fosforilada. Esta análise mostrou que os grupos tratados apresentavam um nível maior de fosforilação em relação ao controle. Aumento da fosforilação de ERK em Neuro2a tem sido descrita essencial para o processo de neuritogênese, sendo que a inibição desta via inibe também a diferenciação das células, indicando que as células tratadas com atRL estariam em processo de diferenciação (SINGLETON, 2000). Entretanto, foi possível observar que a retirada do soro levou a um aumento na fosforilação de ERK em relação ao controle mantido em 10% SFB. Redução nos níveis de soro fetal bovino já foi correlacionado positivamente com a diferenciação em Neuro2a pela sinalização via ERK, mostrando que as lipoproteínas presentes no soro podem atuar como inibidores parciais da diferenciação em Neuro2a (EVANGELOPOULOS et al., 2005).

Sendo assim, é possível que apenas a diferenciação desencadeada pela redução de soro fetal bovino foi suficiente para aumentar a expressão de ADAM23^{100kDa}, indicando que esta proteína possa estar envolvida neste processo. Este dado se torna relevante visto que outros autores já descreveram a presença de ADAM23^{100kDa} na superfície celular, sugerindo que o processamento do pró-domínio de ADAM23 possa ocorrer após o tráfego da proteína pela via biossintética secretora (BORGONOVO et al., 2018; GOLDSMITH et al., 2004).

Os resultados apresentados aqui demonstram que a privação de soro leva ao aumento da expressão proteína ADAM23. Esta alteração no perfil de expressão da proteína na sua forma não processada foi independente do tratamento com atAR ou atRL, sendo que apenas a redução do soro fetal bovino foi suficiente para induzir esse aumento observado. Estes dados corroboram com resultados de Pan e colaboradores (2010), no qual foi mostrado que a retirada do soro fetal bovino aumenta a acessibilidade a

cromatina ajudando a expor o sítio de ligação do promotor SP1 que recruta RNA polimerase II, o qual resulta no aumento endógeno da transcrição do gene *adam23*.

Outra possibilidade é o fato de a redução de soro promover efeitos de estresse oxidativo, soro fetal bovino é um complexo natural de proteínas e metabólicos, entre eles moléculas antioxidantes que auxiliam a célula. Este fato torna-se mais relevante em células de origem nervosa visto que neurônios possuem baixos níveis de antioxidantes endógenos e altos índices atividade metabólica oxidativa (GHORBANI et al., 2015). Proteínas de superfície de membrana como PrP^c e NCAM já demonstraram possuir papel neuroprotetivo contra estresse oxidativo (FUJITA-HAMABE; TOKUYAMA, 2012; ZENG; ZOU; WANG, 2015;).

Para investigar se ADAM23 está envolvida com a neuroproteção de células, a linhagem Neuro2a foi exposta ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂), modelo clássico já descrito por causar aumento das espécies reativas de oxigênio (MACZUREK et al., 2013). As células foram expostas a concentração de 50 µM por diferentes tempos (24h, 48h e 72h) (Figura 9) ou diferentes concentrações por 48 horas (Figura 10). Em ambos os ensaios não houve alteração na expressão de ADAM23. Estes resultados indicam que o aumento de ADAM23 a longo prazo causado pela redução do soro talvez não seja devido ao estresse oxidativo.

Os dados coletados neste trabalho mostram que ADAM23 alterou sua expressão em um dos modelos utilizados para diferenciação neuronal, entretanto esta alteração foi resultado da redução dos níveis de soro fetal bovino e não do agente usado para induzir a diferenciação. Sendo assim, foi possível observar que apenas a sinalização induzida pela redução do soro fetal bovino é o suficiente para desencadear o aumento da forma imatura de ADAM23, indicando um papel desta proteína nos estágios iniciais de diferenciação desencadeado pela redução do soro.

Os estágios iniciais do processo de diferenciação neuronal envolvem modificações da membrana, formação de neuritos e remodelação do citoesqueleto, ADAM23 já foi descrita por alterar membrana de neuroblastoma induzindo a formação de protusões e alterando os filamentos de actina destas células (CAL et al., 2000; SILVA; DOTTI 2002). Markus-Koch e colaboradores (2017) também mostraram que células precursoras nervosas humanas que superexpressam ADAM23 possuíam maiores formações de

neuritos, enquanto que as células silenciadas para *adam23* inibiam a formação dos mesmos, sugerindo um possível papel desta proteína neste estágio inicial de diferenciação.

Outra possibilidade é o envolvimento de ADAM23 nos estágios finais de diferenciação que consiste no estabelecimento de conexões sinápticas. Owuor e colaboradores (2009) mostraram que os animais nocaute para *adam23* não apresentavam má formação tecidual, indicando que ADAM23 pode não estar envolvida no desenvolvimento, mas sim na manutenção do sistema nervoso. Esta hipótese ganha força, visto que LGI1 um dos parceiros moleculares de ADAM23 e de ADAM22 é descrito como um ligante antiepileptogênico capaz de regular a transmissão sináptica mediada por receptores de glutamato (AMPA), sugerindo que ADAM23 junto com ADAM22 e LGI1 formem um complexo proteico essencial para regulação da transmissão sináptica (FUKATA; FUKATA, 2017; LOVERO et al., 2015)

Os dados coletados neste trabalho indicam um possível papel da ADAM23 durante a diferenciação neuronal, entretanto esse papel ainda precisa ser melhor investigado. Assim, o grupo dará continuidade a estas investigações com o intuito de identificar o papel desta proteína já descrita como essencial para o desenvolvimento ou manutenção neuronal.

7. Conclusão

- ✓ Anticorpo monoclonal (DL11C8) anti-ADAM23 reconheceu com especificidade a forma não processada (100 kDa) e processada (70 kDa) da proteína ADAM23 tanto em encéfalo na linhagem que superexpressa ADAM23.
- ✓ Foi observado que todas as linhagens celulares utilizadas no trabalho (SHSY-5Y; Neuro2a; T98G; PC-12) expressavam ADAM23 tanto em sua forma não processada (100 kDa) como processada (70 kDa).
- ✓ Células PC-12 tratadas com BDNF não apresentou alteração na expressão de ADAM23.
- ✓ A redução de soro fetal bovino em PC-12 levou a um aumento na expressão de sinaptofisina e PrP^C.
- ✓ A redução do soro fetal bovino em Neuro2a resultou no aumento na expressão de ADAM23 em sua forma não processada (100 kDa).
- ✓ Ensaio de estresse oxidativo utilizando H₂O₂ em Neuro2a não apresentaram nenhuma alteração na expressão de ADAM23.

8. Referências Bibliográficas

- AHMED, S.; REYNOLDS, B. A.; WEISS, S. BDNF Enhances the Differentiation but Not the Survival of CNS Stem Cell-Derived Neuronal Precursors. **The Journal of Neuroscience**. v. 15, n. 8, p. 5765-5778, 1995
- ALFANDARI, D.; COUSIN, H.; GAULTIER, A.; SMITH, K.; WHITE, J.M.; DARRIBÉRE, T.; SIMONE, D.W. Xenopus ADAM13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. **Current Biology**. v. 11, p. 918-930, 2001.
- ANDERS, A.; GILBERT, S.; GARTEN, W.; POSTINA, R.; FAHRENHOLTZ, F. regulation of the α secretase ADAM10 its prodomain and proprotein convertase. **FASEB Journal**. v. 15, p. 1837-1839, 2001.
- BAX, D.V.; MESSENT, A.J.; TART, J.; HOANG, M.VAN; KOTT, J.; MACIEWICZ, R.A.; HUMPHRIES, J. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ and ADAM17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 22377-86, 2004.
- BIEDLER, J. L.; HELSON, L.; SPENGLES, B. A. Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. **Cancer Research**. v. 33, p. 2643-2652, 1973
- BLACK, R. A.; RAUCH, C. T.; KOZLOSKY, C. J.; PESCHON, J. J.; SLACK, J. L.; WOLFSON, M. F.; CASTNER, B. J.; STOCKING, K. L.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K. A.; GERHART, M.; DAVIS, R.; FITZNER, J. N.; JOHNSON, R. S.; PAXTON, R. J.; MARCH, C. J.; CERRETTI, D. P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. **Nature**, v. 385, n. 6618, p. 729-733, 1997.
- BLACK, R.; WHITE, J. ADAMs: focus on the protease domain. **Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 654-659, 1998.
- 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
- CAL, S.; FREIJE, J.M.P.; LÓPEZ, J.M.; TAKADA, Y.; LÓPEZ-OTÍN, C. ADAM23/ MDC3, a Human Disintegrin that Promotes Cell Adhesion via Interaction with the $\alpha v \beta 3$ Integrin through an RGD-independent Mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 1457-1469, 2000.
- CALMON, M. F., COLOMBO, J., CARVALHO, F., SOUZA, F. P., FILHO, J. F., FUKUYAMA, É. E., CAMARGO, A. A., CABALLERO, O. L., TAJARA, E. H., CORDEIRO, J. A. E RAHAL, P. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 173, n. 1, p. 31-37, 2007
- CAO, Y.; KANG, Q.; ZHAO, Z.; ZOLKIEWSKA, A. Intracellular Processing of Metalloprotease Disintegrin ADAM12. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 29, p. 26403-26411, 2002.
- CHANTRY, A.; GREGSON, N. A.; GLYNN, P.; A Novel Metalloproteinase Associated with Brain Myelin Membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 36, p. 21603-21607, 1989.
- CHEN, H.; SAMPSON, N. Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg $\alpha 6 \beta 1$ integrin is the receptor for sperm fertilin β . **Chemistry & Biology**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 1999.
- CHEN, L.; HOLMAN, H. N.; HAO, Z.; BECHTEL, H. A.; MARTIN, M. C.; WU, C.; CHU, S. Synchrotron Infrared Measurements of Protein Phosphorylation in Living Single PC12 Cells during Neuronal Differentiation. **Analytical Chemistry**. v. 84, p. 4118-4125, 2012.

CHEN, S.; MANGÉ, A.; DONG, L.; LEHMANN, S.; SCHACHNER, M. Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v. 22, p. 227-233, 2003.

CHEUNG, Y.; LAU, W. K.; YU, M.; LAI, C. S.; YEUNG, S.; SO, K.; CHANG, R. C. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. **NeuroToxicology**, v. 30, p. 127-135, 2009.

CHOI, J., KIM, K., JEON, Y., KIM, S., JANG, S., KU, J. E PARK, J. Promoter hypermethylation of the ADAM23 gene in colorectal cancer cell lines and cancer tissues. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 6, p. 1258-1262, 2009.

COSTA, F.F.; VERBISCK, N.V.; SALIM, A.C.; IERARDI, D.F.; PIRES, L.C.; SASAHARA, R.M.; SOGAYAR, M.C.; ZANATA, S.M.; MACKAY, A.; O'HARE, M.; SOARES, F.; SIMPSON, A.J.; CAMARGO, A.A. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23, p. 1481-1488, 2004.

COSTA, F. F., COLIN, C., SHINJO, S. M., ZANATA, S. M., MARIE, S. K., SOGAYAR, M. C. E CAMARGO, A. A. ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. **Neuroscience Letters**, v. 380, n. 3, p. 260-264, 2005.

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**. v. 461, p. 16-20, 2009.

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.

DHAUNCHAK, A. S.; HUANG, J. K.; JUNIOR, O. F.; ROTH, A. D.; PEDRAZA, L.; ANTEL, J. P.; BAR-OR, A.; COLMAN, D. R. A Proteoma Map of Axoglial Specialization Isolated and Purified from Human Central Nervous System. **Glia**. v. 58, p. 1949-1960, 2010.

EDJSÖ, A.; HOLMQUIST, L.; PÅHLMAN, S. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. **Seminars in Cancer Biology**. v.17, p. 248-256, 2007.

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

ELIZONDO, D. M.; ANDARGIE, T. E.; MARSHALL, K. M.; ZARIWALA, A. M.; LIPSCOMB, M. W. Dendritic cell expression of ADAM23 governs T cell proliferation and cytokine production through the avb3 integrin receptor. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 100, n. 855- 864, 2016

EVANGELOPOULOS, M. E.; WEIS, J.; KRÜTTGEN, A. Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation of EGFR. **Oncogene**. v. 24, p. 3309-3318, 2005.

ETO, K.; HUET, C.; TARUI, T.; KUPRIYANOV, S.; LIU, H.Z.; PUZON-MCLAUGHLIN, W.; ZHANG, X.P.; SHEPPARD, D.; ENGVALL, E.; TAKADA, Y. Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9 beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 17804-17810, 2002.

ETO, K.; PUZON-Mc LAUGHLIN, W.; SHEPPARD, D.; SEHARA-FUJISAWA, A.; ZHANG, X.; TAKADA, Y. RGD-independent binding of integrin $\alpha 9 \beta 1$ to the ADAM12 and 15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 34922-30, 2000.

- FUKATA, Y.; FUKATA, M. Epilepsy and synaptic proteins. **Current Opinion in Neurobiology**, V. 45, 2017
- FUJITA-HAMABE, W.; TOKUYAMA, S. The Involvement of Cleavage of Neural Cell Adhesion Molecule in Neuronal Death under Oxidative Stress Conditions in Cultured Cortical Neurons. **Biol. Pharm. Bull.** v. 35, n. 4, p. 624-628, 2012.
- GAULTIER, A.; COUSIN, H.; DARRIBERE, T.; ALFANDARI, D. ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 23336-23344, 2002.
- GIEBELER, N.; ZIGRINO, P. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. **Toxins**, v. 8, n. 5, p. 122, 2016.
- GINGRAS, M.; CHAMPIGNY, M.; BERTHOD, F. Differentiation of Human Adult Skin-Derived Neuronal Precursors into Mature Neurons. **Journal of Cellular Physiology**. v. 210, p. 498-506, 2007.
- GHILARDI, C.; CHIORINO, G.; DOSSI, R.; NAGY, Z.; GIAVAZZI, R.; BANI, M.R. Identification of novel vascular markers through gene expression profiling of tumor-derived endothelium. **BMC Genomics**. v. 9, n. 201, 2008.
- GHORBANI, A.; SADEGHNIA, H. R.; ASADPOUR, E. Mechanism of protective effect of lettuce against glucose/serum deprivation-induced neurotoxicity. **Nutritional Neuroscience**. v. 18, n. 3, p. 103-109, 2015.
- 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, p. 647-658, 2004.
- GOMIS-RÜTH, F.X. Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. **Molecular Biotechnology**. v. 24, p.157-202, 2003.
- GRANER, E.; MERCADANTE, A. F.; ZANATA, S. M.; FORLENZA, O. V.; CABRAL, A. L. B.; VEIGA, S. S.; JULIANO, M. A.; ROESLER, R.; WALZ, R.; MINETTI, A.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V. R.; BRENTANI, R. R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Molecular brain research**. v. 76, p. 85-92, 2000.
- GUPTA, V.; CHITRANSHI, N.; YOU, Y.; GUPTA, V.; KLITORNER, A.; GRAHAM, S. Brain derived neurotrophic factor is involved in the regulation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 454, p. 381-386, 2014.
- HOWARD, L.; LU, X.; MITCHELL, S.; GRIFFITHS, S.; GLYNN, P. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. **Biochemistry Journal**, v. 317, p.45-50, 1996.
- 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.
- HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. NEUROTROPHINS: Roles in Neuronal Development and Function. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 24, p. 677-736, 2001.
- IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B.; FRÖHLICH, C.; LOECHEL, F.; ZOLKIEWSKA, A.; ISHIGURO, K.; TETSUHITO, K.; LIU, W.; LANGFORD, J.K.; SANDERSON, R.D. The Cysteine-rich Domain of Human ADAM 12 Supports Cell Adhesion Through Syndecans and Triggers Signaling Events that Lead to β 1 Integrin-dependent Cell Spreading. **The Journal of Cell Biology**. v. 149, p. 1143-1155, 2000.

IGLESIAS, M. E.; LIU, Y.; WANG, H.; MUHAISEN, A.; CEÑA, V.; GALLEGU, C.; COMELLA, J. X. Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. **Journal of Neurochemistry**. v. 75, n. 3, p. 991-1003, 2000.

JIANG, J.; ZHOU, C.; GAO, S.; TIAN, Y.; WANG, C.; WANG, L.; GU, H.; TANG, X. BDNF-TrkB Pathway Mediates Neuroprotection of Hydrogen Sulfide against Formaldehyde-Induced Toxicity to PC12 Cells. **PLoS ONE**. v. 10, n. 3, 2015.

KAM, R. K. T.; SHI, W.; CHAN, S. O.; CHEN, Y.; XU, G.; LAU, C. B.; FUNG, K. P.; CHAN, W. Y.; ZHAO, H. Dhfr3 Protein Attenuates Retinoic Acid Signaling and Is required for Early Embryonic Patterning. **The Journal of biological chemistry**. v. 288, n. 44, p. 31477-31487, 2013.

KÄRKKÄINEN, L.; RYBNIKOVA, E.; PELTO-HUIKKO, M.; HUOVILA, A.P. Metalloprotease-Disintegrin (ADAM) Genes are Widely and Differentially Expressed in the Adult CNS. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v. 15, p. 547-560, 2000.

KIM, H. A., PARK, W., JEONG, H., LEE, H., LEE, S. H., KWON, N. S., BAEK, K. J., KIM, D. E YUN, H. Leucine-rich glioma inactivated 3 regulates adipogenesis through ADAM23. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1821, n. 6, p. 914-922, 2012.

KLEIN, T. BISCHOFF, R. Active Metalloproteases of the A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) Family: Biological Function and Structure. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 1, p. 17-33, 2011.

KLUEG, K. M.; PARODY, T.R.; MUSKAVITCH, M.A.T. Complex Proteolytic Processing Acts on Delta, a Transmembrane Ligand for Notch, during *Drosophila* Development. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, p. 1709-1723, 1998.

LEE, S. B.; KIM, J. J.; KIM, T. W.; KIM, B. S.; LEE, M.; YOO, Y. D. Serum deprivation-induced reactive oxygen species production is mediated by Romo1. **Apoptosis**. v. 15, p. 204-218, 2010.

LEIGHTON, P. A., MITCHELL, K. J., GOODRICH, L. V., LU, X., PINSON, K., SCHERZ, P., SKARNES, W. C. E TESSIER-LAVIGNE, M. Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature*, v. 410, n. 6825, p. 174-179, 2001.

LOUHIVUORI, V.; VICARIO, A.; UUTELA, M.; RANTAMÄKI, T.; LOUHIVUORI, L. M.; CASTRÉN, E.; TONGIORGI, E.; ÅKERMAN, K. E.; CASTRÉN, M. L. BDNF and TrkB in neuronal differentiation of *Fmr1*-knockout mouse. **Neurobiology of Disease**. v. 41, p. 469-480, 2011.

LOVERO, K. L.; FUKATA, Y.; GRANGER, A. J.; FUKATA, M.; NICOLL, R. A. The LGI1-ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.112, n. 30, p. E4129-E417, 2015.

MACZUREK, A. E.; WILD, R.; LAURENTI, D.; STEELE, M. L.; OOI, L.; MÜNCH, G. Generation of hydrogen peroxide-resistant murine neuroblastoma cells: a target discovery platform for novel neuroprotective genes. **Journal of Neural Transmission**. v. 120, n. 8, p 1171-1178, 2013.

MASKOS, K.; FERNANDEZ-CATALAN, C.; HUBER, R.; BOURENKOV, G.P.; BARTUNIK, H.; ELLESTAD, G.A.; REDDY, P.; WOLFSON M.F.; RAUCH, C.T.; CASTNER, B.J.; DAVIS, R.; CLARKE, H.R.G.; PETERSEN, M.; FITZNER, J.N.; CERRETTI D.P.; MARCH, C.J.; PAXTON, R.J.; BLACK, R.A.; BODE, W. Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- α -converting enzyme. **The National Academy of Sciences**. v. 95, p. 3408-3412, 1998.

MARKUS-KOCH, A.; SCHMITT, O.; SEEMANN, S.; LUKAS, J.; KOCZAN, D.; ERNST, M.; FUELLEN, G.; WREE, A.; ROLFS A.; LUO, J. ADAM23 promotes neuronal differentiation of human neural progenitor cells. **Cellular & Molecular Biology Letters**. v. 22, n. 16, 2017

MILLA, M. E.; LEESNITZER, M. A.; MOSS, M. L. Specific sequence elements are required for expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, p.30563-30570, 1999.

MITCHELL, K.J.; PINSON, K.I.; KELLY, O.G.; BRENNAN, J.; ZUPICICH, J.; SCHERTZ, P.; LEIGHTON, P.A.; GOODRICH, L.V.; LU, X.; AVERY, B.J.; TATE, P.; DILL, K.; PANGILINAN, E.; WAKENIGHT, P.; TESSIER-LAVIGNE, M. SKARNES, W.C. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nature Genetics**. v. 28, p. 241-249, 2001.

MORI, Y.; MATSUI, T.; OMOTE, D.; FUKUDA, M. Small GTPase Rab39A interacts with UACA and regulates the retinoic acid-induced neurite morphology of Neuro2A cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 435, p. 113-119, 2013.

MOSS, M., JIN, S., BECHERER, J., BICKETT, D., BURKHART, W., CHEN, W., HASSLER, D., LEESNITZER, M., MCGEEHAN, G., MILLA, M., MOYER, M., ROCQUE, W., SEATON, T., SCHOENEN, F., WARNER, J. E WILLARD, D. Structural features and biochemical properties of TNF- α converting enzyme (TACE). **Journal of Neuroimmunology**, v. 72, n. 2, p. 127-129, 1997.

NAKAFUKU, M.; SATOH, T.; KAZIRO, Y. Differentiation Factors, Including Nerve Growth Factor, Fibroblast Growth Factor, and Interleukin-6, Induce an Accumulation of an Active Ras-GTP Complex in Rat Pheochromocytoma PC12 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 267, n. 27, p. 19448-19454, 1992.

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

OGURA, Y.; SATO, K.; KAWASHIMA, K.; KOBAYASHI, N.; IMURA, S.; FUJINO, K.; KAWAGUCHI, H.; NEDACHI, T. Subtoxic levels of hydrogen peroxide induce brain-derived neurotrophic factor expression to protect PC12 cells. **BioMed Central Research Notes**. v. 7, p. 840-848, 2014.

OTA, M., MOCHIZUKI, S., SHIMODA, M., ABE, H., MIYAMAE, Y., ISHII, K., KIMURA, H. E OKADA, Y. ADAM23 is downregulated in side population and suppresses lung metastasis of lung carcinoma cells. **Cancer Science**, v. 107, n. 4, p. 433-443, 2016.

OWUOR, K.; HAREL, N.Y.; ENGLLOT, 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.

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, p. 306-312, 2010.

PRIMAKOFF, P.; HYATT, H.; TREDICK-KLINE, J. Identification and Purification of a Sperm Surface Protein with a Potential Role in Sperm-Egg Membrane Fusin. **The Journal of Cell Biology**. v. 104, p. 141-149, 1987.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G.; The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genet**, v.16, p. 83-87, 2000.

REISS, K.; SAFTIG, P. The "A Disintegrin And Metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 2, p. 126-137, 2009.

ROSS, J.; OLMSTED, J. B.; ROSENBAUM, J. L. The Ultrastructure of Mouse Neuroblastoma Cells in Tissue Culture. **Tissue & Cell**. V. 7, N. 1, P. 107-137, 1975.

RUMAJOGEE, P.; MADEIRA, A.; VERGÉ, D.; HAMON, M.; MIQUEL, M. Up-regulation of the neuronal serotonergic phenotype in vitro: BDNF and cAMP share Trk B-dependent mechanisms. **Journal of Neurochemistry**. v. 83, p. 1525-1528, 2002.

RYU, H.; CHUNG, M.; DOBRZYNSKI, M.; FEY, D.; BLUM, Y.; LEE, S. S.; PETER, M.; KHOLODENKO, B. N.; JEON, N. L.; PERTZ, O. Frequency modulation of ERK activation dynamics rewires cell fate. **Molecular Systems Biology**, v.11, p. 838-852, 2015.

SAGANE, K.; HAYAKAWA, K.; KAI, J.; HIROHASHI, T.; TAKAHASHI, E.; MIYAMOTO, N.; INO, M.; OKI, T.; YAMAZAKI, K.; NAGASU, T. Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. **BMC Neuroscience**. v. 6, n. 1, 2004.

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

SAGANE, K.; ISHIHAMA, Y.; SUGIMOTO, H.; LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. **International Journal of Biological Sciences**. v. 4, n. 6, p. 387-396, 2008.

SCHLONDORFF, J.; BECHERER, J. D.; BLOBEL, C. P. Intracellular maturation and localization of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE). **Biochemistry Journal**. v. 347, p. 131-138, 2002
SEALS, D.F.; COURTNEIDGE, S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins functions. **Genes & Development**, v. 17, p. 7-30, 2003.

SHIH, C.; CHEN, C.; CHEN, L. New Function of Adaptor Protein SH2B1 in Brain-Derived Neurotrophic Factor-Induced Neurite Outgrowth. **PLoS ONE**. v. 8, n. 11, 2013.

SILVA, J. S.; DOTTI, C. G. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis **Nature Reviews Neuroscience**, v.3, n.9, p. 694-704, 2002.

SINGLETON, D. W.; LU C. L.; COLELLA, R.; ROISEN, F. J. Promotion of neurite outgrowth by protein kinase inhibitors and ganglioside GM1 in neuroblastoma cells involves MAP kinase ERK1/2. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v. 18, p. 797-805, 2000.

STONE, A.L.; KROEGER, M.; SANG, Q.X. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins. **J Protein Chem**. 1999 v. 18, n. 4, p.447-465, 1999.

SUN, Y.P.; DENG, K.J.; WANG, F.; ZHANG, J.; HUANG, X.; QIAO, S.; ZHAO, S. 2004). Two novel isoforms of ADAM23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. **Gene: An International Journal on Genes and Genomes**. v. 325, p. 171-178, 2004.

SUN, Y.; WANG, Y.; ZHANG, J.; TAO, J.; WANG, C.; JING, N.; WU, C.; DENG, K.; QIAO, S. ADAM23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. **Neurochemical Research**. v. 32 (7), p. 1217-1223, 2007.

TAKADA, H.; IMOTO, I.; TSUDA, H.; NAKANISHI, Y.; ICHIKURA, T.; MOCHIZUKI, H.; MITSUFUJI, S.; HOSODA, F.; HIROHASHI, S.; OHKI, M.; INAZAWA, J. ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. **Oncogene**. v. 24, p. 8051-8060, 2005.

TAKAHASHI, E.; SAGANE, K.; K.; NAGASU, T.; KUROMITSU, J. Altered nociceptive response in ADAM11-deficient mice. **Brain Research**. v. 1097, p. 39-42, 2006.

TAKEDA, S. ADAM and ADAMTS Family Proteins and Snake Venom Metalloproteinases: A Structural Overview. **Toxins**, v. 8, n. 5, p. 155, 2016.

TAKEDA, S.; IGARASHI, T.; MORI, H.; ARAKI, S. Crystal structure of VAP-1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. **The EMBO Journal**. v. 25, p. 2388-2396, 2006.

VERBISCK, N.V.; COSTA, E.T.; COSTA, F.F.; CAVALHER, F.P.; COSTA, M.D.M.; MURAS, A.; PAIXÃO, V.A.; MOURA, R.; GRANATO, M.F.; IERARDI, D.F.; MACHADO, T.; MELO, F.; RIBEIRO, K.B.; CUNHA, I.W.; LIMA, W.C.C.; MACIEL, M.S.; CARVALHO, A.L.; SOARES, F. F.; ZANATA, S.M.; SOGAYAR, M.C.; CHAMMAS, R.; CAMARGO, A.A. ADAM23 negatively modulates $\alpha v \beta 3$ integrin activation during metastasis. **Cancer Research**. v. 69 (13), p. 5546-52, 2009.

WANG, Y.; SUN, Y.; QIAO, S. ADAM23 knockdown promotes neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells by up-regulating P27KIP1 expression. **Cell Biology International**, v. 36, p. 1275-1279, 2012.

WATERHOUSE, E. G.; AN, J. J.; OREFICE, L. L.; BAYDYUK, M; LIAO, G.; ZHENG, K.; LU, B.; XU, B. BDNF Promotes Differentiation and Maturation of Adult-born Neurons through GABAergic Transmission. **The Journal of Neuroscience**. v. 32, n. 41, p. 14318-14330, 2012.

WHITE, J.M. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 598-606, 2003.

WOLFSBERG, T.G.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G.; WHITE, J.M. ADAM, a Novel Family of Membrane Proteins Containing A Disintegrin And Metalloprotease Domain: Multipotential Functions in Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions. **The Journal of Cell Biology**. v. 131, p. 275-278, 1995.

WOLFSBERG, T.G.; BAZAN, J.J.; BLOBEL, C.P.; MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J.M. The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: Structural, functional and evolutionary implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 90, p. 10783-10787, 1993.

YAGAMI-HIROMASA, T.; SATO, T.; KURISAKI, T.; KAMIJO, K.; NABESHIMA, Y. E. FUJISAWA-SEHARA, A. A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. **Nature**, v. 377, n. 6550, p. 652-656, 1995.

YAMAGUCHI, R., MURO, Y., ISOTANI, A., TOKUHIRO, K., TAKUMI, K., ADHAM, I., IKAWA, M. E OKABE, M. Disruption of ADAM3 Impairs the Migration of Sperm into Oviduct in Mouse1. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 1, p. 142-146, 2009.

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.

XIE, H.; HU, L.; LI, G.; SH-SHY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chinese Medical Journal**. v. 123, n. 8, p. 1086-1092, 2010.

XU, J., MUKERJEE, S., SILVA-ALVES, C. R. A., CARVALHO-GALVÃO, A., CRUZ, J. C., BALARINI, C. M., BRAGA, V. A., LAZARTIGUES, E. E FRANÇA-SILVA, M. S. A Disintegrin and Metalloprotease 17 in the Cardiovascular and Central Nervous Systems. **Frontiers in Physiology**, v. 7, 2016.

ZAWLIK, I.; WITUSIK, M.; HULAS-BIGOSZEWSKA, K.; PIASKOWSKI, S.; SZYBKA, M.; GOLANSKA, E.; LIBERSKI, P. P.; RIESKE, P. Regulation of PrP^c expression: Nerve growth factor (NGF) activates the prion gene promoter through the MEK1 pathway in PC12 cells. **Neuroscience Letters**. v. 400, p. 58-62, 2006

ZENG, L.; ZOU, W.; WANG, G. Cellular prion protein (PrP^c) and its role in stress response. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**. v. 8, n. 5, p. 8042-8050, 2015.

ZHANG, X.P., KAMATA, T., YOKOYAMA, K., PUZON-MCLAUGHLIN, W., TAKADA, Y., Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin $\alpha v\beta 3$. **J. Biol. Chem.** v. 273, p.7345–7350, 1998.

ZHAO, Z.; GRUSZCZYNSKA-BIEGALA, J.; CHEUVRONT, T.; YI, H.; VON DER MARK, H.; VON DER MARK, K.; KAUFMAN, S.J.; ZOLKIEWSKA, A. Interaction of the disintegrin and cysteine-rich domains of ADAM12 with integrin $\alpha 7\beta 1$. **Experimental Cell Research.** v. 298, p. 28-37, 2004.