

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABÍOLA M. ZACHEU

**Efeito de Metilmercúrio em Células HeLa Transfectadas
com ADAM23**

**CURITIBA
2009**

FABÍOLA M. ZACHEU

**Efeito de Metilmercúrio em Células HeLa Transfectadas
com ADAM23**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração em Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA
2009

A Jesus, meu grande guia, onde obtenho
minha fé todos os dias.

Aos meus amados pais, com todo meu
respeito e admiração.

Ao meu marido, Dilmar por todo amor,
carinho e pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela proteção.

Aos meus pais, Nestor e Celina, verdadeiros exemplos de dedicação aos filhos, honestidade e caráter.

Ao meu marido, Dilmar, pelo amor, compreensão e dedicação. Com você minha vida é muito mais feliz.

Às minhas irmãs, Juliana e Raquel, grandes companheiras das alegrias e dificuldades.

Ao professor Sílvio Zanata, pela oportunidade de fazer parte dos alunos do seu laboratório, por sua confiança e amizade.

À minha grande professora e doutora Máisa Brigagão, grande responsável por tudo isto, exemplo de força, caráter e determinação para muitas mulheres.

À professora Adriana Mercadante, pela amizade.

Aos grandes amigos, agradecimento especial à Dani, Márcia, Fer e Silvinha, verdadeiros exemplos de amizade e cuja ajuda foi essencial à execução deste trabalho.

A todos os amigos e colegas que ainda estão no laboratório e que direta ou indiretamente ajudaram-me na realização deste projeto.

Ao Luís e à Michele, por todo conhecimento transmitido.

Aos amigos e colegas que passaram pelo Laboratório de Neurobiologia.

Aos professores do Departamento de Patologia Básica, pelos conhecimentos transmitidos.

A grande amiga que me ajudou nos momentos mais corridos: Dani.

A Capes - PROCAD, processo 0262056 pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A família das ADAMs (Domínios Desintegrina e Metaloprotease) compreende proteínas de superfície celular localizadas na membrana plasmática e que possuem diversas funções biológicas, as quais incluem interações célula-célula e célula-matriz além de atividade proteolítica. Membros desta família possuem uma organização estrutural que incluem os domínios metaloprotease, desintegrina, rico em cisteína, semelhante ao fator de crescimento epidermal, transmembrânico e citoplasmático. O objeto de estudo deste trabalho foi a proteína ADAM23, que está expressa em altos níveis no sistema nervoso central, tanto de embriões como adultos. Na ADAM23 o domínio metaloprotease encontra-se inativo sugerindo que participe em processos de adesão, modulando a atividade de integrinas. Camundongos nocauteados para o gene da ADAM23 apresentam defeitos neurológicos severos, corroborando com a indicação da importância desta proteína no desenvolvimento do cérebro normal. Já foi demonstrado na literatura que o metilmercúrio (MeHg), um potente e largamente distribuído contaminante ambiental, responsável por vários tipos de neuropatias, é capaz de ativar outros membros da família ADAM, particularmente aqueles que ativam a via de Notch. Uma vez que o MeHg está envolvido com modificações aberrantes no sistema nervoso por interferir na sinalização das moléculas responsáveis pelo desenvolvimento normal dos neurônios e ADAM23 é uma molécula abundantemente expressa pelos neurônios e está diretamente envolvida com o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso, hipotetizamos neste trabalho a possível participação de ADAM23 nos processos de toxicidade mediados pelo MeHg. Células eucarióticas (HeLa) expressando estavelmente ADAM23 ectópica foram produzidas e submetidas ao tratamento com MeHg por vinte e quatro horas. Os ensaios de adesão foram executados para verificar se estas células seriam influenciadas ou não no seu comportamento adesivo frente às proteínas de matriz extracelular (fibronectina e vitronectina) sob a influência MeHg. Não foi observada diferença significativa nos processos adesivos quando as células foram semeadas sobre fibronectina. Em contrapartida, quando foram semeadas sobre vitronectina, um dos clones expressando mais ADAM23 (clone 22) apresentou menor capacidade adesiva, antes mesmo do tratamento com MeHg, quando comparado com a linhagem selvagem. O tratamento com MeHg reduziu a capacidade adesiva, tanto das células selvagens como do clone 13, sobre vitronectina. A diferença nos fenômenos adesivos frente a diferentes substratos (vitronectina e fibronectina) na presença de ADAM23 sugere tanto a participação de ADAM23 no processo adesivo como a diferente escolha de receptores de ancoragem à matriz extracelular (*e.g.* integrinas). A diminuição na capacidade adesiva de células submetidas ao tratamento com MeHg apenas sobre vitronectina sugere que a interferência mediada pelo MeHg é específica para alguns tipos de componentes da matriz extracelular e seus respectivos receptores celulares.

Palavras-chave: ADAM 23. Metilmercúrio. Matriz extracelular

ABSTRACT

The ADAM proteins (A Disintegrin and Metalloprotease domains) are membrane cell surface molecules with several functions on cell/cell or cell/matrix interaction, having both adhesive and proteolytic properties. These proteins have a structural organization consisting of metalloprotease domain, disintegrin, cystein-rich, epidermal growth factor-like, transmembrane and cytoplasmatic domains. The ADAM23, which is predominantly expressed in the central nervous system, has no metalloprotease activity, suggesting that its adhesive function be mediated only by its disintegrin domain. ADAM23 has been related with development and maintenance of central nervous system, since *adam23* knock-out mice suffer of severe neurological defects and die 6-8 days after birth. It has been shown that methylmercury (MeHg), a potent and widespread environmental neurotoxin, is able to activate members of the ADAM family, particularly those involved in Notch receptor pathway activation. Since MeHg toxicity is involved with human deficits in neurological function, due to aberrant nervous system development, and ADAM23 is directly involved with the normal establishment of nervous system, here we hypothesized a possible role of ADAM23 in the toxicity mediated by MeHg. HeLa cells, ectopically expressing ADAM23, were treated with MeHg and the adhesion capacity of the cells was measured over different extracellular matrix components (fibronectin and vitronectin). We could not observe any effect when cells were plated over fibronectin. However, an overexpressing ADAM23 clone (22) showed a decreased adhesion over vitronectin, even in the absence of MeHg, when compared with the control, suggesting involvement of specific signals mediated by cell membrane receptors (*e.g.* integrins) and a preference for distinct extracellular matrix components. Furthermore, MeHg treatment reduced adhesion of both wild-type and clone 13 (overexpressing ADAM23) over vitronectin. Taken together, these results suggest that ADAM23 may interfere in MeHg toxicity altering the adhesive properties of the cells.

Key words: ADAM 23. Methylmercury. Extracellular Matrix.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	- micrograma
μL	- microlitro
μM	- micromolar
ADAM	- domínio desintegrina e metaloprotease
ANOVA	- análise de variância
BSA	- albumina sérica bovina
CO_2	- dióxido de Carbono
DAPI	- 4', 6-diaminidino-2-fenilindol
DMSO	- dimetilsulfóxido
EDTA	- etilenodiamino tetraacetato
EGF	- fator de crescimento epidermal
GTP	- guanosina trifosfato
HA	- hemaglutinina
HBSS	- solução salina balanceada de Hank
H_2O_2	- peróxido de hidrogênio
HCl	- ácido clorídrico
Hek	- rim embrionário humano
HeLa	- adenocarcinoma de cervix humano
HeLa wt	- adenocarcinoma de cervix humano tipo selvagem
HEPES	- ácido N-2 -hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
IgG	- imunoglobulina tipo G
kDA	- kilodalton
LN	- laminina
mA	- miliampere
MEC/ ECM	- matriz extracelular
MeHg	- metilmercúrio
MEM	- meio mínimo essencial
mg	- miligrama
ml	- mililitro
mM	- milimolar
MTT	- metiltiazolotetrazólio

NaCl	- cloreto de sódio
NaOH	- hidróxido de sódio
nm	- nanômetro
RGD	- arginina-glicina-aspartato
PBS	- solução salina tamponada com fosfato
PFA	- paraformaldeído
SDS	- dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	- soro fetal bovino
SNC	- sistema nervoso central
TBS-T	- solução salina de Tris com Tween 20
TEMED	- N,N,N,N tetrametil etilenodiamina
UV	- ultravioleta
VN	- vitronectina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura comum da família das proteínas ADAMs.....	15
Figura 2. Metilmercúrio induz diminuição da viabilidade celular em células HeLa.....	29
Figura 3. Células HeLa transfectadas positivas para ADAM23-Imunofluorescência.....	32
Figura 4. Expressão de ADAM23 em colônias transfectadas com o vetor pcDNA3.1.....	33
Figura 5. Ensaio de adesão celular com diferentes proteínas de MEC.....	35
Figura 6. Ensaio de adesão celular com diferentes clones sobre fibronectina.....	37
Figura 7. Ensaio de adesão celular com diferentes clones sobre vitronectina.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1. 1 METILMERCÚRIO	11
1. 2 ADAM 23.....	15
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAL E MÉTODO	22
4.1 CULTURA CELULAR	22
4.2 ESTOCAGEM DAS CÉLULAS.....	22
4.3 VETOR	22
4.4 PREPARO DAS ALÍQUOTAS DO ANTIBIÓTICO (GENETICIN - G418).....	23
4.5 ENSAIO DE TRANSFEÇÃO COM LIPOFECTAMINA.....	23
4.6 PREPARO DAS ALÍQUOTAS DE METILMERCÚRIO	24
4.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR - MÉTODO MTT.....	24
4.8 ANÁLISE DA PRESENÇA DA PROTEÍNA ADAM23 NAS CÉLULAS TRANSFECTADAS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	25
4.9 ANÁLISE DA PRESENÇA DA PROTEÍNA ADAM23 NAS CÉLULAS TRANSFECTADAS POR <i>SDS-PAGE</i> E <i>WESTERN BLOT</i>	26
4.9.1 <i>SDS-PAGE</i>	27
4.9.2 <i>WESTERN BLOT</i>	27
4.10 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR	27
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 EFEITOS DO METILMERCÚRIO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR	29
5.2 EFEITO DO ANTIBIÓTICO - G418.....	30
5.3 TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS HELA COM pCDNA3.1ADAM23 / pCDNA3.1(-) E CONFIRMAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA / <i>WESTERN BLOT</i>	30
5.4 ENSAIO DE ADESÃO.....	34
6 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

1. 1 Metilmercúrio

Certas neuropatologias clássicas têm sido associadas à interação entre o organismo humano, o meio ambiente e as modificações desse meio decorrente da atividade humana: a doença de Parkinson, freqüentemente associada à exposição a compostos orgânicos; a doença de Alzheimer, algumas vezes associada à exposição ao alumínio; e a recente associação da esquizofrenia com a interação de fatores hereditários e adquiridos, são alguns dos possíveis exemplos. As neuropatologias associadas à intoxicação mercurial são testemunhos clássicos das conseqüências da exposição do homem a fatores de risco ambientais.

O mercúrio representa um difundido e perigoso contaminante ambiental, com grande capacidade de bioacumular-se e biomagnificar-se na cadeia alimentar aumentando o risco da exposição humana. Na natureza, compostos mercuriais podem passar por diversos processos de transformação, convertendo-se em formas orgânicas e inorgânicas (EISLER, 2004; CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2005). Em estudos comparativos com diferentes espécies, o metilmercúrio (MeHg) revelou-se como a forma mais tóxica do mercúrio (TOIMELA & TAHTI., 2004; SILVA-PEREIRA *et al.*, 2005).

O mercúrio é exposto aos seres humanos na forma do vapor ou na sua forma orgânica, o metilmercúrio. A forma orgânica, presente na água e nos peixes, encontra caminho para o organismo humano através da alimentação. Entre os riscos que oferecem essas formas de interação homem e ambiente, é de particular significado a agressão ao sistema nervoso central e periférico.

Estudos toxicológicos sobre a exposição ao metilmercúrio têm demonstrado que o sistema nervoso central é um órgão alvo (MOTTET *et al.*, 1984). Este fato pode ser associado à habilidade do MeHg em facilmente atravessar a barreira hematoencefálica por ser altamente lipofílico, acumulando-se então em diferentes áreas como o cerebelo, córtex cerebral e retina (MOTTET *et al.*, 1984; ERIE *et al.*, 2005), causando a morte em certas populações neuronais.

Há dois bem conhecidos incidentes de envenenamento por MeHg que ocorreram no Japão, Minamata, em 1950 e 1960 - (TAKEUCHI *et al.*, 1962) e no Iraque em 1972 (BAKIR *et al.*, 1973). Em ambas as epidemias de envenenamento por MeHg, os sinais primários de exposição foi a disfunção neurológica caracterizada por ataxia cerebelar, fraqueza generalizada nas extremidades e distúrbios sensoriais os quais incluem falhas na visão e audição. Enquanto os sinais primários do envenenamento estão bem descritos, os mecanismos da neurotoxicidade do MeHg não são completamente compreendidos.

A contaminação mercurial dos rios e lagos decorrentes das atividades no garimpo de ouro, com contaminação dos peixes e de seres humanos, foi caracterizada na região Amazônica brasileira. Na Região do Rio Tapajós, a contaminação pelo mercúrio, vem sendo estudada através da análise do metal nos peixes e nas amostras de cabelo de populações de diferentes comunidades ribeirinhas (AKAGI *et al.*, 1995; MALM *et al.*, 1995; PINHEIRO *et al.*, 2000; DOLBEC *et al.*, 2001). No processo da garimpagem do ouro nos rios da Amazônia, grande quantidade de mercúrio é utilizada na captação de finas partículas do metal nobre, formando um amálgama ouro-mercúrio que posteriormente é submetido à queima para separação dos metais. O excesso do mercúrio líquido e o vapor resultante da queima do amálgama depositam-se nos rios e lagos da região, onde provavelmente sofrem processos de metilação, com conseqüente acúmulo na cadeia alimentar aquática. Estudos revelaram que atividades garimpeiras são responsáveis pela liberação de mercúrio no Rio Cuiabá e Rio Paraguai, no Pantanal Mato-grossense (BASTOS *et al.* 2004; PINHEIRO *et al.* 2000).

Uma vez que o mercúrio é biomodificado na cadeia alimentar aquática, o peixe configura-se como a maior rota de exposição ao metilmercúrio para a população humana (TAVARES *et al.* 2001; YOKOO *et al.* 2001; HYLANDER *et al.* 2000A; HYLANDER *et al.* 2000B).

Parte da sintomatologia devida à intoxicação mercurial advém de lesões do sistema nervoso central, porém uma parte significativa pode ser explicada pelo comprometimento do sistema nervoso periférico, uma vez que a neuropatia periférica e a lesão dos gânglios das raízes dorsais são prevalentes nesses pacientes (CHANG & HARTMANN, 1972). O exame *post-mortem* do sistema nervoso central de seres humanos e animais expostos ao mercúrio mostra que a região mais afetada é o cerebelo, sendo as células granulares especialmente

suscetíveis de morte neuronal induzida por este agente neurotóxico (MARTY & ATCHISON, 1997). TAKAHATA *et al.* (1970), em estudos *post-mortem*, em mineradores de mercúrio, mostraram altas concentrações da substância no córtex occipital e o acúmulo de pequenos grânulos de mercúrio nas células nervosas, particularmente nas células de Purkinje do cerebelo.

O metilmercúrio afeta a transmissão sináptica, tanto no sistema nervoso periférico como no sistema nervoso central, e essa ação é mediada por vários mecanismos (ATCHISON & HARE, 1986). Um dos efeitos primários do metilmercúrio sobre a transmissão sináptica é o aumento, seguido de diminuição, da liberação espontânea do neurotransmissor, assim como a diminuição da liberação de neurotransmissor provocada pelo impulso nervoso (ATCHISON & NARAHASHI, 1982; JUANG & YONEMURA, 1975; YUAN & ATCHISON, 1993). Esta última tem sido associada à diminuição da quantidade de neurotransmissor disponível para a liberação (ATCHISON & NARAHASHI, 1982), ao bloqueio dos canais de Ca^{++} dependentes de voltagem que controlam a exocitose das vesículas sinápticas e à diminuição da excitabilidade da membrana neuronal (SHRIVASTAV *et al.*, 1976; ATCHISON, 1986; TRAXINGER & ATCHISON, 1987; KAUPPINEN *et al.*, 1989; HARE & ATCHISON, 1992; SHAFER & ATCHISON, 1989).

Embora exista uma caracterização das perdas visuais suscitadas pela intoxicação mercurial ainda são pouco conhecidos os mecanismos celulares e moleculares subjacentes a este tipo de lesão, tanto na retina quanto no córtex cerebral de mamíferos adultos.

Segundo BAIRD (1997), o mercúrio possui grande afinidade por grupamentos sulfidrilas (-SH) que aparecem comumente em enzimas que controlam a velocidade das reações metabólicas críticas no corpo humano e são alvos deste metal ingeridos ou por moléculas que contém este metal. Em contrapartida, se as proteínas afetadas formam parte das maiores estruturas fundamentais para a sobrevivência celular (como por exemplo, os microtúbulos), o mercúrio pode alterar estas estruturas até mesmo destruí-las, produzindo danos irreparáveis para a célula.

Um exemplo claro estudado no cérebro de ratas é que a inalação de vapores de mercúrio impede que o GTP se una à tubulina e inibe que esta se polimerize para formar os microtúbulos (PENDERGRASS *et al.*, 1997). A tubulina é uma proteína formadora do citoesqueleto celular conservada evolutivamente, tanto em vertebrados como em invertebrados. Neste caso, os íons do mercúrio poderiam afetar a dinâmica

da membrana dos cones de crescimento neuríticos, já que conseguem interferir na estrutura da membrana e diminuir seu crescimento em até 77% (LEONG *et al.*, 2001), visto que a formação de dendritos e axônios depende de um adequado funcionamento destes cones de crescimento na célula. Estas estruturas filamentosas podem se unir aos metais devido a sua elevada concentração de cisteínas e metioninas, figurando como um dos mais importantes e abundantes componentes subcelulares dos neurônios já que possuem a função de organizar o tráfico vesicular através do axônio (LILIOM *et al.*, 2000).

A despolarização dos microtúbulos devido à presença do mercúrio tem sido detectada em diversos tipos celulares e as células neuronais são muito mais sensíveis que os fibroblastos e igual ou mais sensíveis às células gliais (LILIOM *et al.*, 2000). A destruição dos microtúbulos e como consequência o acúmulo destas células nas fases M e G2 do ciclo celular, também são propostos como um evento importante no desenvolvimento de processos apoptóticos provocados pelo metilmercúrio em linhagens neuronais (MIURA. *et al.*, 1999).

Segundo THIER *et al.*, 2003 e BONACKER *et al.*, 2004, o mercúrio também pode provocar danos citogenéticos e os resultados obtidos dos estudos consistem na idéia de que parte da toxicidade cromossômica provocada pelo mercúrio pode estar relacionada com a perda da funcionalidade da proteína cinesina e/ou dos microtúbulos, o que conduziria a alterações na distribuição cromossômica. Neste caso, os compostos mercuriais atuam através de sua influência sobre a própria formação dos microtúbulos ou sobre a divisão cromossômica e, conseqüentemente conduziriam à perda de cromossomos.

O comprometimento funcional do sistema nervoso frente a diferentes classes de agentes hoje reconhecidos como neurotóxicos começa a revelar-se em bases celulares e moleculares graças a esforços crescentes no sentido de identificar possíveis alvos e procedimentos terapêuticos nestes níveis que revertam ou compensem os distúrbios neurológicos relatados.

1.2 ADAM 23

A sigla ADAM, *A Desintegrin And Metalloprotease*, faz referência aos domínios desintegrina e metaloprotease apresentados por uma família de proteínas que possuem como estrutura comum um pró-domínio, domínio metaloprotease, domínio desintegrina, região rica em cisteína, domínio semelhante ao EGF (fator de crescimento epidermal), domínio transmembrânico e cauda citoplasmática.

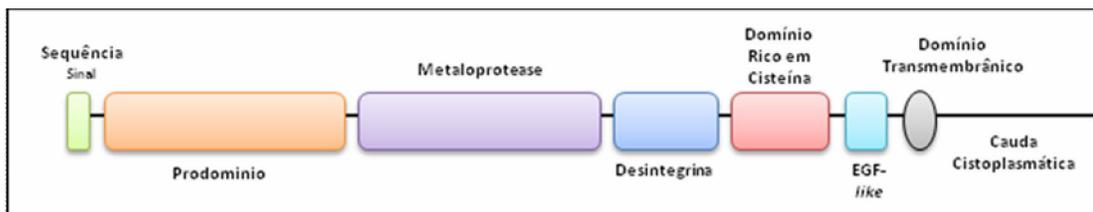


Figura 1. Estrutura comum da família das proteínas ADAMs. (adaptado de COURTNEIDGE, S. A; SEALS, D. F., 2003).

As ADAMs são proteínas transmembrânicas que atuam tanto como enzimas proteolíticas (através de seu domínio metaloprotease) e como ligante de integrina (domínio desintegrina), sendo estas duas propriedades importantes na manutenção estrutural e funcional do sistema nervoso (KARKKAINEN *et al.*, 2000). Trinta e quatro (34) ADAMs com o domínio transmembrânico foram clonadas e seqüenciadas e membros desta família têm sido encontrados em diversas espécies como *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus* e *Drosophila*, mas nenhuma ADAM foi encontrada em eucariotos unicelulares e em plantas (WOLFSBERG *et al.*, 1995; COURTNEIDGE & SEALS, 2003).

Os domínios estruturais das ADAMs são similares aos encontrados na família de proteínas solúveis do veneno de serpente (SVMPs), as metaloproteases de veneno de serpente, e, as ADAMs são únicas entre proteínas de superfície celular relacionadas tanto no processo de adesão como no proteolítico (WOLFSBERG *et al.*, 1995) sendo então cataliticamente ativas e reconhecedoras de substratos específicos (BLOBEL & WHITE, 1992). Em vítimas de picada de serpente, essas metaloproteases e desintegrinas promovem hemorragia, sendo que as metaloproteases solúveis degradam membranas basais dos capilares (BJARNASON & FOX, 1995) e as desintegrinas solúveis ligam integrinas das

plaquetas, através de uma seqüência tripeptídica RGD, inibindo sua agregação (NIEWIAROWSKI *et al.*, 1994).

A extremidade N terminal das ADAMs contém uma seqüência sinal, que direciona a molécula para a membrana plasmática e um pró-domínio, que mantém o sítio metaloprotease inativo. A remoção do pró-domínio da proteína precursora está envolvida com a maturação desta e com ativação do sítio metaloprotease. Essa remoção ocorre durante seu processamento, logo após sua passagem pelo compartimento medial do Complexo de Golgi por uma pro - proteína convertase do tipo furina (LUM *et al.*, 1998), sendo sua função secundária, auxiliar no dobramento correto da proteína, particularmente do domínio metaloprotease (VAN WART & BIRKEDAL-HANSEN, 1990; SEALS, 2003).

O domínio metaloprotease de muitas ADAMs possui o sítio ativo consenso HExxHxxGxxH, no qual os resíduos de histidina ligam átomos de zinco, sendo essa ligação necessária para a atividade proteolítica da molécula, enquanto a glicina permite uma rotação e o ácido glutâmico é o resíduo catalítico. (LUM *et al.*, 1998; SEALS *et al.*, 2003; WOLFSBERG, *et al.*, 1995).

O domínio metaloprotease das ADAMs 1, 8 – 10, 12, 13, 15-17, 19-21, 24-26, 28, 30 e 33-40 contém os resíduos do sítio ativo, e assim, são ativas cataliticamente. Já as ADAMs 2-7, 11, 14, 22, 23, 29 e 32 codificam seqüências diferentes neste domínio e apesar de estruturalmente similares, o sítio proteolítico não está ativo (WOLFSBERG *et al.*, 1995; SAGANE *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2006).

Em mamíferos, a maioria delas (incluindo ADAMs 2, 7, 18, 20, 21, 29 e 30) são exclusivamente ou predominantemente expressas nos testículos ou estruturas associadas. Outros membros, (ADAMs 8, 9, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 22, 23, 28 e 33) possuem uma distribuição mais ampla.

O domínio desintegrina mimetiza um local de ligação das proteínas de matriz, como a fibronectina, aos receptores de integrinas. Assim como a fibronectina, muitas ADAMs possuem uma seqüência consenso RGD ou ECD (equivalente ao RGD) dentro de um trecho de 13 aminoácidos, chamado alça desintegrina, que confere ligação a integrinas (BLOBEL *et al.*, 1992). ADAM11, ADAM22 e ADAM23 têm uma seqüência conservada, AVN (E/D) CD, e podem ligar a mesma integrina. Esses exemplos demonstram que a seqüência presente na alça desintegrina tem papel crítico na especificidade da adesão às diferentes integrinas (SAGANE *et al.*, 1998).

ADAMs 1, 3, 12 e 14 têm um motivo na sua região rica em cisteína, que é muito similar a seqüências encontradas em peptídeos de fusão virais (BLOBEL *et al.*, 1992). Esse fato, juntamente com observações que mostraram que as ADAMs 1, 3 e 12 participam de reações de fusão celular, levaram à hipótese de que essa região está envolvida em fusão de membranas. Ela também pode complementar a capacidade de ligação do domínio desintegrina e, talvez, proporcione especificidade às interações mediadas por esse domínio. Além disso, já se sabe que essa região regula a atividade metaloprotease em ADAM13 de *Xenopus* (SEALS, 2003).

O domínio semelhante à EGF, o domínio transmembrana e a cauda citoplasmática nas ADAMs sugerem que estas moléculas podem servir como transdutores de sinal entre o meio extracelular e intracelular. As caudas citoplasmáticas das ADAMs são muito variáveis tanto em tamanho quanto na sua seqüência e possuem motivos especializados que têm sido estudados no envolvimento da regulação da atividade metaloprotease a partir do meio intra para o extracelular, na regulação da sinalização celular a partir do meio extra para o intracelular, e/ou no controle da maturação e da localização subcelular (SEALS, 2003).

A cauda citoplasmática pode ainda conter sítios de ligação para proteínas possuidoras de domínio SH3 e sítios de fosforilação para serina/treonina e/ou tirosina quinases, podendo, assim, não somente regular a função da ADAM diretamente, mas também, prover interação com ligantes intracelulares possuidores de domínio SH2 nos resíduos resultantes de fosfotirosina (SUN *et al.*, 2004).

Diversas ADAMs são expressas em múltiplas isoformas. Por exemplo, ADAM22 (SAGANE *et al.*, 1998), ADAM29 e ADAM30 (CERRETI *et al.*, 1999) possuem de duas a três formas que variam no comprimento da cauda citoplasmática, embora nenhuma diferença funcional nestas isoformas foram relatadas. Já a ADAM12 possui duas isoformas (S e L) que divergem na sua função.

A expressão predominante de ADAM23 no cérebro (SNC) tanto de embriões como de adultos, sugere sua participação no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2004). Esta desintegrina apresenta estrutura típica dos membros da família, no entanto, não possui no seu domínio metaloprotease os aminoácidos que formam sítio ativo para a ligação de zinco (HExxHxxGxxH), o qual é crítico para a atividade proteolítica. Animais deficientes para essa proteína apresentam problemas neurológicos, como

tremor e ataxia e, sobrevivem no máximo duas semanas após o nascimento (SAGANE *et al.*, 1998; MITCHELL *et al.*, 2001).

A ADAM23 possui domínio metaloprotease inativo, sendo um ligante de integrina, podendo então, estar envolvida com adesão de células de origem neural. Portanto, ADAM23 é uma molécula potencialmente adesiva, mas não proteolítica e, provavelmente, possui um papel fundamental no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central (SAGANE *et al.*, 1998).

Foi descrito que a ADAM23 interage com integrinas para promover a adesão celular, sendo que uma maior adesão foi observada quando células que expressam integrina $\alpha v 3$ são plaqueadas sobre poços recobertos pelo domínio desintegrina de ADAM23. No entanto, tal adesão não foi observada para células que expressam $\alpha 5 1$ submetidas ao mesmo procedimento que $\alpha v 3$. Interações de adesão célula-célula e célula matriz extracelular são muito importantes para a formação e função da rede neural, podendo ser que alguns destes eventos estejam sendo modulados pela ADAM23 que interage especificamente com $\alpha v 3$ (CAL *et al.*, 2000).

GOLDSMITH e colaboradores, (2004) demonstraram que células granulares cerebelares sintetizam duas formas glicosiladas de ADAM23 com massas moleculares aproximadas de 70 kDa e de 100 KDa, e ambas estão presentes na célula. ADAM23 com 100 KDa representa a forma imatura da proteína (cuja massa teórica é de 92 KDa), enquanto ADAM23 com 70 KDa corresponde a forma madura, na qual há ausência do pró-domínio e cuja massa teórica é de 61 kDa. Essa hipótese foi levantada, devido ao fato da ADAM23 possuir um motivo de reconhecimento para uma pró-proteína convertase entre seu pró-domínio e seu domínio metaloprotease, sugerindo que não só as ADAMS cataliticamente ativas são processadas por pró-proteínas convertase (GOLDSMITH *et al.*, 2004).

SUN *et al.*, (2004) identificaram uma isoforma da ADAM23 (ADAM23) humana, chamada ADAM23 que não possui o domínio transmembrana e que é principalmente expressa em encéfalo de embriões e neonatos, e uma isoforma, chamada ADAM23 , cujo domínio transmembrana é codificado por um éxon ainda não descrito, ambas provenientes de processamento alternativo do RNA. Interessantemente, o padrão de expressão temporal da subunidade v durante o desenvolvimento de camundongos coincide, de certo modo, temporalmente com o da ADAM23 , a qual é principalmente expressa em encéfalos de embriões e

neonatos. O nível de mRNA de ambas diminui drasticamente após o nascimento, desaparecendo no SNC de camundongos adultos. Logo, a interação entre ADAM23 e ν pode ser importante em algum estágio durante o desenvolvimento cerebral. Em alguma extensão, ADAM23 pode estar competindo com ADAM23 e por ν , prevenindo a ligação de ν 3 a outras moléculas, e assim modulando as interações célula-célula e célula-matriz.

2 JUSTIFICATIVA

Levando-se em consideração que a ADAM23 é predominantemente expressa no SNC (Sistema Nervoso Central), o fenótipo de camundongos nocauteados para este gene e seu envolvimento no fenômeno de adesão celular, é provável que esta proteína possua grande importância no desenvolvimento do sistema nervoso. Para que a rede neuronal possa ser formada durante o desenvolvimento do SNC existe a necessidade da migração neuronal e do direcionamento axonal, onde interações entre célula-célula e célula-matriz extracelular são imprescindíveis.

Adicionalmente, alguns estudos demonstraram que o metilmercúrio pode estar envolvido em problemas na formação e extensão dos cones de crescimento dos neuritos (MIURA *et al*, 2000.) devido a um grande efeito neurotóxico, onde o SNC é um órgão-alvo.

Estas considerações nos levam a investigar o papel biológico da ADAM23 frente à intoxicação mercurial, mas para isso são necessárias ferramentas que possam estudá-la em diversos ensaios bioquímicos e funcionais. Neste contexto, fez-se necessário a produção de células que expressassem ADAM23 em grande quantidade a partir da inserção de vetores apropriados como ferramenta no estudo da função biológica da proteína.

3 OBJETIVOS

- Produção de linhagens celulares que expressam ADAM23 humana a partir da transfecção estável com vetor apropriado e seleção com G418.
- Estudar o papel biológico de ADAM23, associada à fibronectina e vitronectina (proteínas da matriz extracelular) na fenomenologia da adesão neuronal axonal sob a influência de metilmercúrio.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Cultura Celular

A linhagem celular HeLa (adenocarcinoma de cervix humano, código ATTC (CCL-2) utilizada para a realização dos experimentos foi cultivada em meio MEM (Cultilab, Campinas, SP) suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, SP), 1% piruvato/glutamina (Sigma, St. Louis, MO), 0,1% gamicina, e o sub-cultivo celular foi realizado duas vezes por semana, numa proporção de 1:6. As células foram mantidas em estufa a 37° C contendo 5% de CO₂ e umidade controlada.

4.2 Estocagem das células

Para que houvesse sempre um estoque, as células foram congeladas em meio MEM suplementado com 40% de SFB e 10% de DMSO (Sigma, St. Louis, MO) em nitrogênio líquido.

A recuperação das linhagens congeladas foi realizada através do seu descongelamento rápido a 37°C seguido por semeadura em meio MEM suplementado com 10% SFB.

4.3 Vetor

O vetor plasmidial utilizado - pcDNA 3.1(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) foi gentilmente cedido pelo Dr. Santiago Cal (Universidade de Oviedo, Instituto Universitário de Oncologia, Faculdade de Medicina, Espanha):

- pcDNA 3.1 ADAM 23 - HA: cDNA da ADAM23 humano foi clonado no sítio Eco RV do pcDNA 3.1 modificado, que contém 24 pb que codificam a hemaglutinina (HA). Como resultado, a proteína ADAM23 resultante possui uma etiqueta de HA na região carboxi-terminal (CAL *et al*, 2000) e um promotor forte, o CMV – citomegalovírus humano.

- pcDNA 3.1 (-): não contém o inserto da proteína. (Este vetor foi gentilmente cedido pela Dra. Bettina Malnic, Instituto de Química, USP). Também possui o promotor forte, o CMV – citomegalovírus humano.

4.4 Preparo das Alíquotas do Antibiótico (Geneticin[®]- G418, Gibco, USA).

A solução estoque de 0,06 g/ml foi preparada em água deionizada, filtrada em filtro de membrana 0,22 µm e congelada a -20 °C ao abrigo luz.

As diluições foram feitas no momento do experimento fazendo-se os cálculos necessários para a utilização da concentração de interesse a ser adicionada diretamente no meio de cultivo da placa com as células.

4.5 Ensaio de Transfecção com Lipofectamina

As células foram semeadas (2×10^5 células/poço) em placas estéreis de poliestireno de 35 mm de diâmetro (TPP, Suíça) ou em placa de 6 poços de 9,6 cm² de área (TPP, Suíça), quarenta e oito horas anterior ao ensaio para que ficassem com aproximadamente 75-80% de confluência (foi utilizado meio MEM sem gamicina).

O DNA plasmidial (4 µg) foi diluído em 250 µl de meio (sem SFB e sem gamicina). Então, em outro tubo, 10µl da lipofectamina (Invitrogen Co., CA, USA) foi diluída em 250 µl de meio (sem SFB e sem gamicina), homogeneizada e incubada por cinco minutos à temperatura ambiente. As soluções foram combinadas, homogeneizadas e deixadas em repouso por vinte minutos à temperatura ambiente.

O meio das células foi trocado para 1,5 ml de meio (sem SFB e sem gamicina) mais os 500 µl da solução de transfecção contendo o plasmídeo e a lipofectamina. Após quatro horas, foram adicionados 3 ml de meio de cultivo com 20% SFB. O antibiótico G418 (500 µg/ml) foi adicionado após 48 horas juntamente com as respectivas diluições das células (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) que foram transferidas para uma placa (p100) de 78,5 cm² de área (TPP, Suíça).

As células permaneceram em cultura por três semanas e então foram selecionadas as colônias resistentes com anéis de clonagem e vaselina estéreis.

4.6 Preparo das Alíquotas de Metilmercúrio

As alíquotas foram preparadas partindo-se de uma solução estoque de 4 mg/ml gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro do Laboratório de Toxicologia Celular - Departamento de Biologia Celular – UFPR.

As concentrações estoques ficaram cem vezes (100x) mais concentradas (0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1,0 mM; 5 mM; 7,5 mM; 10,0 mM) e a partir delas foram feitas as diluições no meio de cultivo para que ficassem nas concentrações de trabalho (1,0 µM; 2,5 µM; 5,0 µM; 10,0 µM; 50,0 µM; 75,0 µM e 100,0 µM) preparadas no momento do experimento.

Todas as soluções foram filtradas em filtro de membrana 0,22 µM, armazenadas sob congelamento e ao abrigo da luz.

4.7 Ensaio de Viabilidade Celular - Método MTT

Em uma placa de 96 poços, 4×10^4 células HeLa/poço foram semeadas em meio MEM suplementado com 10% de SFB. Após dezesseis horas, o meio dos poços foi trocado para MEM contendo 0,1% de SFB e deixado durante aproximadamente vinte e quatro horas a 37°C com 5% de CO₂ e atmosfera umidificada - 95%.

Após este período, as células foram tratadas (meio de cultivo sem SFB acrescido do MeHg) com diversas concentrações de metilmercúrio (1,0 μM ; 2,5 μM ; 5,0 μM ; 10,0 μM ; 50,0 μM ; 75,0 μM e 100,0 μM) e incubadas durante vinte e quatro horas.

Uma solução 5 mg/ml de MTT (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi preparada em HBSS (Merck, Darmstadt, Alemanha) e após aspirado cuidadosamente o meio dos poços, 100 μl da solução de MTT foram colocados em cada poço, obtendo-se uma concentração de 0,5 mg/ml de MTT/poço.

As células foram incubadas em estufa de CO_2 a 37°C durante quatro horas. O meio contendo MTT foi cuidadosamente retirado e 150 μl de isopropanol (TEDIA, U.S.A.) foram adicionados em cada poço. O meio foi homogeneizado e a leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 550 nm. Os tratamentos foram realizados em quintuplicata.

4.8 Análise da Presença da Proteína ADAM23 nas Células Transfectadas por Imunofluorescência

As células foram semeadas sobre lamínulas de vidro (com aproximadamente 2 cm^2 área) que foram transferidas para uma placa de 24 poços (com 2 cm^2 área) num total de 5×10^3 células por poço (volume total de 70 μl de meio MEM suplementado com 10% de SFB). Após cinco horas foram adicionados mais 500 μl do meio de cultivo, e cultivadas por vinte e quatro horas. As células foram fixadas durante quinze minutos em vapor de formol e então lavadas com PBS. Em seguida, foram adicionado 400 μl de saponina 0,01% (Sigma, St. Louis, MO) em PBS por trinta minutos e então foram bloqueados os sítios inespecíficos com PBS-BSA 1% durante duas horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, tratou-se as células com o anticorpo primário anti-HA (Zymed, Invitrogen) numa diluição de 1:50.

O anticorpo primário foi deixado por dezesseis horas em câmara úmida à 4°C e para retirada dos anticorpos não ligados, as células foram lavadas quatro vezes com PBS. Adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de coelho Alexa Flúor 488 (Molecular Probes) na diluição de 1:700, incubado durante uma hora à temperatura ambiente e protegido da luz (câmara escura). As células foram

novamente lavadas três vezes com PBS e a marcação do núcleo das células foi feita com 3 μ M do corante DAPI por dez minutos à temperatura ambiente. Após a incubação com DAPI as células foram lavadas uma vez com água deionizada e então, montou-se a lâmina utilizando Fluormont como meio de conservação.

A lâmina permaneceu guardada a 4°C protegida da luz até sua análise em microscopia de fluorescência.

4.9 Análise da Presença da Proteína ADAM23 nas Células Transfectadas por *SDS-PAGE* e *Western Blot*

4.9.1 *SDS-PAGE*

Foi utilizada a técnica de SDS-PAGE para a separação eletroforética das proteínas celulares. Quatro por cento de acrilamida/bis acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) contendo 0,4% de SDS (dodecil sulfato de sódio) foi a concentração utilizada para o gel de empilhamento. Para o gel de separação, foi utilizado uma concentração de 10% de acrilamida/bis acrilamida em tampão Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) contendo 0,4% de SDS (dodecil sulfato de sódio). Agentes catalisadores (persulfato de amônio e N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina-TEMED) foram adicionados em ambos os géis para que ocorresse a polimerização dos mesmos.

Quantidades iguais de proteínas de cada amostra foram misturadas em tampão de amostra redutor (Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, 0,2% de SDS, 10% de glicerol, 0,005% de azul de bromofenol e 50 mM de -mercaptoetanol) na proporção de 1:4 (tampão de amostra:amostra) e fervidas durante aproximadamente cinco minutos.

As amostras foram cuidadosamente aplicadas nos poços dos géis e submetidas a uma corrente de 10 mA até a entrada das proteínas no gel de separação, com posterior aumento da corrente para 20 mA até a saída do gel da frente de migração. Marcadores de massa molecular (25, 30, 35, 50, 75, 105 e 160 kDa) foram utilizados para determinação das massas das proteínas de interesse.

4.9.2 *Western Blot*

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose (GE Piscataway, NJ) durante uma hora sob voltagem constante de 100 V. Para a realização da transferência foi utilizado um tampão de transferência contendo 192 mM de glicina, 25 mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol. Após este processo, as membranas foram coradas com vermelho de ponceau (0,2% de ponceau, 3% de ácido acético glacial) para a verificação da eficiência da transferência.

As membranas foram lavadas até a completa retirada do corante e incubadas durante uma hora com solução TBS-T (120 mM de NaCl, 20 mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite liofilizado, desnatado e desengordurado (Molico, Nestlé) para que houvesse um bloqueio com proteínas inertes ao experimento, dos sítios livres da membrana. Então, as membranas foram incubadas sob agitação, por dezesseis horas a 4°C, com solução de anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio (TBS-T leite). O anticorpo primário e sua respectiva diluição utilizada foi: coelho anti-HA, 1:1000 (Zymed, Invitrogen). Após a lavagem da membrana com TBS-T por três vezes de cinco minutos cada, foi incubada com o anticorpo secundário adequado em tampão de bloqueio por uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. O anticorpo secundário utilizado foi: anti-IgG de coelho conjugado com HRP, 1: 3000 com o substrato (H₂O₂) e o luminol para a reação quimioluminescente (West Pico, Pierce Rockford, IL). A membrana foi colocada entre duas folhas de filme plástico (transparência) e, no escuro, exposta a um filme autoradiográfico (Kodak) por tempos determinados até a obtenção do sinal, este verificado após revelação e fixação do filme.

4.10 Ensaio de Adesão Celular

Placas de 96 poços (TPP, Suíça) foram tratadas com 15 µg/ml de vitronectina, fibronectina, matrigel e BSA diluídas em PBS. Após incubação por

dezesesseis horas a 4°C, os poços foram lavados para retirar a proteína não ligada e então bloqueados com 1% de BSA por duas horas a 37°C.

Então, células HeLa (10^5 células/poço), sob a influência ou não de metilmercúrio, foram semeadas em tampão HEPES (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mg/ml D-glucose, pH 7,4) e cátions divalentes (Mg^{2+} e Ca^{2+}) e então, deixadas a 37°C durante duas horas para que ocorresse a adesão.

Os poços foram lavados três vezes com PBS para remoção das células não aderidas, as que permanecerem aderidas foram fixadas com 100 µl de metanol/poço e posteriormente coradas com azul de metileno (0,4% de azul de metileno em 30% metanol). O corante foi eluído com solvente apropriado (0,4 g azul de metileno, 1 ml de ácido acético glacial em 99 ml água deionizada) e a absorbância foi mensurada espectrofotometricamente à 650 nm.

4.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do programa *Graph Pad Prism5* vs 5.00 usando o teste *one-way* ANOVA com *Turkey's Multiple Comparision Test*, diferença estatística com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeitos do Metilmercúrio sobre a Viabilidade Celular

A análise da viabilidade celular em células HeLa wt (linhagem selvagem) tratadas com metilmercúrio foi feita pelo método de metabolização do MTT.

O MTT é um composto amarelo solúvel que é metabolizado via mitocôndria, obtendo-se como produto final um composto púrpura insolúvel que precipita dentro da mitocôndria celular. Após o tempo decorrido de incubação com as células, o MTT foi removido e o precipitado formado foi solubilizado com a adição de Isopropanol. A leitura espectrofotométrica da absorbância dos poços foi feita e estabeleceu-se uma correlação direta entre absorbância e viabilidade celular, ou seja, quanto mais células viáveis, mais mitocôndrias e mais produto metabolizado, gerando uma intensidade de cor maior, com maior absorbância.

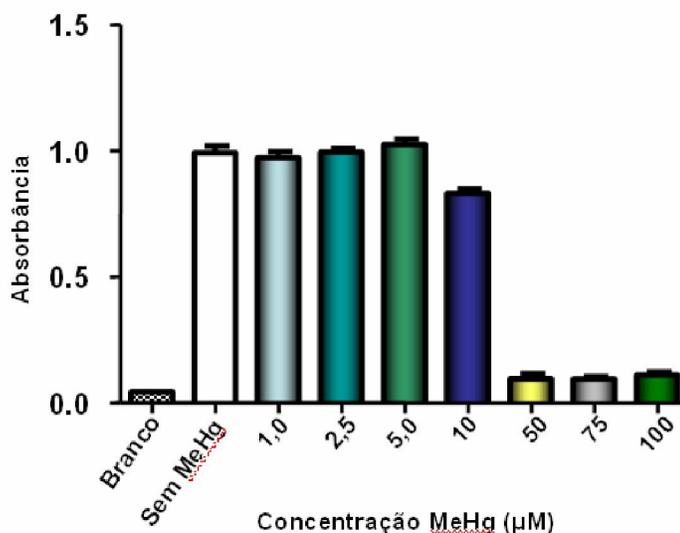


Figura 2. Metilmercúrio induz diminuição da viabilidade celular em células HeLa. Células HeLa wt (4×10^4 céls/poço) foram tratadas com diversas concentrações de metilmercúrio durante 24 horas. Após este período, a viabilidade celular foi monitorada pelo método do MTT. A porcentagem de células foi calculada em relação ao controle, que foi considerado como sendo 100%. $n=5$; $p < 0,05$.

O tratamento de células de adenocarcinoma de cervix humano - HeLa pelo metilmercúrio induz uma diminuição na viabilidade celular na linhagem estudada (figura 2).

O gráfico foi construído considerando-se o veículo do metilmercúrio (HBSS) como “branco” e, como controle, as células sem o tratamento (como sendo 100% na contagem celular).

O carenciamento de soro que as células foram submetidas após vinte quatro horas ao seu plaqueamento foi realizado para que pudesse ser observado somente o efeito do metilmercúrio sob a viabilidade e não sob a proliferação, visto que com a carência do SFB o crescimento foi diminuído em função da supressão de diversos fatores necessários para o crescimento normal das células presente no mesmo.

Como podemos observar pela figura 2, após vinte e quatro horas de tratamento com MeHg percebe-se um efeito significativo/diminuição na viabilidade celular a partir da concentração de 10 μ M. Diante dos resultados obtidos e análise dos dados, foi escolhida a concentração de 5 μ M de metilmercúrio para a realização dos experimentos posteriores. Esta escolha baseou-se no fato de ser a maior concentração a não apresentar diminuição da viabilidade celular.

5.2 Efeito do Antibiótico - G418

Para analisarmos o efeito do metilmercúrio sobre células que expressam ADAM23 fez-se necessário a produção de ferramentas que pudessem ser utilizadas neste estudo, bem como em outros projetos do grupo. Como ponto de partida escolhemos fazer uma transfecção estável devido à sua eficiência, estabilidade e interação direta dos complexos (lipossomos) com a membrana ou endocitose não mediada por receptores.

O vetor de expressão eucariótica pcDNA3.1 foi utilizado com e sem o inserto da proteína ADAM23. Este vetor possui um gene de resistência ao antibiótico G418, importante na seleção das células transfectadas positivamente.

O antibiótico citado é um aminoglicosídeo, similar na estrutura à neomicina/gentamicina e kanamicina, tóxico tanto para células procarióticas como eucarióticas e bloqueia a síntese protéica interferindo na função dos ribossomos (SOUTHERN & BERG, 1982).

O ensaio de toxicidade da célula HeLa selvagem e sem transfecção foi realizado, tratando-a com uma concentração crescente de G418. Tal ensaio permite

determinar a concentração adequada do antibiótico que deve matar as células na ausência da expressão do gene de resistência. As células dividiram-se algumas vezes na presença de doses letais do antibiótico e somente após alguns dias o efeito tornou-se aparente sendo que seleção completa durou três semanas.

Neste ensaio preliminar de toxicidade as células foram semeadas (10^4 células) numa placa de 35mm de diâmetro, o meio de cultivo (sem antibiótico) foi adicionado e após quarenta e oito horas o G418 foi adicionado nas concentrações de 200, 400, 500 e 600 $\mu\text{g/ml}$.

As células apresentaram uma mortalidade de 100% em aproximadamente dez dias na concentração de 600 $\mu\text{g/ml}$, enquanto que nas células não tratadas com o G418 (controle) o crescimento celular foi mantido. Observou-se uma mortalidade menor na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$ e 400 $\mu\text{g/ml}$ (após dez dias) e não houve mortalidade na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$.

Após três semanas todas as células morreram na concentração 500 $\mu\text{g/ml}$, corroborando com os resultados apresentados em KIRSCH *et al*, 2003, resultando na escolha desta concentração de trabalho.

5.3 Transfecção das Células HeLa com pcDNA3.1ADAM23 / pcDNA3.1(-) e confirmação da expressão da ADAM23 por Imunofluorescência *Western Blot*.

Para o estabelecimento de colônias transfectadas estavelmente e expressando a proteína ADAM23, as células HeLa foram transfectadas com o vetor vazio (pcDNA 3.1(-)) e com o vetor contendo o inserto do gene *adam23* fundido a uma etiqueta de hemaglutinina (pcDNA3.1-ADAM23-HA), utilizando-se o reagente *Lipofectamine 2000* (Invitrogen Co., CA, USA). Paralelamente foi mantida como controle a linhagem selvagem. Em todos os experimentos o G418 foi adicionado após quarenta e oito horas ao plaqueamento das células, as quais sofriam posteriores diluições.

Após seleção realizada pelo G418 durante três semanas, foi feita uma clonagem nas colônias resistentes. Esta etapa consistia na colocação de anéis isoladores sobre as colônias mais isoladas, tripsinização e transferência para outra placa de cultivo celular já contendo o meio de cultivo acrescido do G418.

Foram realizadas quatro transfecções com o isolamento de 59 colônias transfectadas com o vetor com ADAM23 e 11 colônias com o vetor vazio. Após a expansão das colônias, todas passaram pelo processo de confirmação da positividade da transfecção.

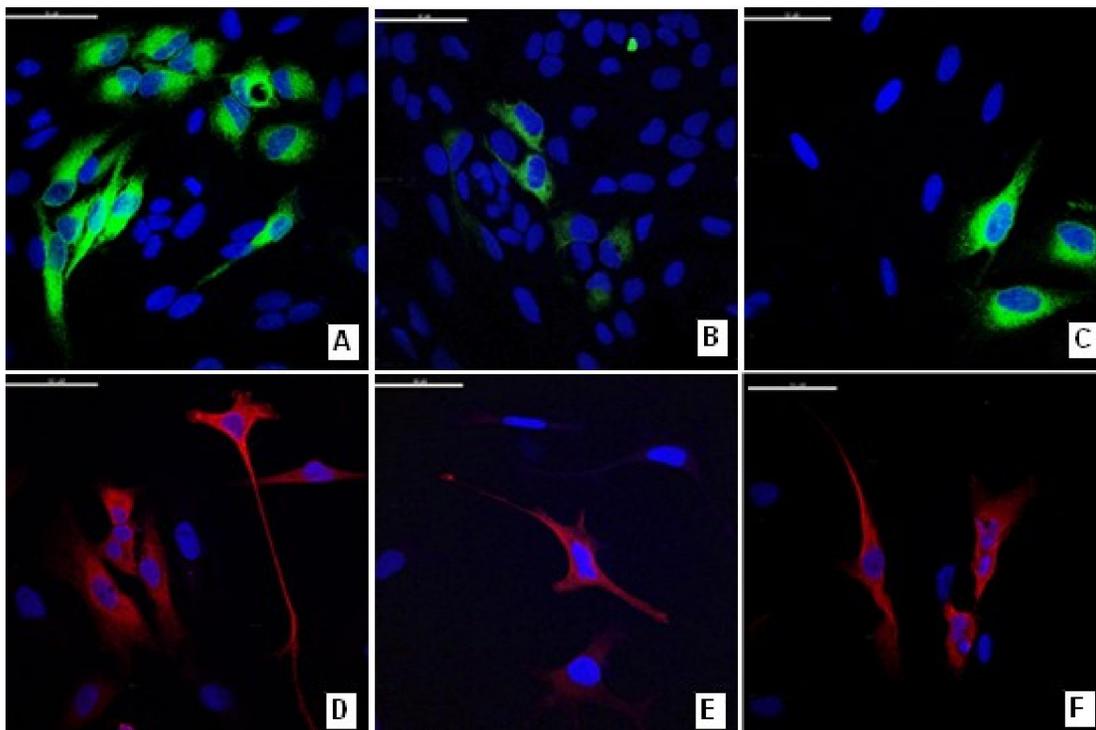


Figura 3. Células HeLa transfectadas positivas para ADAM 23 - Imunofluorescência. Células da linhagem HeLa transfectadas estavelmente e expressando a proteína ADAM 23 foram submetidas à reação de imunofluorescência empregando o anticorpo primário anti-HA. Em (A), (B), (C) foram tratadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho *Alexa 488* e (D), (E), (F) com secundário anti-IgG de Coelho *Texas Red*. O núcleo foi corado com DAPI e visualizado em microscopia confocal. Barra = 50µm

Obtivemos algumas colônias transfectadas positivamente para ADAM23 e para o vetor vazio. Isto pôde ser confirmado pelas colônias resistentes ao G418, visto que as mesmas permaneceram viáveis e estáveis. Como podemos observar na figura 3, a expressão de ADAM23 nas células HeLa positivas foi evidenciada por reação de imunofluorescência empregando o anticorpo primário anti-HA que se ligou na porção citoplasmática da proteína que continha a etiqueta HA na região carboxi-terminal. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG de coelho *Alexa 488* (figura 3, A-C) ou o anti-IgG de coelho *Texas Red* (figura 3, D-F) conferindo-lhes fluorescência e nos indicando a positividade da presença da proteína ADAM23 transmembrânica.

As células não apresentaram homogeneidade quanto à expressão de ADAM23, apesar de apresentaram-se resistentes ao antibiótico, fato bem visualizado na figura 3B. Isto pode ter ocorrido devido ao fato do plasmídeo incorporar-se aleatoriamente ao DNA celular e não ter sido inserido numa região favorável à transcrição do inserto. Em alguns clones, provavelmente o vetor plasmidial foi incorporado ao genoma da célula e lhe conferiu resistência ao G418, mas sua localização não permitiu a expressão adequada da proteína ADAM23.

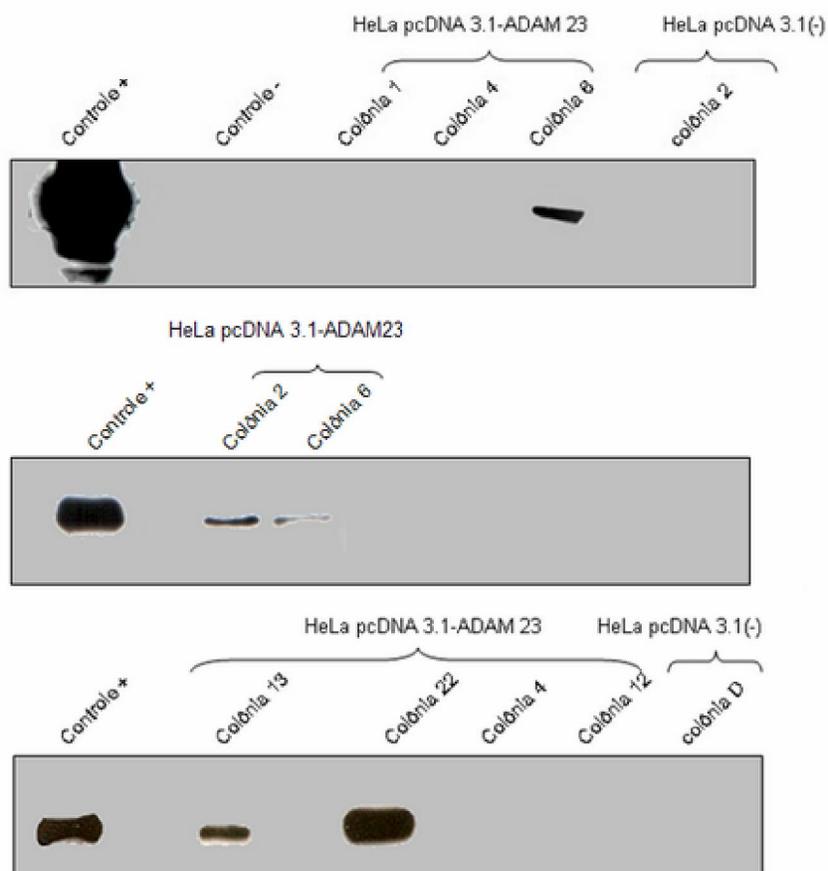


Figura 4. Expressão de ADAM23 em colônias transfectadas com o vetor pcDNA 3.1. Células HeLa selvagens foram transfectadas com pcDNA 3.1(-) e pcDNA 3.1-ADAM23 – HA, selecionadas com G418 por 3 semanas e com anéis isoladores de colônia. Após a lise celular, separação eletroforética e eletrotransferência das proteínas celulares para uma membrana de nitrocelulose, a membrana foi reagida com anticorpo anti-HA e anti-IgG de coelho-HRPO. Como controle positivo e negativo foi utilizado extrato protéico de células HEK transfectadas transientemente com pcDNA 3.1(-) e pcDNA 3.1-ADAM23 –HA.

Avaliamos também a expressão de ADAM23 pela técnica de *Western Blot*, onde extratos de células que foram transfectadas com vetor vazio e vetor com ADAM23 foram separados em *SDS-PAGE* e eletrotransferidas para uma membrana

de nitrocelulose. As membranas foram reagidas com o anticorpo primário anti-HA, secundário anti IgG de coelho acoplado à enzima peroxidase e o imunocomplexo visualizado por reação quimioluminescente.

Obtivemos 5 clones positivos para ADAM23 (denominadas de colônias 2, 6, 10, 13 e 22), conforme podemos observar na figura 4. Tivemos morte celular e não adesão às placas de cultivo na colônia 10. As outras colônias positivas, bem como as colônias transfectadas com o vetor vazio foram expandidas e congeladas para a manutenção da linhagem e para estudos posteriores.

Com o resultado acima foi possível observar apenas a expressão total de ADAM23, não sendo possível fazer qualquer análise sobre a homogeneidade da expressão nos diferentes clones. Para os ensaios de adesão foram escolhidos os clones 13 e 22 devido à maior expressão protéica, conforme figura 4.

Uma alternativa para a solução deste problema seria o isolamento das colônias homogêneas através da técnica de citometria de fluxo. Este ensaio não foi realizado devido à falta de anticorpos específicos para ADAM23 que reconhecessem adequadamente epítomos externos deste antígeno de superfície, uma vez que o anticorpo primário utilizado acima reconhece a etiqueta - HA expressa na porção citoplasmática e carboxi-terminal da proteína.

Esforços têm sido feitos pelo grupo objetivando a obtenção de anticorpos que possam se ligar especificamente à ADAM23, particularmente epítomos extracelulares.

5.4 Ensaio de Adesão

Este ensaio foi realizado visto que, eventos de adesão célula-célula e célula matriz extracelular (MEC) são de grande importância para a formação da rede neural (CAL *et al.*, 2000) e que ADAM23 é uma molécula potencialmente adesiva, mas não proteolítica, provavelmente possuindo um papel fundamental no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central (SAGANE *et al.*, 1998).

Já foi descrito por MITCHELL *et al.*, 2001 a importância desta proteína no desenvolvimento do sistema nervoso através da análise de camundongos nocautes

para o gene da ADAM23, que desenvolvem problemas neurológicos como tremor e ataxia logo após o nascimento e sobrevivem no máximo duas semanas.

Adicionalmente, parte da sintomatologia devida à intoxicação mercurial advém de lesões do sistema nervoso central (CHANG & HARTMANN, 1972) e o metilmercúrio afeta a transmissão sináptica, tanto no sistema nervoso periférico como no sistema nervoso central, e essa ação é mediada por vários mecanismos (ATCHISON & HARE, 1986), resolvemos investigar a ação de metilmercúrio sobre a capacidade adesiva de células transfectadas expressando ADAM23.

Inicialmente fizemos um ensaio de adesão com células HeLa selvagens, com diferentes tipos de proteínas de MEC, como fibronectina, vitronectina, matrigel e como controle negativo no processo adesivo foi utilizado BSA.

A MEC possui algumas propriedades e atividades como mecanismo de resistência, elasticidade, conformação tissular, crescimento celular/diferenciação, migração, homeostasia e está relacionada com processos invasivos e degenerativos (MOSHER *et al.*, 1992). É composta de moléculas multifuncionais como laminina, entactina, fibronectina, vitronectina, colágeno, proteoglicanos, entre outras.

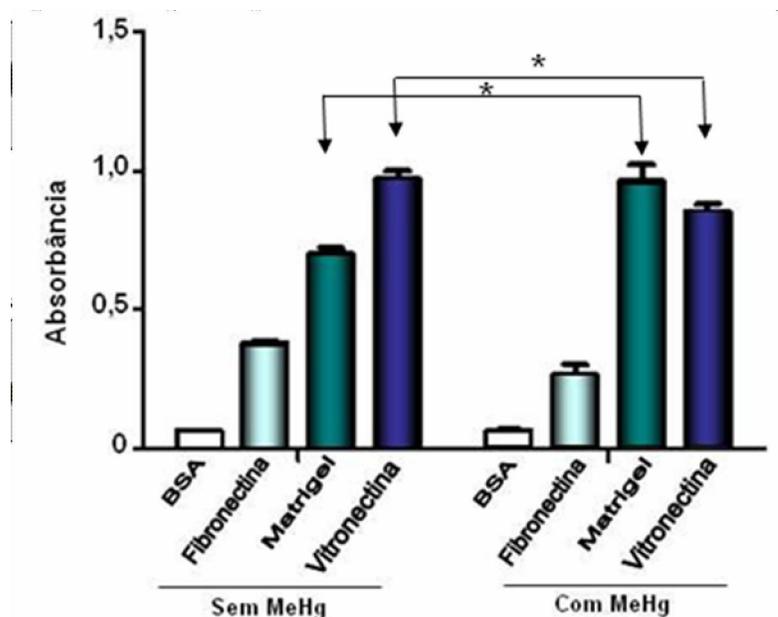


Figura 5. Ensaio de adesão celular com diferentes proteínas de MEC. Células HeLa wt foram semeadas em placas de 96 poços já cobertos previamente com BSA, fibronectina, matrigel e vitronectina por 2 horas à 37°C 5% CO₂. Células não aderidas foram removidas através de lavagens e a absorbância foi medida espectrofotometricamente à 650nm. * = estatisticamente significativo (p<0,05)

Como podemos observar na Figura 5, há uma redução na adesão à vitronectina e aumento na adesão com matrigel quando as células foram tratadas com MeHg sugerindo que este pode ter alguma influência sobre receptores (como integrina $\alpha 3$ ou ADAM's) na superfície celular que interagem com vitronectina e uma menor influência nos receptores que se comunicam com as outras proteínas de MEC. Não houve diferença estatística quando comparada as células da condição controle - BSA (com ou sem tratamento com MeHg) , demonstrando que o MeHg não está afetando a viabilidade celular.

A vitronectina contém uma sequência RGD que serve como sítio de ligação de integrinas $\alpha 3$ presentes na membrana, que por sua vez, servem para ancorar células à matriz extracelular. A integrina $\alpha 3$ também conhecida por receptor de vitronectina, possui afinidade por outras proteínas adesivas como vitronectina, fibronectina, fibrinogênio, laminina, colágeno, colágeno tipo I (VARNER & CHERESH, 1996); é responsável pela ligação das proteínas com a matriz extracelular, está envolvida na migração celular e estas integrinas são altamente expressas nas células tumorais. (HAUBNER *et al.*, 1997; TARABOLETTI & MARGOSIO, 2001).

A fibronectina é uma glicoproteína adesiva, encontrada em todos os vertebrados. É um dímero composto por duas subunidades denominadas A e B (220 KDa) ligadas através de pontes dissulfetos próximas à região carboxi terminal. Possui diversas isoformas e algumas delas estão presentes na MEC como filamentos de fibronectina altamente insolúveis. Está largamente envolvida com migração e proliferação celular (RUOSLAHTI, 1998).

Escolhemos como proteínas a serem usadas nos próximos ensaios: a fibronectina e vitronectina, em função do Matrigel ser constituído por diferentes proteínas da matriz extracelular que incluem laminina, colágeno IV e entactina (KLEINMAN & MARTIN, 2005). Nestas condições a interpretação dos resultados ficaria prejudicada pelas múltiplas possibilidades de interações entre os receptores celulares e as diversas proteínas da matriz.

Após a definição da concentração do MeHg (Figura 2), da obtenção dos clones expressando ADAM23 (Figuras 3 e 4) e da definição das proteínas de MEC (Figura 5), foram feitos ensaios de adesão empregando os clones selecionados.

Foi avaliada a capacidade de adesão sobre fibronectina (Figura 6) e vitronectina (Figura 7) das células HeLa (selvagem, clones controles e clones expressando ADAM23) pré-tratadas ou não com MeHg por vinte e quatro horas.

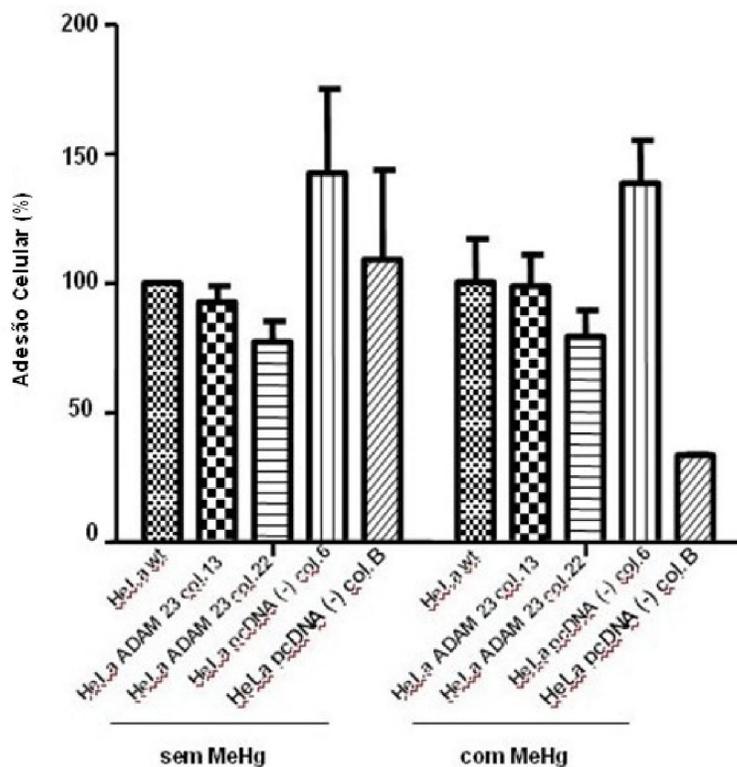


Figura 6. Ensaio de adesão celular com diferentes clones sobre fibronectina. Células HeLa wt, transfectadas com vetor vazio (pcDNA 3.1(-)) e com cDNA para ADAM 23 (pcDNA 3.1 ADAM23-HA) foram deixadas ou não sob tratamento com MeHg por 24 horas. Foram semeadas 1×10^5 células em poços tratados com fibronectina por 2 horas à 37°C 5% CO₂. Células não aderidas foram removidas através de lavagens e aquelas que permaneceram aderidas foram fixadas, coradas e a absorbância foi medida espectrofotometricamente à 650nm (n=5; p<0,05).

Na condição sem tratamento com MeHg foi observado que não há diferença estatística na capacidade adesiva sobre fibronectina dos clones expressando ou não ADAM23.

Paralelamente, após pré-tratamento das células com MeHg, não foi observado diferença na capacidade adesiva destes mesmos tipos celulares. Além disto, quando a adesão celular dos mesmos clones é comparada entre os grupos tratados ou não com MeHg, pode-se observar também que não há diferença significativa entre os mesmos, conforme Figura 6.

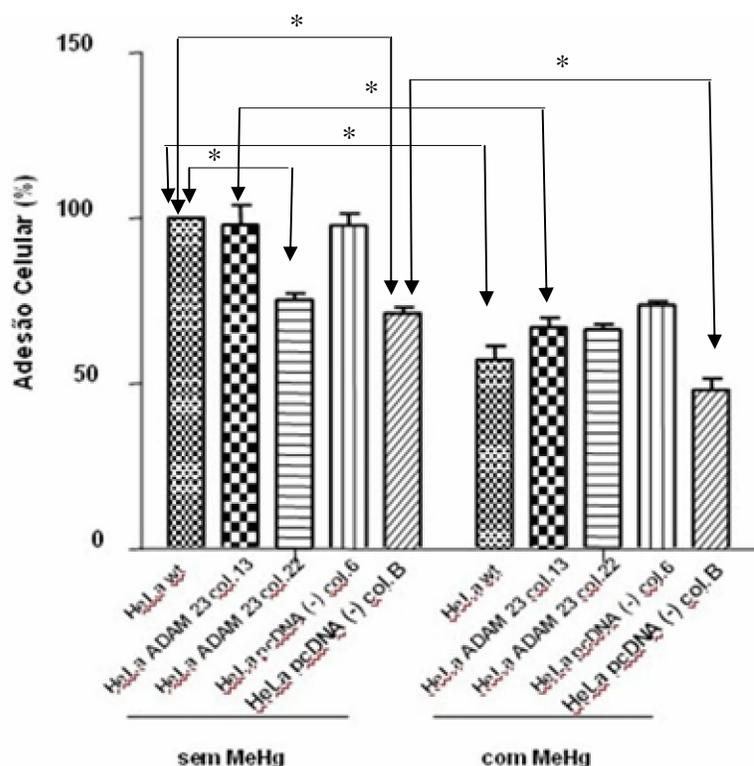


Figura 7. Ensaio de adesão celular com diferentes clones sobre vitronectina. Células HeLa wt, transfectadas com vetor vazio (pcDNA 3.1(-)) e com cDNA para ADAM 23 (pcDNA 3.1 ADAM23-HA) foram deixadas ou não sob tratamento com MeHg por 24 horas. Foram semeadas 10^5 em poços tratados com vitronectina por 2 horas à 37°C 5% CO₂. Células não aderidas foram removidas através de lavagens e aquelas que permaneceram aderidas foram fixadas, coradas e a absorbância foi medida espectrofotometricamente à 650nm (n=5; p<0,05). * = estatisticamente significativo

Enquanto a adesão dos diferentes clones de células HeLa sobre fibronectina não mostrou diferenças significativas, a adesão dos mesmos tipos celulares sobre vitronectina apresentou um padrão complexo.

Foi observada redução de aproximadamente 40% na adesão das células HeLa selvagens sobre vitronectina após tratamento das mesmas com MeHg. Partindo do princípio que não há morte celular nestas condições do tratamento com MeHg, a redução pode ser consequência da inativação direta de receptores celulares para vitronectina ou a ativação de moduladores negativos destes receptores (inativação indireta).

O comportamento do clone 13 frente ao desafio com MeHg é muito semelhante àquele observado para o tipo selvagem, ou seja, diminuição de cerca de 35% na adesão à vitronectina das células tratadas com MeHg. Tal resultado sugere que a expressão de ADAM23 não interfere na capacidade adesiva das células frente ao MeHg.

Fato interessante é que o clone 22, também expressando ADAM23, possui uma capacidade adesiva de 30% a menos que o tipo selvagem, sem tratamento com MeHg. Além disso, não há mudança na capacidade adesiva deste clone quando desafiado com MeHg, como observado para o clone 13 e para a linhagem selvagem.

Esta diversidade entre os clones 22 e 13 poderia ser explicada pela diferença de expressão de ADAM23 nos mesmos. De fato, o clone 22 expressa três vezes mais ADAM23 que o clone 13 (Figura 4). Esta diferença de expressão poderia explicar a menor capacidade adesiva do clone 22, uma vez que a ADAM23 poderia modular negativamente os receptores de vitronectina, ou por deslocamento de receptor (competição) ou por diminuição na sua expressão.

Foi observado também que o clone B, transfectado com vetor vazio e que também foi selecionado por resistência ao G418, possui comportamento semelhante ao clone 22. Neste caso, não podemos determinar a causa deste comportamento adesivo frente à vitronectina, entretanto, este poderia ser um evento clonal não relacionado diretamente à expressão e/ou do tratamento de interesse neste estudo. Comportamento semelhante foi observado quando este clone foi desafiado com MeHg e semeado sobre fibronectina (Figura 6).

A utilização de mais clones selecionados por G418 tanto expressando ectopicamente ADAM23 como aqueles transfectados com o vetor vazio, deverão conduzir a uma resposta conclusiva à possível participação de ADAM23 no processo de adesão sobre moléculas da matriz extracelular, bem como os possíveis fatos do MeHg sobre a capacidade adesiva destes tipos celulares.

6 CONCLUSÕES

- Foram produzidos clones estáveis de células HeLa (adenocarcinoma de cérvix humano) expressando ADAM23 a partir da transfecção permanente com o vetor pcDNA3.1-ADAM23 e seleção com a droga G418.
- Células HeLa transfectadas e expressando a proteína ADAM23 apresentaram diferentes comportamentos no seu processo adesivo quando aderidas sobre vitronectina e fibronectina tratadas e não tratadas com metilmercúrio. O tratamento das referidas células com MeHg resultou numa capacidade adesiva aumentada sobre matrigel e diminuída sobre vitronectina.
- Necessidade da produção de mais clones celulares expressando a proteína ADAM23, para estudos comparativos e conclusivos.

REFERÊNCIAS

AKAGI, H; MALM, O; HARADA, M; BRANCHES, FJP; PFEIFFER,WC; KATO, H. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. **Science of Total Environmental**. v. 175, p. 85-95, 1995.

ATCHISON, W. D. Extracellular calcium dependent and independent effects of methylmercury on spontaneous and potassium evoked release of acetylcholine at the neuromuscular junction. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 237, p. 672-680, 1986.

ATCHISON, W. D.; HARE, M. F. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. **FASEB J.** v. 8, p. 622-629, 1986.

ATCHISON, W. D.; NARAHASHI, T. Methylmercury induced depression of neuromuscular transmission in the rat. **Neurotoxicology**. v. 3, p. 37-50, 1982.

BAIRD C. Toxic heavy metals. **Environmental chemistry**. WH Freeman, New York, p.386-395, 1997.

BAKIR, F.; DAMLUJI, S. F.; AMIN-ZAKI, L.; MURTADHA, M.; KHALIDI, A. methylmercury poisoning in Iraq. **Science**. v. 181, p. 230-241, 1973.

BASTOS, W. R.; FONSECA, M. F.; PINTO, F. N.; REBELO, M. F.; SILVEIRA, E. G.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. Mercury persistence in indoor environments in the Amazon Region. **Environ Res**. v. 96, p. 235-238, 2004.

BLOBEL, C.P.; WHITE, J.M. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 4: 760-765, 1992.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins. **Methods Enzymol.** 248:345-68, 1995.

BONACKER, D.; STOIBER, T.; WANG, M.; BOHM, K. J.; UNGER, E. *et al.* Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. **Arch Toxicol.** 2004.

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.

CERRETI, D. P.; DU BOSE, R. F.; BLACK, R. A.; NELSON, N. Isolation of two novel metalloproteinase-disintegrin (ADAM) cDNAs that show testis-specific gene expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 263, p. 810-815, 1999.

CHANG, L. W.; HARTMANN, H. A. Electron microscopic histochemical study on the localization and distribution of mercury in the nervous system after mercury intoxication. **Exp. Neurol.** v. 35 (1), p. 122-37, 1972.

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. 1481-8, 2004.

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

CRESPO-LÓPEZ, M. E.; HERCULANO, A. M.; CORVELO, T. C.; DO NASCIMENTO, J. L. M. Mercurio y neurotoxicidad. **Rev. Neurol.** v. 40, p. 441-447, 2005.

DOLBEC, J.; MERGLER, D.; LARRIBE, F.; ROULET, M.; LEBEL, J.; LUCOTTE, M. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population. **Braz. Sci. Total Environ.** v. 271, p. 87-97, 2001.

EISLER, R. Mercury hazards from gold mining to humans, plants, and animals. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** v. 181, p. 139-98, 2004.

ERIE, J. C.; BUTZ, J. A.; GOOD, J. A.; ERIE, E. A.; BURRITT, M. F.; CAMERON, J. D. Heavy metal concentrations in human eyes. **Am J Ophthalmol.** v. 139, p. 888-93, 2005.

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

HARE, M. F.; ATCHISON, W. D. Comparative action of methylmercury and divalent inorganic mercury on nerve terminal and intraterminal mitochondrial membrane potentials. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 261, p. 166-172, 1992.

HARE, M. F.; MCGINNIS, K. M.; ATCHISON, W. D. Methylmercury increases intracellular concentration of Ca⁺⁺ and heavy metals in NG108-15 cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 266, p. 1626-1635, 1993.

HARE, M. F.; ATCHISON, W. D. Methylmercury mobilizes Ca⁺⁺ from intracellular stores sensitive to inositol 1,4,5-trisphosphate in NG108-15 cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 272, p. 1016-1023, 1995.

HAUBNER, R.; FINSINGER, D.; KESSLER, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha_v \beta_3$ integrin for a new cancer therapy. **Angew. Chem. Int. Ed. Eng.** v. 36, p. 1374-1389, 1997.

HARLOW, E. & LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual.** 1 ed. Cold Spring Harbor Laboratory: USA. 1998.

HYLANDER, L. D.; MEILI, M.; OLIVEIRA, L. J.; GUIMARÃES, J. R. D.; ARAÚJO, D. M.; NEVES, R. P.; STACHIW, R.; BARROS, A. J. P.; SILVA, G. D. Relationship of mercury with aluminum, iron and manganese oxy-hydroxides in sediments from the Alto Pantanal, Brazil. **The Science of the Total Environment.** v. 260, p. 97-107, 2000. (A)

HYLANDER, L. D.; PINTO, F. N.; GUIMARÃES, J. R. D.; MEILI, M.; OLIVEIRA, L. J.; SILVA, E. C. Fish mercury concentration in the Alto Pantanal, Brazil: influence of season and water parameters. **The Science of the Total Environment.** v. 261, p. 9-20, 2000. (B)

IGNÁCIO, A. R. A.; COSTA, M. B.; KEHRIG, H. A.; FRÓES, M. M.; MALM, O.; HEDIN-PEREIRA, C. Methylmercury contamination increases proliferation in the subventricular zone of adult rats. **Soc. Neurosci.** v. 552.11, 2005.

JUANG, M. S.; YONEMURA, K. Increased spontaneous transmitter release from presynaptic nerve terminal by methylmercuric chloride. **Nature.** v. 256(5514), p. 211-3, 1975.

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.

KAUPPINEN, R. A.; KOMULAINEN, H.; TAIPALE, H. Cellular mechanisms underlying the increase in cytosolic free calcium concentration induced by methylmercury in cerebrocortical synaptosomes from guinea pig. **J. Pharm. Exp. Ther.** v. 248, p. 1248-1254, 1989.

KIRSCH, P.; HAFNER, M.; ZENTGRAF, H.; SCHILLING, L. Time course of fluorescence intensity and protein expression in HeLa cells stably transfected with hrGFP. **Mol. Cells.** v. 15, p. 341-348, 2003.

KLEINMAN, K. H.; MARTIN, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. **Seminars in Cancer Biology.** v. 15, p. 378-386, 2005.

LEONG, C. C.; SYED, N. I.; LORSCHIEDER, F. L. Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity of nerve growth cones following in vitro exposure to mercury. **Neuroreport.** v. 12, p.733-737, 2001.

LILIOM, K.; WÁGNER, G.; PÁCZ, A.; CASCANTE, M.; KOVÁCS, J.; OVÁDI, J. Organization-dependent effects of toxic bivalent ions. Microtubule assembly and glycolysis. **Eur J Biochem.** v. 267, p. 4731-4739, 2000.

LUM, L.; REID, M.S.; BLOBEL, C.P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. **J. Biol. Chem.** v.273, p. 26236–26247, 1998.

MALM, O.; BRANCHES, F. J. P.; AKAGI, H.; CASTRO, M. B.; PFEIFFER, W. C.; HARADA, M.; BASTOS, W. R.; KATO, H. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajos river basin, Brazil. **Sci. Total Environ.** v. 175(2), p. 141-150, 1995a.

MALM, O.; CASTRO, M. B.; BASTOS, W. R.; BRANCHES, F. J. P.; GUIMARÃES, J. R. D.; ZUFFO, C. E.; PFEIFFER, W. C. An assessment of mercury pollution in different goldmining areas, Amazon Brazil. **Sci. Total Environ.** v. 175(2), p. 127-140, 1995b.

MALM, O.; PALERMO, E. F. A.; SANTOS, H. S. B.; REBELO, M. F.; KEHRIG, H. A.; GUIMARÃES, J. R. D.; TORRES, J. P. M.; FONSECA, M. F.; PFEIFFER, W. C.; MEIRE, R. O. Transport and cycling of mercury in Tucuruí reservoir, Amazon Brazil: 20 years after fulfillment. **RMZ-Materials and Geoenvironment.** v. 51, p. 1195-1198, 2004.

MARTINS, V. R.; GRANER, E.; ABREU, J. G.; SOUZA, S. J.; MERCADANTE, A. F.; VEIGA, S. S.; ZANATA, S. M.; MOURA NETO, V.; BRENTANI, R. R. Complementary

hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nature Med.** v. 3, p. 1376-1382, 1997.

MARTY, S.; ATCHISON, W. D. Pathways mediating Ca^{2+} Entry in Rat Cerebellar Granule Cells Following in VITRO Exposure to Methylmercury. **Toxicology and Pharmacology.** v. 47, p. 319-330, 1997.

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

MIURA, K.; HIMENO, S.; KOIDE N.; IMURA N. Effects of methylmercury and inorganic mercury on the growth of nerve fibers in cultured chick dorsal root ganglia. **Health Sci.** v.46, p. 733-737, 2000.

MIURA, K.; KOIDE, N.; HIMENO, S.; NAKAGAWA, I.; IMURA, N. The involvement of microtubular disruption in methylmercury induced apoptosis in neuronal and nonneuronal cell lines. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 160, p. 279-288, 1999.

MOSHER, D. F.; SITTLE, J.; WU, C.; MC DONALD, J.A. Assembly of extracellular matrix. **Ann. Opin. Cell Biol.** v. 4, p. 810-818, 1992.

MOTTET, N. K.; VAHTER, M. E.; CHARLESTON, J. S.; FRIBERG, L. T. Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance. **Met Ions Biol System.** v. 34, p. 371-401, 1984.

NIEWIAROWSKI, S.; MACLANE, M. A.; KLOCZEWIAK, M.; STEWART, G. J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Semin. HematoL.** v. 31, p.289-300, 1994.

PENDERGRASS, J. C.; HALEY, B. E.; VIMY, M. J.; WINFIELD, S. A.; LORSCHIEDER, F. L. Mercury vapor inhalation inhibits binding of GTP to tubulin in rat brain: similarity to a molecular lesion in Alzheimer diseased brain. **Neurotoxicol.** v. 18, p.315-324, 1997.

PINHEIRO, M. C. N.; NAKANISHI, J.; OIKAWA, T.; GUIMARÃES, G.;QUARESMA, M.; CARDOSO, B.; AMORAS, W. W.; HARADA, M.; MAGNO, C.; VIEIRA, J. L. F.; XAVIER, M. B.; BACELAR, D. R. Exposição humana ao metilmercúrio em comunidades ribeirinhas da Região do Tapajós, Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 33(3), p. 265-269, 2000.

RUOSLAHTI, E. Fibronectin and its receptors. **Annual Review of Biochemistry.** v.57, p. 375-413, 1998.

SAGANE, K.; OHYA, Y.; HASEGAWA, Y.; TANAKA, I. Metalloproteinase-like, desintegrin-like, cysteine-rich proteins MCD2 and MCD3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochem. J.** v. 334, p. 93-98, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA. 2001. 3 v.

SEALS, D.F.; COURTNEIDGE, S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev.** v. 17, p. 7-30, 2003.

SHAFER, T. J.; ATCHISON, W. D. Block of Ca uptake into synaptosomes by methylmercury: Ca²⁺ and Na⁺ dependency. **J. Pharmacology Exp. Ther.** v. 248, p. 696-702, 1989.

SHRISVASTAV, B. B.; BRODWICK, M. S.; NARAHASHI, T. Methylmercury: Effects on electrical properties of squid axon membranes. **Life Sci.** v. 18, p. 1077-1082, 1976.

SILVA-PEREIRA, L. C.; CARDOSO, P. C. S.; LEITE, D. S.; BAHIA, M. O.; BASTOS, W. R.; SMITH, M. A. C. Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes in vitro. **Braz J Med Biol Res.** v. 38, p. 901-7, 2005.

SOUTHERN, P. J.; BERG, P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. **J. Molec. Appl. Gen.** v. 1, p. 327-330, 1982.

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.

TARABOLETTI, G.; MARGOSIO, B. Antiangiogenic and vascular therapy for cancer. **Curr. Opin. Pharmacol.** v. 1, n. 4, p. 378-384, 2001.

TAKAHATA, N.; HAYASHI, H.; WATANABE, S.; ANSO, T. Accumulation of mercury in the brains of two autopsy cases with chronic inorganic mercury poisoning. **Folia Psychiatr Neurol Jpn.** v. 24(1), p. 59-69, 1970.

TAKEUCHI, T.; MORIKAWA, N.; MASTUMOTO, H.; SHIRAISHI, Y. A pathological study of Minamata disease in Japan. **Acta Neuropathol.** v. 2, p. 40-57, 1962.

TAVARES, P. C.; MONTEIRO, L. R.; LOPES, R. J.; BOLTON, M.; FURNESS, R. W. Contaminação por mercúrio em avifauna a nidificar em salinas - Mercury contamination in avifauna breeding in the salt pans. **III Congresso de Ornitologia, SPEA**, 1-4 Nov 2001, C. Branco, 2001.

THIER, R.; BONACKER, D.; STOIBER, T.; BOHM, K. J.; WANG, M.; UNGER, E. Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. **Toxicol Lett.** v. 140-1, p. 75-81, 2003.

TOIMELA, T. & TAHTI, H. Mitochondrial viability and apoptosis induced by aluminium, mercury and methylmercury in cell lines of neural origin. **Arch Toxicol.** v. 78, p. 565-74, 2004.

TRAXINGER, D. L.; ATCHISON, W. D. Reversal of methylmercury induced block of nerve evoked release of acetylcholine at the neuromuscular junction. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 90, p. 23-33, 1987.

VAN WART, H. E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloprotease activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 87, p. 5578-5582, 1990.

VARNER, J. A.; CHERESH, D. A. Integrins and Cancer. **Curr. Opin. Cell. Biol.** v. 8, n. 6, p. 724-730, 1996.

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, n. 2, p. 275-278, 1995.

YANG, P.; BAKER, T.; HAGG, T. The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. **Prog. Neurobiol.** v. 79, p. 73-94, 2006.

YOKOO, E. M. Avaliação da exposição ao metilmercúrio na população ribeirinha da baixada cuiabana, no Pantanal mato-grossense–Brasil. **Tese de Doutorado**, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Medicina Social. Rio de Janeiro, 117 p., 2001.

YUAN, Y.; ATCHISON, W. D. Disruption by methylmercury of membrane excitability and synaptic transmission of CA1 neurons in hippocampal slices of the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 120, p. 203-215, 1993.

YUAN, Y.; ATCHISON, W. D. Comparative effects of inorganic divalent mercury, methylmercury and phenylmercury on membrane excitability and synaptic transmission of CA1 neurons in hippocampal slices of the rat. **NeuroToxicology.** v. 15, p. 403-412, 1994.