

Avaliação dos níveis e atividade da ADAM10 em diferentes meios biológicos

*Evaluation of ADAM10 levels and activity in
different biological media*

*Evaluación de los niveles y actividad de ADAM10
en diferentes entornos biológicos*

Rafaela Peron
Izabela Pereira Vatanabe
Patricia Regina Manzine
Marina Mantellatto Grigoli
Márcia Regina Cominetti

RESUMO: A doença de Alzheimer (DA) afeta milhões de pessoas no mundo e resulta de dois marcos patológicos principais, os emaranhados neurofibrilares e a placas senis. Estas últimas derivam da clivagem da proteína precursora do amiloide (APP) pela via amiloidogênica, o que é evitado pela α -secretase ADAM10. Este estudo buscou avaliar níveis e atividade da ADAM10 em diferentes meios biológicos de indivíduos com DA, comparando estes achados com os obtidos em sujeitos sem alteração cognitiva, de modo a colaborar para o reforço diagnóstico da doença.

Palavras-chave: ADAM10; Biomarcador; Doença de Alzheimer.

ABSTRACT: *Alzheimer's disease (AD) affects millions of people worldwide and results from two major pathological hallmarks, neurofibrillary tangles and senile plaques. The latter are derived from the cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by the amyloidogenic pathway, which is avoided by the α -secretase ADAM10. This study aimed to evaluate ADAM10 levels and activity in different biological media of individuals with AD, comparing these findings with those obtained in subjects without cognitive impairment, in order to contribute to the diagnostic reinforcement of the disease.*

Keywords: ADAM10; Biomarker; Alzheimer's disease.

RESUMEN: *La enfermedad de Alzheimer (EA) afecta a millones de personas en todo el mundo y es el resultado de dos hitos patológicos principales, ovillos neurofibrilares y placas seniles. Estos últimos se derivan de la escisión de la proteína precursora amiloide (APP) por la vía amiloidogénica, que es prevenida por AM-secretasa ADAM10. Este estudio buscó evaluar los niveles y actividad de ADAM10 en diferentes ambientes biológicos de individuos con EA, comparando estos hallazgos con los obtenidos en sujetos sin deterioro cognitivo, con el fin de colaborar para reforzar el diagnóstico de la enfermedad.*

Palabras clave: ADAM10; Biomarcador; Enfermedad de Alzheimer.

Introdução

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa gradual e progressiva caracterizada pela atrofia cortical predominante no lobo temporal medial, e microscopicamente, perdas neuronais extensas e depósitos fibrilares anormais intra e extracelulares, denominados emaranhados neurofibrilares e placas senis, respectivamente (Kumar, & Tsao, 2018). Os emaranhados neurofibrilares são formados pela proteína Tau, responsável pela manutenção estrutural e funcional do citoesqueleto dos axônios neuronais.

Entretanto na DA, a Tau sofre um processo de hiperfosforilação, gerando a dissociação dos microtúbulos neuronais que, por sua vez, acarreta na formação dos emaranhados intraneuronais e colapso da estrutura neuronal. Tal fenômeno ocorre inicialmente no hipocampo e em seguida pode ser observado em todo o córtex cerebral (Kumar, & Tsao, 2018).

As placas senis surgem a partir da deposição excessiva e subsequente agregação do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) no cérebro. Este peptídeo é derivado da clivagem da proteína precursora de amiloide (APP) pela ação de proteases (β e γ -secretase). A clivagem sequencial por β e depois por γ -secretases resulta em peptídeos de 40 e 42 aminoácidos. O $A\beta$ 42 é mais hidrofóbico e apresenta maior potencial de agregação; dessa forma, seu acúmulo gera toxicidade neuronal. A deposição amiloide ocorre em torno dos vasos meníngeos e cerebrais e junto aos emaranhados neurofibrilares, caracteriza a DA (Kumar, & Tsao, 2018).

Atualmente o diagnóstico provável da DA é firmado pelo quadro clínico e pela exclusão de outras demências, e é realizado principalmente por baterias neuropsicológicas, exames clínicos e de imagem. Dessa forma, nos últimos anos, a literatura tem mostrado o grande esforço de vários grupos de pesquisa no mundo, analisando moléculas potencialmente biomarcadoras para DA (Janelidze, *et al.*, 2018; Nabers, *et al.*, 2018; Nakamura, *et al.*, 2018). Dentre tais moléculas, os achados em tecidos periféricos como o sangue são de particular importância, por representarem um método de baixo custo e de coleta minimamente invasiva. Nesse âmbito, a desintegrina e metaloprotease ADAM10 é um exemplo de molécula facilmente identificada no sangue que tem sido estudada para tal finalidade.

A ADAM10 é a principal protease de membrana e está envolvida em diferentes processos fisiológicos e patológicos, como desenvolvimento embrionário, adesão celular, transdução de sinais, participação no sistema imune, e com funções em doenças como o câncer e DA (Lichtenthaler, 2011). Pela via não amiloidogênica, a APP é clivada pela α -secretase ADAM10 entre os aminoácidos Lys16 e Leu17 no meio da região do $A\beta$, deste modo, liberando a sAPP α - uma estrutura com funções neurotrópica e neuroprotetora - restando o resíduo C83 na membrana, inibindo assim a produção do $A\beta$ amiloidogênico (Morishima-Kawashima, & Ihara, 2002).

O peptídeo A β é composto de 39-43 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 4kDa e compreende um fragmento proteolítico da APP liberado pelas clivagens sequenciais via β e γ -secretases (Evin, Zhu, Holsinger, Masters, & Li, 2003). Contudo, a rota predominante de processamento da APP consiste de clivagens sucessivas por α e γ -secretases. Devido à formação do A β ocorrer no início da cascata de geração das placas amiloides, os mecanismos de formação e prevenção da formação de A β são alvos de intensa pesquisa, tanto pela academia quanto pelas companhias farmacêuticas (Lichtenthaler, 2011).

Nesse sentido, a ADAM10 tem sido sugerida como um potencial biomarcador da DA (Manzine, *et al.*, 2013a; Manzine, *et al.*, 2013b; Manzine, *et al.*, 2013c; Manzine, *et al.*, 2015; Manzine, *et al.*, 2018; Marcello, *et al.*, 2017).

Objetivo

Avaliar o nível e a atividade da protease ADAM10 em diferentes meios biológicos (LCR, plasma, plaquetas e soro) de indivíduos com TNCL e DA, comparando estes achados com os obtidos em sujeitos sem alteração cognitiva. Desta forma, o desenvolvimento deste estudo pretendeu colaborar para o reforço diagnóstico da DA e melhor entendimento da biologia da ADAM10.

Métodos

Todas as etapas deste estudo obedeceram às diretrizes sobre a Ética na Pesquisa com seres humanos (CAEE 51995615.3.0000.5504). Trata-se de estudos desenvolvidos no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) da UFSCar, São Carlos, SP, com pareceria do Departamento de Neurologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Critérios de inclusão e exclusão específicos e instrumentos de avaliação cognitiva foram aplicados nos participantes da pesquisa. As proteínas totais das amostras foram quantificadas pelo kit de quantificação BCA (Thermo Scientific). Após isso, foi realizada a técnica de *western blotting* para a identificação da ADAM10. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-ADAM10 (ProScience) e secundários Goat Anti-Rabbit - HRP (Abcam).

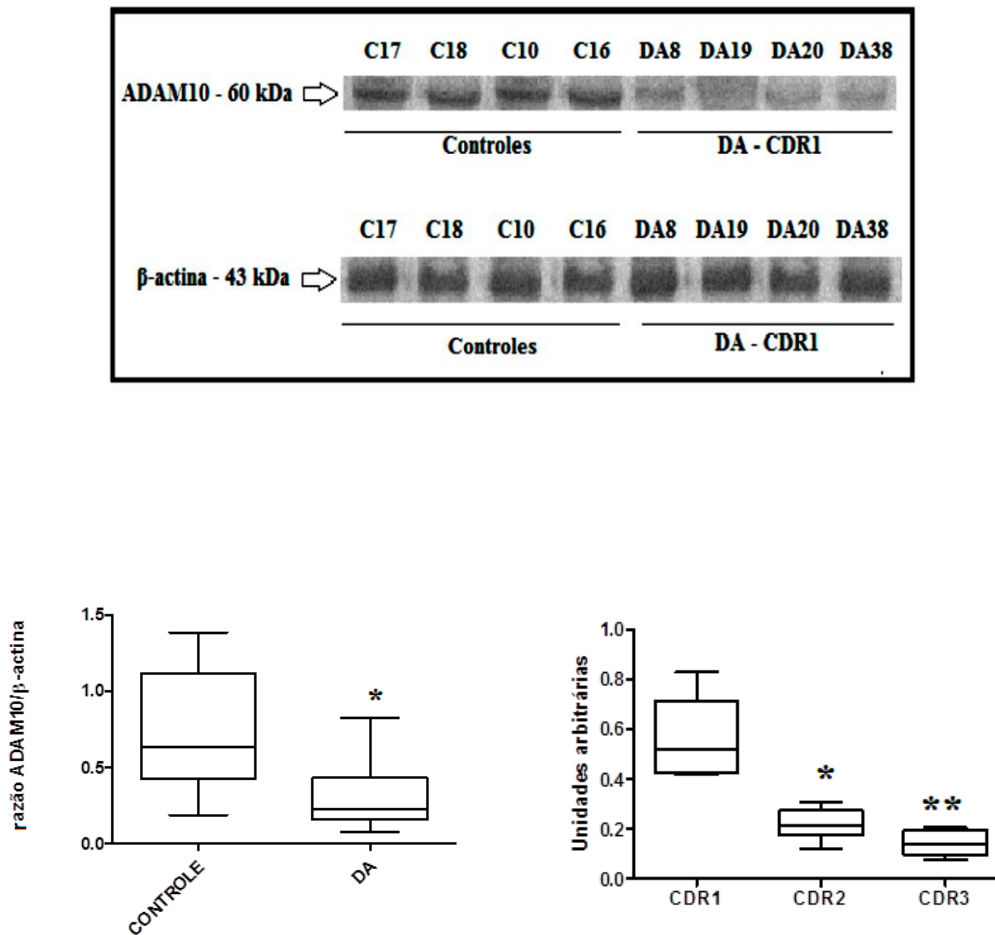
A albumina, abundante no plasma, soro e LCR, foi utilizada como normalizadora (controle endógeno) na quantificação das amostras. Para as amostras plaquetárias, o anticorpo para β -actina 1-19 – HRP (Santa Cruz) foi utilizado como controle endógeno. A revelação e quantificação nos níveis da ADAM10 das amostras foram realizadas no aparelho ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad). Os dados obtidos foram analisados por meio de método quantitativo de volume ajustado pelo software *Image Lab* e as análises estatísticas pelo *software GraphPad Prism*, adotando nível de significância de 5%.

O ensaio de atividade da ADAM10 foi realizado no leitor de fluorescência Sinergy H1, com utilização do peptídeo fluorogênico (Fluorogenic Peptide Substrate III-R&D Systems) como substrato. As amostras foram analisadas em duplicata e também foram utilizadas amostras de controle negativo e positivo, este último contendo a ADAM10 recombinante humana (R&D Systems), a qual também foi utilizada para construção da curva padrão de quantificação. Amostras de plaquetas também foram utilizadas como controle positivo no ensaio de atividade. Para checar a especificidade do sinal obtido, as amostras foram analisadas na presença ou ausência do inibidor específico para a ADAM10 GI254023X (R&D Systems). O aumento da intensidade da fluorescência nas amostras foi determinado pelo leitor de fluorescência. Os valores das amostras com e sem inibidor de ADAM10 foram equacionadas determinando concentrações em ng/mL.

Resultados e Discussão

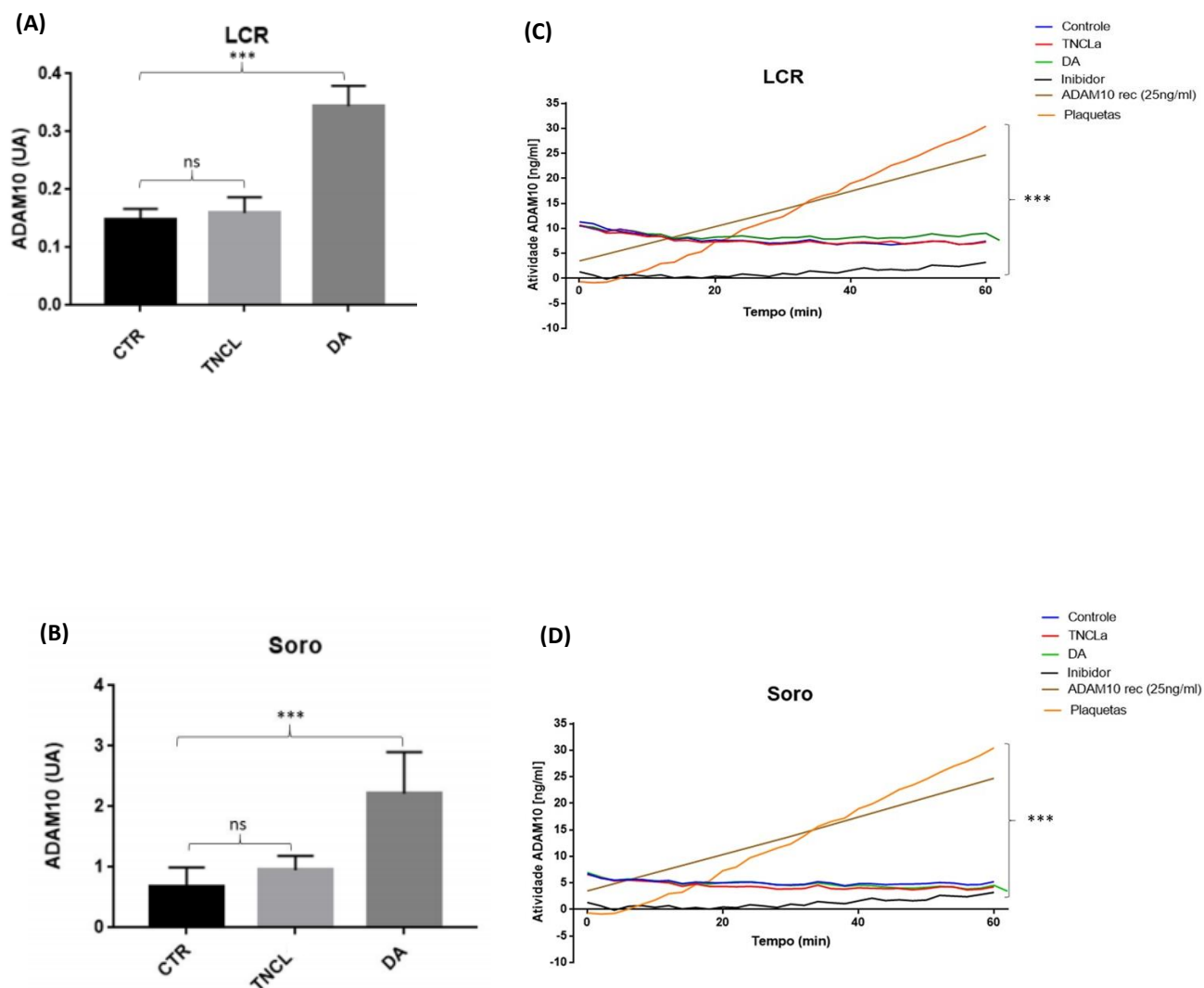
Os resultados **em plaquetas** mostram que os níveis de ADAM10 estão reduzidos em idosos com DA e que esta redução se intensifica com o avanço da doença (Figura 1). Os testes neuropsicológicos (MEEM e CDR) apresentam correlações significativas com os valores da ADAM10 ($p = 0,01$). O ponto de corte $< 0,4212$ da curva ROC capta sensibilidade de 70% e especificidade de 80,77%, para a presença de DA, segundo os níveis da ADAM10.

Figura 1. Níveis Plaquetários da ADAM10 em sujeitos-controles e com DA, e classificados segundo CDR. Controle, n = 30; DA, n = 30. Teste estatístico U de Mann-Whitney; Controle vs DA, * $p < 0,0001$; CDR1 vs CDR2 * $p = 0,0001$; CDR1 vs CDR3 *** $p < 0,0001$; CDR2 vs CDR3 * $p = 0,0049$



Analisando o **LCR e o soro**, notamos que os níveis da forma que chamamos de ADAM10 solúvel (50 kDa) está aumentado na DA, quando comparado aos sujeitos controle e TNCL. Ainda, mostramos que a atividade proteolítica da ADAM10 foi significativamente maior nas plaquetas, quando comparado às amostras de LCR e soro destes mesmos pacientes (Figura 2).

Figura 2. Níveis e atividade da ADAM10. (A) Gráfico de dispersão dos níveis de ADAM10 no LCR entre os grupos. ADAM10/soro albumina para os grupos de idosos avaliados (controle, n=08; TNCL, n= 7; DA n= 09). Teste estatístico U de Mann-Whitney; ***DA vs Controle $p \leq 0,001$; ***DA vs TNCL $p \leq 0,001$; (B) Gráfico de dispersão dos níveis de ADAM10 no soro entre os grupos. ADAM10/soro albumina para os grupos de idosos avaliados (controle, n=08; TNCL, n= 7; DA n= 09). ***DA vs Controle $p \leq 0,001$; ***DA vs TNCL $p \leq 0,001$; (C) Atividade da ADAM10 no LCR. Análise da atividade de ADAM10 ao longo do tempo entre os grupos. Os grupos CTR, TNCL e DA apresentaram diferença estatística significativa, quando comparados às plaquetas (** $p \leq 0,001$); (D) Atividade da ADAM10 no soro. Análise da atividade de ADAM10 ao longo do tempo entre os grupos. Os grupos CTR, TNCL e DA apresentaram diferença estatística significativa, quando comparados às plaquetas (** $p < 0.001$)



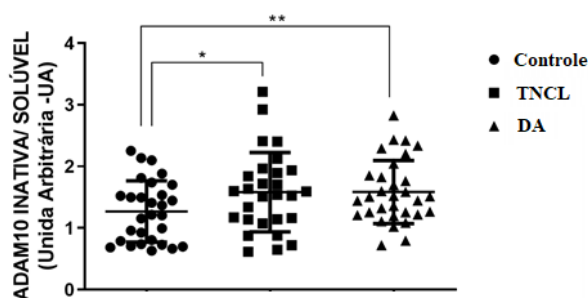
Os níveis plasmáticos da ADAM10 solúvel e inativa (50-55kDa) também estão aumentados em idosos com TNCL ($p = 0,0325$) e DA ($p = 0,0129$), em comparação aos controles. Entretanto, entre os grupos TNCL e DA não foram encontradas diferenças significativas ($p = 0,4790$) (Figura 3).

Verifica-se que as análises dos níveis da ADAM10 no LCR, plasma e soro complementam os observados em plaquetas. Supostamente, a ADAM10 no LCR, plasma e soro não se encontra ancorada na membrana plasmática e, portanto, não apresenta atividade de protease (está inativa).

Acredita-se que, nestes meios, a ADAM10 adquira menor massa (50kDa), ocasionada pela perda dos domínios transmembrana e citoplasmático e, conseqüentemente, é encontrada solúvel no meio.

Por outro lado, a ADAM10 em plaquetas (60kDa) encontra-se reduzida em sujeitos com DA, pois, por apresentar-se ancorada na membrana plasmática, mantém sua atividade de α -secretase. Sendo que sua principal atividade na DA é a inibição da formação do peptídeo A β , sua forma ativa reduzida mostra-se condizente com os mecanismos fisiológicos da doença.

Figura 3. Gráfico de dispersão dos níveis plasmáticos da ADAM10 solúvel entre os grupos. O gráfico indica a razão da ADAM10/soro albumina para os grupos de idosos avaliados (TNCL, $n = 29$; DA, $n = 31$; Controle, $n = 28$). Teste estatístico U de Mann-Whitney (Controle vs TNCL* $p = 0,0325$; Controle vs DA ** $p = 0,0129$)



Nas amostras de LCR e soro não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de ADAM10 solúvel entre os pacientes com TNCL, em comparação com controles cognitivamente saudáveis. Esta diferença (TNCL vs Controle) foi apenas observada no plasma destes pacientes. Entretanto, o grupo DA apresentou aumento da ADAM10 solúvel nestes três meios biológicos (LCR, soro e plasma) em comparação ao grupo-controle, de modo a destacar a análise da ADAM10 solúvel/inativa do plasma como uma potencial ferramenta biomarcadora precoce de alterações cognitivas, como o TNCL.

Além disso, já foi demonstrado na literatura que os níveis da ADAM10 em plaquetas estão aumentados no envelhecimento saudável (Schuck, Wolf, Fellgiebel, & Endres, 2016). e reduzidas em indivíduos com DA (Manzine, *et al.*, 2013c, Colciaghi, *et al.*, 2002).

Outros autores já mostraram que a ADAM10 é sintetizada de forma inativa (com a presença do pró-domínio). Durante o seu transporte ao longo da via secretória, algumas enzimas clivam o pró-domínio da ADAM10, de modo a liberar sua forma madura/ativa, a qual garante sua atividade enzimática na membrana plasmática (Anders, Gilbert, Garten, Postina, & Fahrenholz, 2001, Lammich, *et al.*, 1999). Do mesmo modo já foi demonstrado que o recrutamento da ADAM10 na membrana sináptica e, conseqüentemente, sua atividade, são favorecidos através da ligação com a proteína SAP97.

Conseqüentemente, esse mecanismo exemplifica uma nova via de ativação da clivagem fisiológica da ADAM10 nas sinapses neurais, podendo, assim, explicar a presença de atividade destas proteínas apenas quando as mesmas estão vistas ancoradas à membrana, sejam essas neuronais ou plaquetárias (Marcello, Borroni, Pelucchi, Gardoni, & Di Luca, 2017).

Estudos futuros do nosso grupo de pesquisa visam a analisar a atividade da ADAM10 através de técnicas de fracionamento celular em diferentes linhagens celulares, com o intuito de colaborar, fortalecer e esclarecer estes resultados observados. A procura por biomarcadores em doenças neurodegenerativas como a DA são de extrema importância para a definição de diagnósticos mais precisos e precoces para estas doenças.

Os resultados encontrados neste trabalho evidenciam a relevância e o grande potencial da ADAM10 sanguínea como uma possível ferramenta biomarcadora para a DA e TNCL. Dessa forma, a relevância deste estudo se dá por meio do aprimoramento sobre o conhecimento dos biomarcadores periféricos, em especial a ADAM10, que pode vir a contribuir para a precisão diagnóstica e a prescrição de fármacos nos tratamentos dessas alterações cognitivas.

Referências

Anders, A. Gilbert, S., Garten, W., Postina, R., & Fahrenholz, F. (2001). Regulation of the α -secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *The FASEB Journal*, 15(10), 1837-1839. Recuperado em 01 março, 2020, de: <https://doi.org/10.1096/fj.01-0007fje>.

Colciaghi, F., Borroni, B., Pastorino, L., Marcello, E., Zimmermann, M., Cattabeni, F., Padovani, A. & Di Luca, M. (2002). α -Secretase ADAM10 as well as α APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Molecular Medicine*, 8(2), 67-74. Recuperado em 01 março, 2020, de: <https://molmed.biomedcentral.com/articles/10.1007/BF03402076>.

Evin, G., Zhu, A., Holsinger, R. M. D., Masters, C. L., & Li, Q. X. (2003). Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets. *Journal of neuroscience research*, 74(3), 386-392. Recuperado em 01 março, 2020, de: DOI: 10.1002/jnr.10745.

Janelidze, S., Mattsson, N., Stomrud, E., Lindberg, O., Palmqvist, S., Zetterberg, H., Blennow, K., & Hansson, O. (2018). CSF biomarkers of neuroinflammation and cerebrovascular dysfunction in early Alzheimer disease. *Neurology*, 91(9), e867-e877. Recuperado em 01 março, 2020, de: DOI: 10.1212/WNL.0000000000006082.

Kumar, A., Sidhu, J., Goyal, A., & Tsao, J. W. (2020). Alzheimer Disease. In: *StatPearls* (Internet). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Recuperado em 01 março, 2020, de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>.

Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., & Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3922-3927. Recuperado em 01 março, 2020, de: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3922>.

Lichtenthaler, S. F. (2011). Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *Journal of Neurochemistry*, 116(1), 10-21. Recuperado em 01 março, 2020, de: DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.07081.x.

Manzine, P. R., Barham, E. J., Vale, F. A. C., Selistre-de-Araújo, H. S., Pavarini, S. C. I., & Cominetti, M. R. (2013a). Platelet a disintegrin and metallopeptidase 10 expression correlates with clock drawing test scores in Alzheimer's disease. *International journal of geriatric psychiatry*, 29(4), 414-420. Recuperado em 01 março, 2020, de: <https://doi.org/10.1002/gps.4020>.

Manzine, P. R., Barham, E. J., Vale, F. D. A. C. D., Selistre-de-Araújo, H. S., Pavarini, S. C. I., & Cominetti, M. R. (2013b). Correlation between mini-mental state examination and platelet ADAM10 expression in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 36(2), 253-260. Recuperado em 01 março, 2020, de: DOI: 10.3233/jad-130125.

Manzine, P. R., de França Bram, J. M., Barham, E. J., Do Vale, F. D. A. C., Selistre-de-Araújo, H. S., Cominetti, M. R., & Pavarini, S. C. I. (2013c). ADAM10 as a biomarker for Alzheimer's disease: a study with Brazilian elderly. *Dementia and geriatric Cognitive Disorders*, 35(1-2), 58-66. Recuperado em 01 março, 2020, de: DOI: 10.1159/000345983.

Manzine, P. R., Marcello, E., Borroni, B., Kamphuis, W., Hol, E., Padovani, A., Nascimento, C. C., Bueno, P. de G., Vale, F. A. C., Pavarini, S. C. I., Di Luca, M., & Cominetti, M. R. (2015). ADAM10 gene expression in the blood cells of Alzheimer's disease patients and mild cognitive impairment subjects. *Biomarkers*, 20(3), 196-201. Recuperado em 01 março, 2020, de: DOI: 10.3109/1354750X.2015.1062554.

Manzine, P. R., Pelucchi, S., Horst, M. A., Vale, F. A., Pavarini, S. C. I., Audano, M., Mitro, N., Di Luca, M., Marcello, E., & Cominetti, M. R. (2018). microRNA 221 Targets ADAM10 mRNA and is Downregulated in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 61(1), 113-123. Recuperado em 01 março, 2020, de: DOI: 10.3233/JAD-170592.

Marcello, E., Borroni, B., Pelucchi, S., Gardoni, F., & Di Luca, M. (2017). ADAM10 as a therapeutic target for brain diseases: from developmental disorders to Alzheimer's disease. *Expert opinion on therapeutic targets*, 21(11), 1017-1026. Recuperado em 01 março, 2020, de: DOI: 10.1080/14728222.2017.1386176.

Morishima-Kawashima, M., & Ihara, Y. (2002). Alzheimer's disease: β -Amyloid protein and tau. *Journal of neuroscience research*, 70(3), 392-401. Recuperado em 01 março, 2020, de: <https://doi.org/10.1002/jnr.10355>.

Nabers, A., Perna, L., Lange, J., Mons, U., Schartner, J., Guldnhaupt, J., Saum, K-U, Janelidze, S., Holleczek, B., Rujescu, D., Hansson, O., Gerwert, K., & Brenner, H. (2018). Amyloid blood biomarker detects Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 10(5), 01-11. Recuperado em 01 março, 2020, de: <https://www.embopress.org/doi/pdf/10.15252/emmm.201708763>.

Nakamura, A., Kaneko, N., Villemagne, V. L., Kato, T., Doecke, J., Vincent Doré, V., Fowler, C., Li, Q-X., Martins, R., Rowe, C., Tomita, T., Matsuzaki, M., Ishii, K., Ishii, K., Arahata, Y., Iwamoto, S., Ito, K., Tanaka, K., Masters, C. L., & Yanagisawa, K. (2018). High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*, *554*(7691), 249-254. Recuperado em 01 março, 2020, de: <https://www.nature.com/articles/nature25456>.

Schuck, F., Wolf, D., Fellgiebel, A., & Endres, K. (2016). Increase of α -secretase ADAM10 in platelets along cognitively healthy aging. *Journal of Alzheimer's Disease*, *50*(3), 817-826. Recuperado em 01 março, 2020, de: DOI: 10.3233/JAD-150737.

Rafaela Peron – Fisioterapeuta. Mestre em Gerontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar. Doutoranda em Fisioterapia, UFSCar, atuando nas áreas de Doenças Crônicas e Dor. São Carlos, SP, Brasil.

E-mail: rafaelaperoncardoso@gmail.com

Izabela Pereira Vatanabe – Bacharel em Gerontologia, Departamento de Gerontologia, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar. Mestre em Ciências Fisiológicas, PIPGCG, UFSCar. Doutoranda, Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFSCar. São Carlos, SP, Brasil.

E-mail: izabelavatanabel@gmail.com

Patricia Regina Manzine – Enfermeira, Mestre em Enfermagem, UFSCar. Doutora em Ciências, concentração em Ciências Fisiológicas. Pós-Doutora em Gerontologia, UFSCar e Pós-Doutora CIBERNED-Biomedical Research Networking Center in Neurodegenerative Diseases, Universidade de Barcelona, Espanha e Universidade Federal de São Carlos. Docente UFSCar, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Gerontologia, DGERO. São Carlos, SP, Brasil.

E-mail: pmanzine@ufscar.br

Marina Mantellatto Grigoli – Graduanda em Gerontologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

E-mail: marinagerontologia017@outlook.com

Márcia Regina Cominetti - Professora Associada, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil. Coordenadora do LABEN, Laboratório de Biologia do Envelhecimento, Departamento de Gerontologia, UFSCar. Graduada em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Doutora em Ciências, concentração em Fisiologia, UFSCar. Pós-Doutora, Institute de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, França.

E-mail: mcominetti@ufscar.br