

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

**EFEITOS PROTETORES DA PROLACTINA EM CULTIVO GLIAL DE
CÓRTEX DE RATOS EXPOSTOS AO METILMERCÚRIO**

Andréa Cristina Monteiro dos Santos

BELÉM
2008

ANDRÉA CRISTINA MONTEIRO DOS SANTOS

**EFEITOS PROTETORES DA PROLACTINA EM CULTIVO GLIAL DE
CÓRTEX DE RATOS EXPOSTOS AO METILMERCÚRIO**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz. ICB – UFPA.

**BELÉM
2008**

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFGA – Belém (PA)

Santos, Andréa Cristina Monteiro dos

Efeitos protetores da prolactina em cultivo glial de córtex de ratos expostos ao metilmercúrio / Andréa Cristina Monteiro dos Santos; orientador, Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz. – 2008.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2008.

1. Mercúrio – Toxicologia. 2. Prolactina. 3. Cortex cerebral. 4. Rato como animal de laboratório. I. Título.

CDD – 22. ed. 615.925663

ANDRÉA CRISTINA MONTEIRO DOS SANTOS

**EFEITOS PROTETORES DA PROLACTINA EM CULTIVO GLIAL DE
CÓRTEX DE RATOS EXPOSTOS AO METILMERCÚRIO**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências e
Biologia Celular, do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do
Pará, Belém, 2008.**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Luis Martins do Nascimento (UFPA)

Prof. Dr. Anderson M. H. Oliveira Silva (UFPA)

Prof^a. Dr^a. Leda Quércia Vieira (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, aos meus familiares e amigos. Especialmente a minha querida vó Terezinha Monteiro e minha mãe Iza Monteiro, por serem meu esteio durante esta intensa jornada.

Ao professor e orientador Domingos Luiz W. P. Diniz por seu apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram a execução e conclusão deste trabalho.

Aos professores Cláudio Salgado, Rommel Burbano, José Antônio P. Diniz e José Luiz do Nascimento pela colaboração intelectual e material cedida para o desenvolvimento do trabalho.

Às professoras Sueli Kataoka e Ilce Moreira, e aos profs. Luís Maués e Anderson Manuel Herculano pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Neuroendocrinologia do Instituto de Ciências Biológicas – UFPA e da seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas.

Ao Instituto Evandro Chagas pelo apoio científico e financeiro cedido para realização deste estudo.

RESUMO

O metilmercúrio (MeHg) é um composto comprovadamente neurotóxico cujos mecanismos degenerativos ainda não estão bem esclarecidos. No sistema nervoso central o MeHg é seqüestrado do interstício preferencialmente por astrócitos diminuindo a carga de exposição neuronal. Estudos *in vitro* demonstraram que a prolactina (PRL) possui efeitos mitogênicos sobre astrócitos, além de regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Este estudo teve por objetivo investigar efeitos protetores da prolactina sobre distúrbios provocados por MeHg na viabilidade, morfologia, expressão de GFAP (glial fibrillary acidic protein), mitogênese e liberação de interleucina-1 β (IL-1 β) em cultivo glial de córtex cerebral de ratos neonatos focalizando as células astrogliais. A exposição a diferentes concentrações de MeHg (0,1, 1, 5 e 10 μ M) a diferentes intervalos de tempo (2, 4, 6, 18 e 24 h) ocorreu em cultivos com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os resultados obtidos demonstraram diminuição progressiva de 20% e 62% da viabilidade celular após exposição às concentrações de 5 e 10 μ M MeHg no tempo de 24 h, respectivamente, pelo método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio bromide (MTT) e distúrbios na expressão e distribuição de GFAP. Diferentes concentrações de prolactina (0,1, 1 e 10 nM) foram adicionadas em meio sem soro fetal bovino (FBS) para avaliar sua ação proliferativa isoladamente. Esta ação foi confirmada com indução de mitogênese em cerca de 4,5x em 18 h de observação na maior concentração (10 nM PRL). Nestas condições (sem SFB) foram analisados os efeitos da associação de 1 nM PRL + 5 μ M MeHg em teste de viabilidade, expressão de GFAP, morfologia celular, índice mitótico e liberação de IL-1 β com o objetivo de estudar possíveis efeitos citoprotetores deste hormônio. A PRL atenuou os distúrbios provocados pelo MeHg, aumentando a viabilidade em 33%, a expressão de GFAP, proliferação celular (4x) e atenuando os distúrbios morfológicos, incluindo picnose nuclear e lise. Adicionalmente, a PRL induziu amplificação da liberação de IL1 β quando associada ao MeHg. Estes achados confirmam a hipótese de que a PRL possa atuar como um agente citoprotetor em cultura primária de glia e particularmente em astrócitos, ação esta aditiva aos seus efeitos mitogênicos.

Palavras-chaves: metilmercúrio, prolactina, glia, astrócitos e citoproteção.

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) is a compound highly neurotoxic and its degenerative mechanisms are not very clear yet. In Central Nervous System, MeHg is mostly uptake by astrocytes, decreasing neuronal exposition. Studies demonstrated that prolactin (PRL) has mitogenic effects on astrocytes and it can regulate pro-inflammatory cytokines expression. The aim of this work was to verify the protective effects of PRL on disturbs provoked by MeHg on cellular viability, morphology, GFAP (glial fibrillary acidic protein) expression, mitogenesis and release of interleukin-1 β in glia primary culture of cerebral cortex of newborn rats, with astrocytes in focus. Glia primary culture were exposed to different concentrations of MeHg (0,1, 1, 5 e 10 μ M) in different time intervals (2, 4, 6, 18 e 24 h) in medium with fetal bovine serum 10%. Results demonstrated progressive decreasing of 20% e 62% on cellular viability after exposed to 5 e 10 μ M MeHg for 24 h, respectively, by MTT [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay and disturbs in the GFAP expression and distribution. Different concentrations of PRL (0.1, 1 e 10 nM) were added in free serum medium to evaluate its proliferative action. This was confirmed by mitogenesis induction around 4.5x in 18h at 10 nM PRL. In these conditions (free serum) were evaluated the effects of co-treatment of 1 nM PRL + 5 μ M MeHg on cellular viability, morphology, GFAP expression, mitotic index and release of IL-1 β . PRL attenuated disturbs caused by MeHg, increasing viability in 33%, GFAP expression, cellular proliferation (4x), and attenuating morphologic alterations like nuclear picnosis and lysis. These findings prove that PRL can act like a cytoprotective agent in primary culture of glia, particularly in astrocytes, in addition to its mitogenic effects.

Key-words: methylmercury, prolactin, glia, astrocytes and cytoprotection.

LISTA DE SIGLAS

ACTH - Hormônio adreno-corticotrófico
AF - Ácido fosfatídico
ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry
 Ca^{+2} – Íon cálcio
 $[\text{Ca}^{+2}]_i$ – Cálcio intracelular
DAG - Diacilglicerol
DMEM-F12 - Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium-Factor 12
ERK – Cinase regulada por sinal extracelular
FITC – Isoticianato de fluorêscéina
FLD - Fosfolipase D
GFAP - Glial fibrillary acidic proteína
Hg – Mercúrio
 Hg^0 - Mercúrio metálico
 Hg^{2+} - Mercúrio inorgânico
 $\text{Hg}^{+2}\text{-Fe}$ - Mercúrio inorgânico conjugado ao ferro
HPA - Eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal
IL-1 β – Interleucina-1 β
IL-6 – Interleucina-6
IM – Índice mitótico
JAK – Janus cinase
KCl – cloreto de potássio
MeHg – Metilmercúrio
MeHgCl – Cloreto de metilmercúrio
MTT - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio bromide)
NGF – Fator de crescimento do nervo
NK – Célula “natural killer”
P2 – Rato com dois dias de vida pós-uterina
PBS – Solução de tampão fosfato
PRL – Prolactina
PRLR – Receptor de prolactina
ROS - Espécies reativas de oxigênio

SNC – Sistema nervoso central

SFB – Soro fetal bovino

STAT – Transdutores de sinal e ativação de fatores de transcrição

TGF- β – Fator de transformação do crescimento- β

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Mercúrio.....	1
1.2	Mercúrio na Amazônia.....	2
1.3	Metilmercúrio no Sistema Nervoso Central.....	5
1.4	Células do Sistema Nervoso Central.....	7
1.5	Prolactina.....	10
1.6	Justificativa.....	13
1.7	Objetivos.....	15
1.7.1	<i>Geral</i>	15
1.7.2	<i>Específicos</i>	15
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1	Cultura Primária de Glia.....	16
2.2	Intoxicação Mercurial.....	17
2.3	Tratamento com Prolactina.....	17
2.4	Medida da Viabilidade Celular.....	17
2.5	Imunocitoquímica para detecção de GFAP.....	18
2.6	Índice Mitótico.....	19
2.7	Dosagem de Interleucina-1 β	19
2.8	Análise Estatística dos Resultados.....	20
2.9	Procedimentos Experimentais	20
2.9.1	<i>Experimento I</i>	20
2.9.2	<i>Experimento II</i>	21
2.9.3	<i>Experimento III</i>	21
2.9.4	<i>Experimento IV</i>	21
3	RESULTADOS.....	23
3.1	Padronização da Cultura Primária de Glia.....	23
3.2	Efeitos da exposição ao MeHg.....	23
3.2.1	<i>Efeitos sobre a viabilidade celular</i>	23
3.2.2	<i>Efeitos sobre a expressão do GFAP</i>	26

3.3	Possível Proteção dos Efeitos do MeHg pela PRL.....	26
3.3.1	<i>Sobre a viabilidade celular.....</i>	31
3.3.2	<i>Sobre a morfologia celular.....</i>	33
3.3.3	<i>Sobre a expressão do GFAP em astrócitos.....</i>	36
3.3.4	<i>Proliferação celular.....</i>	38
3.3.5	<i>Liberção de Interleucina-1β (IL-1 β).....</i>	39
4	DISCUSSÃO.....	41
5	CONCLUSÃO.....	48
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mercúrio

De acordo com a “Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)” dos Estados Unidos, o mercúrio (Hg) é o terceiro metal encontrado mais frequentemente e a substância mais tóxica (ATSDR, 2001). A toxicidade do mercúrio é considerada a segunda causa mais comum de contaminação aguda por metal pesado, com 3.956 casos relatados em 1997 pela “Association of Poison Control Centers” (OZUAH, 2000).

Anualmente a emissão de mercúrio na atmosfera em todo o mundo tem sido estimada em 2.200 toneladas (FERRARA *et al*, 2000). Um terço dessas emissões originam-se de fontes naturais (erupções vulcânicas) e os outros dois terços originam-se de fontes antropogênicas. Esse composto encontra-se no meio ambiente em três estados básicos: mercúrio elementar ou vapor de mercúrio, mercúrio inorgânico e orgânico (etil-, metil-, alquil- e fenilmercúrio).

O mercúrio elementar é encontrado em termômetros, termostatos, amálgamas dentárias e eventualmente muda para um estado de vapor. Quando absorvido o vapor de mercúrio elementar pode atravessar a barreira hemato-encefálica e a placenta (OZUAH, 2000). Esse metal pode também ser metilado por microorganismos que estão no solo e na água, sendo transformando em metilmercúrio, a forma encontrada nos peixes, fungicidas e pesticidas.

O mercúrio inorgânico pode ser encontrado em cosméticos, laxativos, diuréticos e anti-sépticos. Ele pode ser formado a partir do metabolismo do vapor de mercúrio ou do metilmercúrio (CLARKSON, 2002). Normalmente não atravessa a barreira hemato-encefálica ou a placenta, mas quando complexado com glutathione pode causar problemas renais ou gastrintestinais. O mercúrio orgânico (metilmercúrio) é considerado a forma mais tóxica e mais freqüente de exposição.

O metilmercúrio (MeHg) é quase completamente absorvido no trato gastrintestinal (90-95%), porém como este metal realiza extensivamente o ciclo enterohepático, uma fração de mercúrio presente na bile é convertido pela microflora intestinal em mercúrio inorgânico. Desta forma, boa parte do MeHg é eliminado do organismo após demetilação e excreção da forma inorgânica através das fezes (OZUAH, 2000; CLARKSON, 2002). Entretanto, após o processo de distribuição por todos os tecidos, aproximadamente 10% deste metal pode ser

encontrado no sistema nervoso central. Contudo, a alta mobilidade do MeHg não consiste na sua solubilidade lipídica, pois o metilmercúrio está presente no organismo como um composto hidrossolúvel, complexado principalmente com ligantes tióis. Ele atravessa a barreira hemato-encefálica ligado a L-cisteína, assim a maior toxicidade da exposição ao metilmercúrio envolve o sistema nervoso central (CLARKSON, 2002).

A exposição tanto à forma orgânica quanto à forma inorgânica do mercúrio representam um significativo problema toxicológico para espécie humana (HANSEN *et al.*, 1990). A preocupação com contaminação ambiental gerada pelo mercúrio ganhou maior destaque em âmbito mundial devido a dois grandes acidentes ambientais ocorridos nas décadas de 50 e 60 em Minamata no Japão (ROSS, 1996) e no Iraque (BAKIR *et al.*, 1973), onde milhares de pessoas morreram de uma doença conhecida posteriormente como Doença de Minamata. Este fato despertou o interesse de cientistas que tentavam compreender como o mercúrio prejudicou o homem de maneira tão severa.

A partir desse momento, os estudos avançaram e estabeleceu-se que o metilmercúrio é o composto que traz grandes riscos à saúde humana, sendo produzido através da metilação do mercúrio por bactérias presentes no ambiente. Entretanto, entendeu-se que o fato da água conter altos níveis de mercúrio inorgânico é um fator secundário, pois é necessária a presença de bactérias no ambiente, pois este metal é tóxico para esses microorganismos. Assim, esses seres vivos tentam expulsá-lo, transformando-o em metilmercúrio, uma molécula lipossolúvel e mais facilmente eliminada do organismo, além disso, são necessárias condições adequadas de pH e temperatura (WASSERMAN *et al.*, 2001).

1.1. Mercúrio na Amazônia

Na região Amazônica o problema do mercúrio ganhou atenção na década de 80 com o início da atividade garimpeira. O extrativismo indiscriminado do ouro, particularmente no Baixo Amazonas, seria um dos principais responsáveis pela contaminação ambiental por mercúrio, onde estudos estimam que esta atividade mineral lançou entre 1975 a 2002 aproximadamente 3000 toneladas deste metal no ambiente da região (LACERDA, 2003). O mercúrio é depositado nas águas na forma inorgânica e, assim passa a ser acumulado nos animais destes ecossistemas. Quando liberado no ambiente aquático, este metal pode ser

biometilado, culminando na sua transformação em metilmercúrio, sendo este o principal composto de intoxicação dos organismos aquáticos (LEBEL *et al.*, 1998).

Pesquisas recentes indicam que as emissões de mercúrio na Amazônia não são apenas de origem garimpeira, podendo também ocorrer por incêndios florestais, os quais promovem a emissão do mercúrio inorgânico conjugado ao ferro ($\text{Hg}^{+2}\text{-Fe}$) presente nos solos e na biomassa vegetal. Assim ele pode ser volatilizado para a atmosfera na forma de mercúrio metálico (Hg^0). Neste ambiente, ele sofre oxidação, retornando para os solos e rios junto com a água da chuva na forma de mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) (Figura 1), devido a essa fase atmosférica do mercúrio, ele pode ser transportado para regiões remotas e acumular-se em reservatórios hídricos onde ocorrerá sua metilação (MeHg) por bactérias metalogênicas (WASSERMAN *et al.*, 2001). O mercúrio organificado passa a ser acumulado na cadeia alimentar principalmente em animais carnívoros de ciclo de vida longo. Portanto, pode-se encontrar focos de contaminação por mercúrio distantes de fontes antropogênicas como demonstrado em recente investigação sobre a biodisponibilidade e bioacumulação do mercúrio na cadeia alimentar ao longo do Rio Madeira (LECHLER *et al.*, 2000).

O metilmercúrio sofre bioacumulação na cadeia alimentar aquática e quanto mais no topo da cadeia o animal estiver, maior a quantidade de MeHg acumulada no seu organismo, pois torna-se mais difícil a eliminação do mesmo. Estudos demonstram que no reservatório de Tucuruí, uma região próxima à área de atividade garimpeira, e no reservatório de Balbina, onde não há atividade garimpeira nas proximidades, os peixes carnívoros apresentam concentrações de MeHg maiores que $0.2\mu\text{g/g}$ de peso (KEHRIG *et al.*, 1998).

A redução das emissões de mercúrio na Amazônia devido à redução da atividade garimpeira provocou diminuição das concentrações deste metal restrita às antigas áreas de mineração. O mercúrio sofre remobilização dos sedimentos e re-emissão dos solos, o que deve contribuir para manutenção dos altos níveis de mercúrio na região. Este processo tem sido acelerado pelo intenso plantio da soja na região do Baixo Amazonas, o qual resulta em vasto desflorestamento em estados como Rondônia e Amazonas (BASTOS *et al.*, 2005).

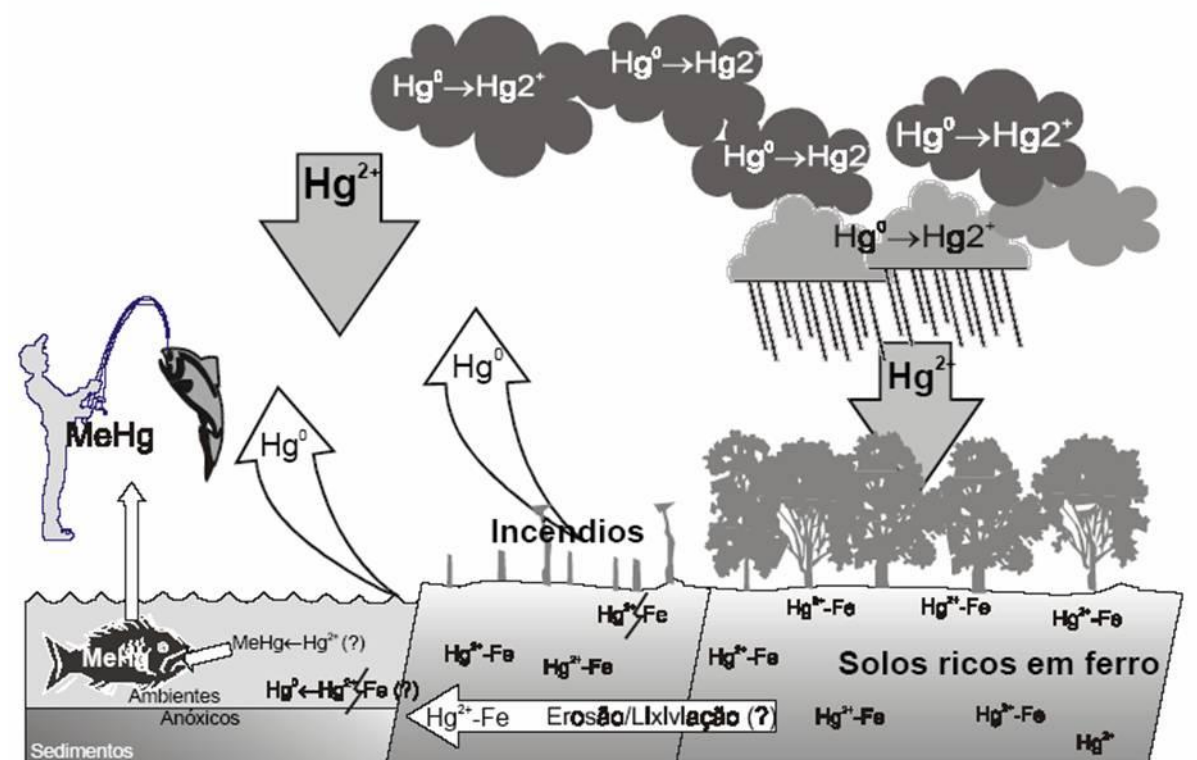


Figura 1: O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico (WASSERMAN *et al.*, 2001).

O homem torna-se uns dos principais afetados pela intoxicação mercurial, quando usufrui o rio poluído para diversas atividades como a alimentação, pois os peixes que apresentam os maiores níveis de MeHg são os mais consumidos pelo o homem, como o tucunaré e a traíra. As comunidades ribeirinhas e grupos indígenas são os principais afetados pela contaminação de mercúrio. Estudos demonstraram que em algumas regiões a concentração de MeHg nos peixes está abaixo do limite recomendado para consumo pela legislação Brasileira, porém o consumo contínuo e em grande quantidade desses peixes pelas comunidades indígenas e ribeirinhas pode torna-se um importante fator de risco de toxicidade crônica (LEBEL *et al.*, 1998).

Segundo HARADA *et al.* (2001), o aparecimento de manifestações clínicas da doença de Minamata na Amazônia deverá seguir a regra da evolução da contaminação ambiental, em cinco estágios: 1) contaminação ambiental pelo mercúrio inorgânico; 2) transformação do mercúrio inorgânico em mercúrio orgânico (biometilação); 3) acúmulo do mercúrio orgânico na cadeia alimentar aquática; 4) acúmulo do organo-metal pelo homem através da ingestão de peixes e; 5) aparecimento dos sinais e sintomas da doença de Minamata. No entanto, o registro do aparecimento dos sintomas desta doença nos habitantes da região amazônica ainda é controverso, pois existem estudos que não observam quadro clínico semelhante à doença de

Minamata, porém há outros estudos que relatam intoxicação por MeHg e aparecimento de tais sintomas (DOREA, 2003). GOCHFELD (2003) relata que o MeHg pode se acumular a níveis suficientes para causar sintomas de intoxicação, e a mulher grávida pode transferir para o feto quantidades de MeHg que são capazes de prejudicar o desenvolvimento do sistema nervoso.

1.3 Metilmercúrio no Sistema Nervoso Central

A principal toxicidade devido o metilmercúrio (MeHg) que envolve o sistema nervoso central causa disfunção autonômica e sensorial, desmielinização, migração neuronal e divisão celular anormal do sistema nervoso. Os sintomas crônicos da toxicidade incluem ataxia cerebelar, neuropatologia periférica, perda de memória, demência, tremores, depressão e outros (LYN PATRICK, 2002). Exames patológicos de pacientes com vários destes sintomas indicaram que o córtex cerebelar é uma das regiões mais afetada por este composto (CHANG, 1980).

No sistema nervoso central acumula-se principalmente nos astrócitos, que são os primeiros a encontrar MeHg quando atravessam a barreira hemato-encefálica. Essas células contêm altos níveis de metalotioneína e glutatona, ambas são carreadoras de metais pesados. O metilmercúrio altera a síntese de proteínas, interrompe a via de aminoácidos excitatórios e promove o acúmulo neurotóxico de serotonina, aspartato e glutamato (LYN PATRICK, 2002).

Os mecanismos de neurotoxicidade do MeHg ainda não são bem esclarecidos, isto ocorre talvez pelo fato de que múltiplos mecanismos possam contribuir para a toxicidade deste metal. Estudos demonstraram que este composto possui a propriedade de alterar a homeostasia dos íons cálcio (Ca^{+2}) nas células nervosas (DENNY *et al.*, 1996). E em culturas celulares de cerebelo um aumento significativo da concentração de cálcio intracelular [Ca^{+2}]_i mediada por este composto está diretamente relacionada com o aumento da taxa de mortalidade das células em cultura.

O MeHg induz a liberação do Ca^{+2} de seus estoques intracelulares dentro do citossol, em sinaptossomos, linfócitos T e células granulares do cerebelo (LIMKE *et al.*, 2004). Como a manutenção da homeostase celular do cálcio é de grande importância para a geração de sinais intracelulares, qualquer distúrbio nessa homeostase ocasiona uma desregulação das funções celulares e conseqüente morte celular.

A falta de compreensão sobre os vários mecanismos de neurotoxicidade do MeHg pode ser exemplificado na ação deste metal nas células do cerebelo, neste caso podemos observar que as células granulares, os interneurônios inibitórios e os astrócitos são altamente sensíveis à toxicidade do MeHg, provocando desordem na citoarquitura celular, impedimento da sinaptogênese e da migração das células granulares. No entanto, as células de Purkinje são menos sensíveis aos efeitos tóxicos do MeHg, porém acumulam maior quantidade deste metal do que as células granulares (ATCHISON, 2005).

Contudo, talvez o principal efeito citotóxico do metilmercúrio seja devido este composto apresentar alta afinidade por grupos sulfidrilas, deste modo impedindo a função de muitas enzimas e proteínas. Por ligar-se ao grupo sulfidrilas, ele altera toda a conformação estrutural da proteína, assim ele atinge a célula como um todo, pois grande parte das proteínas celulares essenciais é atingida. Em consequência, as membranas celulares são desestruturadas, os elementos do citoesqueleto e mitocôndrias também são alvos.

Um dos maiores alvos deste metal pode ser a glutathione, a qual protege o tecido cerebral dos efeitos tóxicos de muitas substâncias exógenas e endógenas. O grupo sulfidrilas da glutathione está envolvido nas reações de desintoxicação enzimáticas, promovendo o processo de transporte de mercúrio e manutenção da integridade da membrana celular, ambos os quais também podem ser alterados pelo metal (TRENGA *et al.*, 1991).

O distúrbio na atividade mitocondrial também é um dos principais mecanismos de neurotoxicidade do MeHg. Estudo *in vitro* demonstra que este metal causa uma rápida inibição na atividade respiratória de células do sistema nervoso central, através da inibição da captação de oxigênio. Desta forma, a mitocôndria torna-se o alvo direto e imediato do MeHg, onde acredita-se que a cadeia de transporte de elétrons é provavelmente o sítio de efeitos tóxicos do metal, gerando um excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) no encéfalo (YEE and CHOI, 1996). O uso de cultivos primários de astrócitos como modelo de estudo para intoxicação mercurial demonstrou a formação de ROS pelos astrócitos induzidos por MeHg, sendo a mitocôndria o sítio inicial de produção desses radicais. E que o potente dano causado pelo ambiente intracelular oxidante é aumentado com a redução dos níveis de glutathione (SHANKER *et al.*, 2004).

1.4 Células do Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central (SNC) é constituído por dois principais tipos celulares: neurônio e glia. O primeiro é o tipo celular mais altamente especializado, o qual forma circuitos que constituem a base estrutural da função cerebral, por isso é considerado a unidade funcional do sistema nervoso. Os neurônios são as células que processam as informações oriundas do ambiente externo para gerar uma resposta efetora de uma determinada célula, tecido, órgão, sistema ou do organismo. Além disso, os neurônios para desenvolverem suas funções altamente especializadas necessitam de um ambiente extracelular controlado e livre de agentes agressores, para isso os neurônios contam com o apoio das células gliais. Além de fornecer o arcabouço para crescimento e direcionamento do neurônio, a glia também pode atuar estabelecendo limites metabólicos para proteção funcional como na resposta imune. No sistema nervoso, a glia ocorre em três tipos celulares diferentes: oligodentrócitos, microglia e astrócito (ALLEN & BARRES, 2005; SEIFERT, SCHILLING, & STEINHAUSER, 2006).

Os oligodentrócitos possuem citoplasma relativamente pequeno em relação ao núcleo, mas seus vários processos são enviados para os axônios adjacentes formando a bainha de mielina, a qual constitui um importante salto evolucionário para os organismos vertebrados, pois lhes conferiu um aumento excepcional na velocidade de condução do impulso nervoso ao longo dos axônios. Além disso, novos dados indicam que essas células também são capazes de sintetizar fatores tróficos como o fator de crescimento insulínico e fator de transformação do crescimento- β (transforming growth factor – TGF- β), esses fatores geram sinais aos neurônios adjacentes e podem regular a diferenciação celular e a formação da mielina (HANSSON & RÖNNBÄCK, 2003).

A microglia, como o próprio nome define é a menor das células gliais, age como fagócitos, são as células imunes do SNC. Em casos de injúrias como isquemia ou traumas, essas células removem debris celulares (DANTON & DIETRICH, 2003), em infecções causadas por vírus ou bactérias a microglia recruta leucócitos e torna-se uma célula apresentadora de antígenos (NELSON *et al.*, 2002). Além disso, a microglia ativada no sítio da inflamação altera sua morfologia e libera citocinas (grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células para o desencadeamento das respostas imunes) inflamatórias que amplificam o sinal da inflamação pela ativação e recrutamento de outras células para o local da lesão, como por exemplo, os astrócitos. As duas principais citocinas pró-inflamatórias liberadas pela microglia são interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose

tumoral- α (TNF- α), porém essas células também liberam mediadores anti-inflamatórios, desta forma agindo como uma célula mediadora da resposta imune no SNC (ver revisão KIM & JOH, 2006).

Os astrócitos são as células gliais mais numerosas, constituindo 20% a 50% do volume de muitas áreas encefálicas, são implicados na segregação, manutenção e suporte dos neurônios. Apresentam uma função semelhante da barreira hemato-encefálica e, desempenham um importante papel no desenvolvimento e reparação do SNC. Dentre as células gliais, o astrócito particularmente possui o importante papel de regular o ambiente químico que envolve os neurônios e as sinapses (EDDLESTON & MUCKE, 1993), ele rapidamente remove e metaboliza neurotransmissores, como por exemplo, o glutamato, por um sistema de transporte de alta afinidade (BRIDGES, *et al.*, 1992).

Morfológica e funcionalmente, os astrócitos podem ser classificados em dois grupos: os protoplasmáticos, que apresentam prolongamentos finos e ramificados, com corpo celular grande, sendo encontrados na substância cinzenta, e os astrócitos fibrosos, de corpo celular pequeno e com prolongamentos longos e finos encontrados na substância branca.

Para identificação deste tipo celular é muito utilizada a marcação da proteína ácida fibrilar glial (glial fibrillary acidic proteína – GFAP), que é uma proteína astroglial-específica presente nos filamentos intermediários. O GFAP é uma proteína específica de astrócitos maduros (BIGNAMI *et al.*, 1972), sua presença é necessária para a mielinização do sistema nervoso (LIEDTKE *et al.*, 1996) e, é uma proteína facilmente fosforilada de forma dependente da idade (WOFCHUK & RODNIGHT, 1995). Sua expressão pode ser modulada por várias citocinas e fatores de crescimento como: interleucinas-1, 2 e 6, TGF-alfa, TNF-alfa, alfa-interferon (LAPING *et al.*, 1994) e devido ter sua expressão aumentada em casos de danos no sistema nervoso central, é usado como importante indicador de neurotoxicidade (O'CALLAGHAN & JENSEN, 1992).

Essas células produzem *in vivo* e *in vitro* fatores de crescimento que agem regulando a morfologia, proliferação, diferenciação ou sobrevivência em subpopulações distintas de células nervosas. Alguns destes fatores, como o fator de crescimento neural pode estimular os neurônios, promovendo o crescimento axonal. Além disso, os astrócitos também possuem um importante papel na desintoxicação do SNC, como seqüestradores de metais e uma variedade de substâncias neuroativas de origem endógena ou xenobiótica.

Em casos de algumas desordens do SNC, como esclerose múltipla, inflamação ou trauma, o astrócito pode reagir iniciando um processo de astrogliose, sofrendo hipertrofia e proliferação como um recurso funcional para reparar ou ocupar a área lesada. Esta forma de

astrócito pode funcionar como uma célula imunocompetente com a secreção de citocinas e a expressão de antígenos com o complexo principal de histocompatibilidade de classe I e II (DEVITO *et al.*, 1997), este processo também é marcado pelo aumento da expressão e formação do filamento de GFAP em resposta a agressão por compostos neurotóxicos (NORTON *et al.*, 1992).

Muitos estudos sugerem que os astrócitos possuem uma eficiente capacidade neuroprotetora, entretanto, os mecanismos pelos quais estas células promovem seus efeitos são pouco compreendidos dada a complexidade de suas ações, como por exemplo, o TGF- β que pode ser secretado por esta célula, pode regular processos de crescimento e diferenciação celular, formação da matriz extracelular e regulação imune, como reparo antecedido por injúrias (DHANDAPANI *et al.*, 2003). Neste caso os astrócitos podem responder a regulação hormonal como também secretar substâncias classicamente conhecidas por sua ação endócrina, caso específico da prolactina (PRL) que será discutido oportunamente mais adiante (MÖDERSCHEIM *et al.*, 2007).

Como já foi explicitado, os astrócitos em resposta a diferentes danos no SNC podem reagir secretando uma variedade de citocinas pró ou anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, NGF, TGF- β 1 e TGF- β 1) (FERNANDES *et al.*, 2006; JAUNEAU *et al.*, 2006; VIVIEN & ALI, 2005). Particularmente, a IL-1 é produzida praticamente por todos os tipos de células nucleadas, podendo ser expressa sobre duas formas moleculares, denominadas IL-1 α e IL-1 β . Todavia, a potência e as atividades biológicas destes dois peptídeos são praticamente iguais e, se ligam com a mesma afinidade aos mesmos receptores de superfície celular. A IL-1 β em particular possui diferentes ações no SNC. Esta pode agir como um pirogêno endógeno, influenciar no comportamento do sono e é um potente estimulador do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA) (ver revisão O'CONNOR & COOGAN, 1999).

Estudos demonstraram que a IL-1 β pode induzir a proliferação e a gliose reativa de astrócitos, o aumento da imunorreatividade da proteína GFAP e pode induzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α . Isto leva a hipotetizar que a IL-1 β é o ativador fisiológico dos astrócitos em certos quadros inflamatórios do SNC (LEE *et al.*, 1995; FRIEDMAN, 2001). Um outro agente imunogênico que pode produzir efeito similar é a PRL, a qual, também estimula a secreção de IL-1 β por astrócitos (DEVITO *et al.*, 1995). Além disso, a interação da PRL e IL-1 β no eixo HPA já é conhecida, onde esta interleucina estimula a liberação de PRL pela pituitária (SKURLOVA *et al.*, 2006).

1.5 Prolactina

Nas mais complexas formas de vida os componentes responsáveis pela adaptação às perturbações no ambiente e a manutenção da homeostase são o sistema nervoso, endócrino e imune. A interação entre os dois primeiros sistemas é bastante conhecida, freqüentemente o sistema nervoso interage com o endócrino fornecendo informações sobre o meio externo, ao passo que o sistema endócrino regula a resposta interna a esta informação, os mediadores desta relação seria o eixo hipotálamo-hipófise.

O hipotálamo regula a pituitária nas secreções de seus hormônios por alças de retroalimentação negativa e em alguns casos positiva também. Estes mecanismos endócrinos classicamente reconhecidos também foram mais recentemente identificados como atuantes em respostas imunológicas sistêmicas. Particularmente para o controle das ações da prolactina, este tipo de regulação foi identificado como uma interação neuroimunoendócrina caracterizada por uma alça de retroalimentação positiva com a IL-1.

Em situações de estresse, o hipotálamo ativa os lactotrofos da pituitária a secretar PRL, esta age diretamente nos linfócitos para garantir o equilíbrio da resposta imune, através da secreção de citocinas inflamatórias como IL-1. Esta citocina, por sua vez, pode agir na pituitária estimulando a secreção de mais PRL, mas também de outros imunorreguladores como o hormônio adreno-corticotrófico (ACTH), o qual incita a secreção de glicocorticóides que são imunossupressores (ver revisão DORSHKIND & HORSEMAN, 2001). Estes mecanismos de regulação permitem a integração do sistema imune com os sistemas nervoso e endócrino, permitindo maior eficácia nas ações de defesa e citoproteção contra agentes estressogênicos, pela informação contínua ao eixo HPA da condição da agressão e da resposta inflamatória.

A prolactina é um hormônio polipeptídico sintetizado primariamente pela pituitária, por isso foi considerado, por muitos anos, um hormônio exclusivamente lactogênio, tem sua secreção regulada predominantemente por inibição pela dopamina liberada pelo hipotálamo com a contribuição da somatostatina. Este hormônio também pode ser sintetizado no encéfalo, em células especializadas no útero, placenta e mama, além de linfócitos. Além disso, a PRL pode ser liberada no leite materno e exerce funções no neonato.

No entanto, a PRL exerce efeitos endócrinos ou autócrinos, em diversos tipos de tecidos, com mais de 300 funções descritas em vertebrados (ver revisão BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998). Dentre as várias funções descritas para a PRL, ela pode regular a diferenciação das

glândulas mamárias, ovário, próstata, glândulas submaxilares e lagrimais, pâncreas e fígado (HORSEMAN, 2001). Mas, também pode modular a proliferação de vários tipos celulares, incluindo: as células betas do pâncreas, da pituitária anterior, adipócitos, linfócitos T e astrócitos. A via de sinalização melhor descrita ativada pela PRL na célula alvo é a via JAK/Stat (SCHINDLER, 1999), a qual resulta na ativação da transcrição de produtos gênicos que executarão as funções celulares mediadas por esse polipeptídeo.

Dados na literatura demonstram que a PRL exibe propriedades imunoestimulatórias sobre os linfócitos-T e B, célula natural killer (NK), macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (KOOIJMAN *et al.*, 1996; DOGUSAN *et al.*, 2001; MATERA *et al.*, 2001). E que este polipeptídeo também pode atuar na resposta inflamatória, apesar dos mecanismos não serem bem esclarecidos, a PRL pode ser antiinflamatório ou pró-inflamatório, depende do tipo celular, do tecido e o estado fisiológico do órgão (YU-LEE, 2002). No Sistema Nervoso Central (SNC) estudos demonstraram que a PRL pode agir como fator de crescimento e, está envolvida na regulação da expressão de citocinas como TNF- α e IL-1 (DEVITO *et al.*, 1995) e da mitogênese em astrócitos (DEVITO *et al.*, 1993).

No sistema imune, a PRL pode estimular a proliferação de linfócitos T, o que lhe confere uma ação imunoprotetora (CHAVEZ-RUEDA *et al.*, 2005), adicionalmente, no SNC este hormônio possui possível ação anticonvulsivante (DORETTO *et al.*, 2003), o que poderia relacioná-lo à neuroproteção. MÖDERSCHEIM *et al.* (2007), demonstraram que o tratamento com PRL promove aumento da viabilidade de astrócitos em cultivos primários, além de seu receptor e a própria molécula ser expressa no citoplasma de astrócitos e neurônios corticais em resposta à hipóxia isquêmica severa. Porém em cultivo, a PRL demonstrou exercer apenas atividade gliatrófica e não neurotrófica.

Segundo MANGOURA *et al.* (2000) a PRL ativa nos astrócitos uma via de sinalização mitogênica em paralelo com uma via de diferenciação celular (figura 2). A PRL ligaria-se ao seu receptor (PRLR) presente na membrana plasmática dos astrócitos formando um dímero, isto ativaria a principal via de sinalização mitogênica da PRL, a fosfolipase D (FLD), através da ativação de proteínas tirosina cinases-Src. A ativação da FLD libera segundos mensageiros que produzirão os efeitos mitogênicos. Adicionalmente, a ligação da PRL ao PRLR ativaria as janus cinases 2 (JAK2) as quais agiriam em outras tirosinas cinases citoplasmáticas ou no próprio PRLR, resultando em proliferação celular.

Por sua vez, JAK2 fosforilariam os transdutores de sinal e ativação de fatores de transcrição (STAT1 e 3), ativando uma via de sinalização para diferenciação dos astrócitos, pois se observou uma maior regulação da expressão de GFAP sem efeito na proliferação

celular. Entretanto, para a diferenciação astrocítica estimulada pela PRL pode ser requerida adicionalmente uma segunda via de sinalização celular, a ativação de cinase regulada por sinal extracelular (ERK).

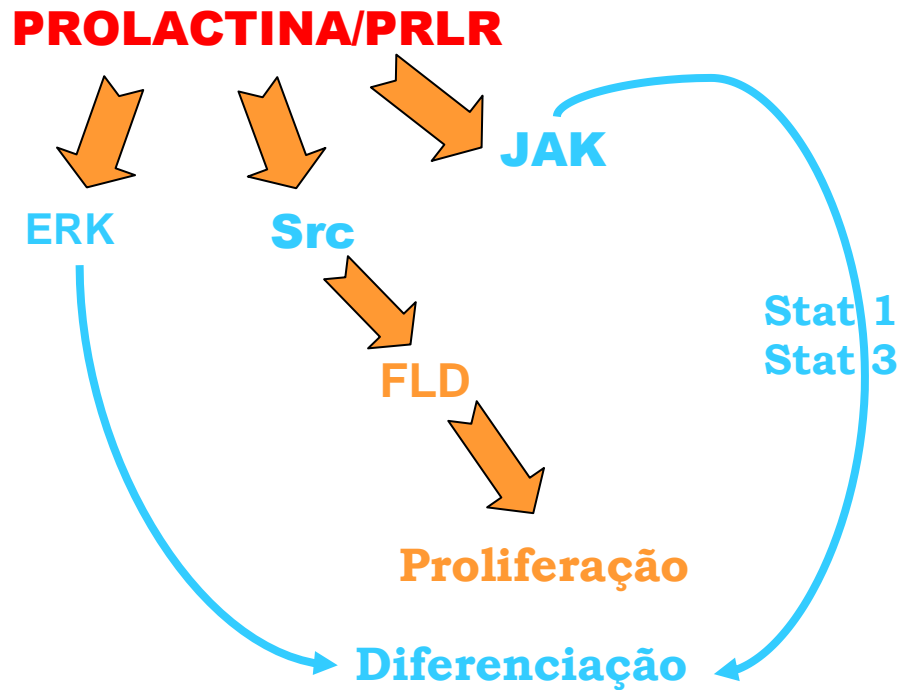


Figura 2: Esquema de sinalização celular da PRL nos astrócitos que levarão à proliferação ou a diferenciação celular. A ligação da PRL a seu receptor desencadeia vias de sinalização da FLD (fosfolipase D) por intermédio de proteínas tirosina cinase-Src, o que resulta em proliferação. Além de ativar Janus cinases (JAK) e transdutores de sinal e ativação de fatores de transcrição (STAT 1 e 3) que resulta em diferenciação celular (modificado de MANGOURA *et al.*, 2000).

1.6 Justificativa

A preocupação com o problema da contaminação mercurial e suas possíveis conseqüências para a região Amazônica é devido a grande quantidade que vem sendo lançada deste metal ao meio ambiente como resultado do garimpo. Esta atividade já foi intensamente praticada na região e agora tem seu ritmo diminuído, porém este extrativismo indiscriminado deixa graves marcas de poluição. Pois, na garimpagem este metal é adicionado ao ouro para separá-lo de outros materiais, é usado em excesso, não sendo reaproveitado e lançado através de lavagens no rio e por evaporação no ar. Assim o mercúrio se dispersa pelos solos, pelos rios e pela atmosfera, onde poderá ser biometilado, tornando-se mercúrio orgânico, forma altamente tóxica para a população ribeirinha e para todos os outros seres vivos desta região (PFEIFFER, 1989; WASSERMAN *et al.*, 2001). Por isso, a contaminação por mercúrio poderá vir a ser um sério problema toxicológico a médio e longo prazo na Amazônia.

Em alguns estudos sugerem-se um mecanismo de neurotoxicidade do MeHg, onde este composto inibiria a captação de cisteína por astrócitos, um precursor para a síntese de glutatona. Esta proteína, por sua vez, modularia a toxicidade mercurial, agindo como um tampão, diminuindo sensivelmente os níveis de MeHg intracelular (ALLEN *et al.*, 2001b). A glutatona também protegeria as células nervosas contra a formação de radicais livres resultantes da neurotoxicidade induzida por este metal, os quais comprometem o potencial de redução da célula (QU *et al.*, 2003).

O MeHg acumula-se preferencialmente em astrócitos e vários são os distúrbios que pode causar nesta célula. Porém, a manutenção de um turnover resultante à absorção, acúmulo (Tiffany-Castiglioni and Qian, 2001) e liberação (Fujiyama, *et al.*, 1994) de MeHg pelos astrócitos implica numa ação mediadora potencial da neurotoxicidade mercurial. Isto acontece principalmente, devido a astrogliia possuir altos níveis citosólicos de metalotioneínas (I e II) e de glutatona, ambas proteínas carreadoras de metais pesados (Tiffany-Castiglioni and Qian, 2001).

O MeHg consiste em um agente estressogênico, o qual pode levar os astrócitos a reagirem, sofrendo proliferação, hipertrofia e aumento da expressão de GFAP. Em contrapartida, a PRL pode induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α e IL-1 β) e mitogênese em astrócitos (DEVITTO *et al.*, 1997), além de proliferação microglial (...). Estas evidências sugerem que a PRL pode atuar como um fator de neuroproteção, pois a mesma poderia agir nas células gliais, particularmente nos astrócitos, promovendo

citoproteção contra efeitos deletérios do MeHg. A partir desse instante, torna-se necessário o desenvolvimento de uma abordagem metodológica para avançar no conhecimento sobre possíveis efeitos neuroprotetores da PRL contra a ação neurotóxica do MeHg.

1.7 Objetivos

1.7.1 Geral

Este trabalho tem como objetivo geral o estudo *in vitro* dos efeitos da intoxicação por Metilmercúrio (MeHg) sobre células gliais com ênfase em astroglias, e, demonstrar possível propriedade neuroprotetora da prolactina sobre esse tipo celular, utilizando para isso o modelo de cultura primária de glia do córtex cerebral de ratos recém-nascidos.

1.7.2 Específicos

- Investigar os efeitos da intoxicação mercurial sobre a viabilidade celular e a expressão de GFAP por astrócitos.
- Investigar os efeitos da prolactina sobre a viabilidade celular e expressão de GFAP em astrócitos intactos ou submetidos à intoxicação mercurial.
- Investigar ação mitogênica da prolactina sobre as células gliais, preponderantemente astrócitos normais ou expostos ao MeHg.
- Investigar os efeitos da prolactina e do MeHg sobre a expressão e liberação de citocinas pela glia, preponderantemente astrócitos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultura Primária de Glia

A cultura glial de córtex cerebral foi usada como modelo de estudo dos efeitos do MeHg sobre as células do sistema nervoso central. O método utilizado foi descrito por MOURA NETO *et al.* (1983), modificado por DINIZ *et al.* (2006). Para isso, ratos Wistar com dois dias de vida pós-uterina (P2) foram anestesiados em éter, em seguida, seus cérebros removidos após uma craniotomia, os córtices isolados e picotados em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium-Factor 12 (DMEM-F12, Gibco), suplementado com glicose (30 mM), bicarbonato de sódio (3 mM), glutamina (2 mM), penicilina/estreptomicina (10^4 UI/ml), fungizona (2,5 mg/ml) e com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco).

As células passaram por duas dissociações mecânicas intercaladas por 10 minutos de decantação em meio DMEM-F12 com soro. Ao final da decantação, o sobrenadante foi coletado, sendo este utilizado para o cultivo. O número de células vivas foi contado em uma câmara de Neubauer pelo método de exclusão por azul de tripan. Em seguida, as células foram plaqueadas em garrafas (área de 75cm^2) previamente tratadas com poli-L-lisina (0,2 $\mu\text{g/ml}$), a uma densidade de 9×10^6 células/garrafa e mantidas em 10 ml de meio DMEM/F12 acrescido de 10% SFB em estufa com ambiente de 5% CO_2 . O meio de manutenção das células foi trocado após dois dias. As culturas de células foram padronizadas e observadas diretamente durante todo o período em cultivo. No sexto ou sétimo dia, as garrafas foram intensamente agitadas e desprezou-se o meio de manutenção. Em seguida, as células residentes nas garrafas foram retiradas pela ação de solução de tripsina 0,025% + EDTA (Sigma) em tripsinização de um minuto e replaqueados em placas de 24 poços (área de $1,9\text{cm}^2$ e 15 mm de diâmetro por poço) previamente tratadas com poli-L-lisina (0,2 $\mu\text{g/ml}$), a uma densidade de 2×10^5 células em 0,5ml/poço de meio de manutenção. Finalmente, os cultivos foram acondicionadas em estufa sob atmosfera de 5% CO_2 à 37°C . Aonde permaneceram por dois dias, após os quais se realizou o experimento.

2.2 Intoxicação Mercurial

No momento em que os cultivos alcançaram a confluência (2 dias após tripsinização), fez-se a intoxicação com MeHg nas concentrações de 0,1, 1, 5 e 10 μ M cloreto de metilmercúrio (MeHgCl - ALPHA-NYC), diluindo a solução estoque de 10 mM em DMEM-F12. Todas as soluções de metilmercúrio utilizadas no experimento foram filtradas em membrana de 0,22 μ m (Milipore). Depois de preparadas estas soluções, o meio de manutenção do cultivo foi retirado e realizaram-se duas lavagens com PBS-glicose (solução de tampão fosfato com glicose a 0,6%), em seguida adicionaram-se as soluções de mercúrio em volume de 0.5ml/poço.

2.3. Tratamento com Prolactina

Para analisar os possíveis efeitos neuroprotetores da prolactina, realizou-se o tratamento com prolactina (PRL - Ovina. National institute of Arthritis, Diabetes e Digestive e Kidney Diseases (NIADDK). Bethesda, MD, USA) em cultivos gliais, usando diferentes concentrações da mesma, conforme dados já descritos na literatura. Após 48h da tripsinização e plaqueamento das células em placas de 24 poços, retirou-se o meio de cultura e lavou-se o cultivo com PBS-glicose, em seguida, adicionou-se meio DMEM/F12 sem SFB com PRL ou sem PRL. Ao término do tratamento, os cultivos foram incubados por um período de 18h em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

2.4. Medida da Viabilidade Celular

Esse método tem como princípio avaliar a viabilidade celular da cultura por uma análise fotolorimétrica, cuja um sal tetrazólio, o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio bromide), irá marcar apenas as células vivas. Pois, as células viáveis possuem capacidade de reduzir a forma oxidada do MTT a um composto de cor azulada (formazan),

através de desidrogenases mitocondriais, sendo o monitoriamento dessa reação feito por espectrofotometria (modificado de MOSMANN, 1983).

Nos cultivos controles e tratados com MeHg e/ou PRL, o meio foi retirado e então foram feitas três lavagens com PBS-glicose e posteriormente adicionado 500µl de PBS e 50µl de MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) numa concentração final de 5 mg/ml nos poços da placa, depois foram incubados por três a quatro horas em estufa com 5% de CO₂, protegidos da luz. No fim da incubação a solução de MTT foi desprezada e colocou-se uma solução de álcool isopropílico 0,04N para solubilizar o formazan e PBS-glicose (diluição de 1:1). Em seguida, as células foram homogeneizadas no mesmo meio e realizou-se a leitura no espectrofotômetro em comprimento de 570 nm. O branco da reação foi obtido com a solução de PBS-glicose e álcool isopropílico.

2.5 Imunocitoquímica para a detecção de GFAP

A realização desta técnica serviu para identificar os astrócitos e avaliar os efeitos do metal e do tratamento com PRL sobre a expressão de GFAP. Para isso, fez-se uma imunofluorescência indireta anti-GFAP, onde as células foram previamente fixadas com metanol e acetona absolutos, por 15 e 10 minutos respectivamente, à temperatura de 4°C. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS e incubadas em PBS-BSA 3% por 30 minutos, em seguida, adicionou-se o anticorpo primário monoclonal anti-GFAP (1:100, Dako Corporation) diluído em solução de bloqueio (PBS-BSA 1%), incubando-as em temperatura de 4°C, pernoite.

Após o período de incubação, realizou-se a lavagem e o bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS-BSA 3% por 1 hora, logo a seguir adicionou-se o anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado a isoticianato de fluoresceína (FITC, Sigma) numa diluição de 1:50 em PBS-BSA 1%, incubando-se por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas contendo as células foram lavadas e montadas em lâminas com N-propilgalactose, então analisadas ao microscópio de fluorescência Axiphot (Zeiss). Para efeito de padronização dos resultados, as fotos que compõem a mesma figura possuem o mesmo tempo de exposição à luz do microscópio de fluorescência.

2.6 Índice Mitótico

Para análise da proliferação das células gliais, particularmente os astrócitos, realizou-se a técnica de índice mitótico (IM). Após um período de 18 horas de co-tratamento, 100 µl de solução de colchicina (0,016µg/l, Sigma) para cada 5 ml de meio de cultura foi adicionado nos cultivos. Depois de 24 horas de incubação em estufa de 5% de CO₂, o meio da cultura (que contém células que soltaram nesse período de incubação) foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos juntamente com as células que foram coletadas com auxílio de tripsina-EDTA 0,025%. Com a obtenção do sedimento de células, adicionou-se solução hipotônica (KCl, Merck) e manteve-se por 15 minutos em estufa. Em seguida, realizou-se uma segunda centrifugação de 1000 rpm por 10 minutos e a solução hipotônica foi retirada, então as células foram fixadas com ácido acético e metanol absoluto (diluição 1:3) para posterior montagem em lâminas e coloração com Giemsa (Merck). As células foram visualizadas ao microscópio de luz para a contagem do índice mitótico. O índice mitótico foi determinado a partir da contagem do número de metáfases em 2.000 astrócitos/cultura. O IM foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de metáfases} \times 100}{2.000}$$

2.7 Dosagem de Interleucina-1β

A dosagem de Interleucina-1β (IL-1 β) foi realizada com objetivo de determinar o efeito da exposição ao MeHg e/ou tratamento com PRL sobre a secreção desta citocina pró-inflamatória. Para realização desta dosagem, utilizou-se kit de ELISA ((r)IL-1β, Amersham Biosciences) e transcorreu-se o experimento de acordo com o manual de instruções do kit. As amostras de sobrenadante dos cultivos, anteriormente congeladas à -70°C foram descongeladas à temperatura ambiente.

Em seguida, colocou-se 50 µl de solução diluente em todos os 96 poços. Depois, 50 µl de solução padrão ou amostra foi adicionado aos poços em duplicata, incubando-os por 2 horas. Ao fim da incubação, os poços foram lavados três (3) vezes com tampão de lavagem e adicionaram-se 100 µl de anticorpo biotilado a cada poço, incubando a placa por 30 minutos

à temperatura ambiente. Posteriormente, realizaram-se novamente 3 lavagens e 100 µl de solução conjugada de estreptavidina- HRP foram acrescentados aos poços, incubando-os por 30 minutos. Após este período, mais 3 lavagens foram feitas e adição de 100 µl de solução de substrato TMB, incubou-se por 30 minutos e acrescentaram-se 100 µl de solução de parada. Finalmente, efetuou-se a leitura dos poços em leitor de placa de ELISA para determinação da densidade óptica a 450 nm de comprimento de onda.

2.8 Análise Estatística dos Dados

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm S.D.M. e tratados através do ANOVAs e pós-teste Newman Keulls. A significância estatística foi definida como $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$.

2.9 Procedimentos Experimentais

2.9.1 Experimento I

As culturas gliais foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 24 poços numa densidade de 3×10^5 células, para obtenção de uma cultura confluída. Após dois dias de incubação, as culturas foram intoxicadas com MeHgCl nas concentrações de 0,1, 1, 5, 10 µM em meio DMEM/F12 com 10% de SFB. Os cultivos foram plaqueados em quatro placas de cultura, sendo cada placa destinada a um tempo de exposição diferente (2, 4, 6 e 24 horas). Ao término do tempo de exposição, os cultivos foram destinados ao protocolo experimental de medida de viabilidade celular (método de MTT).

2.9.2 Experimento II

Os cultivos sofreram o mesmo procedimento experimental descrito na seção anterior, com uma única diferença, as células foram plaqueadas em duas placas de 24 poços com lamínulas. Desta forma, os cultivos foram expostos às mesmas concentrações em períodos de 6 ou 24 horas. Após este período, os cultivos foram destinados ao processamento para a imunocitoquímica anti-GFAP.

2.9.3 Experimento III

Neste protocolo as culturas de glia foram tripsinizadas e plaqueadas em uma placa de 24 poços com lamínulas e outra sem lamínulas numa densidade de 2×10^5 células, para a obtenção de um cultivo aproximadamente 85% confluyente. Após dois dias de incubação, os cultivos receberam os seguintes tratamentos em meio DMEM/F12 sem SFB: controle, consistindo em apenas o meio DMEM/F12 sem SFB; 1 nM de PRL; 5 μ M de MeHg; 1 μ M de MeHg; 1 nM de PRL + 5 μ M de MeHg; 1 nM de PRL + 1 μ M de MeHg. Após um período de exposição de 18 horas, a placa sem lamínula foi destinada à realização das fotomicrografias de contraste de fase, coleta do meio de cultura para posterior dosagem de IL-1 β por ELISA (amostras estocadas a -70°C), em seguida, processamento do método de MTT. A placa com lamínula destinou-se para a realização da imunocitoquímica anti-GFAP.

2.9.4 Experimento IV

Os cultivos de células gliais foram semeados em garrafas de 25 cm² em densidade de 3×10^6 células. Ao chegar o sexto dia de cultivo, uma cultura com aproximadamente 85% de confluência foi obtida. Neste dia, as garrafas foram agitadas manualmente, o meio foi recolhido e desprezado. Em seguida, foi adicionado o meio DMEM/F12 sem SFB com ou sem PRL e MeHg. As concentrações estudadas foram de 0,1, 1 e 10 nM de PRL, 5 μ M de MeHg e 0,1, 1 e 10 nM de PRL + 5 μ M de MeHg em volume de 5 ml de meio por garrafa. O

controle foi obtido com a adição de apenas meio DMEM/F12 sem SFB. Após um período de 18 horas de exposição, os cultivos foram destinados ao processamento do protocolo experimental para o cálculo do índice mitótico.

3 RESULTADOS

3.1 Padronização da Cultura Primária de Glia

Após sete dias de cultura, foi possível observar astrócitos de forma poligonal e achatada, células de corpo celular brilhante com longos prolongamentos, que corresponderiam possivelmente a neurônios e algumas células arredondadas brilhantes, a qual exibe uma forma semelhante à microglia em repouso (Figura 3A). Devido à obtenção de uma cultura bastante mista de células do sistema nervoso central, o método de cultivo foi modificado para obtenção de um cultivo glial com predominância de astrócitos, confirmado pela imunomarcação para GFAP (Figuras 3C-D).

3.2 Efeitos da Exposição ao MeHg

3.2.1 Efeitos sobre a viabilidade celular

Os experimentos de viabilidade celular tiveram como objetivo averiguar os efeitos do MeHg sobre a sobrevivência das células do sistema nervoso central após a intoxicação *in vitro* e, portanto, verificar se os efeitos deste metal afetam estas células de forma dose e tempo dependente. Para isto, foi realizado o ensaio de viabilidade celular por meio da técnica descrita por Mosmann (MOSMANN, 1983).

As culturas gliais foram intoxicadas com MeHg em meio DMEM/F12 com SFB, nas concentrações de 0,1, 1, 5 e 10 μM nos períodos de 2, 4, 6 e 24 horas de exposição. No período de 2 h de exposição, as concentrações de 0,1, 1 e 5 μM não apresentaram nenhuma alteração na viabilidade celular dos cultivos, a concentração de 10 μM causou uma sobrevivência de 93% da população celular, isto é, uma redução de 7% na viabilidade, porém este decréscimo não é estatisticamente significativo (Figura 4A).

No período de 4h de exposição, a concentração de 1 μM apresentou uma tendência para o aumento na viabilidade celular em relação ao controle e as concentrações de 5 e 10 μM

provocaram uma pequena redução da sobrevivência das células (Figura 4B). Além disso, uma exposição de 6 h ao MeHg apresentou um leve decréscimo da viabilidade celular nas concentrações de 5 e 10 μM em relação ao controle, porém nada estatisticamente significativo (Figura 4C).

Como foi demonstrado, a cultura glial apresentou resistência aos efeitos tóxicos do MeHg em curtos intervalos de tempo. No entanto, no período de exposição de 24h as células começaram a sofrer com os efeitos deletérios deste metal (Figura 4D). Em 24h de intoxicação com MeHg, a concentração de 10 μM foi altamente tóxica, reduzindo a viabilidade celular em 62% em relação ao cultivo controle. A concentração de 5 μM foi menos deletéria, porém provocou um decréscimo de 20% na viabilidade, o que apresentou diferença estatística. As concentrações de 0,1 e 1 μM apresentaram um ligeiro aumento da sobrevivência celular, porém sem diferença estatisticamente significativa (9% para 0,1 μM ; 10% para 1 μM).

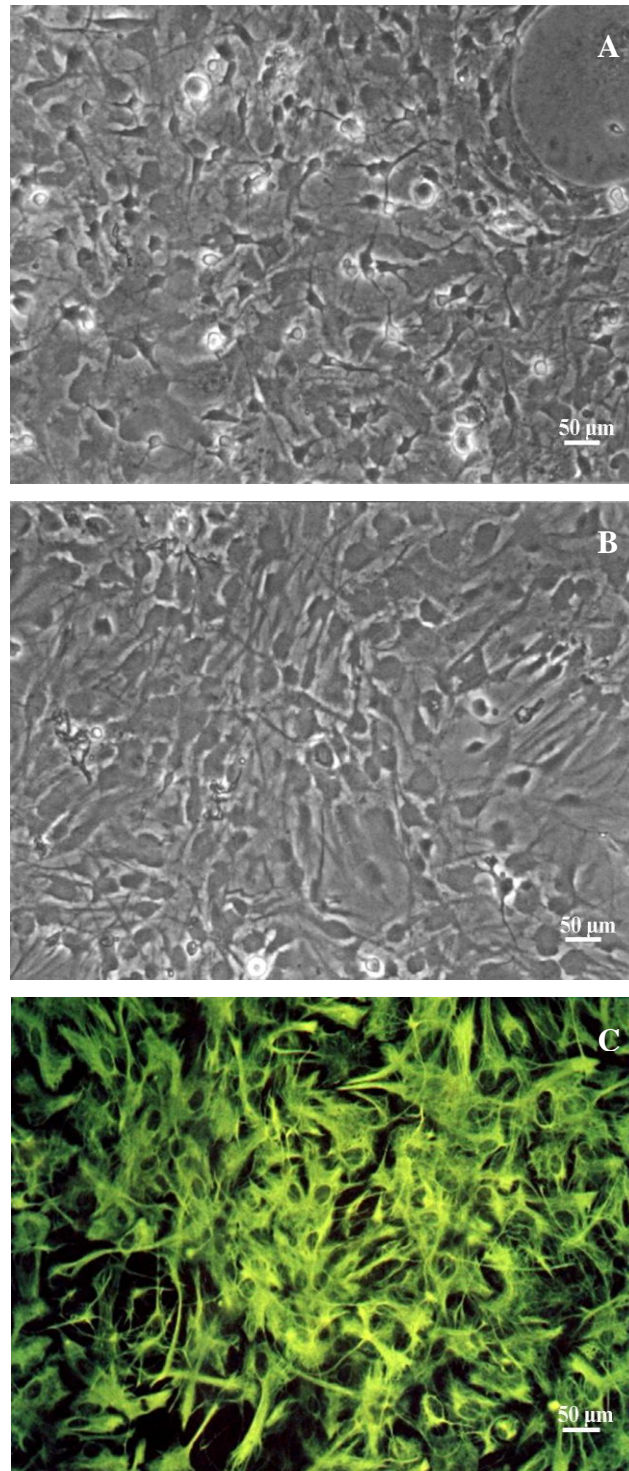


Figura 3: Padronização do cultivo primário de glia cortical: Cultivo de células do córtex cerebral (A); cultura primária de glia (B). Imunocitoquímica identificando os astrócitos pela presença de GFAP, controle (C).

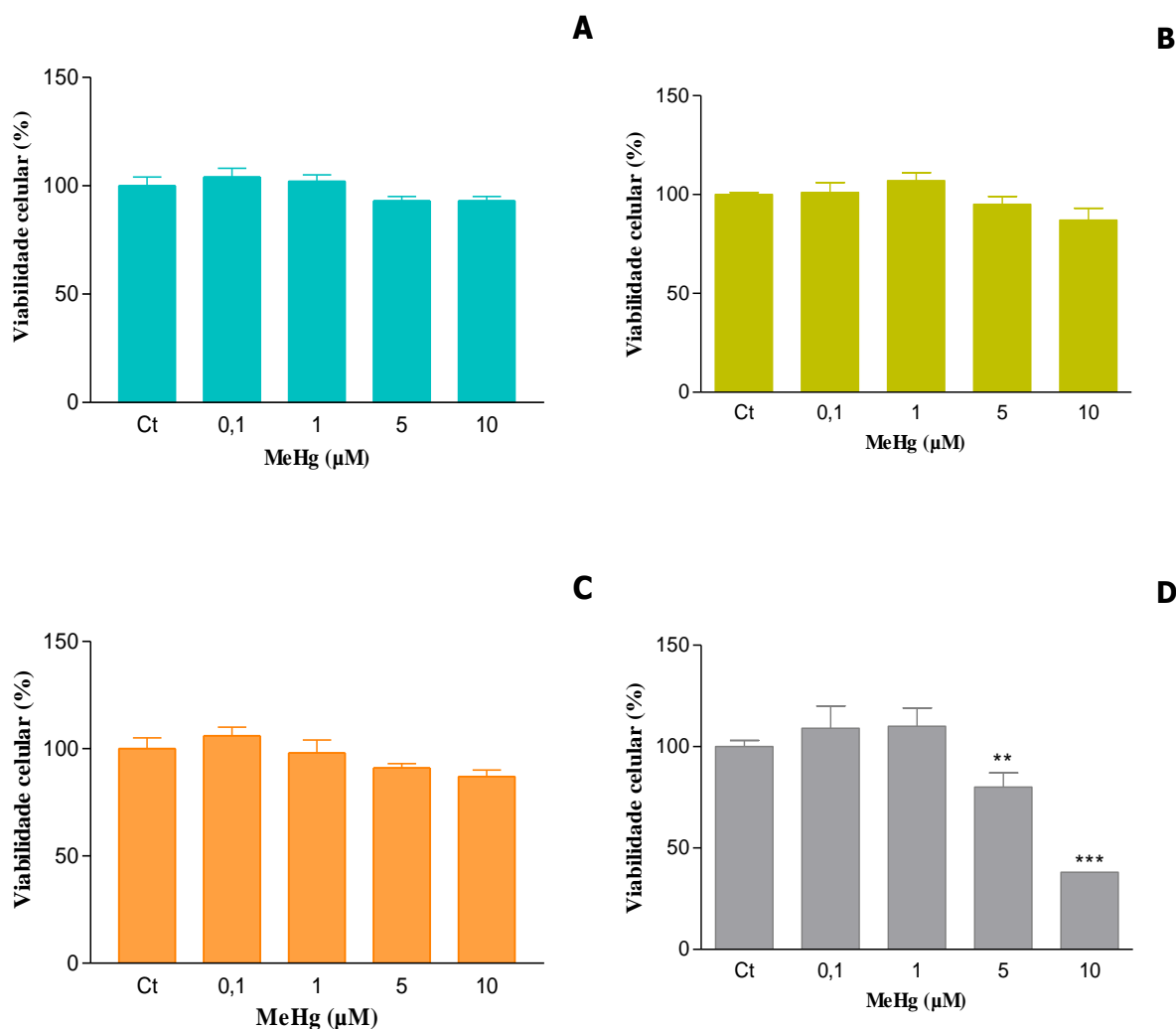


Figura 4: Viabilidade celular de cultivo glial exposto ao MeHg em meio DMEM/F12 com SFB nas concentrações de 0,1, 1, 5 e 10 µM. Exposição de 2 h (A); 4 h (B); 6 h (C) e 24 h (D). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

3.2.2 Efeitos sobre a expressão do GFAP

Para analisar os efeitos do MeHg sobre a expressão de GFAP, os cultivos gliais foram semeados em placas com lamínulas e intoxicados com MeHg nas concentrações de 0,1, 1, 5 e 10 µM (em meio DMEM/F12). Por não apresentarem diferenças significantes na medida de viabilidade celular, as exposições de 2 e 4h não foram realizadas para a imunomarcção de GFAP. No entanto, para confirmar se a tendência apresentada no teste de MTT se reproduzia no período de 6h de exposição, a imunomarcção para GFAP foi realizada (figura 5). No entanto, é interessante observar que os astrócitos na concentração de 1 µM organizaram-se de

forma mais filamentosa do que os astrócitos controles, nesta concentração estas células apresentam numerosos prolongamentos compridos e finos (figura 5C).

No tratamento de 24h visualiza-se que na concentração de 1 μ M há uma perda da imunomarcção para GFAP quando comparado ao controle, isto pode ser observado devido à presença de espaços maiores entre as células marcadas (figura 6A-C). Quando comparados, o cultivo controle e o exposto a 5 μ M, observa-se uma redução marcante no número de células, sendo que estas apresentam filamentos compridos e finos em maior número (figura 7A-B). No tratamento de 10 μ M há uma redução drástica no número de células. Entretanto, nos astrócitos restantes pode-se observar uma perda da marcação para o GFAP e do seu aspecto filamentoso com sério dano na integridade desses filamentos intermediários, conseqüentemente, os astrócitos perdem a sua organização citoarquitetônica, sofrendo uma agressão mais intensa que na concentração de 5 μ M (figura 7C).

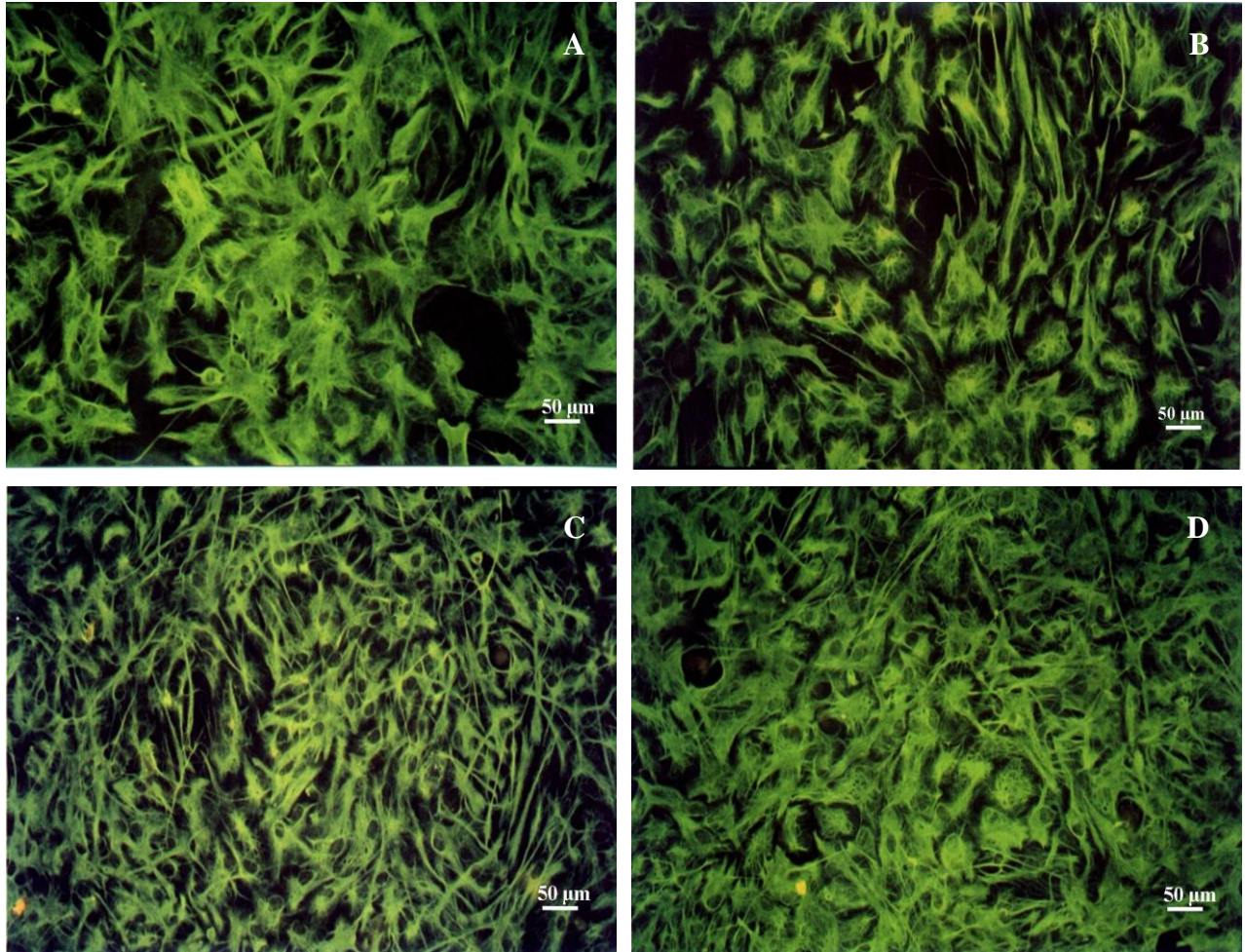


Figura 5: Microscopia de fluorescência com imunomarcção para GFAP em cultivos gliais expostos ao MeHg por um período de 6 h. Cultivo controle (A); cultivos expostos a 0,1 μM de MeHg (B); 1 μM (C) e 10 μM (D).

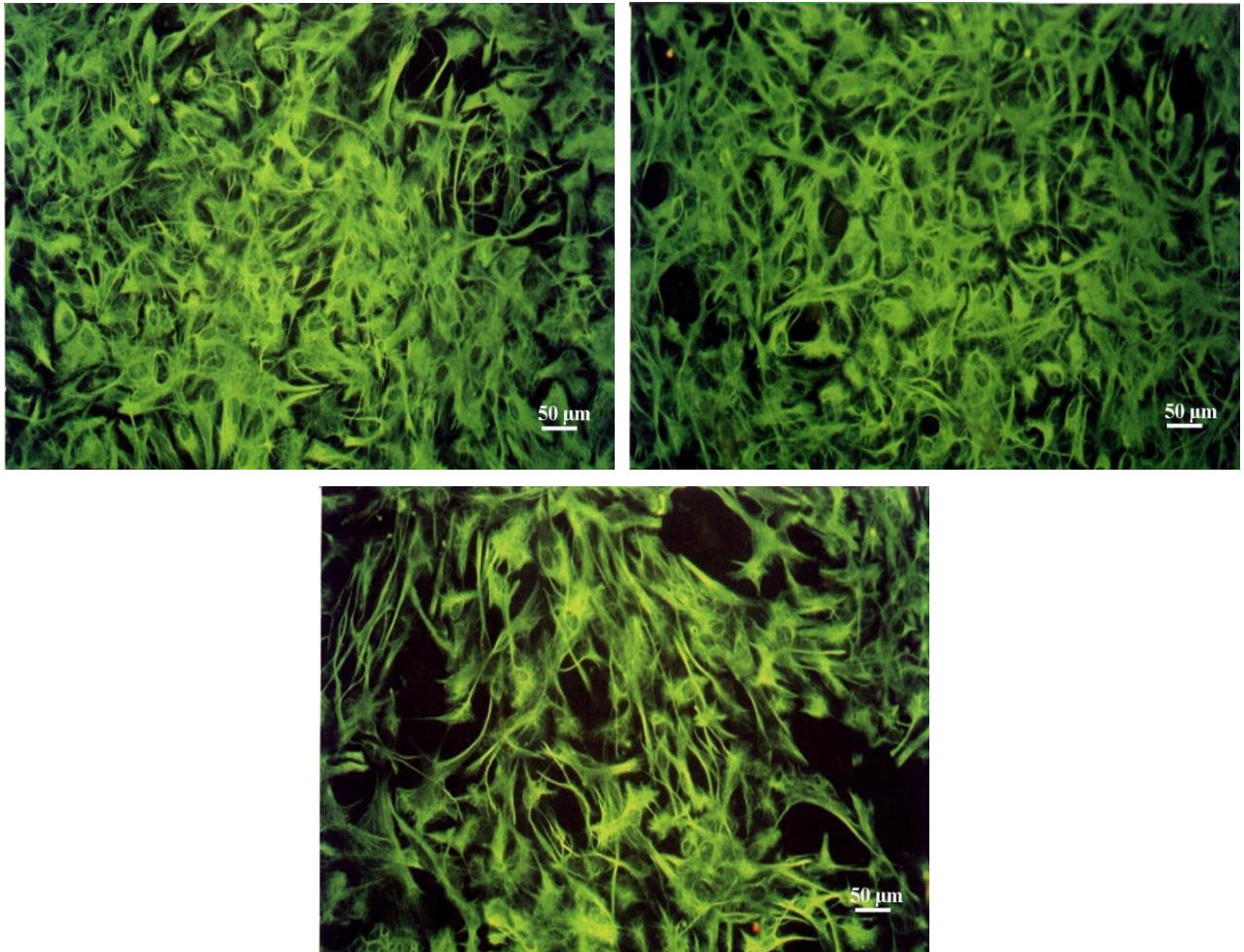


Figura 6: Imunocitoquímica para GFAP em astrócitos corticais expostos ao MeHg por 24 h. Cultivo controle (A); cultivos expostos a 0.1 μM (B) e 1 μM de MeHg (C).

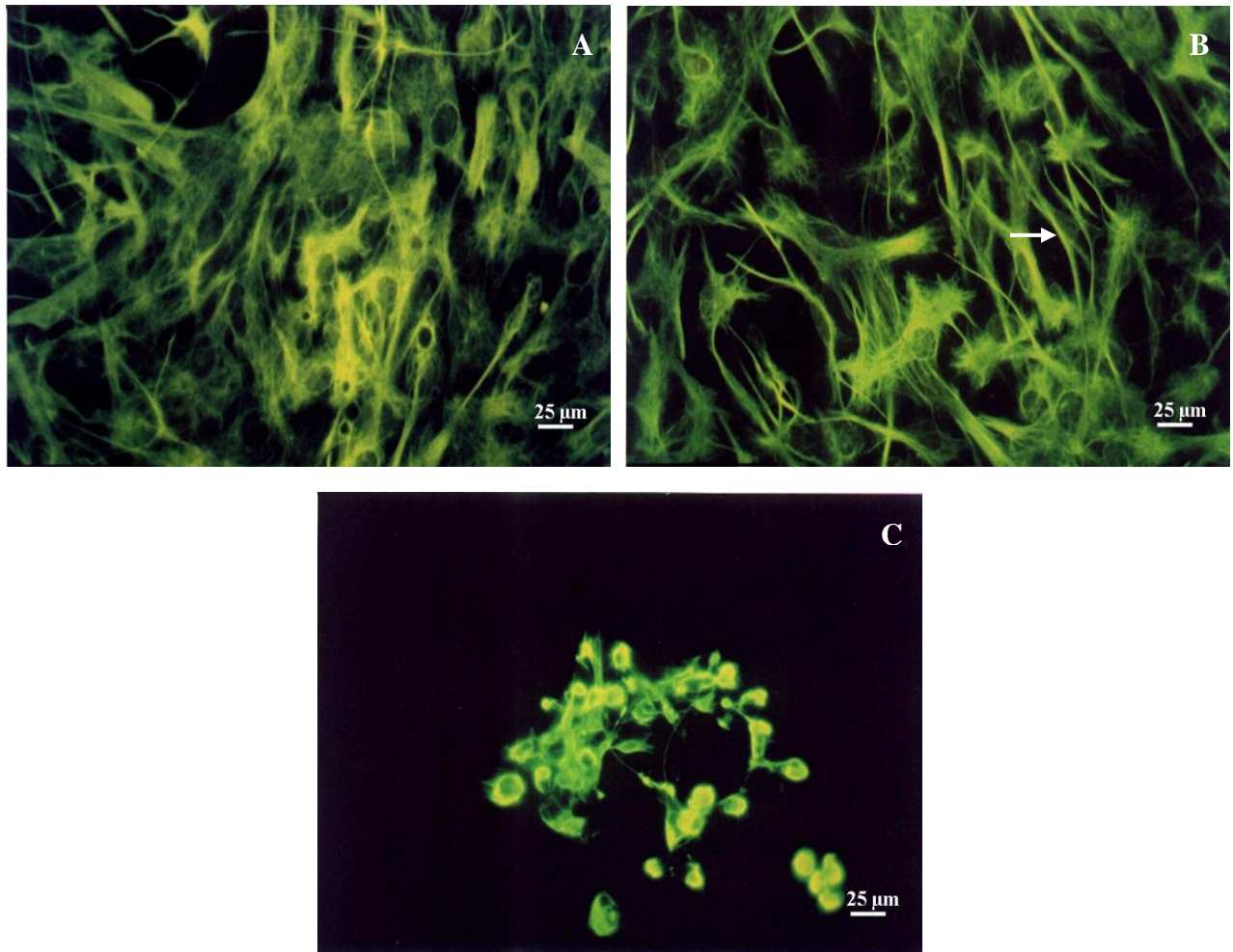


Figura 7: Microscopia de fluorescência com imunocitoquímica para GFAP demonstrando os efeitos do MeHg sobre esses filamentos de astrócitos. Cultura controle (A); cultura exposta a 5 μM, seta indica os filamentos finos e compridos, estes mais numerosos nesta exposição (B) e 10 μM (C) de MeHg por um período de 24 horas.

3.3 Possível Proteção dos Efeitos do MeHg pela PRL

3.3.1 Sobre a viabilidade celular

Para analisar se a PRL conseguiria inibir os efeitos deletérios do MeHg sobre as células gliais, estas foram expostas ao co-tratamento de PRL e MeHg por um período de 18 horas. As exposições foram realizadas em meio DMEM/F12 sem SFB, pois como já foi explicitado este contém PRL em concentrações que iriam interferir em nosso experimento. A cultura controle sem soro não possuiu diferenças significativas na viabilidade celular da cultura controle com soro (Figura 8A). As culturas gliais foram utilizadas com aproximadamente 85% de confluência, com objetivo de avaliar um possível efeito da PRL sobre a proliferação celular.

A concentração de PRL utilizada de 1 nM e o período de tratamento de 18h foram escolhidos devido estudos prévios que demonstraram que esta concentração é capaz de produzir efeitos benéficos sobre os astrócitos *in vitro* (DEVITO *et al.*, 1993). As concentrações avaliadas de MeHg foram de 1 e 5 μM , pois uma concentração inferior (0,1 μM) não produziria nenhum efeito sobre o cultivo, como visto na figura 3 e como a concentração de 10 μM causou morte superior a 50% nos cultivos confluentes (Figura 3B), estando por isso fora dos interesses de nossos estudos, esta concentração não foi estudada no tratamento com a PRL.

A exposição dos cultivos gliais a 5 μM de MeHg resultou em redução de 85% da viabilidade celular, enquanto que a associação desta dose com 1 nM de PRL atenuou este efeito para 52% (Figura 8B), demonstrando que a PRL deve ativar alguma via de sinalização nas células gliais que leva a proteção contra os efeitos tóxicos do MeHg sobre a viabilidade celular. A exposição de 1 μM de MeHg pelo período de 18h não foi citotóxica às células e sua associação a 1 nM de PRL não provocou nenhuma alteração à viabilidade celular.

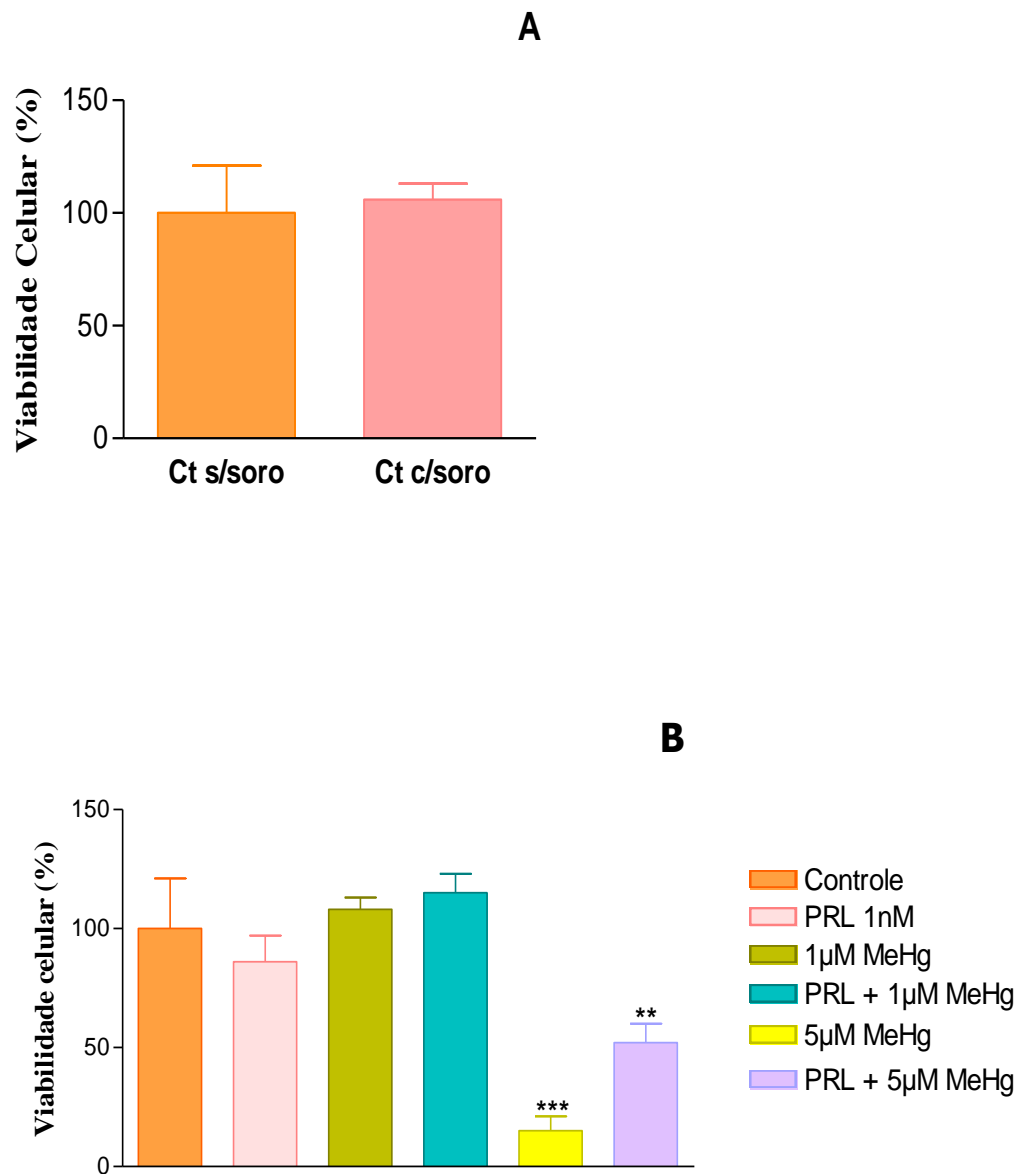


Figura 8: Viabilidade celular de cultivos primário de glia cortical co-tratadas com PRL e MeHg por um período de 18 h. A retirada do SFB não afetou a viabilidade celular (A). O co-tratamento de 5 µM de MeHg e 1 nM de PRL aumentou a viabilidade de 15% ± 6.0 para 52% ± 8.0 (B). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, em relação ao controle.

3.3.2 Sobre a morfologia celular

As culturas gliais observadas ao microscópio de contraste de fase apresentaram alterações morfológicas nas células expostas ao MeHg ou co-tratadas com 1 nM de PRL em meio DMEM/F12 sem SFB. Primeiramente, observa-se que no cultivo controle com 10% de SFB (Figura 9A) os astrócitos com forma poligonal, a qual é a mais característica em cultura madura (células achatadas com grande soma e alguns prolongamentos) e os astrócitos de morfologia estrelada (corpo celular pequeno e numerosos prolongamentos) são as células preponderantes. Entretanto, no cultivo controle sem SFB (Figura 9B) visualiza-se alguns astrócitos apresentando mais prolongamentos citoplasmáticos e a presença de neurônios, provavelmente devido à retirada do soro. Em relação à concentração de 5 μ M de MeHg, foi observada uma evidente morte celular (Figura 10C). Picnose nuclear, lise, restos celulares e perda de morfologia normal encontrada em cultivos não confluentes e sem SFB foram alterações evidenciadas após a exposição mercurial, demonstrando o potente efeito citotóxico deste metal.

Nas culturas gliai expostas ao co-tratamento de 5 μ M de MeHg + 1 nM de PRL (Figura 10D), verifica-se que a PRL diminuiu a intensidade das alterações resultantes da citotoxicidade mercurial. As células gliais remanescentes são numerosas e não apresentam picnose ou lise, mas, apresentam hipertrofia com forma poligonal e processos curtos. Alterações morfológicas não foram observadas após a adição de 1 μ M de MeHg, no co-tratamento de 1 μ M de MeHg + 1 nM de PRL (Figuras 10 A-B) e após a adição de 1 nM de PRL (Figura 9C), comparando-os ao cultivo controle sem SFB (Figura 9B).

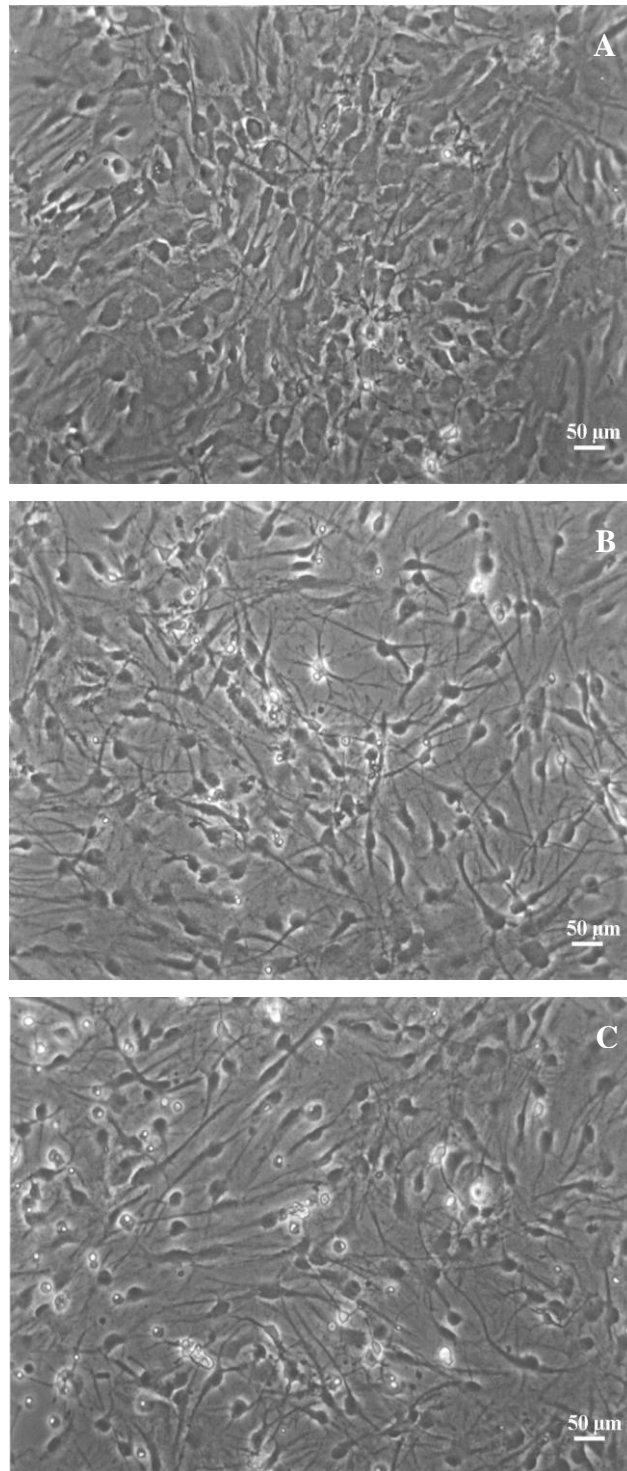


Figura 9: Fotomicrografia de contraste de fase dos cultivos primários de glia tratados com PRL em DMEM/F12 sem SFB por um período de 18 horas. Controle com SFB, morfologia poligonal (A); controle sem SFB, células com morfologia estrelada (B); cultivo tratado com 1 nM de PRL (C).

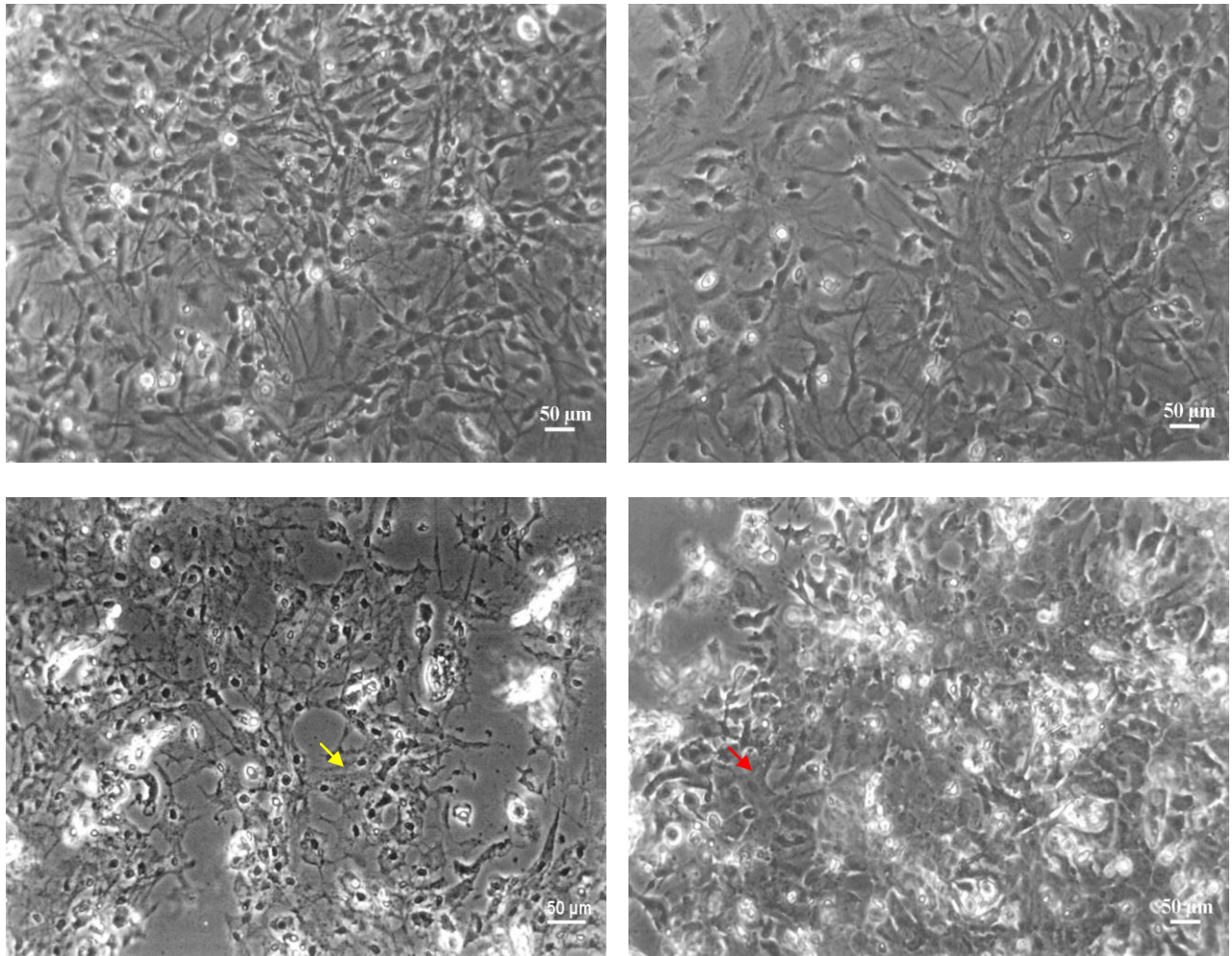


Figura 10: Fotomicrografia de contraste de fase dos cultivos de glia co-tratados com PRL e MeHg por um período de 18 horas em DMEM/F12 sem SFB. Cultivos expostos a $1\mu\text{M}$ de MeHg (A) e o co-tratamento de $1\mu\text{M}$ de MeHg e 1nM de PRL (B), ambos não apresentam alterações morfológicas; cultivos expostos a $5\mu\text{M}$ de MeHg (C), a seta indica células com lise de membrana plasmática e picnose; cultivos expostos a $5\mu\text{M}$ de MeHg e 1nM de PRL (D), a seta indica célula com hipertrofia e curtos processos citoplasmáticos.

3.3.3 Sobre a expressão do GFAP em astrócitos

Para a análise de possíveis efeitos benéficos da PRL sobre a expressão de GFAP, as culturas gliais foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas, então com uma confluência de aproximadamente 85% foram expostos ao co-tratamento de 1 nM de PRL + 1 ou 5 μ M de MeHg, em DMEM/F12 sem SFB. Para a comparação de possíveis efeitos da PRL contra a ação tóxica do metilmercúrio, foram realizadas as intoxicações de 1 e 5 μ M de MeHg. Os astrócitos controle foram obtidos com o cultivo em DMEM/F12 sem SFB. O controle da PRL representou o cultivo tratado apenas com 1 nM de PRL.

Os astrócitos controles apresentam uma distribuição bem característica de filamentos intermediários de GFAP, com exuberante irradiação da região perinuclear em direção aos prolongamentos citoplasmáticos (Figura A). O tratamento com 1 nM de PRL observa-se um aparente aumento do número desses filamentos intermediários comparado ao cultivo controle (Figura B). Em relação à exposição a 1 μ M de MeHg e ao co-tratamento com PRL não se observa nenhuma alteração significativa na expressão de GFAP (Figura 11 C-D).

Contudo, a PRL aparentemente conseguiu atenuar os efeitos deletérios da concentração de 5 μ M de MeHg sobre o GFAP, pois nas culturas expostas a esta concentração, os astrócitos apresentam nítida diminuição do número de células GFAP imunorreativas e de seus processos citoplasmáticos, conseqüentemente perda de organização normal desses filamentos e da marcação de GFAP ao longo de seus prolongamentos (Figura 11E). No entanto, no co-tratamento de PRL + 5 μ M de MeHg, os filamentos estão mais íntegros, com maior densidade de células GFAP imunorreativas caracterizadas pela preservação de uma rede organizada de filamentos perinucleares e formação de filamentos intermediários (Figura 11F).

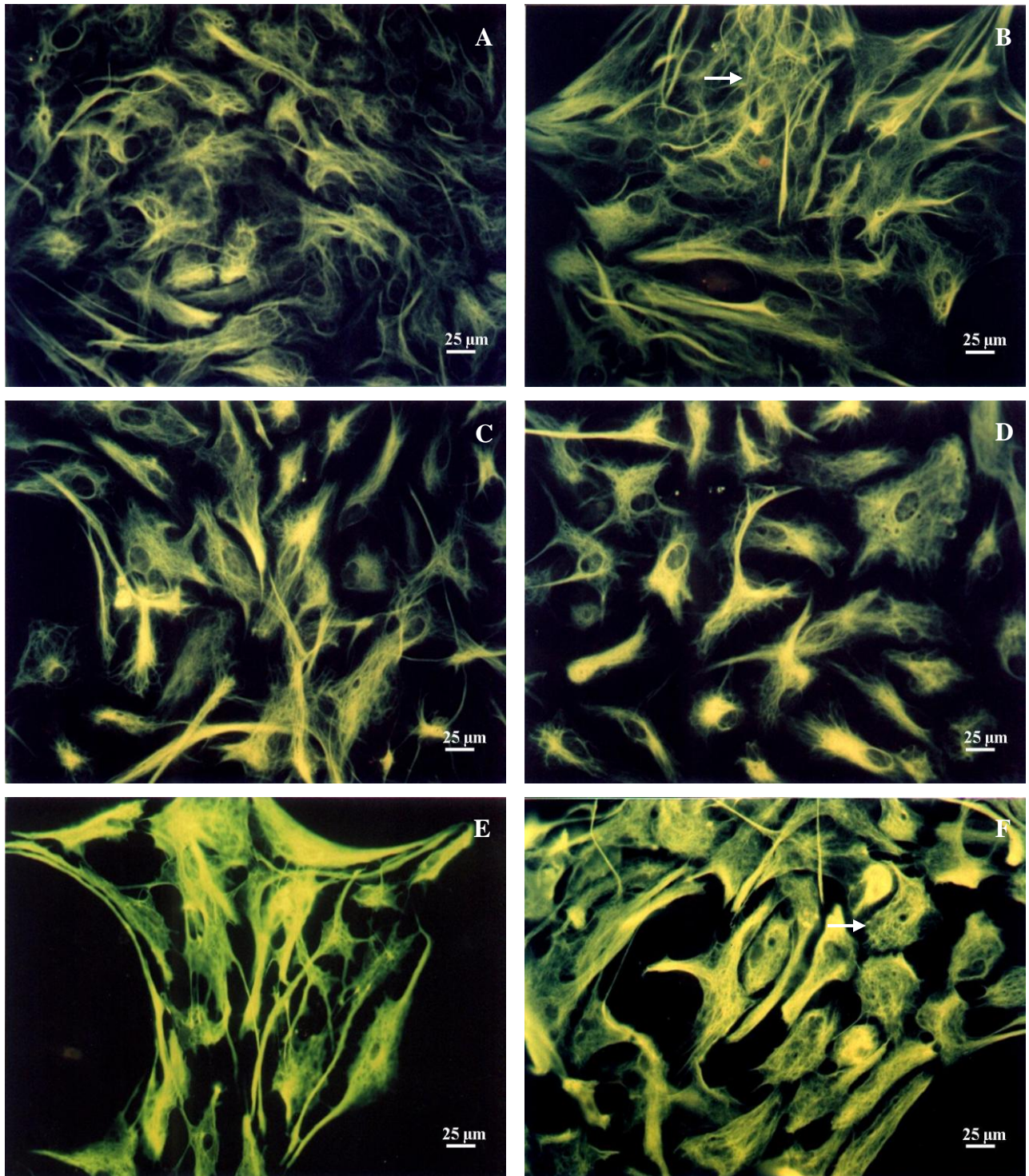


Figura 11: Imunomarcção para GFAP demonstrando os efeitos do co-tratamento de MeHg e PRL sobre a expressão desses filamentos em astrócitos corticais *in vitro* por um período de 18 h. Cultivo controle (A); 1 nM de PRL, a seta branca indica área com numerosos filamentos longos e finos de GFAP (B); 1 μM de MeHg (C); 1 μM de MeHg e 1 nM de PRL (D); 5 μM de MeHg (E); 5 μM de MeHg e 1 nM de PRL (F), a seta branca indica uma célula com redes de filamentos mais organizada, conseqüentemente com morfologia menos alterada.

3.3.4 Proliferação celular

Para analisar se o mecanismo de proteção que a prolactina confere aos cultivos gliais expostos à concentração de 5 μM de MeHg foi devido a indução da proliferação celular dos mesmos, realizou-se o ensaio do índice mitótico. Na técnica de índice mitótico usa-se um potente antimitótico, a colchicina, a qual interfere na função dos fusos mitóticos e causa despolimerização dos microtúbulos fibrilares, devido ligar-se à tubulina, uma proteína que constitui os microtúbulos. Com a adição da colchicina interrompe-se a divisão celular e a mitose é interrompida em metáfase devido à impossibilidade de formar fusos mitóticos. Os cromossomos em metáfase podem ser visualizados ao microscópio e a contagem destes fornece a informação do índice proliferativo das células estudadas.

As culturas gliais controle apresentam um índice mitótico baixo de apenas 0,90, provavelmente devido à cultura ser mantida em meio sem SFB. A PRL mostrou-se capaz de estimular a mitogênese glial na menor concentração, com índice mitótico de 1,80. Entretanto, os cultivos tratados com 1 e 10 nM de PRL apresentam um índice mitótico bastante alto de 4,30 e 4,70, respectivamente, indicando um efeito mitogênico da PRL (Figura 12).

O MeHg inibiu drasticamente a proliferação das células gliais, reduzindo o índice mitótico para 0,05. No entanto, no co-tratamento de 1 nM de PRL + 5 μM de MeHg este índice apresenta um leve aumento para 0,20 e no co-tratamento de 10 nM de PRL + 5 μM de MeHg este índice mitótico aumentou para 0,45, sugerindo que a PRL nestas concentrações foi capaz de atenuar os efeitos do MeHg deletérios sobre a proliferação celular. No co-tratamento, a concentração de 0,1 nM de PRL o efeito contra inibição da mitogênese pelo MeHg na concentração de 5 μM foi bastante baixo, com IM igual a 0,1 (Figura 12).

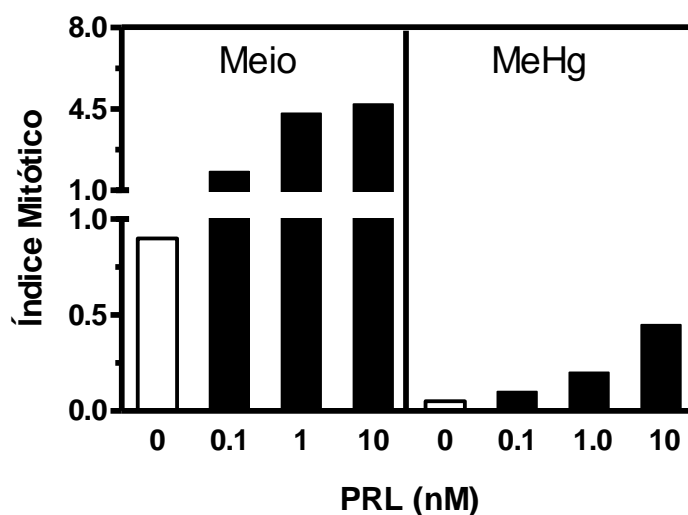


Figura 12: Efeitos da associação 1 nM PRL+5 μ M MeHg sobre o índice mitótico em cultivos de glia cortical sem SFB durante 18 hs de incubação. A PRL exibiu uma potente ação mitogênica. A concentração de 5 μ M de MeHg inibiu a proliferação celular, a PRL nas diferentes concentrações de 1 e 10 nM mostrou-se capaz de atenuar essa inibição causada pelo MeHg .

3.3.5 Liberação de Interleucina-1 β (IL-1 β)

A dosagem de IL-1 β , uma importante citocina pró-inflamatória é uma medida útil para avaliar a resposta inflamatória. Nesse experimento pretende-se analisar quais os efeitos do MeHg, da PRL e associação sobre a liberação dessa citocina pelas células gliais. É importante frisar que se realizou a medida em cultivos tratados sem SFB, desta forma, retirou-se outros fatores interferentes, os quais estão presentes no soro, sobre a secreção de IL-1 β .

A liberação de IL-1 β nos cultivos controles encontra-se na média de $21,9 \pm 0,5$, os tratados com 1 nM de PRL apresentaram aumento ($51 \pm 1,1$) com significância estatística ($***p \leq 0,001$), e os expostos a 5 μ M de MeHg possuíram média de liberação de $22,7 \pm 0,9$, desta forma sem diferença estatisticamente significativa ao controle (Figura 13). Entretanto, o grupo co-tratado com 1 nM de PRL + 5 μ M de MeHg apresentou aumento significativo de liberação de IL-1 β ($62,9 \pm 1,8$), em relação ao grupo controle ($***p \leq 0,001$) e também ao grupo 1 nM de PRL ($a p \leq 0,001$), indicando potencialização da resposta à citotoxicidade induzida pelo metal.

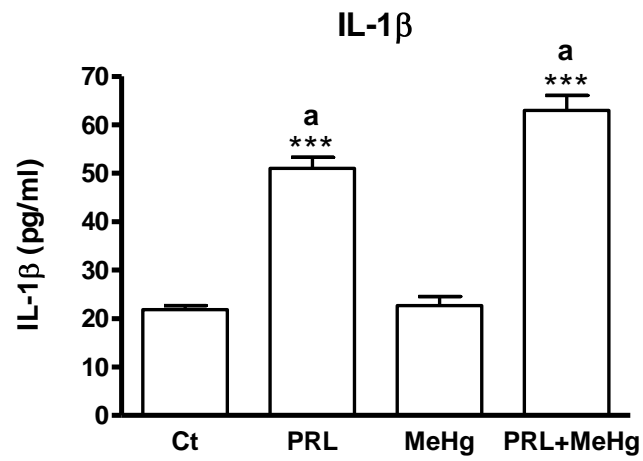


Figura 13: Efeitos da associação 1 nM PRL+5 μ M MeHg sobre a liberação IL-1 β em cultivos de glia cortical sem SFB durante 18 hs de incubação. As colunas representam a média \pm SDM. *** $p \leq 0,01$ em rela o ao cultivo controle e PRL versus PRL + MeHg, a $p \leq 0,001$.

4 DISCUSSÃO

A partir de vários incidentes de contaminação ambiental com o mercúrio no mundo e na região amazônica, muitos estudos surgiram na tentativa de compreender a neurotoxicidade do MeHg (ASCHNER *et al.*, 1990; CASTOLDI *et al.*, 2001; AZEVEDO, 2003), cujo o interesse maior visa elucidar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao processo que culmina com a morte da célula provocada por este xenobiótico. Em contrapartida, outros estudos visam investigar substâncias que possam agir no sentido de proteger o Sistema Nervoso contra as ações neurodegenerativas, inclusive as provocadas pelo MeHg.

O desenvolvimento deste trabalho experimental permitiu o estabelecimento de culturas primárias de células gliais que se apresentaram como uma adequada ferramenta no estudo dos efeitos citotóxicos do metilmercúrio e de um possível efeito protetor da prolactina sobre essas células. Nesses cultivos, as células astrocitárias apresentaram uma morfologia variada: células com morfologia estrelada, corpo celular pequeno e prolongamentos curtos ou longos (figura 3). Além do mais, nesses cultivos ainda foi possível observar células de forma poligonal, achatadas, com corpo celular volumoso quando comparado com o das células estreladas. Essas variações de morfologia dos astrócitos em cultura foram demonstradas por diferentes grupos (WILKIN *et al.*, 1983; GARCIA-ABREU *et al.*, 1996).

A confirmação da presença de astrócitos nos cultivos foi obtida com a marcação das células com anticorpo anti-GFAP, a proteína marcadora de astócitos maduros no sistema nervoso central (ENG, 1971; ENG, 2000). Essa imunomarcação para o GFAP corresponde ao esperado para esses filamentos intermediários (figura 3), onde sua distribuição no citoplasma compreende desde a região perinuclear até a membrana celular (ALLIOT e PESSAC, 1984).

Os efeitos do MeHg sobre a viabilidade de cultivos primários mistos foram caracterizados por progressiva destruição celular relacionada ao tempo e à dose de exposição (Figura 4D). De fato, outro estudo mostrou uma evolução semelhante dos efeitos do metal em preparações com cultivos astrogliais (MORKEN *et al.*, 2005). Em ambos os estudos, os efeitos começam a ser significativos a partir da dose de 5 μ M com 24 hs de incubação em cultivos confluídos com SFB. As exposições em períodos de 2, 4 e 6 hs não produziram dano significativo sobre a atividade mitocondrial (Figura 4A-C), indicando uma certa resistência dos astrócitos em curtos tempos de intoxicação. De fato, alguns trabalhos relatam que comparados a outras células do SNC, como neurônios, as células astrocíticas possuem menor sensibilidade a citotoxicidade do MeHg (KAUR, 2006; KAUR, 2007).

Na exposição de 5 e 10 μM durante período de incubação de 24 hs, os cultivos apresentaram uma redução de 20% e 62% da viabilidade celular, respectivamente (Figura 4D). Estudos anteriores relatam a diminuição da viabilidade dos astrócitos expostos a baixas e altas concentrações de MeHg e confirmam o ensaio de MTT como um bom método para avaliar a citotoxicidade induzida por este metal (MORKEN *et al.*, 2005) o qual reproduziu resultados compatíveis à medida de LDH (lactato desidrogenase) extracelular.

Em estudos similares os efeitos do MeHg nas concentrações de 5-10 μM causaram rápido prejuízo no metabolismo mitocondrial, incluindo bloqueio da síntese de lactato, glutamato e glutathione (ALLEN *et al.*, 2001a; ALLEN *et al.*, 2001b; MORKEN *et al.*, 2005); distúrbios na mitogênese (ZUCKER, *et al.*, 1990; BURKE *et al.*, 2006) e no citoesqueleto (TOIMELA & TÄHTI *et al.*, 1995); formação de espécies reativas de oxigênio (SHANKER, *et al.*, 2004; KAUR *et al.*, 2006); lise de membrana plasmática e morte celular preponderantemente por necrose (ver revisão CASTOLDI *et al.*, 2001; ver revisão LIMKE *et al.*, 2004).

A análise qualitativa da expressão de GFAP por imunofluorescência demonstrou que em algumas exposições, embora não haja alteração significativa da viabilidade celular, visualizam-se mudanças na expressão desses filamentos. Isto acontece com os cultivos expostos a 1 μM de MeHg durante 6 hs (Figura 5C), os quais apresentaram a distribuição dos filamentos de GFAP em numerosos prolongamentos compridos e finos, diferentemente do cultivo controle. Além do grupo exposto a 1 μM de MeHg por 24 hs (Figura 6C), que apresentou diminuição discreta no número de células marcadas. Essas discordâncias indicam uma alteração inicial da expressão de GFAP que antecede o dano sobre a atividade mitocondrial.

Nas exposições de 5 e 10 μM de MeHg (Figura 7) por 24 hs observa-se que o MeHg afetou não apenas a expressão de GFAP, mas também a integridade celular. É possível visualizar claramente a morte celular causada por este metal nessas concentrações, além de perda da marcação para o GFAP, corroborando o resultado da viabilidade celular pelo MTT. Especialmente nos cultivos intoxicados com 10 μM (Figura 7C), a expressão normal desses filamentos intermediários foi criticamente prejudicada, conseqüentemente observa-se astrócitos com morfologia alterada (forma circular). Sabe-se que a morfologia dessas células depende do estado polimerizado e fosforilado de GFAP, desta forma a expressão normal dessa proteína é importante para manutenção da integridade da estrutura celular (LIEDTKE *et al.*, 1996; SLEZAK *et al.*, 2006).

Pela primeira vez, o teste de MTT demonstrou que a PRL pode agir sobre as células corticais do SNC *in vitro* conferindo-lhe uma maior resistência aos efeitos citotóxicos do MeHg. A exposição a 5 μ M de MeHg por 18h reduziu em 85% a viabilidade celular, enquanto no co-tratamento de 5 μ M de MeHg e 1 nM de PRL este decréscimo da viabilidade foi de 48%, demonstrando que a PRL possui ação citoprotetora sobre os cultivos mistos, conseguindo atenuar os efeitos degenerativos deste metal (figura 8B). A intoxicação com 1 μ M de MeHg e o co-tratamento com 1 nM de PRL não apresentou nenhuma diferença significativa em relação ao controle, de maneira semelhante o qual foi observado para a imunomarcagem para GFAP.

Outro aspecto importante a ser discutido são os efeitos da retirada do SFB dos cultivos. Essa retirada permitiu purificar os efeitos da PRL administrada, posto que no soro existe PRL em concentração suficiente, dentre outros fatores de crescimento e citoproteção, para gerar respostas de crescimento e regulação trófica nos cultivos, os quais poderiam induzir falsas interpretações sobre os resultados alcançados. Os cultivos expostos a 5 μ M de MeHg sem SFB apresentaram 65% maior sensibilidade (Figura 8B) comparadas as células intoxicadas na presença de SFB (Figura 4D), sendo esta sensibilidade recuperada em cerca de 48% em cultivos co-tratados naquela condição. Esta diferença sugere que fatores de citoproteção presentes no soro possam atuar atenuando os efeitos tóxicos do MeHg e que no caso de células cultivadas sem soro esta proteção é deflagrada a partir do tratamento com PRL. De fato, maior acúmulo e correspondente maior sensibilidade aos efeitos degenerativos do MeHg foi evidenciado por outros estudos realizados em cultivos de astrócitos de hemisfério cerebral (ADACHI e KUNIMOTO, 2005), onde a dose de 10 μ M de MeHg foi aproximadamente 60% mais efetiva em diminuir a viabilidade celular em cultivos de astrócitos de hemisfério cerebral após 24 h de incubação.

Além disso, é importante frisar que o cultivo controle sem SFB apresentou morfologia estrelada, com muitos prolongamentos e corpo celular reduzido, provavelmente resultado da ausência de fatores de crescimento e alguns nutrientes adicionais contidos no soro fetal bovino. Apesar disto, a viabilidade celular não foi afetada, indicando que esta mudança na morfologia não está associada a algum dano celular (ABE & MISAWA, 2003). ADACHI e KUNIMOTO (2005) também observaram as mesmas mudanças morfológicas sofridas pelo astrócito devido à retirada do SFB e, demonstraram que estas alterações não refletem nenhum dano celular e dependendo do tempo podem ser revertidas.

Em nosso estudo, a diminuição evidente de células imunorreativas observada após tratamento com 5 μ M de MeHg (Figura 11E) confirmou o decréscimo de viabilidade celular

comentado anteriormente. Apesar do número exíguo, as células imunorreativas remanescentes apresentaram intensa marcação, muito embora predominante à região perinuclear, corroborando achados similares observados por outros autores (TOIMELA e TÄHTI, 1995). De fato, aqueles autores descreveram um aumento inicial da expressão de GFAP que diminuiu à medida que avançou o tempo e aumenta a concentração do metal.

Os cultivos co-tratados com 1 nM de PRL e 5 μ M de MeHg apresentaram os efeitos deletérios deste metal sobre a expressão e a organização dos filamentos intermediários de GFAP atenuados (Figura 11F). Por sua vez, o tratamento com PRL (1 nM) aumentou a formação de processos citoplasmáticos com evidentes projeções longas e afiladas, sugerindo que este hormônio atue contribuindo para mudanças na organização morfológica característica de astrócitos a partir da expressão de GFAP (Figura 11B). Estes efeitos suportam evidências anteriores que implicam a PRL como um agente capaz de aumentar a expressão de GFAP e que esta ação poderia estar relacionada a mecanismos de diferenciação celular em astrócitos em desenvolvimento (MANGOURA, et al., 2000) e morfológica em astrócito maduro (WILKIN *et al.*, 1983).

Estas ações da PRL poderiam explicar seus efeitos atenuantes na viabilidade celular e na preservação de astrócitos funcionalmente aptos a expressar GFAP em cultivos expostos ao MeHg em nosso estudo. Além disso, esses dados corroboram os estudos que demonstram ação da PRL sobre a regulação da expressão de GFAP (MANGOURA *et al.*, 2000) e estimulação de secreção de citocinas, como TNF- α e IL-1, as quais reconhecidamente podem regular a expressão desses filamentos (DEVITO *et al.*, 1995).

Essa proteção promovida pela PRL sobre os efeitos do MeHg pode ser bem evidenciada em cultivos que apresentaram drástica alteração da morfologia astrogliar. Pois, as culturas expostas a 5 μ M de MeHg apresentaram picnose nuclear, lise de membrana plasmática, restos celulares e perda de morfologia estrelada característica de astrócitos controles (Figura 10C). Essas alterações morfológicas são semelhantes às caracterizadas para morte por necrose. Muito embora não se tenha avaliado este parâmetro, os resultados estariam de acordo com estudos que demonstram que necrose seria o tipo de morte celular predominante em células nervosas expostas às concentrações $\geq 5 \mu$ M de MeHg (revisão CASTOLDI *et al.*, 2001; ver revisão LIMKE *et al.*, 2004).

No entanto, em cultivos co-tratados visualiza-se que os astrócitos remanescentes são numerosos, apresentam morfologia poligonal e processos curtos típica de cultivos maduros intactos (WILKIN *et al.*, 1983) e redução da picnose nuclear, porém nítida hipertrofia celular e ausência de neurônios (Figura 10D). A partir desses resultados, podemos inferir que no co-

tratamento, a PRL agiu preferencialmente sobre os astrócitos, pois estes não se encontram em processo de morte celular, mas podem estar em um quadro de astrogliose.

O astrócito reativo possui características morfológicas típicas, com aumento da expressão de GFAP e hipertrofia celular do soma e dos prolongamentos (EDDLESTON & MUCKE, 1993; SRIRAM *et al.*, 2004). A astrogliose é um dos mecanismos de resposta inflamatória do sistema nervoso central, na tentativa de reparar os danos que podem ser causados por necrose, isquemia, traumatismo, entre outros. Além disso, o aumento da expressão de GFAP pode ser usado como marcador da resposta inflamatória em diversas patologias, incluindo intoxicação por metais pesados. Adicionalmente, essa proteína desempenha um papel importante no processo inflamatório, como modulador da sobrevivência ou degeneração neuronal (MONNET-TSCHUDI *et al.*, 2007).

Em adição à hipertrofia e aumento da expressão de GFAP, o astrócito reativo também pode sofrer proliferação. Por exemplo, no cérebro de Alzheimer, os astrócitos apresentam uma intensa proliferação como um “esforço” para reparar a área em que ocorre a neurodegeneração (BLASKO *et al.*, 2004). Nesse contexto, o quadro inflamatório também é caracterizado pela expressão de quimiocinas, mediadores e citocinas inflamatórias, sendo os astrócitos reativos importantes fontes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 (CHAVARRIA & ALCOCER-VARELA, 2004) e TNF- α e IL-1 (LEE *et al.*, 1995). Entretanto, os mecanismos de sinalização extracelular envolvidos nesta ativação dos astrócitos ainda são pouco esclarecidos.

Além de atenuar a citotoxicidade do MeHg a PRL mostrou ser um eficiente agente mitogênico desde que elevou em 4.5x o índice mitótico em cultivos semiconfluentes e sem SFB (Figura 12). A potente inibição da proliferação celular promovida pela exposição a 5 μ M de MeHg, também foi parcialmente (45%) recuperada pelo co-tratamento com PRL. Este efeito mitogênico da PRL sobre as células gliais foi evidenciado em outros estudos por diferentes abordagens (DEVITO *et al.*, 1992; MANGOURA *et al.*, 2000). Outros estudos mostraram que a PRL pode participar de respostas gliais a injúria cerebral desde que sua expressão aumentou após hipoxemia isquêmica, muito embora nenhum teste de neuroproteção tenha sido avaliado (MÖDERSCHEIM *et al.*, 2007).

O mecanismo celular pelo qual a PRL induz a proliferação de células ainda não é completamente compreendido. Estudos demonstram que a proteína cinase C (PKC) estaria implicada dentre os sistemas de sinalização transmembrana envolvidos na regulação da proliferação celular induzida por PRL. Devido a PRL induzir a translocação da PKC do citosol para a membrana plasmática no cérebro de ratos *in vivo* e *in vitro* e estimular a

mitogênese astrocitária, DEVITO *et al.* (1992), sugeriram que a PRL poderia atuar como um dos fatores responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso central associado ao fato da presença de altos níveis de PRL e proteínas dependentes de PRL durante o desenvolvimento fetal. Outro mecanismo que foi demonstrado estar envolvido na proliferação dos astrócitos induzida por PRL seria a via de sinalização da fosfolipase D (FLD). A PRL ativaria a FLD, produzindo dois importantes segundos mensageiros, o ácido fosfatídico (AF) e o diacilglicerol (DAG). O AF age produzindo diretamente a resposta mitogênica. O DAG ativa a PCC, a qual é hábil em ativar FLD, gerando uma alça de “feedback” (MANGOURA *et al.*, 2000) positivo.

Apesar da alta capacidade mitogênica da PRL, os resultados do IM demonstraram que a mesma produziu efeito proliferativo nos cultivos co-tratados com MeHg, porém este efeito mitogênico foi bastante reduzido na presença do metal, se compararmos aos cultivos tratados apenas com prolactina nas três diferentes concentrações (Figura 12). No entanto, o efeito protetor da PRL sobre a viabilidade dos astrócitos na presença de MeHg foi bastante pronunciada. Isto sugere que a PRL estaria protegendo as células não apenas por sua capacidade mitogênica, mas, através de outros mecanismos que precisam ainda ser elucidados.

O fato de prolactina produzir efeitos proliferativos, não descarta a possibilidade de atuar garantindo viabilidade celular por mecanismos alternativos como a produção de citocinas pró ou anti-inflamatórias.

Em nossos resultados, PRL (1 nM) mostrou-se eficiente em induzir o aumento de liberação de IL-1 β ($51 \pm 1,1$) quando comparado aos cultivos controles ($21,9 \pm 0,5$) (Figura 13). Entretanto, em cultivos co-tratados com PRL (1 nM) e MeHg (5 μ M) apresentaram liberação estatisticamente superior ($62,9 \pm 1,8$) ao grupo controle e ao grupo intoxicado com este metal ($22,7 \pm 0,9$), sugerindo uma potencialização do efeito da PRL, pela exposição ao metilmercúrio.

Os dados apresentados acima, claramente demonstram a ação da PRL sobre a liberação de uma importante citocina pró-inflamatória, além da potencialização deste efeito em casos de danos às células do SNC. A resposta inflamatória é o mecanismo de proteção mais primitivo desenvolvido pelo organismo, incluindo especialmente o sistema nervoso central. Apesar de controvérsias sobre a ação de citocinas no encéfalo, vários estudos indicam a expressão das mesmas, inclusive demonstrando imunorreatividade para IL-1 β no SNC (ver revisão CORREA *et al.*, 2007). Além disso, indução de IL-1 β em células astrogliais está fortemente associada à astrogliose por aumentar a expressão de GFAP (WOICIECHOWSKY

et al., 2004). Associado a essas evidências, sabe-se que os astrócitos podem funcionar como células imunocompetentes (CHUNG *et al.*, 1991), a PRL pode funcionar como imunorregulador na periferia (BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998) e o eixo hipotálamo - adeno-hipófise – prolactina está intrinsecamente ligado à expressão de IL-1 β no encefálo em quadro de injúria (SKURLOVA *et al.*, 2006).

Finalmente, como a IL-1 β (WOICIECHOWSKY *et al.*, 2004) e PRL (MANGOURA *et al.*, 2000), ambas podem estimular a gliose reativa, podemos inferir, a partir de nossos resultados que este é o principal mecanismo pelo qual a PRL está promovendo proteção aos astrócitos contra os efeitos do MeHg. Portanto, a PRL pode estar envolvida na regulação da expressão de citocinas por astrócitos em caso de injúria no SNC. Contudo, os mecanismos de indução de liberação de IL-1 β pela PRL em astrócitos corticais intoxicados com MeHg, ainda necessitam ser melhor elucidados.

5 CONCLUSÃO

O MeHg causou redução da viabilidade celular, alterações morfológicas com morte celular, expressão de GFAP e proliferação glial, distúrbios atenuados por prolactina, a qual, induziu gliose reativa possivelmente mediada pela potenciação da liberação de IL-1 β resultante a exposição mercurial, confirmando a eficácia desse hormônio em promover neuroproteção.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K., MISAWA, M. Astrocyte stellation induced by Rho kinase inhibitors in culture. **Developmental Brain Research**, v.143, p. 99–104, 2003.

ADACHI, T., KUNIMOTO, M. Acute cytotoxic effects of mercuric compounds in cultured astrocytes prepared from cerebral hemisphere and cerebellum of newborn rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n.12, p. 2308-2311, 2005.

ADAMS, C.R., ZIEGLER, D.K., LIN, J.T. Mercury intoxication simulating amyotrophic lateral sclerosis. **JAMA Journal**, v. 250, n. 5, p. 642-643, 1983.

ALLEN, N. J., & BARRES, B. A. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 15, p. 542–548, 2005.

ALLEN, J. W., EL-OQALY, H., ASCHNER, M., SYVERSEN., T. methylmercury has a selective effect on mitochondri in cultured astrocytes in the presence of [U-¹³C]glutamate. **Brain Research**, v. 908, p. 149-154, 2001a.

ALLEN, J.W., SHANKER, G., ASCHNER, M. Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. **Brain Research**, v. 894, p. 131–140, 2001b.

ALLIOT, F. & PESSAC, B. Astrocytic cell clones derived from established cultures of 8 day pós-natal mouse cerebella. **Brain Research**, v. 306, p. 283-291, 1984.

ASCHNER, M. EBERLE, N.B., GOEDRIE, S., KIMELBERG, H.K. Methylmercury uptake in rat primary astrocyte cultures: the role of the neutral amino acid transport system. **Brain Research**, v. 585, p. 124 – 135, 1990.

ATCHISON, W. D. Is chemical neurotransmission altered specifically during methylmercury-induced cerebellar dysfunction? **Trends Pharmacological Science**, v. 26, n.11, p. 549-57, 2005.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. CERCLA Priority List of Hazardous Substances. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, 2001. Disponível em : www.atsdr.cdc.gov/clist.html. Acesso em 23 de Outubro de 2005.

AZEVEDO, F. A. Toxicologia do Mercúrio. São Paulo: Intetox, 2003.

BAKIR, F., DAMLUJI, S. F., AMIN-ZAKI, L., MURTADHA, M., KHALIDI, A., AL-RAWINY, TIKRITI, S., DHAHIL, H. I., CLARKSON, T. W., SMITH, J. C., DOHERTY, R. A. Methylmercury poisoning in Iraq. **Science**, v. 181, p. 230-241, 1973.

BASTOS, W.R., GOMES, J.P.O., OLIVEIRA, R.C., ALMEIDA, R., NASCIMENTO, E.L., BERNARDI, J.V.E., LACERDA, L.D., SILVEIRA, E.G., PFEIFFER, W.C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**. 2005.

BIGNAMI, A., ENG L.F., DAHL D., UYEDA C.T. Localization of glial fibrillary acidic protein in astrocyte by immunofluorescence. **Brain Research**, v. 43, p. 429-35, 1972.

BLASKO, I., STAMPFER-KOUNTCHEV, M., ROBATSCHER, P., VEERHUIS, R., EIKELBOOM P., GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. How chronic inflammation can affect the brain and support the development of alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. **Aging Cell**, p. 169–176, 2004.

BOLE-FEYSOT, C., GOFFIN, V., EDERY, M., BINART, N., KELLY, P.A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor Knockout mice. **Endocrinology review**, v. 19, p. 225-268, 1998.

BRIDGES, R.J., HATALSKI, C.G., SHIM, S.M., CUMMINGS, B.J., VIJAYAN, V., KUNDI A, COTMAN CW. Gliotoxic actions of excitatory amino acids. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 9, p. 899-907, 1992.

BURKE, K., CHENG, Y., LI, B., PETROV, P., JOSHI, P., BERMAN, R. F., REUHL, K. R., DICICCO-BLOOM, E. Methylmercury elicits rapid inhibition of cell proliferation in the developing brain and decreases cell cycle regulator, cyclin E. **NeuroToxicology**, v. 27, p. 970–981, 2006.

CASTOLDI, A. F., COCCINI, T., CECCATELLI, S., MANZO, L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 197 – 203, 2001.

CHANG, L.W. Mercury, In Experimental And Clinical Neurotoxicology. Spencer, P. S. & Shaumburg, H. H. (eds.). New York, **The Willians and Wilkins Co**, p. 508-526, 1980.

CHAVARRIA, A., ALCOCER-VARELA, J. Is damage in central nervous system due to inflammation? **Autoimmunity Reviews**, v. 3, p. 251– 260, 2004.

CHAVEZ-RUEDA, K., HÉRNÁNDEZ, J., ZENTENO, E., LEAÑOS-MIRANDA, A., LEGORRETA-HAQUET, M. V., BLANCO-FAVELA, F. Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. **Clinical Immunology**, v. 116, p. 182-191, 2005.

CHUNG, I. Y., NORRIS, J. G., BENVENISTE, E. N. Differential tumor necrosis factoralpha expression by astrocytes from experimental allergic encephalomyelitis susceptible and resistant rat strains. **Journal Exp. Med.**, v. 173, p. 801–811, 1991.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspect**, v. 110, p. 11-23, 2002.

CORREA, S. G., MACCIONI, M., RIVERO, V. E., IRIBARREN, P., SOTOMAYOR, C. E., RIERA, C. M. Cytokines and the immune–neuroendocrine network: What did we

learn from infection and autoimmunity? **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 18, p. 125–134, 2007.

DANTON, G. H. & DIETRICH, W. D. Inflammatory Mechanisms after Ischemia and Stroke. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 62, n. 2, p. 127-136, 2003.

DENNY, M.F., ATCHINSON, W.D. Mercurial induced alterations in neuronal divalent cation homeostasis. **Neurotoxicology**, v. 17, n. 1, p. 47-61, 1996.

DEVITO, W. J., OKULICZ, W. C., STONE, S., AVAKIAN, C. Prolactin-Stimulated Mitogenesis of Cultured Astrocytes. **The Endocrine Society**, v. 130, n. 5, p. 2549-2556, 1992.

DEVITO, W.J., AVAKIAN, C., STONE, S., OKULICZ, W.C. Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes is mediated by a protein kinase C-dependent mechanism. **Journal Neurochemistry**, v. 60, p. 835-842, 1993.

DEVITO, W.J., AVAKIAN, C., STONE, S., OKULICZ, W.C., TANG, K-T., SHAMGOCHIAN, M. Prolactin induced expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-alpha in cultured astrocytes. **Journal Cell Biochemistry**, v. 57, p. 290-298. 1995.

DEVITO, W.J., STONE, S., MORI, K. Low concentrations of ethanol inhibits prolactin-induced mitogenesis and cytokine expression in cultured astrocytes. **Endocrinology**, v. 138, n. 03, p. 922-928, 1997.

DINIZ, J. A. P, TRAVASSOS DA ROSA, A. P., GUZMAN, H., XU, F., XIAO S-Y, POPOV, V. L., VASCONCELOS, P. F. C., TESH, R. B. West nile virus infection of primary mouse neuronal and neuroglial cells: the role of astrocytes in chronic infection. **American J. Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p. 691–696, 2006.

DHADANPANI, K.M., HADMAN, M., SEVILLA, L., WADE, M.F., MAHESH, V.B., BRANN, D.W. Astrocyte Protection of Neurons – Role of transforming growth factor- β signaling via A c-Jun-AP-1 protective pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 44, p. 43329-39. 2003.

DOGUSAN, Z., HOOGHE, R., VERDOOD, P., HOOGHE-PETERS, E.L. Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. **J Neuroimmunology**, v. 120, p. 58-66, 2001.

DOREA, J. G. Fish are central in the diet of Amazonian riparians: should we worry about their mercury concentrations? **Environmental Research**, v. 92, p. 232-244, 2003.

DORETTO, M. C., OLIVEIRA-E-SILVA, M., FERREIRA-ALVES, D. L., PIRES, S. G., GARCIA-CAIRASCO, N., REIS, A. M. Effect of lactation on the expression of audiogenic seizures: association with plasma prolactin profiles. **Epilepsy Res.**, v. 54, p. 109-121, 2003.

DORSHKIND, K. & HORSEMAN, N. D. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. **Bioessays**, v. 23, p. 288-294, 2001.

EDDLESTON, M. & MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes: Implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience**, v. 54, p.15-36, 1993.

ENG, L. F., VANDERHAEGHEN, J. J., BIGNAMI, A., GERSTL, B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. **Brain Research**, v. 28, n. 2, p. 351-354, 1971.

ENG, L. F., GHIRNIKAR, R. S., LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP – thirty-one years (1969-2000). **Neurochemical Research**, v. 25, n. 9, p. 1439-1451, 2000.

FERNANDES, A., FALCÃO, A. S., SILVA, R. F., GORDO, A. C., G. M. J., BRITO, M. A., BRITES, D. Inflammatory signalling pathways involved in astroglial activation by unconjugated bilirubin. **Journal Neurochemistry**, v. 96, p. 1667-1679, 2006.

FERRARA, R., MAZZOLAI, B., LANZILLOTTA, E. Temporal trends in gaseous mercury evasion from the Mediterranean seawaters. **Science Total Environmental**, v. 259, p.183-190, 2000.

FRIEDMAN, W. J. Cytokines Regulate Expression of the Type 1 Interleukin-1 Receptor in Rat Hippocampal Neurons and Glia. **Experimental neurology**, v. 168, p. 23-21, 2001.

FUJIYAMA, J., HIRAYAMA, K., YASUTAKE, A. Mechanism of methylmercury efflux from cultured astrocytes. **Biochem. Pharmacol**, v. 47, p. 1525-1530, 1994.

GARCIA-ABREU, J., CAVALCANTE, L. A., SILVA, L. G., MOURA NETO, V. The extracellular matrix of the midline and non-midline midbrain glia: correlations with neurite growth-supporting abilities. **Brazilian Journal of medical end biological research**, v. 29, n. 9, p. 1179-87, 1996.

GOCHFELD, M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 174-179, 2003.

HANSEN, J.C., TORP, U., BOHM., J. Prenatal exposure to methylmercury among Gleenlandic polar Inuits. **Archive Environment Health**, v. 45, n. 6, p. 355-358, 1990.

HANSSON, E. & RÖNNBÄCK, L. Glial neuronal signaling in the central nervous system. **FASEB J.**, v. 17, p. 341-348, 2003.

HARADA, M., NAKANISHI, J., YASADA, E., PINHEIRO, M.C., OIKAWA, T., de ASSIS GUIMARÃES, G., da SILVA CARDOSO, B., KIZAKI, T., OHNO, H. Mercury pollution in the Tapajós River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects. **Environmental International**, v. 27, n. 4, p. 285-90, 2001.

HORSEMAN, N. D. Prolactin. **Kluwer Academic Publishers**, Boston, 2001.

KAUR, P., ASCHNER, M., SYVERSEN, T. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. **NeuroToxicology**, v. 27, p. 492–500, 2006.

KAUR, P., ASCHNER, M., SYVERSEN, T. Role of glutathione in determining the differential sensitivity between the cortical and cerebellar regions towards mercury-induced oxidative stress. **Toxicology**, v. 230, p. 164–177, 2007.

KEHRIG, H.A., MALM, O., AKAGI, H., GUIMARÃES, J.R.D., TORRES, J.P.M. Methylmercury in Fish and Hair Samples from the Balbina Reservoir, Brazilian Amazon. **Environmental research**, v. 77, p. 84-90, 1998.

KIM, Y. S. & JOH, T. H. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 38, n. 4, p. 333-347, 2006.

KOOIJMAN, R., HOOGHE-PETERS, E.L., HOOGHE, R. Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-1 in the immune system. **Adv Immunology**, v. 63, p. 377-454, 1996.

JAUNEAU, A-C, ISCHENKO, A., CHATAGNER, A., BENARD, M., CHAN, P., SCHOUFT, M-T, PATTE, C., VAUDRY, H., FONTAINE, M. Interleukin-1 β and anaphylatoxins exert a synergistic effect on NGF expression by astrocytes. **Journal of Neuroinflammation**, v. 3, n. 8, 2006.

LACERDA, L.D. Updating global mercury emissions from small-scale gold mining in developing and assessing its environmental impacts. **Environmental Geol**, v. 43, p. 308-314, 2003.

LAPING, N.J., TETER, B., NICHOLS, N.R., ROZOVSKY, I., FINCH, C.E. Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines, and growth factors. **Brain Pathology**, v. 4, n.3, p. 259-75, 1994.

LEBEL, J., MERGLER, D., BRANCHES, F., LUCOTTE, M., AMORIM, M., LARRIBE, F., DOLBEC, J. Neurotoxic Effects of Low-Level Methylmercury Contamination in the Amazonian Basin. **Environmental Research**, v. 79, p. 20-32, 1998.

LECHLER, P.J., MILLEN, J.R., LACERDA, L.D., VINSON, D., BONZONGO, J.-C., LYON, W.B., WARWICK, J.J. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? **The Science of the Total Environment**, v. 260, p. 87-96, 2000.

LEE, S.C., DICKSON, W.D., BROSNAN, F.C. Interleukin-1, nitric oxide and reactive astrocytes. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 9, p. 345-354, 1995.

LIEDTKE, W., EDELMANN, W., BIERI, P.L., CHIU, F-C., COWAN, N.J., KUCHERLAPATI, R., RAINE, C.S. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. **Neuron**, v. 17, p. 607-615, 1996.

LIMKE, T.L., HEIDEMANN, S.R., ATCHISON, W.D. Disruption of Intraneuronal Divalent Cation Regulation by Methylmercury: Are Specific Targets Involved in Altered

Neuronal Development and Cytotoxicity in Methylmercury Poisoning? **NeuroToxicology**, v. 25, p. 741–760, 2004.

LYN PATRICK, N.D. Mercury Toxicity and Antioxidants: Part I: Role of Glutathione and alpha-Lipoic Acid in the Treatment of Mercury Toxicity. **Alternative Medicine Review**, v. 7, p. 456-471, 2002.

MANGOURA, D., PELLETIERE, C., LEUNG, S., SAKELLARIDIS, N., WANG, D. Prolactin concurrently activates Src-PLD and JAK/Stat signaling pathways to induce proliferation while promoting differentiation in embryonic astrocytes. **J. Devl Neuroscience**, v. 18, p. 693-704, 2000.

MATERA, L., GALETTO, A., MORI, M. Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells. **Lupus**, v.10, p. 728-734, 2001.

MÖDERSCHEIM, T. A. E., GORBA, T., PATHIPATI, P., KOKAY, I. C., D. R. GRATTAN, WILLIAMS, C. E., SCHEEPENS, A. Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. **Neuroscience**, v. 145, p. 963-973, 2007.

MONNET-TSCHUDI, F., ZURICH, M-G, HONEGGER, P. Neurotoxicant-induced inflammatory response in three-dimensional brain cell cultures. **Human & Experimental Toxicology**, v. 26, p. 339–346, 2007.

MORKEN, T. S., SONNEWALD, U., ASCHNER, M., SYVERSEN, T. Effects of Methylmercury on Primary Brain Cells in Mono- and Co-culture. **Toxicological Sciences** v. 87, n.1, p. 169 – 175, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** v. 65, p. 55 – 63, 1983.

MOURA NETO, V., MALLAT, M., JEANFET, C. Microheterogeneity of tubulin proteins in neuronal and glial cells from the mouse brain culture. **EMBOJ.**, v. 2, p. 1243-1301, 1983.

NELSON, P. T., SOMA, L. A., LAVI, E. Microglia in diseases of the central nervous system. **Annals of medicine**, v. 34, n. 7-8, p. 491-500, 2002.

NORTON, W.T., AQUINO, D.A., HOZUMI, I., CHIU, F.-C., BROSNAN, C.F. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. **Neurochemical Research**, v. 17, p. 877-885, 1992.

O'CALLAGHAN, J.P. & JENSEN, K.F. Enhanced expression of glial fibrillary acidic protein and the cupric silver degeneration reaction can be used as sensitive and early indicators of neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, p. 113-122, 1992.

O'CONNOR, J. J. & COOGAN, A. N. Actions of the pro-inflammatory cytokine IL- β on central synaptic transmission. **Experimental Physiology**, v. 84, p. 601-614, 1999.

- OZUAH PO. Mercury poisoning. **Curr Prob Pediatr**, v. 30, p. 91-99, 2000.
- PFEIFFER, W.C., DE LACERDA L.D., MALON O., SOUZA, C.M., DA SILVEIRA, E.G., BASTOS W.R. Mercury Concentrations in Inland Waters of Goldmining areas in Rondônia- Brazil. **The Science of the Total Environment**, p. 223 – 240, 1989.
- QU, H., SYVERSEN, T., ASCHNER, M., SONNEWALD, U. Effect of methylmercury on glutamate metabolism in cerebellar astrocytes in culture. **Neurochem Int.**, v. 43, p. 411-416, 2003.
- ROSS, M. A. Methylmercury. **Health effects review**, v. 1, p. 1-2, 1996.
- SCHINDLER, C. Cytokine and Jak-Stat signaling. **Exp Cell Res**, v. 253, p. 7-14, 1999.
- SEIFERT, G., SCHILLING, K., STEINHAUSER, C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: A molecular perspective. **Nature Review Neuroscience.**, v. 7, p. 194–206, 2006.
- SHANKER, G., ASCHNER, J.L., SYVERSEN, T., ASCHNER, M. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. **Molecular Brain Research**, v. 128, p. 48-57, 2004.
- SKURLOVA, M., STOFKOVAL, A., JURCOVICOVAL, J. Exogenous IL-1 β induces its own expression, but not that of IL-6 in the hypothalamus and activates HPA axis and prolactin release. **Endocrine Regulations**, v. 40, p. 125-128, 2006.
- SLEZAK, M., PFRIEGER, F. W., SOLTYS, Z. Synaptic plasticity, astrocytes and morphological homeostasis. **Journal of Physiology**, v. 99, p. 84–91, 2006.
- SRIRAM, K., BENKOVIC, S. A., HEBERT, M. A., MILLER, D. B., O'CALLAGHAN, J. P. Induction of gp130-related Cytokines and Activation of JAK2/STAT3 Pathway in Astrocytes Precedes Up-regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein in the 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Model of Neurodegeneration: key signaling pathway for astrogliosis *in vivo*? **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 19, p. 19936-19947, 2004.
- TIFFANY-CASTIGLIONI, E., QIAN, Y. Astroglia as metal depots: Molecular mechanisms for metal accumulation, storage and release. **NeuroToxicology**, v. 22, p. 557-592, 2001.
- TOIMELA, T. A. & TÄHTI, H. Effects of mercury, methylmercury and aluminium on glial fibrillary acidic protein expression in rat cerebellar astrocyte cultures. **Toxicology in vitro**, v. 9, n. 3, p. 317-325, 1995.
- TRENGA, C.A., KUNKEL, D.D., EATON, D.L., COSTA, L.G. Effect of styrene oxide on rat brain glutathione. **Neurotoxicology**, v. 12, p. 165-178, 1991.
- VIVIEN, D. & ALI, C. Transforming growth factor- β signalling in brain disorders. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 2005.

WASSERMAN, J. L., HACON, S., WASSERMAN, M. A. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. **Mundo & Vida**, v. 2, n. 1, p. 46-53.

WILKIN, G. P., LEVI, G., JOHNSTONE, S. R., RIDDLE, P. N. Cerebellar astroglial cells in primary culture: expression of different morphological appearances and different ability to take up [H3]D-aspartate and [H3]GABA. **Developmental Brain Research**, v. 10, p. 265-277, 1983.

WOFCHUK, S.T. & RODNIGHT, R. Age-dependent changes in the regulation by external calcium ions of the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of rat hippocampus. **Dev. Brain Research**, v. 85, p. 181–186, 1995.

WOICIECHOWSKY, C., SCHÖNING, B., STOLTENBURG-DIDINGER, G., STOCKHAMMER, F., VOLK, H-D. Brain-IL-1 β triggers astrogliosis through induction of IL-6: Inhibition by propranolol and IL-10. **Med. Sci. Monit.**, v. 10, n. 9, p. 325-330, 2004.

YEE, S., CHOI, B.H. Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. **NeuroToxicology**, v. 17, n. 1, p.17-26. 1996.

YU-LEE, LI-YUAN. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. **The Endocrine Society**, p. 435-455. 2002.

ZUCKER, R. M., ELSTEIN, K. H., EASTERLING, R. E., MASSARO, E. J. Flow Cytometric Analysis of the Mechanism of Methylmercury Cytotoxicity. **American Journal of Pathology**, v. 137, n. 5, p. 1187-1198, 1990.