



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA PROLACTINA EM LINFÓCITOS
EXPOSTOS A AÇÃO DO METILMERCÚRIO**

MARIA IZABEL DE JESUS

**Belém-Pará
2012**

MARIA IZABEL DE JESUS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA PROLACTINA EM LINFÓCITOS
EXPOSTOS A AÇÃO DO METILMERCÚRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Domingos L.W. Picanço Diniz.

**Belém-Pará
2012**

Ficha Catalográfica

Jesus, Izabel Maria de

Avaliação do efeito protetor da prolactina em linfócitos exposto a ação do Metilmercúrio / Maria Izabel de Jesus. Belém: Universidade Federal do Pará, 2012.

60 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

1. Metilmercúrio. 2. Linfócitos. Prolactina. 3. B95-A. TNF α

Dissertação. I. Universidade Federal do Pará. II. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 549.291

MARIA IZABEL DE JESUS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA PROLACTINA EM LINFÓCITOS
EXPOSTOS A AÇÃO DO METILMERCÚRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Domingos L. W. Picanço Diniz

Banca Examinadora:

- Orientador
Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz
Titulação: Pós-Doutor
Instituição: Universidade Federal do Pará

Professor: Marcelo de Oliveira Lima
Titulação: Doutor
Instituição: Instituto Evandro Chagas

Professor: Edna Cristina Santos Franco
Titulação: Doutora
Instituição: Instituto Evandro Chagas

Professor: Edivaldo Herculano Correa de Oliveira
Titulação: Pós-Doutor
Instituição: Universidade Federal do Pará

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a memória de meu mui amado sobrinho (filho do coração), Denner Mikael de Jesus, cuja vida foi tão precoce e abruptamente ceifada de nosso convívio. Agradeço a Deus o privilégio e a honra de tê-lo conosco por estes breves vinte anos. Seu maior legado foi sua admirável capacidade de fazer amigos e mantê-los até a hora de sua partida. Meu consolo está na certeza de que um dia nos encontraremos no céu e então ficaremos juntos por toda a eternidade, amém!

AGRADECIMENTOS

À Deus, porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas;

Ao Prof. Dr. Domingos Wanderley Picanço Diniz, pelos ensinamentos, atenção e paciência infinda ao longo desta jornada;

Ao Instituto Evandro Chagas, na pessoa de Dra. Elisabeth Santos, pelo apoio decisivo para a concepção deste trabalho;

À minha família, núcleo principal desta “novela mexicana” que foi esta jornada:

Ao Hélcio e a Ana Heliza, pelo amor e compreensão;

Aos meus pais, David e “Tacinha”, os quais agora carecem mais ainda de toda atenção e amor;

Aos meus irmãos (as), sobrinhos (as), e cunhados (as);

Ao “maninho do coração” Pedro Ângelo, pelo cuidado com a família, pela sua torcida constante e por querer sempre o melhor para nós. Obrigado maninho!

À professora “sim”, tia “não” Lidinéia Rodrigues, pelo apoio nesta jornada;

À minhas amadas tias Izabel Ferreira (*in memoriam*) e Virginia Costa, matriarcas do meu núcleo familiar, pelo papel importante na minha trajetória de vida;

Mui especialmente aos meus sogros, Antônio Cândido Bartolomeu e Guiomar Bartolomeu (ambos *in memoriam*), pelo carinho, ternura e atenção irrestritos no período que convivemos;

Aos meus amigos, por vezes, mais chegados que irmãos:

Ao meu amigo e “sócio”, o pesquisador Edilson Brabo (*in memoriam*), pelo exemplo no pessoal e profissional;

À minha amiga Lourdes Moraes (*in memoriam*), por ensinar com seu exemplo de vida, que a generosidade é uma qualidade fundamental no ser humano;

À minha amiga Ivanoir, pela amizade perene;

A umas meninas tão especiais, que quando citadas lembram (eu disse lembram!) notas musicais:

Do (Dorô), Mi (Emilene), Fá (Fafá), Fe (Fernanda), e Eni;

À minha amiga e irmã (DNA “espiritual”), Elzicléia Ramos;

A todos os meus amigos e amigas da Seção de Meio Ambiente (SAMAM) do Instituto Evandro Chagas (IEC), que de tão próximos, já são meus “primos” e “primas” (DNA do coração). Aos quais, peço perdão por não nominá-los aqui, não necessariamente por questão de espaço na folha, mas, sobretudo por causa do atualmente, reduzido espaço na memória. Até porque, como falei antes, o DNA é o do coração e não da cabeça.

A chefia da SAMAM/IEC, aos funcionários, pesquisadores e colaboradores dos laboratórios de Cultura de Tecidos, de Virologia, de Microbiologia, de Toxicologia e da área administrativa - O meu agradecimento irrestrito a todos;

Aos colegas do Mestrado e professores do Laboratório de Neuroendocrinologia - especialmente a Daisy, Andrea, e Anderson, pela solidariedade e colaboração na troca de conhecimentos e experiências, importante contribuição para a realização deste trabalho;

A CAPES, pelo suporte científico e financeiro;

A todos que de alguma forma fizeram parte desse capítulo da minha vida, o meu muitíssimo obrigado;

A Deus, mais uma vez, por ser Ele o “Alfa” e o “Ômega”, Princípio e Fim, Inspiração, Fonte e Refúgio em todo tempo: Minha gratidão eterna.

Vem de Ti, Senhor

“Não tenho palavras pra agradecer Tua bondade

Dia após dia me cercas com fidelidade

Nunca me deixes esquecer

Que tudo o que tenho

Tudo o que sou

O que vier a ser

Vem de Ti, Senhor

Dependo de Ti

Preciso de Ti

Sozinho nada posso fazer

Descanso em Ti

Espero em ti

...

Nunca me deixes esquecer

Que tudo o que tenho

Tudo o que sou

O que vier a ser

Vem de Ti, Senhor”

Grupo Diante do Trono

Composição: Ana Paula Valadão Bessa

RESUMO

O mercúrio pode ser encontrado em diversas formas, sendo a orgânica como metilmercúrio (MeHg), considerada a mais tóxica. Facilmente absorvido por via oral, se acumula na cadeia trófica e se amplifica em carnívoros aquáticos, principalmente em peixes, daí o risco maior para as populações que deles se alimentam preferencialmente, como os ribeirinhos Amazônidas. O efeito neurotóxico dessa forma de mercúrio tem sido amplamente demonstrado através de estudos epidemiológicos e experimentais. Alguns desses estudos também mostraram que hormônios e substâncias antioxidantes podem agir protegendo o organismo contra a ação deletéria do mercúrio. A prolactina é um destes hormônios que apresenta ação protetora, mas age também como citocina pró-inflamatória. Desde que o MeHg pode também agir como uma substância imunotóxica, procuramos neste trabalho estudar a ação citoprotetora da PRL em cultivos contínuos de linhagem B95-A de linfócitos de primata afim de avaliar sua fragilidade ao MeHg e sua reatividade a ação da PRL. Com o objetivo de avaliar a integridade funcional dos linfócitos expostos ao MeHg utilizou-se teste de reação colorimétrica para 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio bromide (MTT), o qual detecta atividade metabólica mitocondrial. Para avaliar a resposta imune do linfócito, medidas da concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) no sobrenadante do cultivo, foram realizadas por ELISA. É uma citocina pró-inflamatória liberada em resposta a agressão celular de diferentes causas, incluindo estresse oxidativo, um dos efeitos agudos mais evidentes do MeHg, além disso, esta citocina também poder responder a regulação prolactinérgica em linfócitos humanos. Após 18 horas de exposição do cultivo a crescentes concentrações do metal (0,1; 1, 5, 10 e 50 μ M) verificou-se significativa diminuição do tipo dose-dependente da viabilidade celular a partir de 1 μ M (35%) e progressivamente até 50 μ M (80%), quando poucas células íntegras foram encontradas nos cultivos. Um efeito bifásico em forma de “sino” ocorreu na liberação de TNF α , onde concentrações mais baixas de MeHg inibiram (0,1 e 1 μ M), a intermediária estimulou (5 μ M) e as duas maiores (10 e 50 μ M) voltaram a inibir. A prolactina também diminuiu a viabilidade celular, em cerca de 30%, somente na dose mais elevada (10 nM). Por outro lado, na dose de 1 nM a PRL preveniu a diminuição de 40% da viabilidade celular resultante a exposição ao MeHg a 5 μ M. Esta dose de 1 nM de PRL foi a única a estimular a liberação de TNF α , mas curiosamente, reverteu a liberação desta citocina quando associada a 5 μ M de MeHg, concentração que igualmente estimulou a secreção de TNF α . Os resultados confirmaram a toxicidade do MeHg para linfócitos de primatas (linhagem B95-A) e sua reversão por uma possível ação protetora da PRL. Um efeito bifásico na secreção de TNF α resultou da exposição ao MeHg, sugerindo a presença de diferentes mecanismos citotóxicos resultantes a ação mercurial. Por outro lado, a PRL foi pouco efetiva em estimular a secreção daquela citocina, invertendo esta resposta quando associada ao MeHg. No entanto, estes resultados são preliminares e carecem de um estudo mais acurado para sua completa elucidação.

Palavras-chave: Metilmercúrio, linfócitos B95-A, prolactina, TNF α

ABSTRACT

Mercury can be found in several forms, as being organic methylmercury (MeHg), considered the most toxic. Readily absorbed orally, accumulates in the food chain and is amplified in aquatic carnivores, especially in fish, hence the greater risk to populations that preferentially feed on them, such as riparian Amazonian populations. The neurotoxic effect of this form of mercury has been widely demonstrated by epidemiological and experimental studies. Some of these studies have also shown that hormones and antioxidants may act by protecting the body against the deleterious effects of mercury. Prolactin is a hormone that has such protective action, but also acts as a proinflammatory cytokine. Since MeHg can also act as an immunotoxic substance, we have studied the cytoprotective action of PRL in continuous cultures of strain B95-A primate lymphocytes in order to assess their vulnerability to MeHg and its responsiveness to the action of PRL. In order to assess the functional integrity of lymphocytes exposed to MeHg we used to test color reaction for 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), which detects activity mitochondrial metabolism. To evaluate the immune response of lymphocytes, measures of tumor necrosis factor alpha (TNF α) concentration in the middle were performed by ELISA. It is a proinflammatory cytokine released in response to cellular injury from different causes, including oxidative stress, one of the most obvious acute effects of MeHg, and this cytokine also be able to answer prolactin regulation in human lymphocytes. After 18 hours of cultivation exposure to increasing concentrations of the metal (0.1, 1, 5, 10 and 50 mM) showed significant decrease in dose-dependent cell viability from 1 mM (35%) and progressively up to 50 mM (80%), when few intact cells were found in the cultivation. A biphasic effect in a "bell" shaped occurred in the release of TNF- α , where lower concentrations of MeHg inhibited (0.1 and 1 mM) stimulated the intermediate (5 mM) and the two largest (10 and 50 mM) returned to inhibit. Prolactin also decreased the cell viability by about 30% only at the highest dose (10 nM). Moreover, at a dose of 1 nM prevented PRL 40% decrease in cell viability due to exposure to 5 mM MeHg. This dose of 1 nM PRL was the only one to stimulate the release of TNF- α , but curiously reversed the release of this cytokine when combined with 5 mM of MeHg, concentrations that also stimulated the secretion of TNF- α . The results confirmed the toxicity of MeHg to lymphocytes of primates (strain B95-A) and its reversion by possible protective action of PRL. A biphasic effect on the secretion of TNF α resulted from MeHg exposure, suggesting the presence of different mechanisms of cytotoxic action resulting from mercury. Moreover, PRL was less effective in stimulating the secretion of that cytokine, reversing this response when the associated with MeHg. However, these results are preliminary and require a more accurater study for their complete elucidation.

Keywords: Methylmercury, B95-A lymphocytes, prolactin, TNF α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração da relação do mercúrio com o homem	18
Figura 2 - Ilustração da preparação do modelo experimental	28
Figura 3 - Ilustração da exposição ao Metilmercúrio	28
Figura 4 - Ilustração do tratamento com a Prolactina	29
Figura 5 - Ilustração do tratamento conjunto de Prolactina e Metilmercúrio	29
Figura 6 - Teste de viabilidade celular por MTT	31
Figura 7 - Demonstração esquemática e prática da dosagem de liberação do TNF- α pelo método de Elisa	32
Figura 8 : Lavadora de Microplaca	32
Figura 9 . Leitora de Microplaca	32
Figura 10 . Viabilidade celular de células da linhagem B95a expostas ao MeHg	34
Figura 11 . Viabilidade celular de células da linhagem B95a tratadas com PRL	35
Figura 12 . Viabilidade celular de células da linhagem B95a expostas a associação de PRL(1 nM) + MeHg(5 μ M)	36
Figura 13 . Efeitos do MeHg na secreção de TNF- α em células da linhagem B95a por um período de 18 h	37
Figura 14 . Efeitos da PRL na secreção de TNF- α em células da linhagem B95a	38
Figura 15 . Efeito da associação PRL (1 nM) + MeHg (5 μ M) na liberação basal de TNF- α em células da linhagem B95a	39

LISTA DE ABREVIATURAS

B95-A -Células B de Primata não humano, transformada pelo Vírus Epstein baar

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA- Ethylenediaminetetra-acetic acid

IEC - Instituto Evandro Chagas

EPM- Erro padrão da média

IL-1 β - Interleucina-1 β

IL-10- Interleucina-10

JAK- Janus cinase

LPS- Lipopolissacarídeo bacteriano

MHC- Complexo de histocompatibilidade

MTT- (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio bromide)

NK- Células natural killers

NO- Óxido nítrico

NOS- Óxido nítrico sintase

PMN- Células polimorfonucleadas

PRL- Prolactina

PRL-R- Receptor de prolactina

RNA- Ácido ribonucléico

SBF- Soro Bovino Fetal

SNC- Sistema Nervoso Central

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

TNFR- Receptor TNF

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
1.1. Aspectos gerais sobre mercúrio e metil mercúrio	13
1.2. Metilmercúrio e as implicações na saúde humana	15
1.3. Ações de compostos mercuriais em células do Sistema Imune	16
1.4. Linfócitos B e a Produção de Citocina	19
1.5. Linfócitos e Prolactina	21
1.6.Células B95A.....	23
1.7. A problemática do mercúrio na Amazônia	23
1.8. Objetivos	26
1.8.1.Geral	26
1.8.2.Específicos	26
2.MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1. Preparação do modelo experimental	27
2.2. Exposição ao metilmercúrio	28
2.3. Tratamento com prolactina	29
2.4.Teste de viabilidade celular	30
2.5. Dosagem de citocina por técnica de ELISA	31
2.5.1. Dosagem de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)	31
2.6- Aspectos éticos	33
2.7.Análise estatística	33
3. RESULTADOS	34
3.1. Efeitos do MeHg sobre a viabilidade celular	34
3.2. Efeitos da PRL na Viabilidade Celular	35
3.3. Efeitos da PRL em linfócitos expostos ao MeHg	36
3.4. Efeitos do MeHg na secreção de TNF- α	37
3.5. Efeitos da PRL na secreção de TNF- α	38
3.6. Efeitos da exposição simultânea a MeHg e PRL, sobre a liberação TNF- α	39
4. DISCUSSÃO	40
5.CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
APÊNDICES	54
Apêndice A	54
Apêndice B	55
ANEXO A	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre Mercúrio e Metilmercúrio

O Mercúrio, por ser o único metal encontrado na natureza na forma líquida em condições normais de temperatura e pressão e por apresentar uma cor classicamente descrita como mágica, tem exercido certo fascínio no ser humano desde que passou a ser utilizado por este. Relatos de achados arqueológicos apontam para a utilização de substâncias à base de mercúrio, o que seria considerada sua primeira maneira de utilização: pinturas de objetos decorativos e pintura facial. Uma substância chamada Cinábrio, cuja fórmula química é HgS, Sulfeto de Mercúrio, foi encontrada em tumbas do Egito datadas de antes de 1500aC e de forma semelhante, foi achado em tumbas da Grécia (AZEVEDO, 2003).

Ao longo da Idade Média, o mercúrio foi muito usado nos processos de amalgamação (formação de ligas, geralmente com prata e ouro), mas tinha sua principal aplicação na Alquimia, a ponto de se tornar parte importante na história dessa prática (figura 1). O mercúrio apesar de já ter sido, na época medieval, objeto de muitos estudos, somente foi reconhecido como metal a partir do final da Idade Média, com o avanço do conhecimento a respeito de suas características físicas e químicas. Este reconhecimento como elemento químico ocorreu no final do século XVIII por Antoine Laurent de Lavoisier (QUEIROZ, 1995). Duas pioneiras utilizações desse elemento no meio científico se deram nas invenções do barômetro por Torricelli, em 1643, e do Termômetro de mercúrio, por Fahrenheit em 1720 (MIRANDA *et al*, 2007).

Desconhecendo seu potencial para desencadear efeitos tóxicos, antigos povos (Gregos, Romanos, Assírios), utilizavam o mercúrio com fins medicinais como tratamento para doenças que atingiam diversas partes do corpo, como olhos, ouvidos, pulmões e outros. Os

Chineses, particularmente, acreditavam que o uso do mercúrio poderia prolongar a vida. Todavia, o perigo à saúde e à vida, causado pelo mercúrio começou a ser percebido pelos Romanos. Ainda assim, o elemento continuou sendo usado em larga escala com o objetivo de cura e embora o mercúrio tenha sido a primeira substância química a ser alvo de legislação para controle de morbidade em trabalhadores (AZEVEDO, 2003), produtos a base do mesmo, como o mercurocromo, anti-séptico de composto organomercurial, provavelmente continuam sendo usados até hoje em várias partes do mundo.

As considerações sobre riscos à saúde pelo uso de composto mercurial em vacinas baseiam-se no pressuposto de que o etilmercúrio é toxicologicamente similar ao metilmercúrio, sobre o qual muito se conhece com relação aos efeitos tóxicos, embora aspectos próprios da disposição dos compostos de etilmercúrio e sua toxicidade permitam acreditar-se que tal pressuposto pode não estar necessariamente correto (CLARKSON, 2002).

O metal mercúrio, cujo número atômico é 80, tem símbolo Hg. Situa-se no grupo IIB da tabela periódica. Apresenta-se, além de na forma elementar (mercúrio metálico), também como mercúrio inorgânico e mercúrio orgânico. Este metal dificilmente pode ser encontrado como elemento livre no ambiente, e está amplamente distribuído em pequenas concentrações, por toda crosta terrestre. A intensa mobilização e difusão do metal para a superfície, facilitada pelas altas temperaturas, ocasionam zonas de fundas fraturas geológicas onde estão localizados os cinturões geoquímicos de mercúrio, áreas que podem originar depósitos extraíveis, quando o percentual de mercúrio acumulado excede os valores médios encontrados (AZEVEDO, 2003).

Independente da fonte (natural ou artificial) o mercúrio emitido é inorgânico, principalmente como vapor metálico (Hg). O Hg inorgânico poderá ser metilado por dois processos diferentes em condições aeróbias e anaeróbias: processo biológico, através de

bactérias e fungos em presença de Metilcobalamina; e o processo químico ou abiótico, por três vias principais: (a) Reação de Transmetilação; (b) Radiação Ultravioleta na reação com compostos orgânicos doadores do grupo metila e (c) Reação com os ácidos Fúlvico e Úmico. O processo da metilação do mercúrio e sua bioacumulação na cadeia alimentar aquática está na dependência de inúmeros fatores, como a temperatura, pH, quantidade de bactérias presentes no meio, tipo de sedimento ou solo, concentração de sulfeto, condições de Oxi-redução do meio, bem como da sazonalidade (BISINOTI E JARDIM, 2004).

1.2 Metilmercúrio e as implicações na saúde humana

Após a absorção, o metilmercúrio é distribuído para todos os tecidos do corpo. Sua excreção se dá via fezes, urina e leite materno. A dieta alimentar, constituída de peixes representa a principal fonte de exposição do homem a este tipo mercurial. Deste modo, a preocupação com os possíveis agravos a saúde relacionados à ação tóxica desse metal na região é crescente, uma vez que, este é o principal tipo de alimentação referido pelos ribeirinhos, especialmente aqueles residentes nas áreas próximas de atividades garimpeiras da Amazônia, (BRABO *et al*, 2000).

Trabalhos realizados na bacia do rio Tapajós, utilizando peixes como *Plagioscion sp.*(pescada), *Cichla sp.*(tucunaré), *Brachyplatystoma filamentosum* (filhote), Cichlidae (acará), *Mylossoma duriventre* (pacu), *Pseudoplatystoma fasciatum* (surubim), *Pellona spp.* (sarda) e *Leporinus spp.* (aracu), encontraram em áreas de mineração, valores que iam de 0,02 até 2,75 mg/kg, e para peixes de rios não expostos, os valores variaram de abaixo do limite até 0,10 mg/kg (BRABO *et al*, 2000; BISINOTI & JARDIM, 2004).

Os principais efeitos na saúde humana, decorrentes da exposição ao MeHg são de origem neurológica e podem apresentar-se por variados sintomas: escotomas (visão turva),

ataxia (reduzida coordenação para andar), neurastenia (dor nos nervos), perda da audição, disartria (dificuldade na articulação das palavras), deterioração mental, tremor muscular, distúrbio da motilidade e, em exposição mais graves, paralisia e morte (BISINOTI e JARDIM, 2004).

No entanto, embora o mercúrio seja reconhecidamente um metal neurotóxico, o seu papel como possível causador de disfunções no sistema imune tem sido pesquisado na literatura nas últimas décadas (CHRISTENSEN *et al*, 1993; SHENKER *et al*, 1993; MATHIESON, 1995; BAHIA *et al*, 1999; KIM & SHARMA, 2003).

1.3 Ações de Compostos Mercuriais em Células do Sistema Imune

Os possíveis efeitos do mercúrio no sistema imune têm sido estudados utilizando vários tipos de células imunocompetentes. Shenker *et al* (1993), avaliando o efeito imunotóxico de compostos mercuriais em linfócitos T e monócitos humanos encontrou que o mercúrio inibiu a habilidade dessas células de sintetizarem e secretarem a interleucina IL-1. Este estudo demonstrou ainda que compostos mercuriais têm efeitos adversos tanto nas funções dos neutrófilos quanto naquelas desenvolvidas pelos macrófagos. Em baixas doses, o HgCl₂ pode ter potente efeito no sistema imune de roedores, como estimulação ou supressão, dependendo do estado do animal envolvido, levando ainda em animais susceptíveis, a processos de auto imunidade (MATHIESON, 1995).

Um estudo usando duas diferentes linhagens de linfomas, um linfoma de célula T murino (EL4) e um linfoma de célula B (A20), demonstrou um decréscimo dose dependente na viabilidade celular, na integridade da membrana e na proliferação das duas linhagens (KIM & SHARMA, 2003). Shenker *et al* (2000) demonstraram que a citotoxicidade do mercúrio

b(orgânico ou inorgânico) em linfócitos e monócitos, por alteração na atividade mitocondrial dessas células, resultou em sinais de apoptose nesses tipos celulares.

Outros estudos, por sua vez, procurando analisar a ação de substâncias tóxicas, como o mercúrio, em cultura de células sanguíneas, demonstraram que linfócitos e linhagens linfoblásticas apresentaram decréscimos de produção de imunoglobulinas, e de proliferação (BAHIA *et al*, 1999). Alguns desses efeitos têm sido relatados através da avaliação das ações desse metal na produção de citocinas e imunoglobulinas, que podem indicar a implicação deste, na indução de doenças alérgicas e autoimunes (MATHIESON, 1995; DUCHEMM *et al*, 2007; HEMDAM *et al*, 2007).

Neste sentido, um número mais expressivo de estudos utilizando o linfócito como modelo para avaliar a capacidade imunotóxica das diversas formas de mercúrio, principalmente sua forma orgânica, parece ser necessário, uma vez que este metal pode exercer distintos efeitos em diferentes tipos de células do sistema imune, e o avanço do conhecimento de seu potencial imunomodulador é importante para a descrição da participação de citocinas no processo imunotóxico do mercúrio, o que pode ser útil para uma melhor compreensão do processo de comprometimento desse sistema.

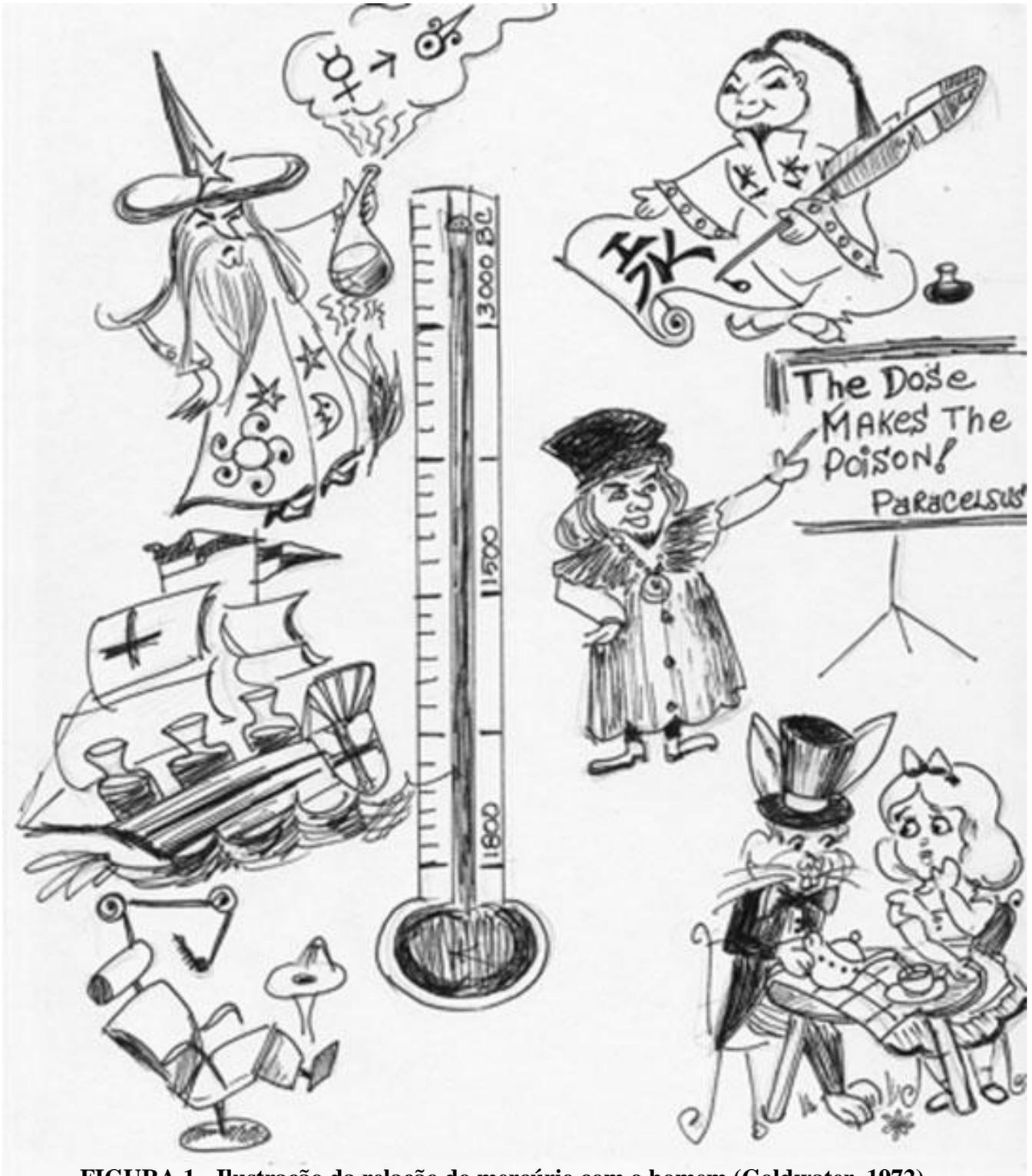


FIGURA 1 - Ilustração da relação do mercúrio com o homem (Goldwater, 1972).

1.4 Linfócitos B e a Produção de Citocinas

O organismo humano possui vários mecanismos de defesa frente às mais diversas agressões. O sistema imune destaca-se nesse cenário, como o mais importante desses mecanismos. Como constituinte do sistema imune, o linfócito B ou célula B, como também é conhecido, tem seu processo de desenvolvimento com ocorrências de eventos que iniciam na medula óssea, onde são originados dos progenitores linfóides. Em seguida essas células seguem para o baço e lá ocorrem as passagens intermediárias (T1, T2 e T3), chamada de Estágios Intermediários de Maturação, antes de alcançarem a maturidade celular ideal. Durante a passagem desses estágios ocorre um processo de Seleção Periférica Negativa que eliminará, através da apoptose, as células B com potencialidade para montagens de respostas autoimunes (REYES *et al*, 2006).

O linfócito B exerce funções importantes tanto nas respostas imunes inatas quanto nas adaptativas. No primeiro tipo de respostas, o linfócito B atua como célula apresentadora de antígeno (CAA), que fagocita os antígenos, processam-no em peptídeos e os expõem em sua superfície celular junto a moléculas chamadas Proteínas de Histocompatibilidade Principal Classe II (MHC de Classe II), que formará com os peptídeos, um complexo de membrana reconhecível por um subgrupo de linfócitos T, chamados de células T CD4+ (ABBAS, 2005).

No segundo tipo de resposta, os linfócitos B, atuam na expressão de receptores de antígenos em sua superfície celular, chamados de anticorpos ou imunoglobulinas que servirão para o reconhecimento do antígeno e a interação com o mesmo. Participam ainda desse processo, as citocinas, que são substâncias efetoras liberadas primariamente, por linfócitos T, que atuam como mediadoras solúveis do sistema imune, agindo na co- estimulação da expansão clonal do linfócito B, mediante interação de contato com subgrupos de linfócitos T, diferenciam-se em células secretoras de anticorpos, os plasmócitos (GORCZYNSKI & STANLEY, 2001).

Os linfócitos também têm sido utilizado como modelo em estudos que procuram analisar a ação de substâncias tóxicas como o mercúrio, em cultura de células sanguíneas. Esses estudos têm demonstrado que linhagens linfoblásticas e linfócitos apresentaram diminuição no índice de proliferação (BAHIA *et al*, 1999, SHENKER *et al*, 1992a, 1993a) e na produção de imunoglobulinas, citocinas (SHENKER *et al*, 1992a, 1993a). Um estudo utilizando linfócitos e monócitos demonstrou que a citotoxicidade do mercúrio (orgânico ou inorgânico) em linfócitos e monócitos, por alteração na atividade mitocondrial dessas células, resultou em sinais de apoptose nesses tipos celulares (SHENKER *et al*, 2000).

As células B são primariamente reconhecidas funcionalmente pela produção de anticorpos, incluindo o autoanticorpo. Entretanto, o interesse por esses linfócitos tem sido revisto recentemente e várias pesquisas tem lhe atribuído outros papéis na função imune, inclusive o de produtor de citocinas (YOUINOU, 2007; MIZOGUCH & EBHAN, 2006; FILLATEAU *et al*, 2002; HARRIS *et al*, 2000 e HARRIS *et al*, 2005). Esse papel tem sido objeto de pesquisa de vários grupos nos últimos anos. Em um estudo que utilizou como modelos celulares linfócitos B e célula T CD4+ dentro de condições inflamatórias induzidas pela infecção por *Toxoplasma gondii* ou *Heligmosomides polygyrus*, foi demonstrado que ambos os tipos celulares foram capazes de produzir um grande número de citocinas dentro das condições inflamatórias utilizadas (HARRIS *et al*, 2000 ; HARRIS *et al*, 2005).

Na última década, um número expressivo de estudos inflamatórios experimentais *in vivo* tem reforçado essa atribuição ao linfócito B. Uma dessas citocinas que tem sido relatada como também produzida por linfócito B de memória quando estimulado é o fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) em contextos de doenças autoimune (DUDDY *et al* ,2007 ; LUND, 2008). Outros estudos relatam que essa citocina produzida por célula B, tem papel importante na organogênese do tecido linfóide e no controle do desenvolvimento de células dendríticas (FU Y-X *et al*, 1998 ; ENDRESS *et al*, 1999). Desse modo, a capacidade dessa célula em

produzir citocina da família TNF, lhe atribui grande importância nos diversos aspectos da imunidade (LUND, 2008).

Outras pesquisas relatam uma considerável produção de IL-10 por essa célula em artrites (MAURI *et al*, 2003), Lúpus (BRUMMEL & LENNERT, 2005; LENNERT *et al*, 2005), irradiação ultravioleta e infecção por *Shistosoma mansoni* (MANGAN *et al*, 2004). A produção *in vitro* de interleucina 10 (IL-10) por linfócito B, quando ativado por LPS, tem sido também documentada (DALWADI *et al*, 2005). Em humanos a liberação desta citocina por células B também já tem sido descrita (DUDDY *et al*, 2004).

Gardner *et al* (2009), pesquisando a resposta inflamatória *in vitro* de PBMCs tratados com concentrações subtóxicas de mercúrio, encontraram importante aumento na liberação de citocinas inflamatórias, dentre elas a interleucina 1 beta (IL-1 β). Este estudo demonstrou que baixas concentrações deste metal podem afetar a função imune em células humana por modificar a regulação de citocinas, podendo influenciar efeitos adversos a saúde como o risco de autoimunidade. Em nosso trabalho a escolha da citocina TNF- α se deu, considerando o uso frequente desta em estudos de exposição *in vivo* e *in vitro* ao metal mercúrio(GARDNER *et al*, 2009; GARDNER *et al*, 2010b ; NYLAND *et al* 2011).

1.5 Linfócitos e Prolactina

Em pesquisas recentes, que tem sugerido a importante relação entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune, o linfócito tem sido modelo para diversas investigações. Alguns desses trabalhos sugerem que essas células do tipo imunocompetente, por apresentarem RNAm de PRL, podem ser produtoras desse hormônio e que essas células possuem ainda, receptores de dopamina, que seriam responsáveis pela possível diferença no

tipo de controle local da produção e regulação da PRL em relação a que ocorre na glândula primária de produção do referido hormônio (FREEMAN *et al*, 2000).

O hormônio Prolactina (PRL) é uma proteína cuja função melhor conhecida é a lactação (ROELFSEMA *et al*, 2012). A PRL tem como inibidor natural a Dopamina, que controla sua síntese através da inibição da secreção. Sua ação vinculada somente à lactação era pela origem primariamente pituitária. Entretanto, atualmente dados da literatura apontam para a sua atuação em diversas funções biológicas. Os efeitos endócrinos ou autócrinos exercidos pela PRL tem sido demonstrado em diversos tipos de tecidos, com mais de 300 funções descritas em vertebrados (BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998). Em humanos a PRL é produzida por muitos tecidos e a ela é atribuída um grande número de funções, inclusive a ação como citocina. (BEN-JONATHAN *et al*, 2008) .

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). Contudo, 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 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 polipeptídio.

Este polipeptídio também é conhecido por atuar na resposta inflamatória, ainda que os mecanismos implicados no processo não estejam bem esclarecidos. Dependendo do tipo celular, do tecido e o estado fisiológico do órgão, a PRL pode ser antiinflamatória ou pró-inflamatória (YU-LEE, 2002). No Sistema Nervoso Central (SNC) estudos demonstraram que a PRL pode agir como fator de crescimento e, estar envolvida na regulação da expressão de citocinas como TNF- α e IL-1 (DEVITO *et al*, 1995).

As propriedades imunoestimulatórias da PRL sobre os linfócitos-T e B, célula natural killer (NK), macrófagos, neutrófilos e células dendríticas tem sido demonstrada na literatura (KOOIJMAN *et al.*, 1996; DOGUSAN *et al.*, 2001; MATERA *et al.*, 2001). Neste estudo, a PRL, um hormônio hipofisário imunorregulador, foi avaliada como substância com capacidade de citoproteção em células imunocompetentes como os linfócitos, supondo sua capacidade de que, ao deflagrar respostas, possa atenuar os danos nestas células frente à exposição ao metilmercúrio, agente agressor utilizado nesse modelo de estudo.

1.6 Células B95A

A linhagem celular B95-A, que foi usada neste trabalho, corresponde à cultura contínua de linfócitos B de primatas do grupo dos sagüis (Marmoset), de ocorrência nas Américas do Sul e Central. Fazem parte deste grupo os Gêneros *Callithrix*, *Saguinus*, *Leontopitheccus* e *Cebuella*. Os mais comumente chamados de Marmoset são os dos gêneros *Callithrix* e *Saguinus*. Mas, um trabalho de caracterização citogenética deste tipo celular a tem relacionado mais especificamente a espécie *Saguinus oedipus* (MULLER *et al.*, 2001).

Esta linhagem celular é transformada pelo vírus Epstein-Barr, adquirindo a condição de linhagem linfoblastóide permanente (KOBUNE *et al.*, 1990). Citologicamente, a linhagem B95-A se comporta de duas maneiras: cerca de 50% das células aderem à superfície do frasco de cultura, sob a forma fibroblastóide e as demais células permanecem dispersas no líquido de cultivo, arredondadas, com a membrana citoplasmática íntegra e bastante brilhante. O processo de divisão celular ocorre, provavelmente, na monocamada entre as células aderidas. A linhagem é mantida em Meio Essencial Eagle, acrescido de 10% de soro bovino fetal.

1.7 A problemática do mercúrio na Amazônia

Os impactos ambientais relativos ao uso indiscriminado do mercúrio e suas possíveis repercussões na saúde da população exposta tem sido objeto de preocupação de vários setores,

inclusive grupos de pesquisa, que atuam na região amazônica. Sabe-se que dependendo do tipo e do tempo de exposição a este metal, o indivíduo exposto poderá apresentar desde uma intoxicação aguda até o comprometimento do sistema nervoso central (SNC), como no caso de Minamata, no Japão (ROSS, 1996).

Atualmente, embora a atividade garimpeira na região tenha sofrido considerável diminuição e, por conseguinte, a quantidade do metal disponibilizado antropogenicamente por esta via, ao ambiente também seja menor, os vários estudos realizados nessas regiões, apontam para índices consideráveis do metal (dados em cabelo e urina) nas populações estudadas, resultados coerentes com o tipo de alimento à base de peixes, principalmente carnívoros, referidos pelos sujeitos pesquisados (SANTOS *et al*, 2000). Considerando-se que os peixes carnívoros localizam-se no topo da cadeia alimentar aquática, a dieta a base destes, pela população dos locais pesquisados levaria a esse aumento nos níveis de mercúrio e metilmercúrio, já que trabalhos com peixes dessa região têm demonstrado valores acima do limite estabelecidos por parâmetros internacionais (BRABO *et al*, 2000).

A estreita relação entre os sistemas nervoso e endócrino na coordenação das diversas funções do organismo tem sido amplamente estudada nos últimos anos. Porém, pesquisas recentes têm acrescentado a esses, o papel do sistema imune como muito importante na interação com o então chamado sistema neuroendócrino, a fim de propiciar um melhor entendimento nas respostas do organismo aos mais diversos agentes externos, sejam eles biológicos ou não biológicos (ver revisão DORSHKIND & HORSEMAN, 2001)).

A ação do mercúrio, particularmente do metilmercúrio, especificamente em compartimentos intracelulares tem sido pesquisada em diversos tipos celulares como astrocitos e neurônios (ALLEN *et al*, 2001) e célula de retina (HERCULANO *et al*, 2003). Bahia e colaboradores (1999), trabalhando com cultura de células humanas expostas ao mercúrio, demonstraram que linfócitos e linhagens linfoblásticas apresentaram decréscimo na

sua capacidade proliferação. Como resultado da citotoxicidade induzida pelo mercúrio (tanto orgânico como inorgânico), linfócitos e monócitos apresentaram sinais de apoptose (morte celular programada), principalmente por alteração na atividade mitocondrial que inclui a mudança na permeabilidade de membrana nesta organela (SHENKER *et al*, 2000) ocasionando a morte celular.

Por outro lado, Estudos têm demonstrado que algumas substâncias podem desempenhar um papel citoprotetor frente à exposição a agentes estressores. Dentre essas substâncias, A PRL, por desempenhar papéis importantes junto às células do sistema imune como os linfócitos T e B, por exemplo, atuando como fator autócrino de crescimento para proliferação de linfócitos (SABHARWAL *et al*, 1992) assim como sendo capaz de aumentar a capacidade imune dessas células (DOHI *et al*, 2003) pode surgir neste cenário com mais esta atribuição. Visando averiguar este potencial este estudo usou como modelo celular uma célula do sistema imune: o linfócito, que foi exposta à ação do metilmercúrio e recebeu tratamento com o hormônio prolactina, onde se pretendeu avaliar uma possível proteção celular propiciada por este hormônio à célula em questão, dos efeitos tóxicos desse metal e a partir dos resultados obtidos, contribuir para o conhecimento das interações entre o sistema imune e o sistema neuroendócrino nos processos relacionados às diversas funções biológicas envolvidas nas respostas orgânicas às agressões externas, inclusive aqueles ligados a metais pesados, como é o caso do mercúrio.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Geral

Estudar possível ação citoprotetora e imunoreguladora da prolactina em linfócitos de primata expostos ou não ao metilmercúrio.

1.7.2 Específicos

1. Avaliar possíveis alterações na viabilidade celular em cultivos contínuos de células da linhagem B-95A submetidos à exposição de diferentes concentrações de MeHg e PRL;
2. Avaliar possíveis alterações na secreção basal de TNF α em cultivos contínuos de células da linhagem B-95A submetidos à exposição de diferentes concentrações de MeHg e PRL;
3. Avaliar possíveis alterações na viabilidade celular e secreção basal de TNF α em cultivos contínuos de células da linhagem B-95A submetidos à exposição concomitante de MeHg(5 μ M) e PRL(nM).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação do modelo experimental.

Para a avaliação da possível proteção do hormônio prolactina sobre os efeitos tóxicos do Metilmercúrio, utilizou-se como modelo celular linfócitos B de sagui (*Saguinus oedipus*) modificados por co-cultivo com o vírus Epstein-Barr (linhagem B95-A). A linhagem celular foi desenvolvida em garrafas próprias para cultivo celular, com área de 25 cm com 5 ml de Meio Dulbecco's (DMEM) enriquecido com 20% de soro fetal bovino (SBF) e mantidas em estufas bacteriológicas a 37° C.

A linhagem B95-A tem a característica de ser mista quando em crescimento *in vitro*: uma parte é mantida ancorada, com citoplasma aberto e morfologia tipo-fibroblasto; o restante das células permanece flutuante no meio e com morfologia original de leucócito, mantendo íntegras tanto as membranas celular e nuclear, quanto à cromatina desespiralizada, a manifestar um comportamento interfásico.

Foi escolhido o uso das células em suspensão por serem mais viáveis à manipulação, deste modo, no momento em que a linhagem celular atingiu uma quantidade necessária de células em suspensão (10^6) foi transferida para tubo de ensaio estéril, na proporção de 0,5 ml de suspensão celular/tubo, em um total de 40 tubos (Figura 2). Cada tubo sofreu três lavagens com meio DMEM sem soro bovino fetal (SBF), antes do ensaio experimental. A exclusão do soro teve por objetivo isolar o efeito da prolactina exógena de possíveis interferências de fatores tróficos ali contidos, bem como um controle de qualidade para a reação com MTT.

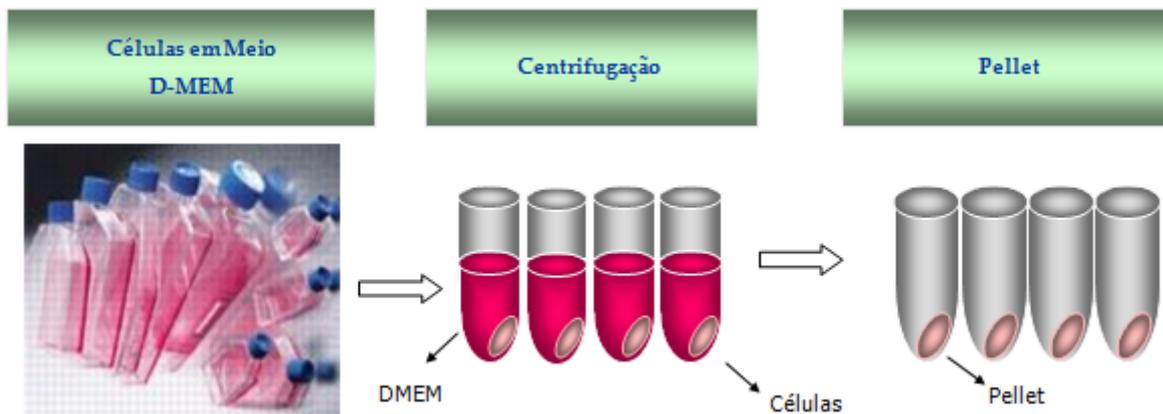


Figura 2- Ilustração da preparação do modelo experimental

2.2 Exposição ao MeHg.

A exposição ao MeHg ocorreu nas concentrações de 0,1; 1; 5; 10 e 50 μM de MeHgCl, diluídas em meio DMEM puro. Após as células estarem isentas de SBF, foram adicionadas ao *pellet* de um total de 20 tubos, organizados por concentração, em 05 grupos (quatro tubos para cada concentração). As soluções diluídas de mercúrio, em volume de 0.5ml/tubo como ilustrado na Figura 3, e em seguida mantidas em estufa bacteriológica a 37° C, durante 18 horas (*over night*).

Após esse período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante retirado e guardado à - 70 °C para posterior medida de TNF α por técnica de ELISA. O pellet foi então imediatamente utilizado para teste de viabilidade celular por MTT.

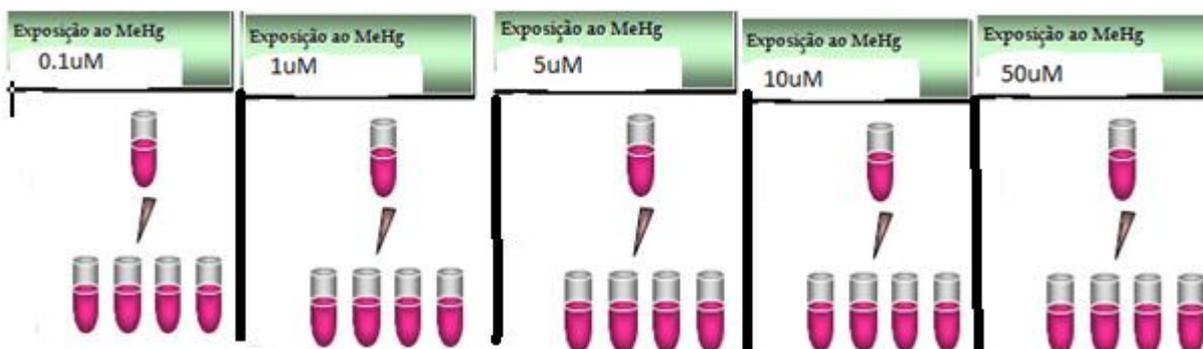


Figura 3- Ilustração da exposição ao Metilmercúrio

2.3 Tratamento com prolactina

Para analisar os efeitos citoprotetores da prolactina (PRL ovina, SIGMA) sobre a linhagem B95-A, foram usadas as concentrações 0,1; 1 e 10 nM de PRL diluída em DMEM no volume de 0.5ml/tubo. Para este grupo foram utilizados 12 tubos, sendo 04 para cada diluição, como mostrado na figura 4.

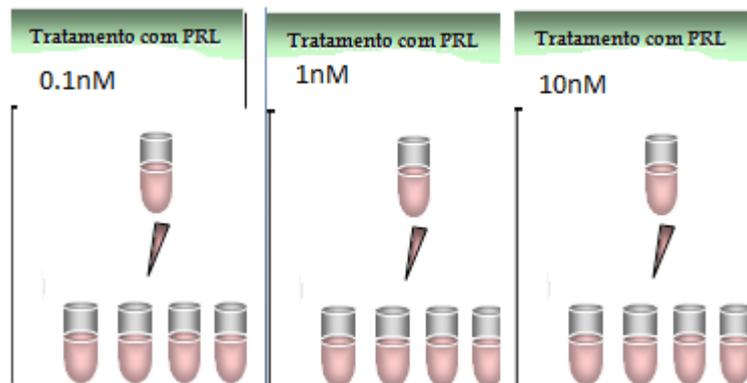


Figura 4- Ilustração do tratamento com a Prolactina

Os oito tubos restantes foram utilizados como segue: 04 com tratamento conjunto de PRL na concentração de 1 nM + MeHgCl em concentração de $5\mu\text{M}$ (figura 5); os últimos 04 tubos foram mantidos como controle, sem adição de PRL e MeHgCl, ou seja, as células foram mantidas suspensas em meio DMEM sem SBF.



Figura 5- Ilustração do tratamento conjunto de Prolactina e Metilmercúrio

Para conclusão do teste, os tubos foram mantidos também em estufa bacteriológica a 37° C, durante 18 horas (*over night*). Após esse período, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante retirado e guardado à -70 °C, para posterior medida de TNF α . O precipitado foi usado para ensaio de viabilidade celular.

2.4 Teste de viabilidade celular

O teste de viabilidade foi feito por Análise fotocolorimétrica utilizando o sal tetrazólio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio bromide) o qual marca apenas as células vivas. As células viáveis possuem a capacidade de reduzir, através das desidrogenases mitocondriais, a forma oxidada do MTT a um composto de cor azulada, formazan. O monitoramento dessa reação foi feito por espectrofotometria (MOSMANN, 1983).

Ao precipitado remanescente no tubo foi adicionado solução composta de 500 μ l de HANKS (solução balanceada de tampão fosfato, sem cálcio e magnésio) e 50 μ l de MTT, numa concentração final de 5 mg/ml/tubo; incubados durante 02 horas em estufa bacteriológica a 37°C abrigados da luz (ilustrado na figura 6). Após sua incubação e centrifugação, a solução de MTT foi substituída por DMSO puro para solubilizar os cristais de formazan deixados na superfície celular. Após a resuspensão em DMSO as células pigmentadas foram analisadas em espectrofotômetro (SEAC-SIRIOS, Itáli), com comprimento de onda de 570 nm. O branco da reação foi a solução de DMSO (usada como diluente).

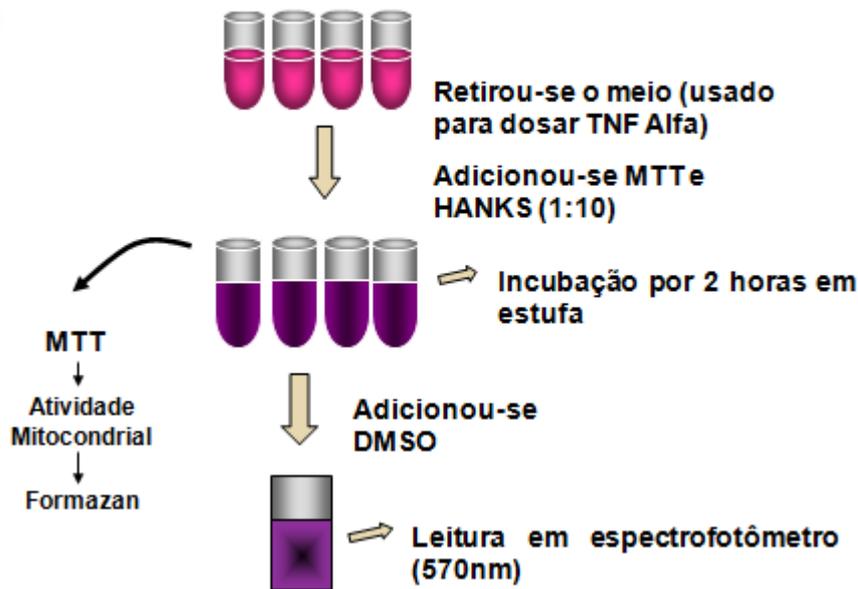


Figura 6- Teste de viabilidade celular por MTT

2.5 Dosagem de citocina por técnica de ELISA

Medidas de concentração de TNF α no meio foram realizadas por técnica de ELISA (kit comercial Bender MedSystems, Viena, Austria). O resumo do procedimento seguiu como descrito abaixo.

2.5.1 Dosagem do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)

A figura 7 ilustra a dosagem da liberação do TNF- α pelo método de Elisa. Na microplaca sensibilizada com o anticorpo anti TNF- α de macaco, após os primeiros dois ciclos de lavagem mencionados no kit (Lavadora Clean Up- Microplate Washer, figura 8), foram adicionado em 14 poços (em duplicata), 100 μ l de volume final do padrão já previamente diluído como prescrito no kit. Nos poços referentes às amostras foram adicionados 50 μ l do diluente de amostra mais 50 μ l dos sobrenadantes dos cultivos expostos e não expostos a serem analisados. 100 μ l de diluente de amostra foram utilizados como branco no teste. Em seguida foram adicionados 50 μ l de conjugado de biotina em cada poço. Após essa fase, a placa foi incubada ao abrigo da luz, por 2 horas. Após o primeiro período de

incubação a placa foi submetida a 4 ciclos de lavagens com tampão de lavagem próprio em lavadora automatizada (Lavadora Clean Up- Microplate Washer), ilustrado na figura 8.

Na próxima etapa do teste, foi então adicionado 100 μ l de Streptavidin-HRP em cada poço. Procedeu-se a segunda incubação prescrita no kit que foi de uma hora. Em seguida a placa foi novamente lavada como anteriormente descrito. Em cada poço foi adicionado 100 μ l de TMB substrato e incubado por 10 minutos. Após o último período de incubação, a solução de parada (100 μ l) foi adicionada em todos os poços da placa. A absorbância da solução foi lida com comprimento de onda de 450 nm em uma leitora de microplacas Vivid Vision – Microplate Reader (Figura 9).

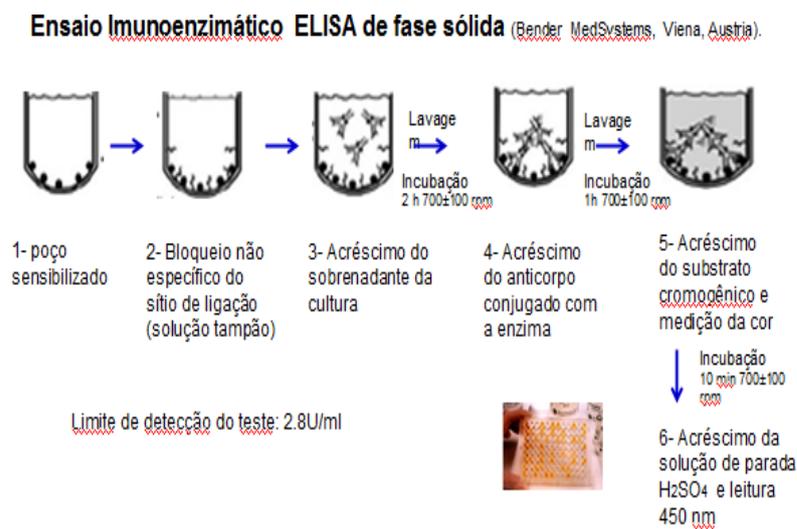


Figura 7- Demonstração esquemática e prática da dosagem de liberação do TNF- α pelo método de Elisa



Figura 8- Lavadora de Microplaca



Figura 9- Leitora de Microplaca

2.6 Aspectos éticos

O Projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto Evandro Chagas. As precauções de ordem ética seguiram as recomendações conforme normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa consultado. Parecer de aprovação N° 007/2011/CEPAN/IEC/SVS/MS (Anexo A).

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm EPM (erro padrão da média) e tratados através do teste ANOVA de um critério com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações (GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Efeitos do MeHg na viabilidade celular

As culturas foram expostas a concentrações crescentes de 0,1; 1; 5; 10 e 50 μM de MeHg por 18 h e somente a concentração de 0,1 μM não alterou a viabilidade dos cultivos (Figura 8). Em contrapartida, a diminuição progressiva da viabilidade celular guardou relação inversa com o aumento das concentrações testadas. Perdas em cerca de 80% na viabilidade ocorreram com a concentração mais alta (50 μM).

O MeHg na concentração de 1,0 μM , reduziu a viabilidade celular em 35%. As concentrações de 5 e 10 μM , 60% e 62%, respectivamente, não apresentaram diferenças significantes entre si.

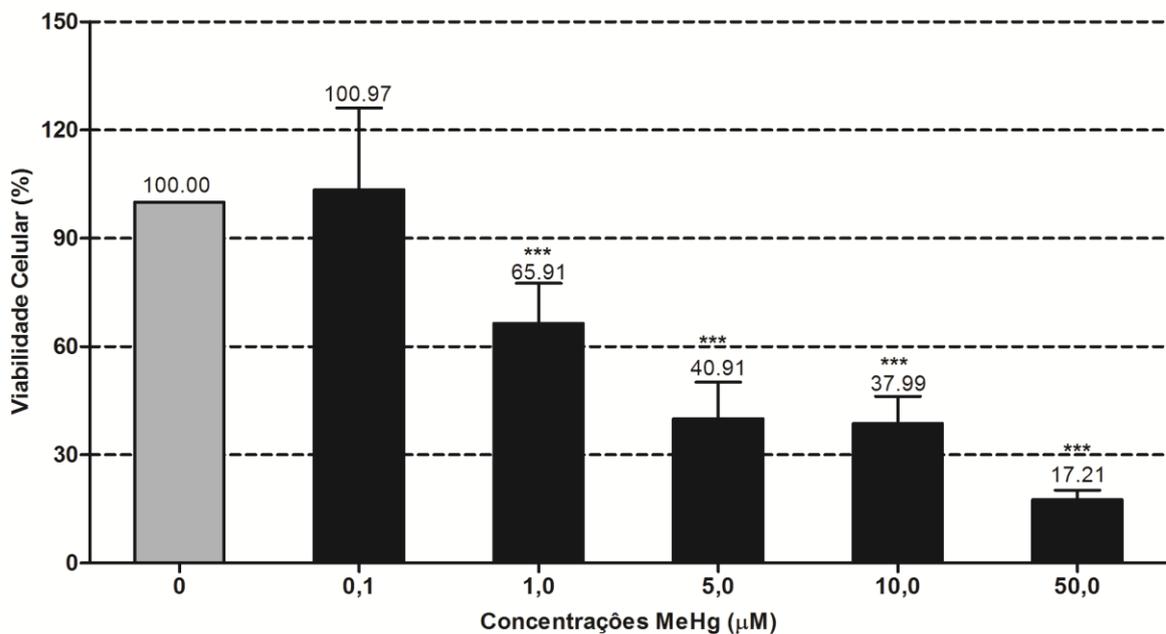


Figura 10: Viabilidade celular de células da linhagem B95a exposta ao MeHg em meio DMEM sem SBF nas concentrações de 0,1; 1; 5; 10 e 50 μM . Exposição de 18h. Dados em valores percentuais representativos da média + erro padrão da média (n=4). *** $p < 0,001$ para comparações entre os grupos: tratado versus controle.

3.2 Efeitos da PRL na viabilidade celular

Com o objetivo de estudar a possível ocorrência de efeitos degenerativos da PRL descritos por outros estudos (DEVITO *et al.*, 1993), testamos três concentrações limiaries: 0,1; 1 e 10 nM, onde 0,1 não produz efeito, 1 produz efeito citoprotetor e/ou mitogênico e 10 nM, causa degeneração celular (DEVITO *et al.*, 1993). Como esperado, somente a concentração de 10 nM produziu significativa diminuição da viabilidade em cerca de 30%.

Assim, optamos pelo uso da concentração de 1 nM para associa-la a concentração intermediária de 5 μ M de MeHg, a qual, foi efetiva em diminuir a viabilidade celular em 60% (Figura 9).

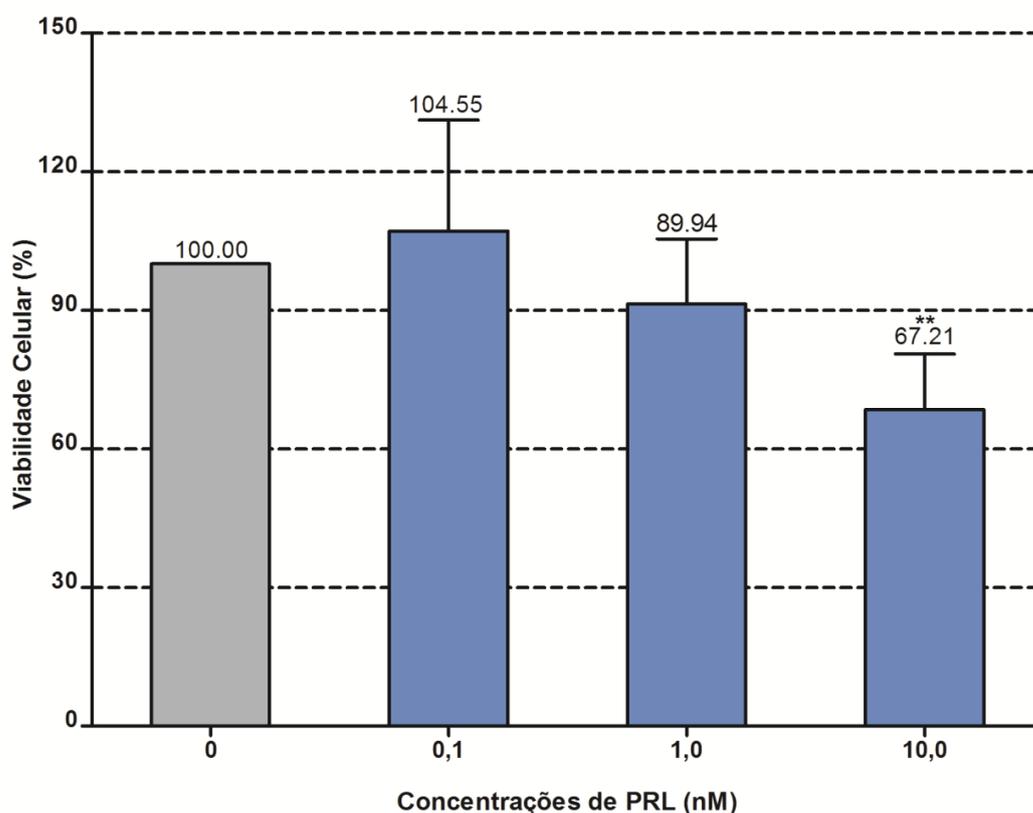


Figura 11. Viabilidade celular de células da linhagem B95a tratados com PRL (0,1; 1 ou 10 nm) por um período de 18 h. Dados expressos em erro padrão da média. Valores percentuais (n=4). ** $p < 0,01$.

3.3 Efeitos da PRL em linfócitos expostos ao MeHg.

A administração de PRL (1,0 nM) e o tempo de exposição (18 h) foram orientados por evidências de ação antiestressora deste hormônio em outras preparações *in vitro* (DEVITO *et al.*, 1993). Neste experimento, associamos o MeHg (5 μ M) em dose de efeito intermediário para permitir melhor visualização das possíveis variações resultantes na viabilidade celular (Figura 10).

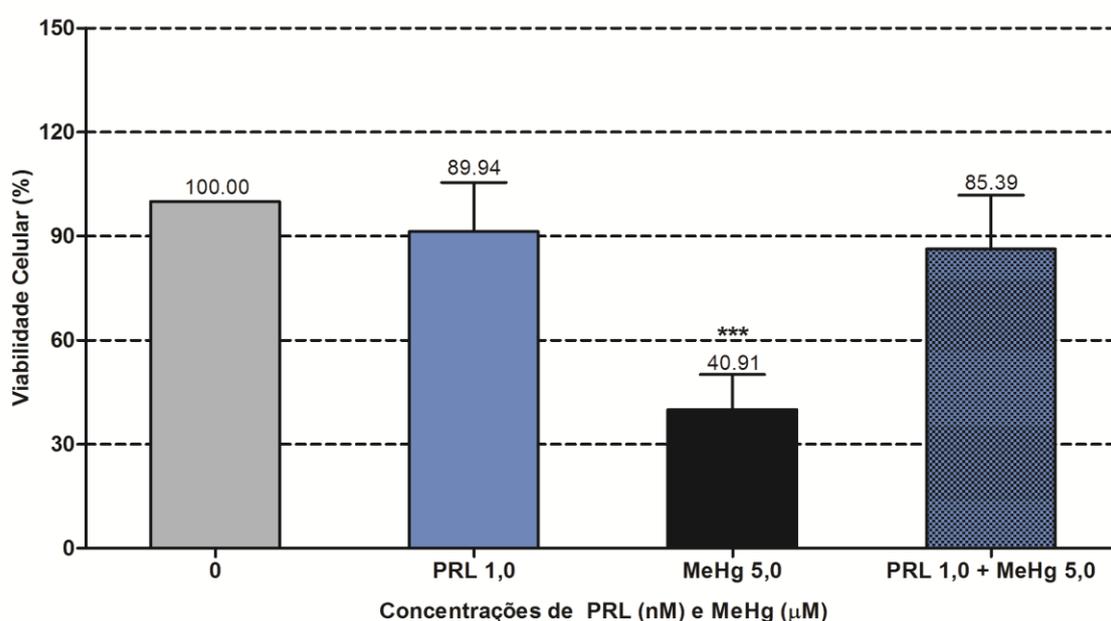


Figura 12. Viabilidade celular de células da linhagem B95a expostas a associação de PRL (1 nM) + MeHg (5 μ M) por um período de 18 h. Não houve diferença significativa entre o grupo co-tratado e o grupo controle. Dados expressos em EPM (n=4) de valores percentuais.

A viabilidade celular se manteve inalterada nos cultivos tratados com 1.0 nM de PRL, mas diminuiu cerca de 40% após adição de MeHg a 5 μ M. Na associação MeHg/PRL, houve neutralização total do efeito citotóxico do metal.

3.4 Efeitos do Metilmercúrio na secreção de TNF- α .

Um característico efeito bifásico na secreção de TNF- α foi observado após exposição a diferentes doses de MeHg. Diminuição com as doses menores (0,1 e 1 μ M) e maiores (10 e 50 μ M) e uma significativa estimulação após a exposição à dose intermediária (5 μ M) de MeHg. (Figura 11).

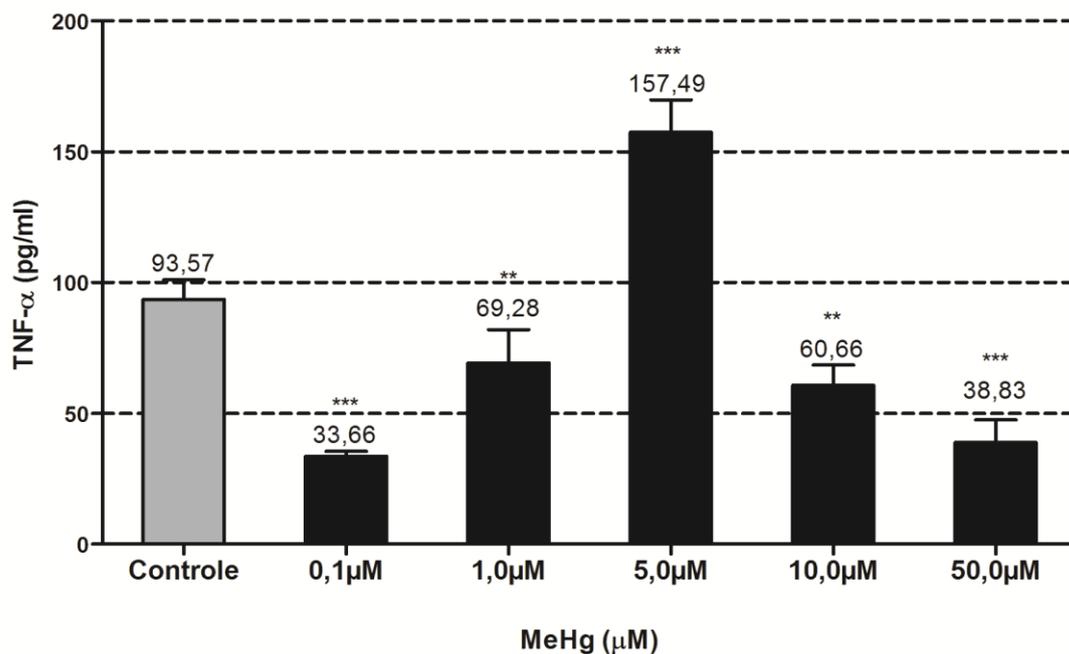


Figura 13. Efeitos do MeHg (0.1; 1; 5; 10 ou 50 μ M) na secreção de TNF- α em células da linhagem B95a por um período de 18 h. Dados expressos EPM (n=4). ** p <0,01. *** p <0,001.

3.5 Efeitos da PRL na secreção de TNF- α

Neste grupo, somente a concentração de 1nM foi efetiva em estimular a secreção de TNF- α um efeito estatisticamente significativo mas funcionalmente pouco eficaz (Figura 12), sugerindo responsividade secretória de TNF- α limitada nesta linhagem de linfócitos a regulação da PRL isoladamente.

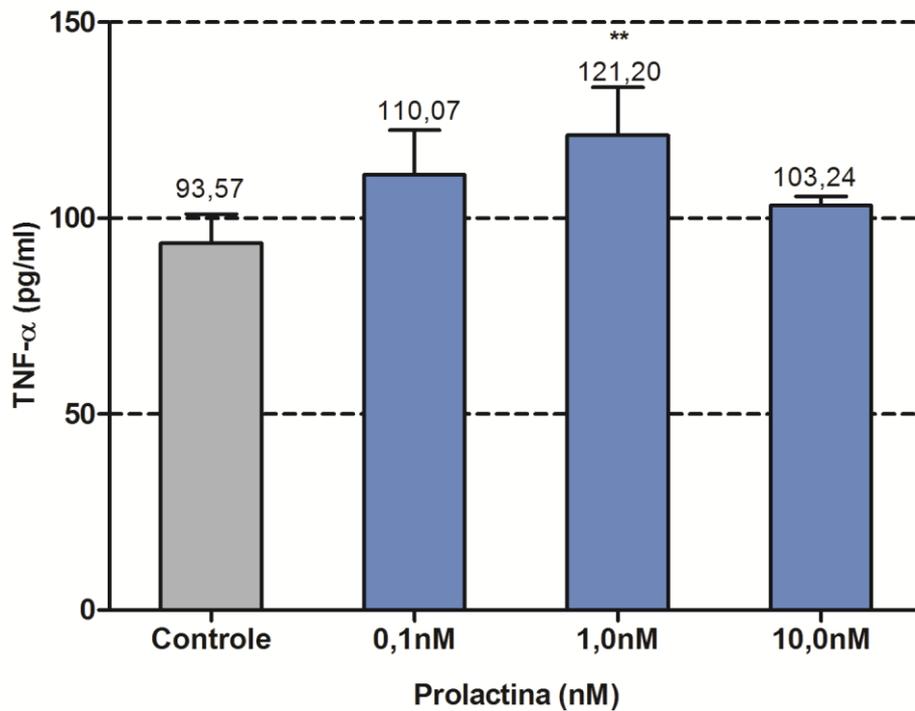


Figura 14. Efeitos da PRL (0,1; 1 e 10nM) na secreção de TNF- α em células da linhagem B95a por um período de 18 h. Dados expressos em EPM (n=4). ** p <0,01.

3.6 Efeitos da exposição simultânea a Metilmercúrio e Prolactina, sobre a liberação TNF- α

No grupo com tratamento conjunto, o valor de liberação de TNF- α , mostrou-se diminuído e estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle e com os grupos tratados com PRL e MeHg, separadamente. Mas não houve recuperação na liberação da citocina pesquisada, no grupo cotratado quando comparado com o controle (fig 13).

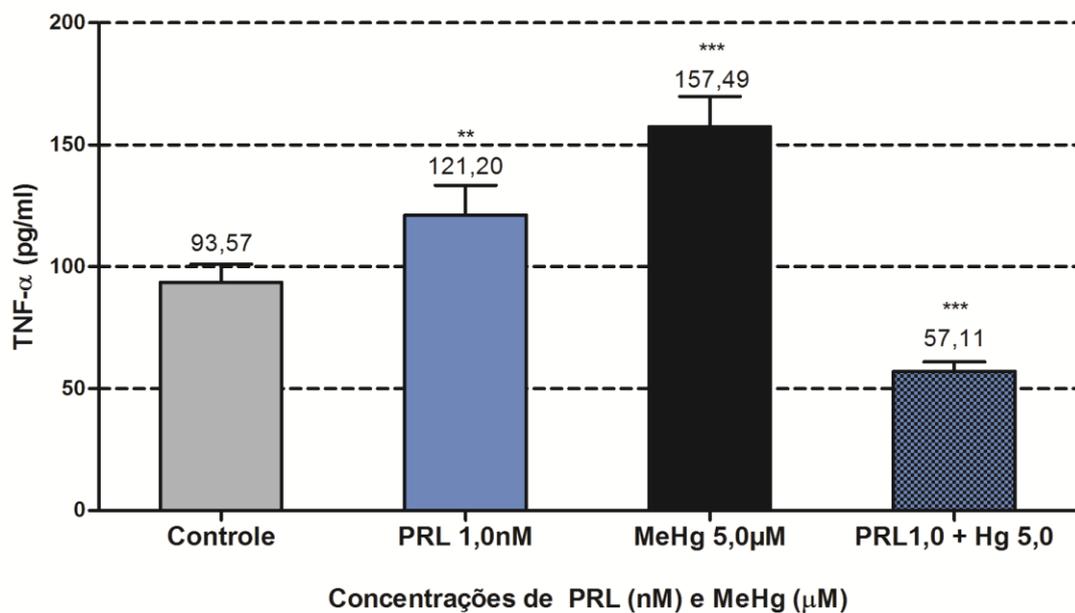


Figura 15. Efeito da associação PRL (1 nM) + MeHg (5 μ M) na liberação basal de TNF- α em células da linhagem B95a por um período de 18 h. Dados expressos em EPM (n=4). ** p <0,01. *** p <0,001.

4. DISCUSSÃO

Este estudo pretendeu avaliar o papel da PRL como um imunoregulador e citoprotetor em cultivo contínuo de linfócito B95a (linhagem de linfócito B de *Saguinus oedipus*, rotineiramente utilizada para estudos de infecção viral) submetido à exposição mercurial aguda (18 h).

Os resultados obtidos evidenciaram uma progressiva e potente ação citotóxica em cultivo contínuo de linfócitos B95a agudamente (18h) resultante de crescentes concentrações de MeHg (0,1; 1; 5; 10 ou 50 μM) adicionadas no meio. Similar exposição mostrou efeito bifásico na secreção de TNF- α . Com a diminuição significativa ocorrendo em resposta às duas menores (0,1 e 1 μM) e as duas maiores concentrações (10 e 50 μM), e um evidente aumento após exposição a concentração intermediária de 5 μM de MeHg.

Este tipo ação mercurial foi comumente descrito por diversos estudos (LIMKE *et al*, 2004; GASSÓ *et al*, 2001) e provavelmente se deve a sua capacidade de bloquear canais de cálcio (DENNY & ATCHINSON, 1996; GASSÓ *et al*, 2001), dependendo se seu efeito foi preponderante em competir com o íon cálcio por canais externos ou internos de membranas, citoplasmáticas ou extracelulares (DENNY & ATCHINSON, 1996). Assim, é esperado que efeitos iniciais ou resultantes a baixos níveis de exposição provoquem inibição da liberação de substâncias que dependam da entrada de cálcio extracelular para ocorrer.

Em níveis intermediários de exposição esperam-se efeitos estimulantes, pois bloqueios intracelulares do sequestro de cálcio livre do citoplasma para o interior das organelas resultam em seu inevitável acúmulo e um sucedâneo de efeitos estimuladores do cálcio sobre o metabolismo celular, incluindo excitose, essencial para liberação de citocinas como o caso do TNF- α . Em concentrações letais para a célula, espera-se uma falência geral das suas

funções essenciais, como o caso das duas maiores concentrações aplicadas, as quais resultaram em potente ação citotóxica.

Essa citotoxicidade do mercúrio ficou mundialmente conhecida com o caso de Minamata em 1953 no Japão, quando foram relatadas inúmeras alterações degenerativas do sistema nervoso (TAKEUCH *et al*, 1962; IGATA, 1993; HARADA, 1995; KONDO 1997) em pessoas que se alimentaram de peixes contaminados após a dragagem do sedimento da sua Baía.

Estudos conduzidos a partir de então, mostraram que o mercúrio pode atuar em qualquer tipo celular produzindo inflamação e necrose resultantes do estresse oxidativo como preponderantes mecanismos de degeneração celular em intoxicações agudas (BASSETT *et al*, 2012). Por outro lado, alguns estudos desenvolvidos em células do sistema imune, evidenciaram a participação de uma possível via apoptótica ativada por MeHg (SHENKER *et al*, 2000).

De fato, o mercúrio pode comprometer a resposta imune por efeitos degenerativos como os observados por KIM e SHARMA (2003), utilizando linhagens de células de linfoma T(Células EL 4) e linfoma B (Células A20), e avaliando viabilidade por MTT.

No que tange a secreção de TNF- α os achados de outros estudos são inconclusivos, mas apontam para efeito estimulante do MeHg (ILBACK *et al*.1996; GARDNER *et al*, 2009). De fato, a exposição ao MeHg (3,69 g/g de alimento) por 3 dias aumentou a concentração plasmática de TNF- α e interferon gama (IFN-gama) em camundongos infectados ou não por vírus amiocárdico Coxsackie B3 (CB3) (ILBACK *et al*, 1996). Estes achados reforçam o pressuposto de que contaminações agudas por MeHg agem como disparadores da resposta imune, não por uma ação específica a ele, mas como um estimulante da atividade celular geral

indiretamente via acúmulo de cálcio livre no citoplasma (DENNY & ATCHINSON, 1996; LIMKE *et al*, 2004).

Em outro plano, a sensibilidade do cultivo ao metal, encontrado neste estudo, pode estar relacionada a retirada do soro fetal bovino se compararmos a cultivos realizados por outros estudos (KIM & SHARMA, 2003). Diminuição significativa da viabilidade celular foi obtida com a concentração de 1 μM . Células A20 (linfoma B) expostas a mercúrio inorgânico teve significante decréscimo de viabilidade somente a partir da exposição à concentração de 10 μM (KIM & SHARMA, 2003), ou seja, uma concentração 10 vezes maior que a encontrada em nosso estudo.

De fato, outras evidências mostraram que cultivos sem soro apresentaram maior acúmulo e correspondente maior sensibilidade aos efeitos degenerativos do metal por astrócitos de hemisfério cerebral e cerebelo (ADACHI & KUNIMOTO, 2005), onde a dose de 10 μM de MeHg foi aproximadamente 60% mais efetiva em diminuir a viabilidade celular em cultivos de astrócitos de hemisfério cerebral após 24 h de incubação.

A diminuição da viabilidade celular em células do sistema imune tem sido demonstrada tanto sob a ação do mercúrio clorídrico quanto do metilmercúrio. De fato, o mercúrio inorgânico mostrou ser menos potente em produzir citotoxicidade, desde que para o metilmercúrio a LD50 é de 2,5 μM e para o mercúrio clorídrico a LD50 é de 20 μM (SHENKER *et al*, 2000).

O papel atribuído ao metilmercúrio como agente causador de apoptose em células como linfócitos T e B (GUO *et al*, 1998; KIM e SHARMA, 2003) e monócitos, nos conduz a necessidade de distingui-la da necrose em nosso modelo utilizado, para futuros estudos de mecanismos de intoxicação.

O fato de a prolactina poder agir como um fator proliferativo; apresentar efeitos citotóxicos em determinadas concentrações e condições experimentais; e estimular o metabolismo de células do sistema imune é que nos fez avaliar possíveis interferências deste hormônio na viabilidade celular e metabolismo do linfócito geneticamente modificado utilizado como modelo experimental neste estudo (células da linhagem B95a).

A PRL, de fato, mostrou alguma toxicidade na maior concentração testada (10 nM). A viabilidade celular foi comprometida em cerca de 30% após o período de tratamento (18 h). Os testes com as demais concentrações não exibiram quaisquer variação em comparação com o grupo controle.

Essa toxicidade observada pode ser resultante do tempo de exposição e/ou ausência de soro fetal bovino na solução nutriente, fator contribuinte para o aumento da fragilidade celular. Uma aproximação das condições reais nos mostra que a PRL é liberada em grandes concentrações imediatamente após estímulo estressor, cujo pico ocorre em cerca de 30 min, e retornando à condição basal 120 minutos depois. Adicionalmente, há que se considerar sobre a ausência das proteases retiradas com o soro, fator adicional para manutenção de moléculas integras de PRL por mais tempo no meio.

Estes achados estão de acordo com outros estudos onde a PRL apresentou efeitos com perfil bifásico sobre a proliferação celular medida por incorporação de timidina, um indicador de divisão celular, onde a concentração de 1 nM atingiu o índice mais elevado de incorporação, enquanto que a concentração de 10 nM retornou os níveis de incorporação a valores próximos ao basal (DEVITO *et al.* (1992). Considerando que a replicação celular mantém uma taxa de novas unidades funcionais ativas, é de se esperar que a diminuição da marcação celular por MTT possa significar, inclusive, que os cultivos tratados com a

concentração de 10 nM apresentem algum nível de estagnação em ciclos de reprodução das células a ela expostas.

A prolactina é um hormônio classicamente conhecido por sua ação reguladora no sistema reprodutor e da resposta ao estresse. Muito embora, muito pouco se saiba sobre os mecanismos regulatórios envolvidos no potente aumento de sua secreção em resposta a uma clássica condição de estresse (ataque e defesa), algumas evidências que sustentam sua ação estimulante na resposta imune (ARUMUGAN *et al*, 2010; TRIPATH & SODHI, 2008) e efeitos citoprotetores (YAMAMOTO *et al*, 2008; JOHANSSON *et al*, 2009) a ela relacionados, nos motivou estudar a ocorrência de mecanismos capazes de aumentar a resistência de linfócitos B, células sanguíneas efetivas em responder a agressões de diferentes tipos com liberação de anticorpos específicos e citocinas pró-inflamatórias como o TNF α , aqui avaliado.

Com o objetivo de avaliar se a PRL confere a linhagem B95a, alguma resistência à intoxicação mercurial, promovemos sua incubação conjunta a concentração de 5 μ M de MeHg, na dose intermediária de 1 nM, inócua em diminuir a viabilidade celular. Os resultados mostraram que a PRL foi eficaz em neutralizar totalmente a ação degenerativa do MeHg. Este resultado reforça a hipótese de ação citoprotetora da PRL, além de confirmar sua ação trófica para linfócitos B de primatas do Novo Mundo.

De fato, evidências acumuladas em vários estudos contribuem para consolidar o papel imunoendócrino da PRL (ARUMUGAN *et al*, 2010; TRIPATH & SODHI, 2008), regulando a função de vários tipos celulares que atuam na resposta imune e em mecanismos neutralizadores de processos degenerativos como a resposta inflamatória. Regulações sobre a função de 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) são alguns exemplos.

A regulação da resposta inflamatória pode ser um dos papéis indicados para o leque de possibilidades regulatórias da PRL, apesar dos mecanismos relacionados ainda carecerem de maiores esclarecimentos. A PRL pode agir como um agente antiinflamatório ou pró-inflamatório, dependendo do tipo celular, do tecido e do 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).

A ação da PRL sobre a funcionalidade do linfócito foi avaliada neste estudo pela medida da concentração de TNF- α secretado para o meio em resposta a incubação (18 h) com crescentes concentrações de PRL.

Os resultados mostraram que apenas a concentração de 1 nM foi eficaz em estimular a secreção da citocina. O aumento isolado foi mínimo e funcionalmente questionável, sugerindo que esta célula possa não ser responsiva a ação isolada da prolactina em estimular a secreção de TNF- α . Outros fatores circulantes talvez sejam necessários para uma ação conjunta mais efetiva.

De outro modo, a liberação efetiva do TNF- α pode ter sido suprimida pelo fato de linfócitos B produzirem a Interleucina 10 (CARTER *et al.*, 2012; NOH *et al.*, 2012), uma citocina imunossupressora que não foi avaliada neste estudo, mas que pode ter sido liberada neste processo a que foi submetido o modelo celular e dessa forma, interferindo na resposta ao metal.

A condição seguinte, associação da PRL ao MeHg, curiosamente, reverteu o efeito estimulatório de ambos, individualmente, sobre a secreção de TNF- α , para inibitório. Isso confirma a responsividade limitada da célula para responder ao controle da PRL sobre a secreção daquela citocina.

Em relação ao modo de ligação a receptores, a PRL tem sua ativação através de receptores de citocinas do tipo I que ativam as STATS do tipo STAT1, STAT3 e STAT5a e ainda pela ativação da JAK2. Outro estudo mostrou ainda que a PRL também ativa as vias de sinalização scr-PLD (uma via mitogênica em astrócitos) e JAK/STAT nos processos de diferenciação de astrócitos para induzir a proliferação deste tipo celular (MANGOURA et AL, 2000).

No caso do TNF- α a ativação se dá através da ligação a receptores TNF que dispara o processo de transdução de sinal podendo ativar dois tipos de vias. Uma que produz domínios de morte citoplasmática e que leva a morte celular, e, por conseguinte a ativação de caspases que leva a apoptose e induz inflamação e / ou sobrevivência celular por meio do fator ligado ao receptor de TNF que espalham sinais com o objetivo de levar a ativação de fatores transcricionais e indução gênica (BENEDICT, 2003) ao núcleo.

Os resultados deste estudo confirmaram a toxicidade do MeHg para células da linhagem B95-A e sua reversão, que pode estar relacionada a ação protetora da PRL.

5. CONCLUSÃO

- O estudo evidenciou efeitos degenerativos do MeHg sobre a integridade funcional de linfócitos B (B95a) de um primata do Novo Mundo;
- A ação citoprotetora da PRL foi confirmada uma vez que o efeito parcial do MeHg foi totalmente neutralizado por adição conjunta deste hormônio;
- Essa ação protetora provavelmente não ocorreu com participação do TNF- α , uma vez que a PRL não foi eficaz em regular sua secreção basal ou alterada por MeHg, com efeitos isolados, de baixa magnitude e contraditórios;
- Alguns estudos tem demonstrado que o linfócito B tem uma aparente resposta de origem humoral aos compostos mercuriais (produção de autoanticorpo e aumento policlonal dos níveis no soro de imunoglobulinas), sugerindo que este metal afeta grandemente esta célula;
- É corrente na literatura que o linfócito B também tem respondido ao mercúrio na produção de inúmeras citocinas, inclusive o TNF α , demonstrando ser um bom modelo para o estudo *in vitro* da imunomodulação por este metal;
- Neste sentido, a continuidade deste estudo pode vir a contribuir para discussão do potencial do mercúrio em relação a este tipo celular do sistema imune.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Abul K. & LICHTMAN, Andrew H. *Imunologia Celular e Molecular*. Tradução Cláudia Reali. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005.
- ALLEM, J.W.; SHANKER,G.; ASCHNER, M. Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. **Brain Res.** 894, pp 131-140, 2001.
- ARUMUGAM, Ramamani. *et al.* Regulation of Islet β -Cell Pyruvate Metabolism: Interactions of Prolactin, Glucose, and Dexamethasone. **Endocrinology**, 151(7): 3074-3083, 2010.
- AZEVEDO, F. A. *Toxicologia do Mercúrio*. São Carlos: **RiMa**, 2003. São Paulo, InterTox, 2003.
- BAHIA, M.O.; AMORIM, M.I.M.;BURBANO, R.R.; VINCENT, S.; DUBEAU, H. Genotoxi. Effects of Mercury on in vitro cultures of Human Cells. **An. Acad. Bras. Ci.**, 71(3-1): 437-443, 1999.
- BASSET, Tyler. ; BACH, Paxton.; CHAN, Hing Man. Effects of Methylmercury on the Secretion of Pro-Inflammatory Cytokines From Primary Microglial Cells and Astrocytes. *NeuroToxicology* 33: 229-234, 2012.
- BEN-JONATHAN, N., CHRISTOPHER, R.; LAPENSE and ELIZABETH W. LAPENSE. What Can We Learn from Rodents about Prolactin in Humans. **Endocrine Reviews.** 29 (1), 1-41, 2008.
- BERTON , E and DAVE, J. Prolactin, Growth Hormone and Immune Homeostasis. In: *Cellula and Citokine Networks in Tissue Immunity*. Edited by Meetzer Mand Mantovani A- New York: **Wiley-Liss**,. Page 69-75, 1991.
- BEUTLER, B.A.; MILSARK, I.W. & CERAMI, A. - Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution and metabolic fate in vivo. **J. Immunol.**, 135: 3972-3977, 1985.
- BEUTLER B., CERAMI A. Tumor Necrosis, Cachexia, Shock, and Inflammation: A Common Mediator. **Annual Review of Biochemistry** Vol. 57: 505-518, 1988.
- BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Quím. Nova** v 27 (4): 593-600, 2004.
- BOLE-FEYSOT, C. *et al.* Prolactin and its receptor: actions signal transduction pathways and phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice. **Endocr Rev**; 19: 225-68, 1998.
- BRABO, E.S.; SANTOS,E.O.; DE JESUS, I.M.; MASCARENHAS,A.F.S.; FAIAL, K.R. **Environ. Res.** 2000, 84, 197.
- BRUMMEL, R; LENERT, P. Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-oligodeoxynucleotides. **J Immunol**, 174: 2429-2434, 2005.

CLARKSON, T.W. The Three Modern Faces of Mercury. **Environmental Health Perspectives**. v 110.Supp. 1, February, 2002.

CHRISTENSEN, MM. *et al.* Comparison of the interaction of methylmercury and chloride with murine macrophages. **Arch. Toxicol**; 1993; 3:67:205-11.

COCCINI, Teresa. *et al.* Low-Level Exposure to Methylmercury Modifies Muscarinic Cholinergic Receptor Binding Characteristics in Rat Brain and Lymphocytes: Physiologic Implications and New Opportunities in Biologic Monitoring. **Environmental Health Perspectives**. v 108.Supp. 1, 2000.

DENNY MF, ATCHISON WD. Mercurial-induced alterations in neuronal divalent cation homeostasis. **Neurotoxicology**. 1996 Spring;17(1):47-61.

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**, 60: 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**, 57: 290-298. 1995.

DOGUSAN, Z. *et al.* Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. **J Neuroimmunol**, 120: 58-66, 2001.

DOHI, Keiichiro. *et al.* Exercise increases prolactin-receptor expression on human lymphocytes. The American Physiological Society, **Journal of Applied Physiology** 94: 518-524, 2003.

DOHI, K.; KRAEMER, W.I.; MASTRO, A.M. Exercise increases Prolactin-receptor expression on human lymphocytes. **Appl Physio**. Feb; 94(2): 518-24. Epub 2002.

DORSHKIND, K.; HORSEMAN, N. Anterior Pituitary Hormones, Stress and Immune System Homeostasis. **Bio Essays**. Vol 23 issue 3, pages 288-294.2001.

DUDDY, Martin E. *et al.* Distinct Profiles of Human B cell Effector Cytokines: A Role in Immune Regulation? **The Journal of Immunology**, 2004, 172:3422-3427.

DUDDY, Martin. *et al.* Distinct Effector Cytokine Profiles of memory and Naïve Human B : Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis. **The Journal of Immunology**. 2007, 178; 6092-6099.

ENDRES, R. *et al.* Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin β receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin α and tumor necrosis factor by B cells. **J. Exp. Med**, 159-168, 1999.

FILATREAU, S. *et al.* B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. **Nat Immunol**, 3: 944-950, 2002.

FREEMAN, M.E.; KANYICKSKA, B.; LERANT, A.; NAGY, G. Prolactin: Structure, Function and Regulation of Secretion. **Physiological Reviews**. Vol 80, n 4, October 2000.

FU Y-X. *et al.* B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin α -dependent fashion. **J Exp Med**, 187: 1009-1018, 1998.

GARDNER, Renee. *et al.* mercury Induces an Unopposed Inflammatory response in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells *in Vitro*. **Environmental Health Perspectives**. Volume 117, number 12, 1932-1938, December, 2009.

GARDNER, Renee M. *et al.* Mercury exposure, serum antinuclear/antinucleolar antibodies and serum cytokine levels in mining populations in Amazonian Brazil: A cross-sectional study. **Environmental Research** 110: 345-354, 2010.

GASSÓ, Sergi. *et al.* Antioxidant Compounds and Ca²⁺ Pathway Blockers Differentially Protect Against Methylmercury and Mercuric Chloride Neurotoxicity. **Journal of Neuroscience Research**, 66: 135-145, 2001.

GLEZER, A. *et al.* O papel da prolactina no lúpus eritematoso sistêmico: onde estamos. The prolactin role in systemic lupus erythematosus. **Rev Bras Reumatol**; 49(2):153-63, 2009.

GORCZYNSKI, R.M.; STANLEY, J. *Imunologia clínica / Beni Oley- Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Ed.*; 2001.

HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Crit. Rev. Toxicol.** 25: 1-24, 1995.

HARRIS, DP. *et al.* Cutting edge: the development of IL-4 producing B cells (B effector e cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. **J Immunol**, 175: 7103-7107, 2005., 174: 6781-6790, 2005.

HARRIS, DP. *et al.* Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. **J Immunol**

HEMDAM, N. Y. A. *et al.* Immunomodulation by Mercury chloride in vitro: application of different cell activation pathways. *Journal Compilation, Clinical and Experimental Immunology*, 148: 325-337, 2007.

HERCULANO, A.M.; LIMA, M.A.; DINIZ, L.W.P.;NASCIMENTO, J.L. Nitric Oxide Syntase Activation in Retinal Cell Culture After Methylmercury Intoxication. 2003.

HORSEMAN, ND. Prolactin. Boston: **Kluwer Academic Publishers**, 2001.

IGATA, A. Epidemiological and clinical features of Minamata disease. **Environ. Res.** 63, 157-169, 1993.

ILBÄCK NG, WESSLÉN L, FOHLMAN J, FRIMAN G. Effects of methyl mercury on cytokines, inflammation and virus clearance in a common infection (coxsackie B3 myocarditis). **Toxicol Lett.** Dec;89 (1):19-28. 1996.

JOHANSSON, Magnus. *et al.* Prolactin Treatment Improves Engraftment and Function of Transplanted Pancreatic Islets. **Endocrinology**, 150(4): 1646-1653, 2009.

KIM, Sang Hyun & SHARMA Raghbir P. Cytotoxicity of inorganic mercury in murine T and B lymphoma cell lines: involvement of reactive oxygen species, Ca (2+) homeostasis, and cytokine gene expression. **Toxicology In Vitro**, Volume 17(4): 385-95, 2003.

KOBUNE, F.; SAKATA, H.; SUGIURA, A. Marmoset Lymphoblastoid Cells as a Sensitive Host for isolation of Measles Virus. **Journal of virology** v 64. n 2 P 700 – 705. Feb. 1990.

KONDO, K. Minamata disease in Niigata: epidemiology and legal social issues. In **Mineral and Metal Neurotoxicity**. (Yasui M, MJ Strong and MA Verity, Eds.) (CRC Press: Boca Raton, Florida, USA), pp. 189-197, 1997.

LENERT, P. *et al.* TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. **J Clin Immunol**, 25:29-40, 2005.

LIMKE, Tobi L. *et al.* Disruption of Intraneuronal Divalent Cation Regulation by Methylmercury: Are Specific Targets Involved in Altered Neuronal Development and Cytotoxicity in Methylmercury Poisoning? **NeuroToxicology**, 25: 741-760, 2004.

LUND, Frances E. Cytokine-producing B lymphocytes – key regulators of immunity. Elsevier. **Immunology**, 20: 332-338, 2008.

MANGAN, J. *et al.* Combining quantitative and qualitative methodologies in logistics research, **International Journal of Physical Distribution & Logistics management**, Vol. 34, No. 7, pp. 565-578, 2004.

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. **Int. J. Devl Neuroscience**, 18: 693-704. 2000.

MATERA, L. *et al.* Prolactin in autoimmunity and antitumor defense. **J Neuroimmunol** 109: 47-55, 1995.

MATHIESON, PW. Mercury: god of TH2 cells? **Clinical Exp Immunol**; 102:2:229-30;; Nov. 1995.

MAURY C. PJ. Tumour necrosis factor-an overview. **Acta medica Scandinavica**, vol. 220 no5, pp. 387-394, 1986.

MIRANDA, M.R. *et al.* Mercúrio em Sistemas Aquáticos: Fatores Ambientais que Afetam a Metilação. Laboratório de Traçadores Wolfgang Christian Pfeiffer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, **Artigo Ocol. Bras.** 11 (2): 240-251, 2007

MIZOGUCHI, Atsushi and BHAN, Atul K. A Case for Regulatory B Cells. **The Journal of Immunology**, 176:705-710, 2006.

MOSMAM, Tim. Complexity or coherence? Cytokine secretion by B cells. “Lymphocyte subsets” brings to mind different types of T cells. New work indicates that B cells may also have distinct effector functions. **Nature America Inc.** December. Vol. 1, no 6, pp.465-6. 2000.

NRIAGU, J.O. Production and Uses of Mercury. pp. 23-39. In: J.O. Nriagu, (ed), *The Biogeochemistry of Mercury in the Environment*, New York Elsevier/North – **Holland Biomedical Press**. 1979.

NYLAND, J. F. *et al.* Fetal and maternal immune responses to methylmercury exposure: a cross-sectional study. **Environmental Research** 111, 584-589, 2011. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/envres

PEEVA, E; MICHAEL, D; CLEARY, J; RICE, J; CHEN, X; DIAMOND, B. Prolactin Modulates the Naive Cell Repertoire. **J. Clin. Invest.** 111: 275-283. January 2003.

QUEIROZ, I.R. Determinação do metilmercúrio em peixes de região de garimpo. 109f. Dissertação (mestrado) – **Faculdade de Ciências Farmacêuticas**. Universidade de São Paulo. 1995.

REYES, Lilian I. *et al.* BAFF: Una citoquina reguladora de linfócitos B implicada em autoinmunidad y cáncer linfoide. **Rev Méd Chile**, 134: 1175-1184, 2006.

ROELFSEMA, Ferdinand. *et al.* Prolactin Secretion in Healthy Adults Is Determined by Gender, Age and Body Mass Index. **Plos One**, Vol. 7(2):e31305, 2012.

ROSS, M. A. Methylmercury. **Health effects review**, 1: 1-2. 1996.

SABHARWAL, P.; GLASER, R.; LAFUSE, W.; VARMA, S.; LIU, Q.; KELLEY, K.W.; MALARKEY, W.B. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** vol 89, pp. 7713-7716, August 1992.

SANTOS ECO, JESUS, IM, BRABO, ES, LOUREIRO, ECB, MASCARENHAS, AFS, WEIRICH J. Mercury exposure in riverside Amazon communities in Para, Brazil. **Environmental Research**, 84:100-07, 2000.

SHENKER. BJ. *et al.* Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. Immune Suppression of T-cell activation. **Immunopharmacol Immunotoxicol**; 14:3, 1992. 539-53

SHENKER, B.J.; GUO, T.L.; SHAPIRO, I.M. Mercury – Induced Apoptosis in Human Lymphoid Cells: Evidence that the Apoptotic Pathways Is Mercurial Species Dependent. **Environmental Research**. 84A : 89-99. 2000.

SCHINDLER, D.W. From acid rain to toxic snow. Volvo Environmental Prize Lecture. **Ambio** 28: 350-355. 1999.

TAKEUCHI, T. N. Morikawa, H. Matsumoto and Y Shiraishi. A Pathological study of Minamata disease in Japan. **Acta Neuropathol.** 2, 40-57. 1962.

TRIPATHI, Anurag & SODHI, Ajit. Prolactin-induced production of cytokines in macrophages in vitro involves JAK/STAT and JNK MAPK pathways. **International Immunology**, Vol. 20 (3): 327-336, 2008.

VASSALLO, Dalton Valentim. *et al.* Ações tóxicas agudas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, volume 67, (nº 1), Vitória: ES, 1996.

YAMAMOTO, Toshiyuki. *et al.* β -Cell specific cytoprotection by prolactina on human islets. **Transplant Proc.** 40(2): 382-383, 2008.

YAMAMOTO, Toshiyuki. *et al.* Prolactin Supplementation to Culture Medium Improves β -Cell Survival. **Basic and Experimental Research.** Volume 89 - Issue 11 - pp 1328-1335, 2010. doi: 10.1097/TP.0b013e3181d98af1

YOUINOU, Pierre. β cell conducts the lymphocyte orchestra. **Journal of Auto Immunity**, 28 (2007) 143-151. Doi: 10.1016/j.jaut.2007.02.011

YU-LEE, Li-Yuan. Prolactin Modulation of Immune and Inflammatory Responses. **The Endocrine Society**, Houston, Texas,. p.435-455, 2002.

APÊNDICE A

Tabela 1. Avaliação da Viabilidade Celular de Cultura de Linfócitos B transformados submetidos à intoxicação por MeHg em diversas concentrações. Os dados são apresentados em média mais desvio padrão da média. * 0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 para comparações entre os grupos: tratado versus controle.

	MeHgCl		MeHgCl		MeHgCl
Controle	0.1uM	MeHgCl 1uM	MeHgCl 5uM	10uM	50uM
0.345	0.289	0.174	0.149	0.107	0.048
0.349	0.293	0.252	0.177	0.117	0.060
0.267	0.324	0.181	0.071	0.125	0.051
0.271	0.338	0.204	0.107	0.117	0.054
$\bar{x}=0.308$	$\bar{x}=0.311$	$\bar{x}=0.203$	$\bar{x}=0.126$	$\bar{x}=0.117$	$\bar{x}=0.053$
DP=0.045	DP=0.024	DP=0.035	DP=0.047	DP=0.007	DP=0.005

APÊNDICE B

Tabela 2. Avaliação da Viabilidade Celular de Cultura de Linfócitos B transformados submetidos ao tratamento com PRL em diversas concentrações

CONTROLE	PRL 0.1 nM	PRL 1.0 nM	PRL 10 nM
0.345	0.285	0.297	0.205
0.349	0.316	0.258	0.199
0.267	0.345	0.285	0.214
0.271	0.342	0.271	0.210
$\bar{x}=0.308$	$\bar{x}=0.322$	$\bar{x}=0.277$	$\bar{x}=0.207$
DP=0.045	DP=0.028	DP=0.016	DP=0.006

ANEXO A

Parecer de Aprovação N° 007/2011/CEPAN/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - N° 007/2011

Ananindeua/PA, 25 de março de 2011.

Projeto: “**Avaliação do efeito protetor da Prolactina em linfócitos expostos a ação do metilmercúrio**”.

Pesquisador Responsável: **MARIA IZABEL DE JESUS**

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,


NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC