

ÁUREA REGINA ALVES IGNÁCIO

EFEITO DA INTOXICAÇÃO MERCURIAL SOBRE
PROGENITORES NEURAIS E A GLIA DO
CÉREBRO

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Áurea Regina Alves Ignácio

EFEITO DA INTOXICAÇÃO MERCURIAL SOBRE PROGENITORES NEURAIS E A
GLIA DO CÉREBRO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica)

Orientadores: Cecilia Hedin-Pereira
Olaf Malm

Rio de Janeiro
2007

Ignácio, Áurea Regina Alves

Efeito da intoxicação mercurial sobre progenitores neurais e a glia do cérebro / Áurea Regina Alves Ignácio. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2007. xiii, 153. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Cecilia Hedin-Pereira e Olaf Malm

Tese (doutorado) – UFRJ/IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Biofísica, 2007.

Referências bibliográficas: f. 119-139

1. Compostos de metilmercúrio - toxicidade. 2. Neuroglia – efeitos de drogas. 3. Células-tronco - efeitos de drogas. 4. Intoxicação do sistema nervoso por mercúrio. 5. Ratos Wistar. 6. Neurobiologia – Tese. I. Hedin-Pereira, Cecilia. II. Malm, Olaf. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Biofísica. IV. Título.

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Neuroanatomia Celular no Depto de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas e no Laboratório de Radioisótopos do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho ambos da UFRJ, na vigência dos Auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal-Programa de Qualificação Institucional (CAPES/PQI), Fundação de Amparo a pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

A uma das pessoas que
mais amei e
que perdi repentinamente: **meu Pai**
Manoel Ignácio
In memoriam

Agradecimentos

Ao Prof. *Ricardo Gattass* pela motivação e inspiração inicial desta tese.

Aos meus orientadores *Cecília Hedin-Pereira* e *Olaf Malm*, pela disposição em me orientar, ampliando minha formação como pesquisadora através do amplo domínio de conhecimento que ambos possuem.

A Profa. *Cecília Hedin-Pereira*, minha nova amiga, pelo seu constante acompanhamento durante a minha formação, orientando-me, desafiando-me, incentivando-me, avaliando-me e propondo a continuidade de nossa parceria, o que foi fundamental para a construção de um novo grupo de pesquisa na UNEMAT.

Ao Prof. *Olaf Malm*, por seu carinho e atenção e por desde o início ter acreditado em mim como pesquisadora, sempre me motivando para ampliar meus estudos.

Aos meus colaboradores: Profa. *Maira M. Fróes* (pelo carinho e sabedoria com que me ajudou a construir a habilidade de gerar culturas astrocíticas e aprofundar meus conhecimentos), Dra. *Helena A. Kehrig* (pela precisão nas análises de cromatografia gasosa e por sua amizade), Dr. *Luiz Anastácio Alves* e Dr. *Robson* (pelos experimentos de eletrofisiologia), Prof. *Ricardo Reis* e *Fernanda Pohl* (pela atenção e pelos ensaios de captação de D-Aspartato).

Ao Prof. *João Menezes* pelo entusiasmo e competência na condução dos trabalhos no nosso laboratório após seu retorno do pos-doutoramento motivando-nos à pesquisa.

A Profa. *Leny Cavalcante* por seu constante incentivo na minha formação desde quando fiz mestrado na UFSC, tendo tido sua inestimável contribuição como membro da minha banca naquela ocasião e na banca examinadora de meu projeto de tese de doutorado.

A Profa. *Sandra König* por sua disposição em me ensinar técnicas que para ela já eram rotinas.

Ao Prof. *Jean Remy* por ceder sempre sem empecilhos capelas do seu laboratório de análises de mercúrio.

Aos Técnicos de laboratório *Carla Moreira Furtado* (meu agradecimento especial, por me acompanhar em tudo que precisei fazer pela primeira vez); *Rose* (pela precisa preparação de meio de cultura padronizado); *Ricardo* (pelas análises de absorção atômica); *Elizabeth* (pelo apoio em ganhar intimidade com o criostato); *Antônia* (por me dar segurança na primeira injeção intraperitoneal de BrdU) e *Pedro* (por sua paciência, tranquilidade e habilidade na captura de imagens no microscópio Confocal/FIOCRUZ).

Ao Bioterista *Adiel* por seu carinho, disposição e agilidade em garantir todos os animais necessários para esta tese.

As minhas novas e grandes amigas *Ana, Giovana, Carla, Andressa e Manuela*, obrigada por me fazerem sentir sempre bem, mais jovem, mais tranquila para superar meus desafios, além de me acompanharem em vários experimentos e discussões.

Ao meu amigo *Marcos Romualdo*, por suas dicas, suas doações de anticorpos, mesmo estando tão longe e por sua tranquilidade em encarar o processo de formação como doutor.

Aos meus amigos *Leo Morita, Eduardo, Anderson, Luciana, Ana Lenice, Airton, Liliane, José Eduardo, Leonardo Lara e Daniele* pelas contribuições, cada um em alguma etapa da minha tese e pela prazerosa convivência.

Aos meus colegas do laboratório de gliogênese, Luciana Romão, Suzana, Ana, Tércia, Sheila, pelos encaixes nos horários nos fluxos, no microscópio, por dividirem animais P0 para cultura e, sobretudo pela amizade de vocês.

As minhas colegas do laboratório de Radioisótopos: *Mariana* e *Tércia* pelos momentos de trabalho juntas e a segurança no trabalho com mercúrio.

As minhas filhas, meus grandes tesouros, por compreenderem minha ausência em vários momentos que só a mãe sabe conduzir melhor.

Ao meu esposo *Manoel dos Santos Filho* por seu companheirismo, amor e dedicação durante esta nova etapa de formação.

A minha *mãe* e *meus irmãos* pelo carinho e apoio que sempre me ofereceram durante os quatro anos no Rio de Janeiro, visitando-nos, reforçando atenção para minhas filhas e permitindo momentos de relaxamento.

A minha *sogra* pela sua constante força sempre me colocando pra cima.

A *CAPES* pelo financiamento da bolsa de doutorado e auxílio financeiro anual para pesquisa.

A *UNEMAT* pela concessão de afastamento para cursar o doutorado na UFRJ/IBCCF, investindo na formação do quadro docente e de grupos de pesquisa.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Especificos	23
III. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 <i>Intoxicação Mercurial em cultura de astrócitos cerebrais in vitro</i>	24
3.1.1 Cultura primária de astrócitos.....	24
3.1.2 Técnica de carregamento de corante por “ <i>Scrape Loading</i> ”.....	26
3.1.3 Procedimentos para Tratamento das culturas com MeHg.....	28
3.1.4 Ensaios de permeabilização de membrana.....	28
3.1.5 Avaliação do carregamento de corante.....	29
3.1.6 Medidas de Captação de [³ H] <i>D</i> -Aspartato.....	30
3.1.7 Análise de Dano Celular induzido pelo MeHg.....	31
3.1.8 Imuno-citoquímica.....	32
3.2 <i>Intoxicação Mercurial in vivo</i>	34
3.2.1 Animais e Procedimentos de Intoxicação.....	34
3.2.2 Eliminação dos excrementos e descarte.....	34
3.2.3 Perfusão/crioproteção/criosecção.....	35
3.2.4 Procedimentos para determinação de mercúrio total e MeHg.....	38
3.2.4.1 Metodologia para Quantificação de Hg Total.....	38
3.2.4.2 Metodologia para quantificação de MeHg.....	38
3.2.5 Delineamento Experimental.....	40
3.2.5.1 Proliferação Celular.....	40
3.2.5.2 Determinação dos fenótipos celulares.....	40
3.2.5.3 Quantificação.....	42
IV. RESULTADOS	45
4.1 <i>Intoxicação Mercurial in vitro e suas conseqüências sobre rede astrocitária no cérebro pós-natal: comunicação celular mediada por junções comunicantes e permeabilização de membrana</i>	45
4.1.1 Níveis moderados de MeHg levam a inibição do carregamento de corante permeante à comunicação celular mediada por junção comunicante... ..	45
4.1.2 A captação de corante é devido à abertura de grandes poros transmembrana.....	50
4.1.3 Agentes desacoplantes e bloqueadores de hemicanais inibem a permeabilização induzida pelo MeHg.....	52
4.1.4 Bloqueadores de P2X7 inibem a permeabilização de membrana induzida pelo MeHg.....	52

4.1.5 Mudanças morfológicas na condição de permeabilização induzida pelo MeHg.....	58
4.1.6 Captação de D-aspartato é alterada na condição de intoxicação pelo MeHg.....	59
4.1.7 Conclusões.....	63
4.2 Análise do padrão de acumulação do mercúrio no encéfalo e nos outros órgãos.....	65
4.2.1 Quantificação e Padrão de Acumulação de THg.....	65
4.2.2 Padrão de acumulação de mercúrio nos tecidos amostrados.....	70
4.2.3 Quantificação, Acumulação e Distribuição do MeHg.....	75
4.2.4 Especificação das formas orgânicas de Mercúrio.....	79
4.3 Intoxicação Mercurial “in vivo” e suas conseqüências sobre os nichos neurogênicos do cérebro: hipocampo e zona subventricular.....	81
4.3.1 Aumento do Número de Células na fase S na SVZ com 24 horas de sobrevida de BrdU.....	81
4.3.2 Gliose Reativa.....	83
4.3.3 Identificação e quantificação das Células BrdU positivas.....	85
4.3.4 Alteração no padrão de organização e distribuição de GFAP na SVZ nos animais tratados com MeHg.....	85
4.3.5 O incremento no número de células em fase S na SVZ em intoxicados pode ser interpretado como aumento na neurogênese?.....	89
4.3.6 Conclusões.....	95
V. DISCUSSÃO.....	97
5.1 Resposta das áreas proliferativas do cérebro adulto à intoxicação aguda pelo MeHg.....	97
5.1.1 A proliferação celular como resposta tecidual à lesão e os possíveis candidatos a promovê-la.....	97
5.1.1.1 A adenosina trifosfato (ATP).....	97
5.1.1.2 O neurotransmissor glutamato como potencial regulador da neurogênese de animais intoxicados.....	101
5.1.1.3 A resposta inflamatória como reguladora da proliferação.....	103
5.1.2 Incorporação de BrdU em células durante o ciclo celular ou em processo de morte?.....	106
5.1.3 Hipóteses para a interrupção do ciclo celular.....	108
5.2 Cinética do MeHg no organismo de roedor adulto.....	110
5.2.1 Sistema Nervoso Central: alvo principal do Metilmercúrio.....	110
5.2.2 Relações entre mercúrio e metilmercúrio nos diferentes órgãos do rato adulto.....	112
5.2.3 Metilmercúrio: padrão de acumulação e desmetilação em mamíferos.....	114
5.3 Respostas da rede astrocitária à intoxicação aguda pelo MeHg.....	116
5.3.1 Junções comunicantes são afetadas por intoxicação mercurial.....	117
5.3.2 Intoxicação mercurial provoca permeabilização da membrana astrocitária: o papel de hemicanais e poros P2X7.....	119
5.3.3 Astrócitos cerebrais como candidatos a moduladores da neurotoxicidade induzida pelo MeHg: prejuízos na captação de glutamato.....	125

VI CONCLUSÕES.....	128
VII. PERSPECTIVAS.....	130
VIII. REFERÊNCIAS.....	131

Lista de Figuras

Figura 1 - Distribuição do MeHg no Cérebro Fetal, infantil e Adulto: Padrão Observado na Doença de Minamata.

Figura 2 - Quadro ilustrativo dos efeitos neuropatológicos do MeHg no homem, em primatas não humanos e em pequenos mamíferos (Burbacher et al., 1990).

Figura 3 - Desenho experimental para os ensaios de proliferação e migração utilizando BrdU.

Figura 4 - Desenho esquemático de corte sagital do cérebro de rato adulto e cortes coronais indicando as regiões cerebrais analisadas.

Figura 5 - A Comunicação Juncional avaliada pela passagem de corante (*Lucifer Yellow*) não é afetada por baixa exposição ao MeHg.

Figura 6 - Ensaio de passagem de corante (*Lucifer Yellow*) é inibido por moderada exposição ao MeHg.

Figura 7 - Altos níveis de exposição ao MeHg revelam permeabilização astrocitária nos ensaios de passagem de *Lucifer Yellow*.

Figura 8 - A permeabilização da monocamada astrocitária é restrita a pequenas moléculas e é parcialmente reversível.

Figura 9 - Bloqueadores de Comunicação Juncional bloqueiam a permeabilização astrocitária induzida pelo MeHg.

Figura 10 - Cloreto de Lantânio (LaCl_3) – um bloqueador de hemicanais inibe a permeabilização astrocitária induzida pelo MeHg.

Figura 11 - Bloqueadores de P2X7 inibem a permeabilização astrocitária induzida pelo MeHg.

Figura 12 - A Captação de corante é elicitada por ATP na condição de permeabilização induzida pelo MeHg durante o bloqueio de hemicanais.

Figura 13 - Sinais estruturais de lesão sobre a morfologia celular astrocitária induzida pelo tratamento das culturas com MeHg.

Figura 14 - MeHg bloqueia a captação de [^3H]D-Aspartato em monocamada astrocitária.

Figura 15 - Concentração de Mercúrio nos Órgãos Alvos.

Figura 16 - Concentração de Mercúrio no sangue.

Figura 17 - Concentração de Mercúrio no pelo.

Figura 18 - Concentração de mercúrio total nos órgãos alvo em sete dias pós intoxicação por MeHg.

Figura 19 - Concentração de mercúrio total nos órgãos alvo em 15 dias pós intoxicação por MeHg.

Figura 20 - Concentração de mercúrio total nos órgãos alvo em 21 dias pós intoxicação por MeHg.

Figura 21 - Concentração de MeHg nas estruturas cerebrais.

Figura 22 - Concentração de MeHg nos Órgãos-Alvo.

Figura 23 - Porcentagem de MeHg nos Órgãos Alvos.

Figura 24 - Intoxicação pelo MeHg aumenta o número de células a incorporar BrdU na SVZ, mas não altera este número no giro dentado.

Figura 25 - A Intoxicação pelo MeHg aumenta a expressão de GFAP no hipocampo.

Figura 26 - Expressão de BrdU e GFAP na SVZ de animais controle e intoxicados com MeHg: Alguns progenitores proliferando na SVZ são astrócitos.

Figura 27 - Intoxicação pelo MeHg aumenta a incorporação de BrdU no terceiro ventrículo do cérebro de ratos adultos.

Figura 28 - Intoxicação pelo MeHg resulta em mudanças no padrão de distribuição de GFAP na SVZ.

Figura 29 - BrdU e PH3 na SVZ: Algumas células BrdU(+) nos animais intoxicados com MeHg completam Mitose.

Figura 30 - Número de células PH3(+) na SVZ 15 dias após a intoxicação mercurial

Figura 31 - Número de células PH3(+) na SVZ 7 dias após a intoxicação mercurial, com 8 horas de sobrevida de BrdU.

Figura 32 - Número de Células BrdU(+) diminui no Bulbo Olfatório de ratos contaminados com MeHg.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Modulação da Neurogênese no Cérebro Adulto.

Tabela 2: Correlação no padrão de acumulação de MeHg entre os órgãos alvo.

Tabela 3: Análise dos órgãos intoxicados por MeHg após 7 dias (ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey).

Tabela 4: Análise dos órgãos intoxicados por MeHg após 15 dias (ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey).

Tabela 5: Análise dos órgãos intoxicados por MeHg após 21 dias (ANOVA seguida por teste *a posteriori* Tukey).

Tabela 6: Média da porcentagem de MeHg e Mercúrio Orgânico no fígado, cérebro e cerebelo de rato adulto 15 dias após intoxicação aguda com MeHg.

Lista de abreviaturas e siglas

AMPA	Ácido RS – α amino 3-hidroxi-5-metil-4 esoxazol propriônico
ANOVA	Análise de Variância
AO	Corante laranja de acridina (do inglês <i>Acridine Orange</i>)
ATP	Adenosina Trifosfato
BO	Bulbo Olfatório
BrdU	Bromo – deoxiuridina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CBX	Carbenoxolona
CX	Conexina
DAPI	4,6 – diamidino – 2 – fenilindol dihidróxicloreto
D-Asp	Aspartato
DCX	Doublecortina
DMEM	Meio de Eagle modificado por sulfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dp	Desvio padrão
E	Dia Embrionário
EDTA	Ácido etilenodiamina tetraacético
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ERK	Proteínas Cinases reguladas por sinais extracelulares
EtBr	Brometo de Etidídio
FCS	Soro de Cabra Fetal
FIMS	Sistema de injeção em fluxo de mercúrio
FITC	Fluoresceína isotiocianato
GA	Ácido 18 α -Glicirretínico
GABA	Ácido gama amino butírico
GD	Giro Denteado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLAST	Transportador de Glutamato/Aspartato de alta afinidade
GZA	Ácido Glicirrízico
HC	Hemisfério Cerebral
Hepes	Ácido sulfônico etano 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine
HPLC	Cromatografia líquida de alta performace
IP ₃	Inositol Trifosfato
LY	Corante LúCIFer Yellow
mGlu	Receptor de Glutamato Metabotrópico
NGS	Soro Normal de Cabra
NIMD	National Institute for Minamata Disease
NMDA	N-methyl-d-aspartate
NTDPase	Nucleosídeo Trifosfato Difosfatase
oATP	ATP oxidado

Org -Hg	Mercúrio orgânico
P	Dia Pós-natal
Panx	Panexina
P2X	Receptor Purinérgico Ionotrópico
P2Y	Receptor Purinérgico Metabotrópico
PBS	Salina Tampão Fosfato
PBS-G	Salina Tampão Fosfato + Glicose
PF	Paraformaldeído
PH3	Fosfohistona H3
PKC	Proteína Cinase C
RD	Corante Rodamina Dextran
RITC	Rodamina isotiocianato
RMS	Via Migratória Rostral
SNC	Sistema Nervoso Central
SR-B	Corante Sulfo Rodamina B
STAT3	Sinal transdutor e ativador de transcrição 3
SVZ	Zona Subventricular
TGF- β 1	Fator de Crescimento
THg	Mercúrio Total
TUNEL	Do inglês, <i>Terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
UV	Ultra Violeta

RESUMO

Metilmercúrio (MeHg) é um agente neurotóxico capaz de transpor a barreira hematoencefálica. Neste trabalho investigou-se os efeitos do MeHg no aumento da proliferação celular na zona subventricular (SVZ) e no giro denteado (GD) do hipocampo de ratos adultos, que foram intoxicados via oral com uma única dose (5mg/Kg) de MeHg. Foi constatado que o pico da concentração de MeHg no cérebro se dá 7 dias após a intoxicação mantendo-se alta até 21 dias. O padrão de acumulação de mercúrio (Hg) total e do MeHg no sangue, cérebro, cerebelo, fígado e rim 7, 15 e 21 dias após a intoxicação aguda demonstraram que Hg encontrava-se sempre metilado nas estruturas encefálicas. O mesmo se aplica aos outros órgãos com exceção do fígado no qual 92% do Hg encontrado 15 dias após a intoxicação por MeHg está sob a forma inorgânica sugerindo ter havido desmetilação. A intoxicação pelo MeHg produz um aumento na incorporação de BrdU (bromodeoxiuridina) na SVZ com relação ao controle em todas as sobrevividas acima. Em contraste, não foi encontrado aumento na incorporação de BrdU no giro denteado. Apesar do aumento de 40% nas células marcadas com BrdU, a mitose é inibida em 85%. Foi observado um decréscimo significativo no número de interneurônios que atinge o bulbo olfatório a partir da SVZ. Avaliou-se também a intoxicação por MeHg sobre culturas de astrócitos cerebrais em busca de possíveis mecanismos subjacentes à sua ação ao nível celular. Verificamos que MeHg 30 μ M por 10 min é capaz de reduzir o espalhamento de corantes permeantes de baixo peso molecular por junções comunicantes e em 30 minutos produz completa permeabilização dos astrócitos. Através de ferramentas farmacológicas, verificou-se que esta permeabilização era promovida pela abertura de hemicanais de conexinas e de poros P2X7 em sequência. Hipotetizamos que os efeitos do MeHg sobre astrócitos podem estar na base da toxicidade de MeHg no SNC e também na sua capacidade de induzir progenitores neurais no adulto a entrarem no ciclo celular. Conjuntamente, a permeabilização da membrana astrocitária e o arresto do ciclo celular podem explicar parte dos efeitos tóxicos do MeHg no cérebro adulto. Considerando as evidências crescentes de um papel dos astrócitos nos circuitos neurais e função recentemente descoberta como célula-tronco no cérebro adulto, nossos resultados sugerem que a intoxicação mercurial provocaria um desequilíbrio importante na homeostase cerebral.

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) is a highly neurotoxic compound capable of easily transposing the blood-brain barrier. In this study we investigated if MeHg intoxication in rats led to an increase in the proliferation in germinative regions such as the subventricular zone (SVZ) and dentate gyrus (GD) in the hippocampus of adult rats which were orally intoxicated with a single dose (5mg/Kg) of a MeHg solution. We verified that MeHg concentration in the brain peaks at 7 days after intoxication remaining high at 15 days and decreasing by 50% at 21 days. The pattern of Hg and MeHg accumulation in the blood, brain, cerebellum, liver and kidney 7, 15 and 21 days after acute intoxication demonstrated that Hg was always methylated in encephalic structures. The same occurs in the other organs analyzed except for the liver in which 92% of the Hg found 15 days after the intoxication is in its inorganic form suggesting the occurrence of demethylation. Organic mercury intoxication produces a significant increase in BrdU (Bromodeoxyuridine) incorporation in the SVZ comparing to control in all survival times mentioned above. In contrast, we found no increase in BrdU incorporation in the dentate gyrus. However, we did find reactive gliosis response in that structure showing that it was in fact affected by MeHg intoxication. In spite of the 40% increase in cells labeled for BrdU in the SVZ, mitosis is inhibited in 85%. Consistently there is a significant decrease in the number of interneurons that reach the olfactory bulb from the SVZ. MeHg intoxication was also evaluated in cerebral astrocyte cultures in search for possible mechanisms underlying its effect at the cellular level. We verified that 30 μ M MeHg for 10 minutes reduces the intercellular diffusion of low molecular weight dyes through gap junctions (GJ). Thirty minutes exposure to MeHg results in complete permeabilization of the astrocyte monolayer. Through pharmacological blockade of gap junctions, hemichannels and P2X7 receptor, we verified that this permeabilization was promoted by the opening of unapposed GJ hemichannels and P2X7 pores in sequence. We therefore hypothesize that MeHg toxicity effects on astrocytes may underlie CNS and also in its capacity to induce neural progenitors in the adult to enter cell cycle. Taken together, astrocyte transmembrane permeabilization and progenitor cell cycle arrest may explain part of the toxic effects of MeHg in the brain. Considering the growing evidence of an astrocyte role in neural circuits and its novel function as a stem cell in the adult it is predictable that main aspects of brain homeostasis are disrupted in MeHg intoxicated brains.

INTRODUÇÃO

O MeHg é um composto organometálico altamente neurotóxico formado no ambiente aquático após o processo de metilação do Hg por ação de microorganismos (WHO, 1990, Zahir *et al.*, 2005). A contaminação por MeHg no ser humano se dá principalmente pela ingestão de peixes contaminados. Por seu caráter lipofílico, o metilmercúrio é facilmente absorvido a partir do intestino, circula na corrente sanguínea conjugado as hemácias e, atravessa facilmente as barreiras hemato-encefálica e placentária via proteínas transportadoras, assim como, as membranas celulares em geral (Aschner & Clarkson 1988).

O MeHg acumula-se além do SNC nos demais órgãos, apresentando um padrão de distribuição no organismo tempo e dose dependentes (Sakamoto, *et al.*, 2004). Procurou-se o entendimento dos efeitos decorrentes da intoxicação pelo MeHg em diferentes situações ambientais – nas quais os padrões de mercúrio ambiental variavam de exposições agudas com baixas doses provocando efeitos brandos (Arito & Takahashi, 1991, Chang & Hartmann, 1972a, Fehling *et al.*, 1975, Inouye & Kajiwara, 1988, Oliveira *et al.*, 2001) até efeitos mais severos, nos casos de intoxicação intermediária (Chang, 1977, Tsuzuki, 1981, Burbacher *et al.*, 1986, Lindstrom *et al.*, 1991) ou frente à intoxicação crônica (Hirano *et al.*, 1986, Mitisumori *et al.*, 1984, Davidson *et al.*, 1995).

Neste trabalho nos concentraremos nos efeitos neurotóxicos do mercúrio embora também estejamos estudando o seu perfil de acumulação em outros sistemas.

Neurotoxicidade de Agentes Ambientais

A neurotoxicidade é geralmente definida como uma mudança estrutural ou uma alteração funcional no sistema nervoso, resultante a partir da exposição a um agente químico, biológico ou físico. Efeitos neurotóxicos resultam a partir de uma série de eventos, que incluem a entrada do agente no organismo e sua distribuição no local de ação, interação com alvos celulares específicos e iniciação de mudanças biológicas que culminam em alterações funcionais no SNC (para revisão: Costa *et al.*, 2004).

Embora um grande número de pesquisas tenha focado nas últimas décadas sobre efeitos súbitos da exposição química durante o desenvolvimento, destacando-se o mercúrio, chumbo e etanol, esta tese apresenta um modelo experimental que permite a análise da cinética do mercúrio orgânico no organismo de mamífero adulto e efeitos neurotóxicos, como uma referência para estudos de outros metais pesados em modelos de mamíferos, tais como o chumbo e o cádmio, capazes de causar severas mudanças morfológicas e funcionais no SNC em desenvolvimento ou na fase adulta.

Neurotoxicidade do metilmercúrio no homem: evidências comportamentais e substrato neural

Os estudos envolvendo o comportamento e toxicologia do MeHg se intensificaram após o desastre que levou ao despejo de metilmercúrio, devido ao uso de Hg inorgânico como catalisador na produção de acetaldeído na baía de Minamata no Japão. As conseqüências desta tragédia ambiental se estendem até o presente e

a intoxicação mercurial humana neste evento permitiu a caracterização do quadro de sintomas e sinais que levaram a descrição da Doença de Minamata. Em termos do comprometimento do sistema nervoso, altas doses de intoxicação como ocorrido na década de 50 em Minamata, geraram um quadro clínico típico caracterizado por ataxia, disartria, constrição bilateral do campo visual, distúrbios de audição e distúrbios somestésicos (Takeuchi, 1968, Figura 1).

Estudos *posmortem* com cérebros de pacientes portadores da doença de Minamata mostraram que o dano cerebral detectado após a exposição ao MeHg, em adultos, é mais pronunciado em áreas encefálicas específicas, tais como, a camada granular do cerebelo e o córtex cerebral visual. A exposição pré-natal ao MeHg leva a efeitos adversos múltiplos que interferem em várias etapas fundamentais do desenvolvimento cerebral, tais como a proliferação e a migração celular. Estes resultam em hipoplasia do córtex cerebral e microencefalia em humanos, podendo o peso do cérebro ser reduzido à metade ou a dois terços do normal (Choi, 1991, Eto *et al.*, 1997, 2002), gliose reativa e perda da mielinização (Takeuchi, 1968, Choi, 1989, Choi *et al.*, 1978, Choi *et al.*, 1987, Eto *et al.*, 1992, Geelen *et al.*, 1990, Matsumoto *et al.*, 1964, Mottet & Ferm 1983, para revisão: Sanfeliu *et al.*, 2003).

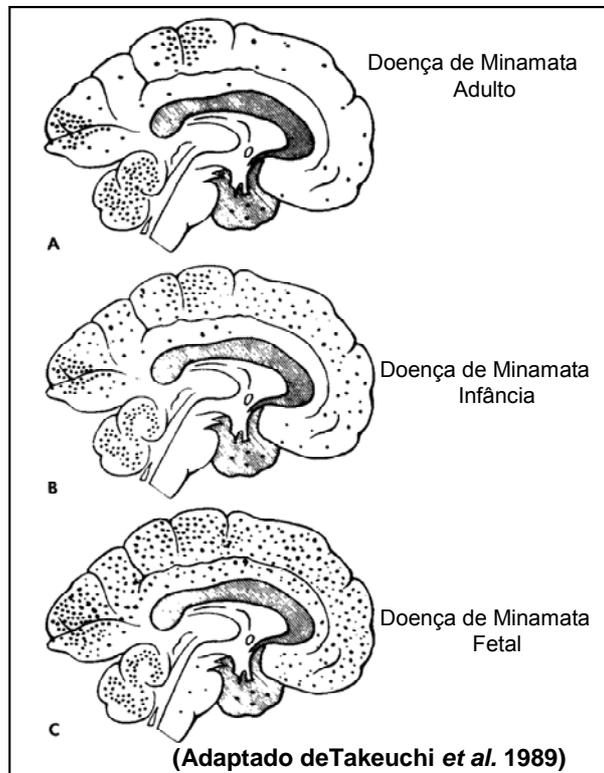


Figura 1 – Distribuição do Metilmercúrio no Cérebro Fetal, infantil e Adulto: Padrão Observado na Doença de Minamata. No cérebro fetal o metilmercúrio distribui-se de forma generalizada por todas as regiões (A); Durante a infância, o metilmercúrio mantém uma distribuição homogênea através das estruturas cerebrais (B); Na fase adulta, o metilmercúrio acumula-se preferencialmente no cerebelo e córtex visual (C).

Uma série de estudos *in vivo* com crianças expostas ao MeHg no período fetal indica a ocorrência de deficiências neuropsicológicas mensuráveis (Davidson, *et al.*, 1995, Grandjean, *et al.*, 1998, Myers, *et al.*, 1995, 1998).

Intoxicação mercurial encefálica em modelo experimental de roedores

Semelhante ao observado no cérebro dos pacientes portadores da doença de Minamata, estudos com modelos animais demonstram que o MeHg acumula-se de forma semelhante no cérebro de outros mamíferos, acarretando distúrbios morfológicos e estruturais, assim como, deficiências motoras e de memória (Stoltenburg-Didinger, 1990). Estudos com roedores demonstram que o MeHg gera déficit de coordenação motora, degeneração neuronal difusa, manifestada por perda neuronal e gliose reativa no córtex cerebral, estriado e cerebelo (Sager *et al.*, 1884, Sakamoto *et al.*, 2004). Em primatas, foi demonstrado que o MeHg causa mudanças patológicas nos nervos periféricos (Eto *et al.*, 2001b), além de defeitos no córtex cerebral semelhantes aos observados em humanos (Eto *et al.*, 2001a), sustentado à hipótese de que o MeHg tenha efeitos similares sobre a morfologia cerebral em várias espécies. O comprometimento da mielina, observado nas autópsias dos japoneses foram também observados em gatos expostos ao MeHg pos-natalmente assim como em camundongos e ratos expostos pré-natalmente (Burbacher *et al.*, 1990, Figura 2).

Efeitos Neuropatológicos da Exposição ao MeHg durante o desenvolvimento		
Humano	Primatas	Pequenos Mamíferos
	Doses altas (12-20 ppm)	
diminuição do tamanho do cérebro, danos corticais, dilatação ventricular, células ectópicas, gliose reativa, desorganização das camadas corticais, perda celular	diminuição do tamanho do cérebro, danos no córtex e gânglio basal, gliose reativa, perda celular, dilatação ventricular, células ectópicas, desorganização das camadas corticais	diminuição do tamanho do cérebro, danos no córtex, hipocampo e cerebelo, dilatação ventricular, perda de mielina, perda celular
	Doses moderadas (3-11 ppm)	
nenhum dado	nenhum dado	diminuição no tamanho do cérebro, danos no córtex e cerebelo, perda de mileina
	Doses baixas (<3 ppm)	
nenhum dado	nenhum dado	diminuição no tamanho do cérebro, perda celular

Figura 2 – Quadro ilustrativo dos efeitos neuropatológicos do MeHg no homem, em primatas não humanos e em pequenos mamíferos – Exposição crônica (Adaptado de Burbacher *et al.*, 1990).

O MeHg, mesmo nas menores concentrações citotóxicas induz retração de neuritos em células de neuroblastoma, NB-1 (Kunimoto & Suzuki, 1995). Além disso, Sakaue, *et al.*, (2003) indicam que uma redução seletiva da proteína axonal ankirinaB, de 440kDa, está associada com estágios preliminares de degeneração de neurônios cerebelares. Além disso, análises morfométricas de neurônios dopaminérgicos expostos à 1 μ M de MeHg demonstraram diminuição no número de neuritos, indicando alterações de citoesqueleto (Götz, *et al.*, 2002).

Recentemente, Kakita e colaboradores (2003) relataram que a exposição de ratas gestantes ao MeHg, após 16 e 21 dias embrionários, E(16) e E(21), leva a um mal-posicionamento de neurônios no córtex cerebral. A gravidade dos efeitos provocados no cérebro em desenvolvimento está relacionada ao período e a duração da exposição mercurial (Sass *et al.*, 2001, Gribble *et al.* 2005). Algumas evidências mostram que o número reduzido de células observado no cérebro em desenvolvimento após a exposição ao MeHg *in vivo* derive da interrupção da divisão celular, primariamente durante a mitose, ao invés de mecanismos de morte celular por necrose (Choi, 1991, Sager *et al.*, 1984). Quanto ao ciclo celular, os efeitos do MeHg parecem agir sobre a progressão do ciclo, inibindo a mitose em células de glioma (Miura *et al.*, 1978), induzindo arresto mitótico G2/M em células de mesencéfalo embrionário (Ponce *et al.*, 1994), em células embrionárias do encéfalo em E12 (Rodier *et al.*, 1984) e em neurônios cerebelares (Sager & Matheson, 1998).

Resposta tecidual à intoxicação mercurial: células macro e microgliais

A intoxicação mercurial provoca uma resposta tecidual semelhante a outras lesões ao SNC. Detecta-se gliose reativa (Takeuchi, 1968, Takeuchi *et al.*, 1996, Choi, 1987, 1989, Choi *et al.*, 1978, Eto *et al.*, 1992, Geelen *et al.*, 1990), considerada um componente importante da resposta celular à lesão no SNC (para revisão: Ridet *et al.*, 1997). Evidências substanciais indicam que mecanismos inflamatórios modulam tanto a proliferação quanto à atividade biossintética dos astrócitos reativos (Yong *et al.*, 1991, Smith & Hale, 1997). A passagem de astrócitos do estado quiescente para o reativo é acompanhada por um aumento nos filamentos intermediários, predominantemente nos níveis de GFAP, e em certas condições, também no aumento da expressão de vimentina (Schiffer *et al.*, 1986).

A gliose reativa é um fenômeno que ocorre em vários outros modelos de lesão tais como, isquemia focal permanente, (Clark *et al.*, 1993, Schroeter *et al.*, 1995), isquemia global transiente (Petito *et al.*, 1990, Jorgensen *et al.*, 1993, Ordly *et al.*, 1993), traumas, doenças desmielinizantes, desordens genéticas ou insultos químicos (Eng & Ghirnikar, 1994). Hipertrofia astrocítica e hiperplasia com regulação da expressão da proteína GFAP estão entre os componentes típicos dessas formas de lesão neural, destacando-se nos modelos de isquemia (Clark *et al.*, 1993).

Visto que os astrócitos são os principais acumuladores de mercúrio (MeHg ou Hg) no SNC e que estes participam como mediadores ditos inflamatórios na intoxicação mercurial (Aschner & Clarkson, 1988), parte de nosso projeto destina-se a avaliar diferentes aspectos do efeito tóxico do MeHg sobre esta população celular *in vitro* e *in vivo*.

Os astrócitos caracterizam o tipo celular não neuronal mais numeroso no SNC, representam cerca de 50% do volume cerebral (Tower & Young, 1973, Herculano-Houzel *et al.*, 2006) e desempenham algumas funções que são essenciais para a atividade neuronal, incluindo a captação e liberação de neurotransmissores tais como o glutamato, tamponamento de K^+ e H^+ , e transporte de água (Fróes e Menezes, 2002, Chen & Swanson, 2003).

Outra população celular recrutada após lesão é a de células microgliais, com função análoga aos macrófagos do sistema imunológico, e que se encontram residentes do SNC. Usualmente apresentam uma morfologia ramificada (Hickey *et al.*, 1992, Kreutzberg, 1996) e baixo nível de expressão do antígeno Complexo de histocompatibilidade da Classe II e moléculas de adesão (Beyer *et al.*, 2000). Na maioria dos eventos patológicos no SNC as células microgliais são rapidamente ativadas e são consideradas como marcadores preliminares de neurotoxicidade (Monnet-Tschudi *et al.*, 1996, Kreutzberg, 1996, Stoll *et al.*, 1998, Beyer *et al.*, 2000). Esta população encontra-se amplamente distribuída na substância branca e cinzenta do cérebro adulto e aparentemente permanece num estado quiescente no parênquima neural, até que seja confrontada com mudanças induzidas patológica ou experimentalmente, em condições que comprometam a integridade do SNC. Nessas circunstâncias, ativação e reatividade da microglia pode incluir mudanças na sua distribuição, morfologia, atividade fagocítica e expressão de MHC (Murabe & Sano, 1982, Jorgensen *et al.*, 1993, Jensen *et al.*, 1994, Vela *et al.*, 2002, Ignácio *et al.*, 2005a).

Um sinal preliminar da neurotoxicidade induzida por compostos de mercúrio é a reação microglial (Monnet-Tschudi, 1996, 1998). Eskes *et al.* (2002), demonstraram que o MeHg afeta diretamente a morfologia microglial a partir de

concentrações não citotóxicas (10^{-10} a 10^{-7} M). Dentre os principais efeitos, inclui-se: retração dos processos celulares, morfologia arredondada dos corpos celulares e aumentada intensidade de marcadores de reatividade microglial.

Efeito tóxico do mercúrio in vitro sobre neurônios, glia e células não neurais

A neurotoxicidade do MeHg é caracterizada por alterações neurológicas e morfológicas assim como neuroquímicas em uma variedade de neurotransmissores, incluindo alterações nos sistemas gabaérgico, glutamatérgico e dopaminérgico (Aschner & Syversen, 2005). Está bem demonstrado que a neurotoxicidade do MeHg pode ser modulada por alterações na fisiologia dos astrócitos, tais como alterações na homeostase do Ca^{2+} , na produção de espécies oxigênio-reativas e na captação de glutamato (Gatti *et al.*, 2004, Adachi & Kunimoto, 2005, Aschner, 2005, Morken *et al.*, 2005, Fróes *et al.*, 2005).

Uma vez no interior da célula astrocitária, o MeHg pode alterar a homeostase intracelular, culminando em modificações no potencial de membrana das mitocôndrias e conseqüentemente na cascata de eventos que levam à apoptose (Belletti *et al.*, 2002, Shanker & Aschner, 2003). O MeHg têm ainda sido demonstrado como capaz de alterar o ciclo celular (Choi *et al.*, 1978, Ponce *et al.*, 1994), causando um arresto em G2/M dependente e independentemente de P53 (Miura *et al.*, 1999, Amorim *et al.*, 2000, Gribble *et al.*, 2005).

Respostas teciduais a lesão: Envolvimento de junções comunicantes, hemicanais, receptores purinérgicos e glutamato

Junções comunicantes e Hemicanais

O acoplamento elétrico celular é mais um aspecto relacionado a respostas teciduais à lesão (Chanson *et al.*, 2005). O acoplamento celular é promovido por grupos de canais aquosos que conectam o interior de células adjacentes, as junções comunicantes, e medeiam a passagem de íons e pequenas moléculas entre células acopladas. Num canal juncional cada célula contribui com um hemicanal, ou conexon formados por proteínas transmembrana denominadas conexinas (para revisão: Evans & Martin, 2002). Os canais célula-célula são permeáveis a moléculas, com massa de até 1000D, como AMPc e IP₃, além de íons Ca²⁺ (Bennett & Zukin, 2004).

O acoplamento celular glial pode ser modulado tanto positiva quanto negativamente quando há lesão direta ou indireta. Tal fenômeno foi relatado em diferentes regiões, por exemplo, na medula espinhal (Chang & Balice-Gordon, 2000) e no córtex cerebral (para revisão: Rouach *et al.*, 2002).

Um dos aspectos fisiológicos regulados pelo mercúrio em células não neurais é o acoplamento celular. Schirmacher *et al.*, (1998) demonstram os efeitos do chumbo, Hg e MeHg sobre a comunicação celular mediada pelas “junções comunicantes” em células ósseas. Neste trabalho é demonstrado que o MeHg altera os níveis de cálcio intracelular e bloqueia a comunicação celular mediada por junções comunicantes num padrão dose e tempo dependentes. Yoshida *et al.*, (1998) demonstraram que a intoxicação por MeHg inibe a comunicação intercelular por junções comunicantes em cultura primária de células renais de rato. O

mecanismo proposto é de que os metais pesados competiriam com Ca^{2+} em múltiplos sítios reduzindo a comunicação celular mediada por junções comunicantes.

As Junções comunicantes *in vivo* desempenham um papel importante no SNC, estando envolvidas em neuroproteção, propagação de ondas de cálcio, controle do volume celular, captação de pequenas moléculas, atividade metabólica, proliferação, migração e diferenciação celular, (Bittman *et al.*, 1997, Owens & Kriegstein, 1998, Bittman & Lo Turco 1999, Fróes *et al.*, 1999, Menezes *et al.*, 2002, Venance *et al.*, 2004), desta forma procuramos investigar qual o efeito do MeHg sobre as junções comunicantes astrocitárias, visto que, circuitos astrocitários acoplados parecem mediar a resposta tecidual à lesão.

Em contraste ao dogma convencional, estudos recentes sugerem que em adição à formação de canais juncionais, as conexinas podem desempenhar funções independentes. Uma importante função está na organização de hemicanais não juncionais, conexons não justapostos. Os hemicanais atuam como unidades funcionais independentes podendo inclusive desempenhar funções distintas das junções comunicantes organizadas pelo pareamento de dois conexons de células adjacentes (para revisão: Jiang & Gu, 2005).

Hemicanais não juncionais específicos podem abrir sob condições fisiológicas e patológicas. A abertura de hemicanais em situações de desequilíbrio homeostático pode ser deletéria para a célula em questão e para o tecido circunjacente (Ye *et al.*, 2003, Thompson *et al.*, 2006, Zhao *et al.*, 2005, Pearson *et al.*, 2005b).

Outro grupo de proteínas de membrana, as panexinas, vem sendo recentemente apontado como proteínas que podem funcionar como hemicanais

quando expressas ectopicamente, permitindo a captação de corante (Pelegriin & Surprenat, 2006).

As panexinas estão distribuídas em três famílias de proteínas de membrana de mamíferos (Panx1, Panx2, Panx3), apresentam ausência de homologia seqüencial, porém forte semelhança no arranjo estrutural na membrana, com as conexinas (Panchin, 2005; Barbe *et al.*, 2006), assemelhando-se, tanto na seqüência de aminoácidos, quanto estruturalmente com as proteínas da família das inexas, descritas em invertebrados. Barbe *et al.* (2006) demonstraram que a expressão ectópica de Panx1 em oócitos resulta em correntes de membrana semelhantes a um hemicanal que pode agir como um canal para a liberação de ATP intracelular em um único oócito ou a formação de um acoplamento juncional entre oócitos que expressam Panx1.

Recentemente sugeriu-se a participação de poros de panexinas em resposta à isquemia hipocampal *in situ* (ZappalÀ *et al.*, 2007). Além disso, Locovei *et al.* (2006a), através de evidências indiretas, sugerem que Panx1 poderia ser responsável pela liberação de ATP por eritrócitos em resposta a uma estimulação mecânica ou osmótica. Mais tarde, Locovei *et al.* (2007) demonstraram que a co-expressão de P2X7R com Panx1 em oócitos levam a respostas complexas observadas em várias células de mamíferos, incluindo a morte celular por aplicação prolongada de ATP. Enquanto a atividade do receptor é resistente ao tratamento com carbenoxolone, um bloqueador de junção comunicante e hemicanal, o mesmo suprime as correntes induzidas por ATP em células co-expressando o receptor P2x7 e Panx1, sugerindo que Panx1 possa ser o substrato molecular para a permeabilização do poro (ou canal receptor de morte) recrutado no complexo de sinalização P2X7R (Iacobas *et al.*, 2007).

Poros/receptores purinérgicos

Receptores purinérgicos têm sido caracterizados como importantes mediadores nas interações célula-célula no tecido neural após lesão e em doenças neurodegenerativas (para revisão: Le Feuvre *et al.*, 2002).

O ATP e seus derivados são os agonistas deste grupo de receptores. O termo receptor purinérgico foi introduzido por Burnstock (1972), quando os receptores de membrana foram pioneiramente caracterizados, porém somente cerca de 15 anos depois, foram estabelecidas as bases farmacológicas que permitiram a divisão atual desses receptores em duas classes: P2Y e P2X. Receptores P2Y são receptores acoplados a proteína G, predominantemente direcionados à cascata IP3/Ca²⁺, embora algumas isoformas estejam associadas com adenilato ciclase/cAMP. Receptores P2X são canais iônicos dependentes de ligante, permeáveis ao Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ e estão entre os receptores de membrana funcionalmente ativos, desde o período de formação das camadas germinativas (para revisão: Burnstock, 2007).

A ativação de receptores de ATP também tem sido demonstrada associada à regulação da síntese de DNA e proliferação em astrócitos (Neary & Zhu, 1994, Ciccarelli *et al.*, 1994), células-tronco neurais (Ryu *et al.*, 2003, Heo & Han, 2006, Mishra *et al.*, 2006), células de Müller (Milenkovic *et al.*, 2003), e progenitores corticais (Weissman *et al.*, 2004).

Os receptores P2X7 têm sido propostos como mediadores de inflamação, e com um possível papel em processos neurodegenerativos. A ativação de receptores P2X7 com altas concentrações de ATP dispara um fluxo iônico

intracelular de Ca^{2+} e Na^+ e efluxo de K^+ e a formação de poros de membrana não seletivos, cuja abertura pode resultar em morte celular.

O receptor P2X7 (também conhecido como receptor P2Z) forma complexos homoméricos que abrem grandes canais na membrana celular quando ativados por ATP extracelular (North & Surprenant, 2000). Em alguns tipos celulares este canal permeável ao ATP é permeável a moléculas maiores que 900Da, enquanto que em outros, são permeáveis somente a pequenas moléculas ou exibem seletividade iônica. Em várias células, incluindo neurônios e glia, a ativação do canal permeável ao ATP induz um aumento na permeabilidade a grandes cátions orgânicos, permitindo o fluxo de corantes fluorescentes de baixo peso molecular (North, 2002).

Receptores purinérgicos estão presentes na retina embrionária (Pearson *et al.*, 2005a) e adulta (Mitchell, 2001). No adulto, receptores P2Y2 e P2Y4a estão expressos na glia de Müller, enquanto que os receptores P2X2, P2X3, P2X4 e P2X7 têm sido identificados em células ganglionares (Greenwood *et al.*, 1997, Wheeler-Schilling *et al.*, 2000) e na glia de Müller de mamíferos e humanos (Brandle *et al.*, 1998, Green-wood *et al.*, 1997, Wheeler-Schilling *et al.*, 2001).

Astrócitos corticais de rato possuem receptores P2X (P2X1, P2X3, P2X4, P2X6 e P2X7) e P2Y (P2Y6, P2Y12/13) (Jacques-Silva *et al.*, 2004, Lenz *et al.*, 2000). Embora o ATP extracelular possa estimular ambas as classes de receptores purinérgicos expressos nos astrócitos, as respostas fisiológicas podem ser diferentes. Por exemplo: P2Y2/4 podem mediar efeitos mitogênicos sobre astrócitos, enquanto que receptores P2X7 geram um arresto no crescimento.

Durante o desenvolvimento da retina, o ATP age predominantemente sobre células progenitoras, antes de eleger respostas em neurônios jovens,

evocando mobilização de Ca^{2+} via a ativação de receptores P2Y. Em embriões de galinha, a resposta aos neurotransmissores purinérgicos parece ser maior no início do desenvolvimento (E3), declinando na direção de E6 e desaparecendo a partir de E8 (Pearson *et al.*, 2002, 2005a).

Segundo Pearson *et al.* (2002), Sakaki *et al.* (1996) e Sugioka *et al.* (1996), a resposta à estimulação purinérgica é máxima durante o período proliferativo quando comparado aos receptores muscarínicos, que embora sejam observados preliminarmente no desenvolvimento, é mantida através do pico da neurogênese.

Nas células progenitoras neurais adultas, Lin *et al.* (2007), demonstraram que receptores purinérgicos estão presentes nos dois sítios neurogênicos bem reconhecidos atualmente, a SVZ adjacente aos ventrículos laterais e o GD do hipocampo. Esses progenitores expressam receptores purinérgicos P2Y e mobilizam cálcio em resposta a um agonista. Sob condições patológicas, tais como inflamação, trauma e estresse, grande quantidade de nucleotídeos, incluindo o ATP, é acumulada no fluído extracelular, parte importante das respostas inflamatórias que iamgina-se controlariam, por exemplo, a ativação e função microglial (para revisão: Köles *et al.*, 2007; Potucek *et al.*, 2006).

Respostas inflamatórias mediadas por citocinas, desempenham um papel significativo na morte neuronal seguindo um insulto patológico. Estudos recentes vêm demonstrando que o ATP extracelular pode agir como um estímulo para a maturação e liberação de IL-1, via a ativação de receptores P2X7. Além disso, o ATP pode agir com o glutamato e modificar a homeostase do Ca^{2+} intracelular, tendo amplo papel nos processos de neurodegeneração (para revisão: Le Feuvre *et al.*, 2002). Contudo, esse mesmo grupo posteriormente demonstrou que a deleção de

receptores P2X7 (P2X7 *knockout mice*) não afeta a morte celular induzida por lesão isquêmica, mas sim pelo tratamento com o antagonista do receptor de IL-1 (Le Feuvre *et al.*, 2003). Além disso, Pelegrin & Surprenat (2006) demonstram que a sinalização de Panx1 de macrófagos tanto de camundongo quanto de humano é requerida para o processamento de caspase-1 e liberação de IL-1 β induzida pela ativação do receptor P2X7.

Glutamato

Evidências atuais reforçam o entendimento que a ativação de receptores purinérgicos e muscarínicos pode regular a maquinaria do ciclo celular e conseqüentemente a expansão do *pool* de progenitores durante o desenvolvimento. Contudo, neurotransmissores como GABA e glutamato têm sido demonstrados como capazes de desempenhar papéis opostos, induzindo a saída de células progenitoras do ciclo mitótico (para revisão: Martins e Pearson, 2007).

O glutamato, um neurotransmissor excitatório, é encontrado em grande quantidade na maioria das áreas do SNC (Miranda-Contreras *et al.*, 2000, Thoreson & Witkovsky, 1999) e a ativação do seu receptor tem sido demonstrado associada à regulação da proliferação celular (Schlett *et al.*, 2006). O glutamato desempenha um efeito anti-proliferativo sobre progenitores neuronais do córtex cerebral em desenvolvimento através dos receptores AMPA/Kainato (LoTurco *et al.*, 1995, Haydar *et al.*, 2000), enquanto que a ativação do receptor NMDA tem um efeito oposto sobre células progenitoras do estriado (Luk *et al.*, 2003).

A liberação de glutamato por astrócitos pode modular a atividade sináptica e participar na sinalização intracelular cerebral (Araque *et al.*, 2001; Bezzi *et al.*,

2001; Nedergaard *et al.*, 2002). Essa liberação ocorre por mecanismos dependentes e independentes de cálcio. A liberação dependente de cálcio é ativada por ligantes tais como prostaglandinas, ATP e bradicinina, tanto quanto, por direta manipulação do cálcio livre intracelular em astrócitos (Duan & Neary, 2006).

Yao *et al.* (2007), demonstraram recentemente que a ativação do receptor glutamatérgico diminui a proliferação celular no GD de ratos adultos, porém sem efeito sobre a habilidade de células imaturas se diferenciarem em neurônios ou astrócitos; Schlett *et al.* (2006) demonstraram a ação do glutamato como um modulador da neurogênese durante a fase embrionária e adulta, agindo diretamente sobre receptores ionotrópicos e/ou metabotrópicos ou influenciando outras células localizadas na região circunvizinha, produzindo moléculas que possam regular a proliferação de precursores neurais através de outros mecanismos.

Melchiorri *et al.* (2007) demonstraram que alguns subtipos funcionais de receptores de glutamato são encontrados em células-tronco/progenitoras, e regulam proliferação, diferenciação e sobrevivência dessas células. A ativação de receptores metabotrópicos (mGlu) de glutamato induzem a auto-renovação de células-tronco embrionárias. Diferentes subtipos de receptores mGlu, mGlu3 e mGlu5 em particular, são encontrados em células-tronco neurais isoladas a partir do cérebro em desenvolvimento ou a partir das regiões de neurogênese persistente no cérebro adulto.

Nácher *et al.* (2007) analisaram a expressão de subunidades NR1 e NR2B do receptor de NMDA em células precursoras que geram novos neurônios no GD do hipocampo de rato adulto, indicando que NR1 e NR2B são expressos em algumas células em proliferação. Estes receptores estão ausentes a partir de progenitores amplificadores transientes (células do tipo 2-3), mas são encontrados em células

expressando GFAP na zona subgranular do hipocampo, sugerindo a presença em células precursoras bipotenciais (tipo1).

Neurogênese como resposta à lesão no SNC adulto

Nas últimas décadas, partindo do trabalho pioneiro de Altman & Das (1965) conseguiu-se estabelecer novos parâmetros capazes de alterar o dogma de que os neurônios do sistema nervoso adulto seriam gerados apenas durante a embriogênese. Reconhecidamente, algumas células pertencentes a nichos específicos no SNC adulto, são capazes de renovação. Pesquisas nos últimos anos têm evidenciado a existência desse potencial neurogênico endógeno, que pode ser ativado como um mecanismo de reparo frente a diferentes formas de lesão e/ou inflamação (para revisão: Lie *et al.*, 2004, Taupin *et al.*, 2005).

Atualmente está bem estabelecido que o SNC possui progenitores multipotentes ou células-tronco, que persistem em regiões restritas do SNC adulto ao longo de toda vida dos mamíferos, incluindo os humanos (para revisão ver: Gage, 2000, Lie *et al.*, 2004). A neurogênese permanece como constitutiva em duas regiões principais, na camada subgranular no GD do hipocampo SVZ cortical e estriatal adjacentes dorsal e lateralmente aos ventrículos laterais. A SVZ adulta contém células-tronco (classificadas de células B) que através de progenitores intermediários (células C) geram neuroblastos (células A) que migram através da via migratória rostral (RMS) para tornarem-se interneurônios funcionais no bulbo olfatório (Doetsch *et al.*, 1999). Já no GD hipocampal novos neurônios nascem na zona subgranular, adjacente ao hilo e migram para a camada granular, onde se tornam neurônios granulares compondo circuitos hipocampais. A neurogênese no

hipocampo adulto é importante para funções cognitivas e de memória (para revisões ver: Gould *et al.*, 1999, Aimone *et al.*, 2006, Kitabake *et al.*, 2007).

Um grupo de astrócitos foi identificado como a população de células-tronco responsável pela geração de novos neurônios nessas regiões (para revisão: Götz & Huttner, 2005). São células GFAP positivas da linhagem de glia radial que localizadas nos nichos neurogênicos do hipocampo e SVZ são capazes de produzir neurônios *in vivo* (Goldman, 2003, Merkle *et al.*, 2004, Alvarez-Buylla & Lim, 2004). As células-tronco da SVZ também podem gerar oligodendrócitos *in vitro* e *in vivo*. Menn *et al.* (2006), demonstram que as células-tronco da SVZ de adultos, células tipo B, também geram um pequeno número de células progenitoras de oligodendrócitos NG2 (neurogenina 2) positivas e oligodendrócitos mielinizantes maduros.

Mais recentemente tem sido evidenciada a neurogênese em outras regiões do SNC adulto, tais como na *substância nigra* (Zhao *et al.*, 2003). Embora já tenha sido proposto que a neurogênese possa ocorrer ao longo dos ventrículos em todo o neuroeixo (Weiss *et al.*, 1996), ainda não está bem estabelecida a precisa localização dos progenitores neurais fora das duas principais regiões proliferativas, bem como sua significância funcional. Alguns trabalhos mostram a existência de células-tronco limitando o terceiro e quarto ventrículos (Zhao *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2005) e canal central da medula espinal, demonstrando que exibem características de célula-tronco neural: capacidade de renovação e multipotencialidade *in vitro* (Martens *et al.*, 2002).

No cérebro adulto, a neurogênese pode estar envolvida com processos de aprendizagem e memória, assim como, pode agir como um mecanismo compensatório frente a processos de morte neuronal. A neurogênese no adulto pode

ser modulada por mecanismos patológicos resultantes de diferentes formas de lesão. O aumento da incorporação de BrdU, seguido por proliferação e algumas vezes migração dos progenitores na SVZ para o sítio de lesão é descrito na literatura após isquemia e surtos epiléticos (Jin *et al.*, 2001, Parent *et al.*, 2002a, Parent *et al.*, 2002b). De forma similar, um aumento na proliferação dos progenitores na zona subgranular do GD é observado por curtos períodos após epilepsia, isquemia e lesões excitotóxicas e mecânicas do GD (tabela 1). A idade e o envelhecimento parecem modular negativamente a neurogênese tanto na SVZ quanto no GD (Seki & Arai, 1995, Tropepe *et al.*, 1997, Enwere *et al.*, 2004). Ambientes enriquecidos e atividade física modulam positivamente a neurogênese nestes nichos proliferativos (Brown, *et al.*, 2003).

Condições patológicas diferentes parecem modular diferencialmente a neurogênese. O estresse ambiental/social diminui a neurogênese hipocampal, enquanto que doenças neurológicas e lesões traumáticas geram um aumento na neurogênese na SVZ e no GD (Tanapat *et al.*, 1998, Zhao *et al.*, 2003, Jin *et al.*, 2004).

Os tipos de lesões que geram um aumento na neurogênese no adulto e como estas modulam diferentemente as regiões proliferativas ainda é pouco conhecido. Da mesma forma ainda não conhecemos plenamente os mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao aumento na proliferação nestes nichos germinativos. Este trabalho abordará pela primeira vez os efeitos da intoxicação por metais pesados na resposta tecidual neurogênica em nichos proliferativos do SNC adulto.

Tabela 1: Modulação da Neurogênese no Cérebro Adulto

Estímulo	Area	Modulação	Referência
Fatores Naturais			
Idade	GD	Diminui	Seki & Arai, 1995; Kuhn <i>et al.</i> , 1996 ; Tropepe <i>et al.</i> , 1997 Enwere <i>et al.</i> , 2004
	SVZ	Diminui	
	BO	Diminui	
Ciclo Estro	GD	Aumenta	Tanapat <i>et al.</i> , 1999; Smith <i>et al.</i> , 2001; Ormerod & Galea, 2003; Ormerod <i>et al.</i> , 2004
Background Genético	GD	Aumenta em linhagem (C57BL/6)	Kempermann <i>et al.</i> , 1997
Doenças			
Doenças Neurológicas	GD	Aumenta	Jin <i>et al.</i> , 2001, 2004; Curtis <i>et al.</i> , 2003; Zhao <i>et al.</i> , 2003; Parent <i>et al.</i> , 1997; Parente <i>et al.</i> , 2002
Diabetes	GD	Diminui	Jackson-Guilford <i>et al.</i> , 2000
Epilepsias Prolongadas	SVZ	Aumenta	Parent <i>et al.</i> , 2002
	BO		
	GD		
Isquemia Cerebral Focal	GD	Aumenta a proliferação, mas reduz a sobrevivência	Takasawa <i>et al.</i> , 2002
Isquemia Cerebral Global Transiente	GD	Aumenta	Toncheo & Yamashima, 2005
Isquemia-Hipoxia	GD	Síntese de DNA s/ proliferação	Kuan <i>et al.</i> , 2004
Lesão Traumática	GD	Aumenta	Liu <i>et al.</i> , 1998 Nakatomi <i>et al.</i> ; 2002
	GD	Aumenta	Dash <i>et al.</i> , 2001
Fatores Diversos			
Aprendizado de novas Tarefas	GD	Aumenta	Gould <i>et al.</i> , 1999
		Aumenta, porém diminui a sobrevivência	Olariu <i>et al.</i> , 2005
Dieta suplementar	GD	Aumenta	Lee <i>et al.</i> , 2000
Isolamento Social	GD	Diminui	Lu <i>et al.</i> , 2000
Consumo de Alcool	GD	Diminui	Nixon <i>et al.</i> , 2002
Privação de Odor	GD	Diminui	Tanapat <i>et al.</i> , 2001; Mirescu <i>et al.</i> , 2004; Coroto <i>et al.</i> , 1994
Enriquecimento de Odor	BO	Aumenta	Rocheffort <i>et al.</i> , 2002
Privação Maternal	GD	Diminui	Mirescu <i>et al.</i> , 2004
Stress	GD	Diminui	Gould <i>et al.</i> , 1998
		Suprime	Phan <i>et al.</i> , 2003
Ambiente enriquecido	GD	Aumenta	Brown <i>et al.</i> , 2003 ; Kempermann <i>et al.</i> , 1997; Lemaire <i>et al.</i> , 1999
Exercício Físico	GD	Aumenta	van Praag <i>et al.</i> , 1999; Ra <i>et al.</i> , 2002; Trejó 2001
		Previne o declínio relacionado com a idade	Kronenberg, <i>et al.</i> , 2005
		Aumenta a proliferação, mas reduz a sobrevivência	Takasawa <i>et al.</i> , 2002
		Aumenta	Toncheo & Yamashima, 2005
		Aumenta	Parent <i>et al.</i> , 2002
Intoxicação Mercurial (MeHg)	SVZ	Aumenta a Incorporação de BrdU	Ignácio <i>et al.</i> , 2005b

Modificado de Taupin (2005)

OBJETIVOS

Geral: Avaliar mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos efeitos do MeHg no sistema nervoso em desenvolvimento e na fase adulta, em relação aos progenitores neurais e a glia do cérebro.

Específicos:

- Avaliar os efeitos do MeHg sobre a população astrocitária do cérebro *in vitro* quanto a diferentes aspectos de sua fisiologia como sobrevivência celular, capacidade de captação de glutamato e comunicação celular mediada por junções comunicantes,
- Avaliar o perfil de acumulação de Hg total e MeHg sobre diferentes órgãos e sobre o tecido nervoso encefálico,
- Verificar se o efeito lesivo do MeHg sobre o SNC interfere na neurogênese na SVZ e no hipocampo,
- Avaliar o efeito do MeHg sobre a população astrocitária *in vivo* através da expressão de GFAP nas regiões neurogênicas do adulto.

Materiais e Métodos

Neste estudo utilizamos ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), entre o primeiro dia pós-natal (P0 – dia de nascimento), e o terceiro dia pós-natal (P2), além de adultos (> P60). Os animais têm reprodução controlada e são criados no biotério do Departamento de Anatomia/UFRJ com alimentação e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais estão de acordo com as diretrizes institucionais para o uso de animais experimentais.

3.1 Intoxicação Mercurial em cultura de astrócitos cerebrais *in vitro*

3.1.1- Cultura primária de astrócitos

Em condições estéreis, tratamos as lamínulas e placas a serem utilizadas para cultura de células dissociadas com poliornitina (150µg/mL-100x) por 60 minutos na incubadora (37°C, 5% CO₂) seguindo-se três lavagens com água destilada antes da utilização.

A dissecação, fora de fluxo laminar, consiste em cortar as cabeças dos animais e mergulhá-las rapidamente em álcool, passando-as a seguir para uma placa de Petri com PBS-Glicose. Imediatamente e em seguida, realizamos a dissecação no fluxo laminar, transferindo as cabeças para uma placa estéril contendo PBS-Glicose (PBS-G).

Os encéfalos foram removidos da caixa craniana, as meninges retiradas, os hemisférios separados e transferidos para uma placa contendo PBS-Glicose.

A dissociação das células é mecânica e consiste em picotar o tecido dos dois hemisférios em pedaços bem pequenos, com a tesoura oftálmica; os pedaços são recolhidos por uma pipeta Pasteur com ponta arredondada, de modo a não destruir as células durante a transferência para um tubo de centrifuga. Dentro do tubo, utilizando pipeta Pasteur, aspira-se e se solta o tecido levemente (aproximadamente por 12 vezes).

Deixa-se decantar as partes dissociadas e aspira-se o PBS turvo passando-o para um novo tubo de centrifuga; As células em solução foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser vertido em descarte, o restante deve receber de 1 a 5 ml de meio de cultura e ser novamente re-suspendido suavemente. Todas as pipetas Pasteur utilizadas apresentavam pontas arredondadas. O tecido deve ser ressuspensão em meio com ajuda de pipeta Pasteur, delicadamente.

Depois de ressuspender o *pellet*, retirar 10 μ L e aplicar sobre a câmara de Neubauer, que já deve estar montada com a lamínula. A gota se espalha por capilaridade; Deve-se contar as células presentes em 4 campos da câmara somando-se, por exemplo:

4 campos=44 células x 5=220 (total de cels. na câmara)

$220 \times 10^4 = 2,2 \times 10^6 / \text{mL}$

$2,2 \times 10^6 \times 5 = 11,0 \times 10^6$ células/5mL (Rendimento)

Imediatamente após a contagem, plaqueia-se as células, aproximadamente 10^6 células por placa de cultura de 35 mm, mantendo-as na incubadora até que a confluência da monocamada seja atingida. Uma cultura com astrócitos em confluência é atingida entre 8 e 10 dias.

3.1.2- Técnica de carregamento de corante por “Scrape Loading”

Para avaliação funcional da comunicação juncional mediada por junções comunicantes, empregamos a técnica de “Scrape loading”, que consiste em romper temporariamente as células para a captação de corante através de um arranhão produzido na placa de cultura o que permite observar a propagação transcelular do corante. O corante utilizado, de baixo peso molecular, passa através das junções comunicantes e, portanto, esta metodologia consiste numa avaliação da extensão do acoplamento das células em cultura (el-Fouly *et al.*, 1987). Para isto, o meio é retirado da cultura que é então banhada com solução de Gey's/Glicose. Em seguida banha-se a cultura com a solução de PBS/Glicose+EGTA (quelante de cálcio), por 1 minuto e imediatamente após, aplica-se à cultura o corante de 443 Da, permeante às junções comunicantes, o fluorescente *Lucifer Yellow* (0,25%, Molecular Probes), também por apenas 1 minuto. Na presença do corante *Lucifer Yellow* deve-se fazer três cortes na placa, com o auxílio do microbisturi, permitindo que o referido corante entre em contato com todas as células da monocamada. Dessa forma, as células que tiveram suas membranas rompidas são preenchidas e a partir destas as outras são permeadas por meio de junções comunicantes. Após este procedimento, as culturas são banhadas sucessivamente com a solução de Gey's/Glicose, durante 7 a 8 minutos até que não se perceba mais nenhum tom amarelado. Como controle para a passagem de corante por vias extracelulares, utilizamos simultaneamente na mesma cultura o corante rodamina dextran (0,30%, Molecular Probes) cujo peso molecular é de 3000Da caracterizando-se, portanto, como impermeante às junções comunicantes. Por fim, no caso dos corantes possíveis de fixação, recobre-se a cultura com uma solução de paraformaldeído (PF) 4%, durante 8 minutos. Passado

este tempo retira-se o PF e dá-se dois a três banhos com PBS/Glicose e depois água, procedendo a captura das imagens ao microscópio.

Corantes:

Corantes permeantes fixados:

Lucifer Yellow - LY 0,25% 443 Da, fluorocromo carregado negativamente, que fluoresce nos limites de absorção/emissão de UV FITC.

Sulforhodamine B - SR-B 580 Da, fluorocromo carregado positivamente, fluoresce nos limites de absorção/emissão de UV RITC.

Corante permeante não-fixado: Brometo de Etídeo

Corante Não-permeante Fixado: Rhodamine Dextran - RD 0,30% 3,000 Da.

3.1.3- Procedimentos para tratamento das culturas com MeHg

Em nosso protocolo de tratamento de monocamadas astrocíticas com MeHg, uma vez atingido a confluência das culturas (entre 8 a 10 dias), o meio foi substituído por novo meio contendo MeHg, em doses e tempos de incubação definidos com base em estudos anteriores (Schirmacher *et al.*, 1998, Yoshida *et al.*, 1998). Cada uma das doses e tempos utilizados neste estudo segue relacionada abaixo: 500nM MeHg/24 horas, 1µM MeHg /24 horas, 10 µM MeHg /10 minutos, 10 µM MeHg/30 minutos, 30 µM MeHg/10 minutos, 30 µM MeHg/30 minutos, 100 µM MeHg/10 minutos, 100 µM MeHg/30 minutos

O cloreto de metilmercúrio (H_3CHgCl , 98% de purificação, Sigma) foi dissolvido em água MiliQ na concentração de 0.1M. A solução estoque foi preparada sempre na semana do experimento e o MeHg foi diluído no meio de cultura em uma das concentrações finais aplicadas em nosso protocolo: 500nM, 1µM, 10µM, 30µM e 100µM.

3.1.4- Ensaios de permeabilização de membrana

Conforme nosso protocolo de intoxicação *in vitro*, as culturas foram incubadas em diferentes concentrações de MeHg por 10 ou 30 minutos previamente ao ensaio de permeabilização. As culturas foram mantidas em solução de Gey's por 5 minutos, seguido por 1 minuto na solução de PBS/EGTA/ Ca^{+2} (solução livre de cálcio) na presença dos fluorocromos, exatamente como descrito para os ensaios de carregamento de corante, combinado ou não com o procedimento de *scrape loading*. Após 5 minutos de lavagem em solução de Gey e fixação em PF, as monocamadas

de astrócitos foram analisadas ao microscópio de fluorescência invertido Nikon TE-300 associado à câmera digital (CoolSnap). Como permeantes de hemicanais de conexina ou poros P2X7 foram empregados principalmente o fluorocromo *Lucifer Yellow*, mas também utilizamos Brometo de Etídeo (EtBr) e SR-B.

Para que pudéssemos identificar as possíveis vias de passagem de corante utilizadas pelos astrócitos tanto na situação controle quanto na intoxicação pelo MeHg, utilizamos os bloqueadores de comunicação juncional clássicos, carbenoxolone (CBX, 100 μ M) ácido 18 α -glicirretínico (GA, 100 μ M) ácido glicirrízico (GZA, 100 μ M – análogo não funcional). Utilizamos também, um bloqueador específico de hemicanais, cloreto de lantânio (LaCl₃, 100 μ M) além dos bloqueadores de poros P2X7, ATP oxidizado (oATP, 100 μ M), *Brilliant Blue G* (BBG, 100 μ M), cloreto de zinco (ZnCl₂, 100 μ M) ou cloreto de magnésio (MgCl₂, 5mM). Foram testados ainda os efeitos do MeHg sobre a permeabilização de membrana na condição de CaCl₂ fisiológico (1.5 mM em solução Gey's) e para tanto, neste caso, os fluorocromos foram diluídos em solução Gey, em vez de PBS/EGTA/Ca⁺².

3.1.5- Avaliação do carregamento de corante

Para avaliação dos níveis de fluorescência do corante *Lucifer Yellow*, o tempo de exposição à luz foi padronizado para 12 segundos em todos os ensaios realizados. Os níveis de fluorescência de *Lucifer Yellow* foram avaliados na região da onda de espalhamento de corante através de três métodos: 1) mapeamento dos níveis de fluorescência por pixel em relação à distância da onda, a partir da extremidade do corte. A intensidade de fluorescência foi analisada ao longo de quatro linhas arbitrárias de 600 μ m (limite de extensão de células fluorescentes

observadas) de comprimento, distribuídas ortogonalmente à linha do corte e espaçada por 200 μm (Figura 5). Utilizamos para análise o programa *Image Java software* (National Institute of Health - NIH Image J). Os níveis de fluorescência de cada pixel ao longo das linhas foram uma função de distância (calculada a partir da conversão de pixels em micrômetros) a partir da borda do corte. 2) O segundo método envolvia a delimitação da área fluorescente e obtinha-se a fluorescência total da área coberta.

A análise dos níveis de fluorescência de corante nos protocolos de permeabilização de membrana foi executada através da soma da fluorescência emitida por pixels individuais. Os valores foram representados como a média \pm desvio padrão, usando o teste estatístico ANOVA para comparar as diferentes condições experimentais.

3.1.6- Medidas de Captação de [^3H]D-Aspartato

Uma vez atingida a confluência, as monocamadas astrocíticas foram submetidas ao protocolo para avaliar os efeitos do MeHg sobre a de captação de [^3H]D-Aspartato pelos astrócitos, conforme segue:

A captação de [^3H]D-Aspartato foi quantificada em culturas de astrócitos, preparadas a partir de hemisférios cerebrais totais de ratos pós-natos (P2), contendo aproximadamente 10^6 células por placa. O meio de cultura (DMEM-10% FCS) foi removido e as culturas foram lavadas três vezes com 2 ml de solução modificada de Hanks (em mM: NaCl 128, KCl 4, CaCl_2 3, MgCl_2 1, HEPES 20, pH7,4). A incorporação foi iniciada adicionando 1 ml de solução de Hank's contendo 0.25 μCi de [^3H] D aspartato (40 Ci/mmol) por placa, prosseguindo por 90 minutos. O MeHg e

demais fármacos inibidores de junções comunicantes, hemicanais e poros P2X7 foram adicionados às culturas 30 minutos antes do fim da captação; enquanto que as culturas controle permaneceram em solução Hank's com o traçador radioativo. As células em cultura foram lavadas por 6x com solução de Hank's gelado e adicionadas com H₂O Miliq, e então raspadas, centrifugadas e o sobrenadante transferido para um *ependorf*. Em seguida, alíquotas foram coletadas para quantificação por cintilação. A radioatividade foi mensurada em um cintilador líquido Packard 1600TR.

3.1.7- Análise de Dano Celular induzido pelo MeHg

Para avaliarmos a ocorrência de estresse ou morte celular nas culturas tratadas com MeHg em relação às culturas controle, utilizamos o método de marcação para laranja de acridina (tradução do inglês *acridine orange*). Este é um corante com afinidade por ácidos nucleicos, que detecta dano no nucleotídeo. Além disso é um corante sensível ao pH. Quando interage com o DNA em estado normal o AO fluoresce verde. Quando o DNA começa a mudar de conformação ou for quebrado por caspases, típico da degradação de DNA em células apoptóticas, ele fluoresce vermelho. Outra possibilidade também do AO fluorescer vermelho é quando ele interage com DNA de fita simples (p.ex., quando degradado por caspases) ou com RNA (Wolf & Aronson, 1961; Elliott & Philip, 1963, Söderström *et al.*, 1977). Deste modo, além de fluorescer no núcleo, seu sítio de ligação com o DNA, em situação de acidose de vesículas ou de compartimentos celulares, também é capaz de fluorescer vermelho no citoplasma se ligando ao DNA de fita simples ou

ao RNA. Assim, células viáveis têm seus núcleos fluorescendo em tom de verde ao passo que células em sofrimento ou em processo morte celular têm seus núcleos e/ou citoplasmas fluorescendo vermelho. Para este procedimento pesa-se 500µg do laranja de acridina e dilui-se em 1 mL de meio de cultura sem soro (350µL de solução Hank's, 640µL de DMEM, 10µL de glicose). Desta solução estoque, dilui-se 1 µL para cada 100µL de meio de cultura, alcançando a concentração final de 5µg/mL. O tempo de exposição é de 20 minutos, mantendo-se a placa de cultura na incubadora.

3.1.8- Imuno-citoquímica

As culturas foram fixadas com PF a 4% em Tampão fosfato salina pH 7.4 (PBS) por 15 minutos. Uma vez fixadas, as culturas foram imersas em solução bloqueadora de sítios inespecíficos à reação imuno-citoquímica do anticorpo primário utilizando NGS a 5% e detergente Triton X-100 a 0.1% em PBS durante 2 horas. As culturas foram então incubadas durante a noite com o anticorpo primário (anti-Cx43 monoclonal, Zymed, 1:100) diluído em solução bloqueadora a 4°C. Utilizamos como anticorpo secundário o anti-camundongo conjugado a Cy-3 feito em cabra (Molecular Probes) diluído em PBS, 1:800. Os núcleos foram corados com DAPI (4,6 – diamidino – 2 – fenilindole, dihidroxicloride). As reações imuno-citoquímicas foram analisadas ao microscópio invertido de fluorescência (Nikon TE-300) e microscópio confocal (Zeiss LSM 510 Meta - FIOCRUZ). Para os anticorpos biotinilados (cabra anti-camundongo, Molecular Probes) empregamos o “kit” ABC (Molecular Probes) que revela a presença da biotina pela ligação com moléculas de avidina ligadas à peroxidase. A reação de revelação da peroxidase foi feita utilizando-se a diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, na

presença de H₂O₂ (0.3% v/v, Sigma) com monitoramento ao microscópio para a interrupção da reação.

Nos ensaios com peptídeos miméticos para as alças extracelulares de Cx43, P26 e P27 (300 µg/ml; NeoMPS, Strasbourg, France), o protocolo consistiu em uma pré-incubação destes peptídeos durante os 10 min finais do tempo de incubação com meio contendo MeHg ou durante 10 min, temperatura ambiente, antes do *scrape loading*).

3.2 Intoxicação Mercurial *in vivo*

3.2.1- Animais e Procedimentos de Intoxicação

Ratos Wistar de dois meses de idade foram intoxicados por administração oral de uma solução de MeHg/L-cisteína. Para tanto, preparamos uma solução de 0,150g de Cloreto de Metilmercúrio (MeHg; 98% de purificação, Sigma) e uma quantidade equimolar de 0,75g de L-cisteína ($C_3H_7NO_2S$ 98% de purificação, Sigma), dissolvidos em 5 mL de água miliQ estéril e mantidos em vidro âmbar vedado. Os animais foram intoxicados utilizando uma sonda naso-gástrica (sonda descartável siliconizada nº 6), de forma que a solução (1,5 mg/ml, 5 mg/Kg) fosse depositada precisamente no estômago do animal.

Foram estabelecidos dois grupos, o grupo FALSO-TRATADO doravante chamado de grupo controle, que recebeu o mesmo procedimento da colocação da sonda, porém sem o tratamento com o metal e o grupo TRATADO. Tanto o grupo controle quanto o grupo TRATADO foram subdivididos em outros cinco subgrupos, segundo o tempo pós a intoxicação aguda com MeHg e sobrevida de BrdU, explicitado em nosso desenho experimental (Figura 3). Todos os animais (controle e tratados) permaneceram sempre em uma capela durante todo o período de experimento, com água e comida *ad libitum*, sendo respeitado os ciclos de 12 horas claro/escuro.

3.2.2- Eliminação dos excrementos e descarte

Todos os excrementos, fezes e urina depositados sobre a maravalha nas gaiolas dos animais submetidos ao tratamento agudo com MeHg, foram

devidamente tratados com solução de Cloreto de Bromo (BrCl), protocolo em anexo, a priori do descarte em sacos plásticos identificados como material tratado com MeHg/BrCl, segundo os procedimentos de descarte do Laboratório de Radioisótopos da IBCCF/UFRJ.

Os restos dos animais tratados com MeHg foram descartados congelados e acondicionados em sacos plásticos identificados como material orgânico/MeHg, seguindo os procedimentos de descarte do Laboratório de Radioisótopos da IBCCF/UFRJ.

3.2.3- Perfusão/crioproteção/criosecção

Todos os animais (n=5 por grupo) foram perfundidos transcárdiacamente com solução salina a 10% e PF a 4% em tampão fosfato (0,1M, pH7,4). Cada grupo foi perfundido segundo nosso desenho experimental (Figura 3), em intervalos de 24 horas, 7 dias, 15 dias ou 21 dias após a última injeção de BrdU.

Após a perfusão com PF 4% os encéfalos foram removidos, crioprotégidos utilizando soluções crescentes de sacarose (10, 20, 30%) e crioseccionados coronalmente à 12 μ m para a obtenção de cortes seriados incluindo a SVZ e o GD (Figura 4). Os cortes seccionados foram recolhidos diretamente sobre lâminas histológicas, sendo que o primeiro, o segundo e o terceiro cortes eram colocados em lâminas diferentes e assim sucessivamente.

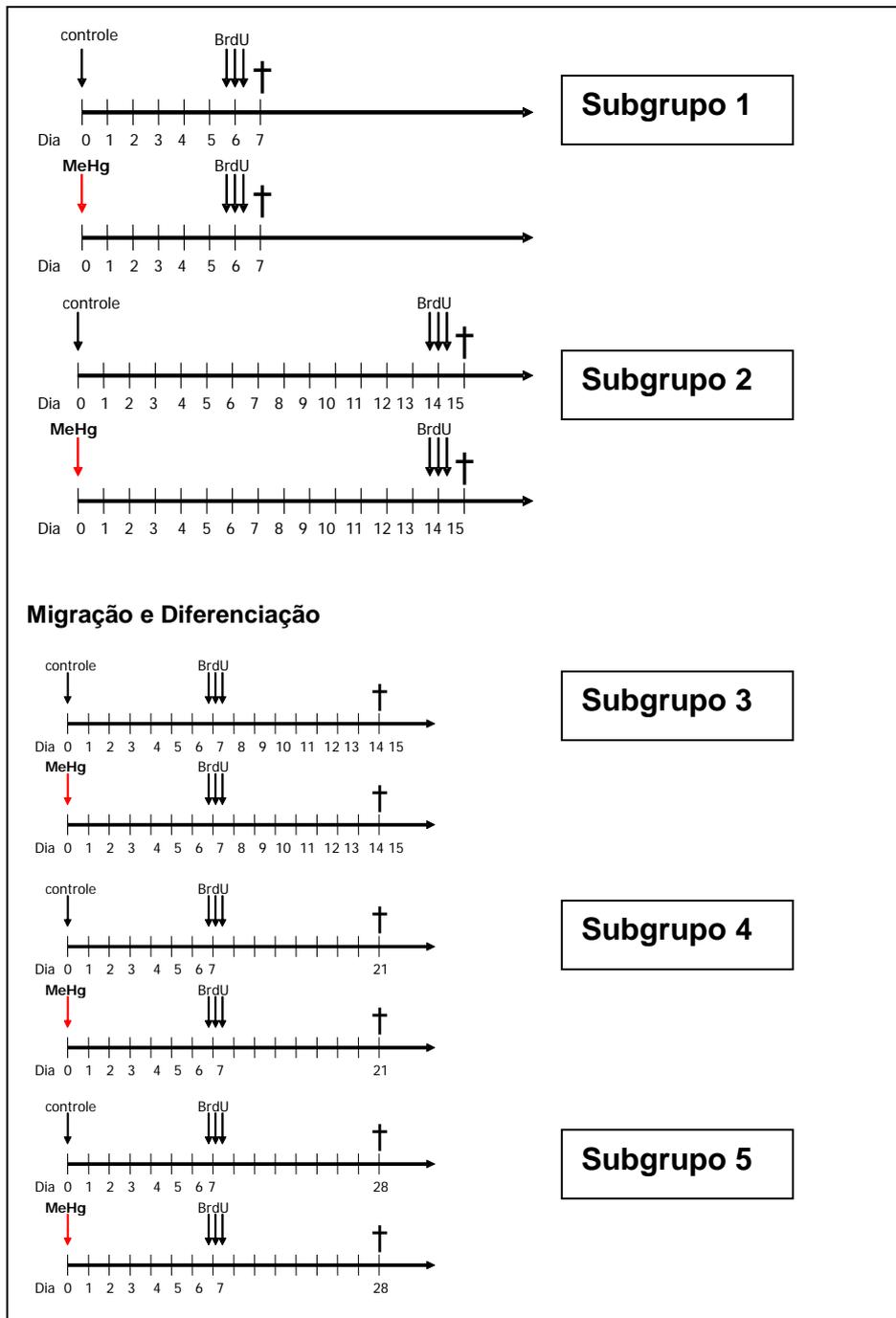


Figura 3: Desenho experimental: Seta vermelha indica a administração nasogátrica de MeHg. Setas pretas apontam datas de injeção intraperitoneal de BrdU. A cruz indica a data de sacrifício. Abreviaturas: BrdU, Bromodeoxiuridina, MeHg, metilmercúrio.

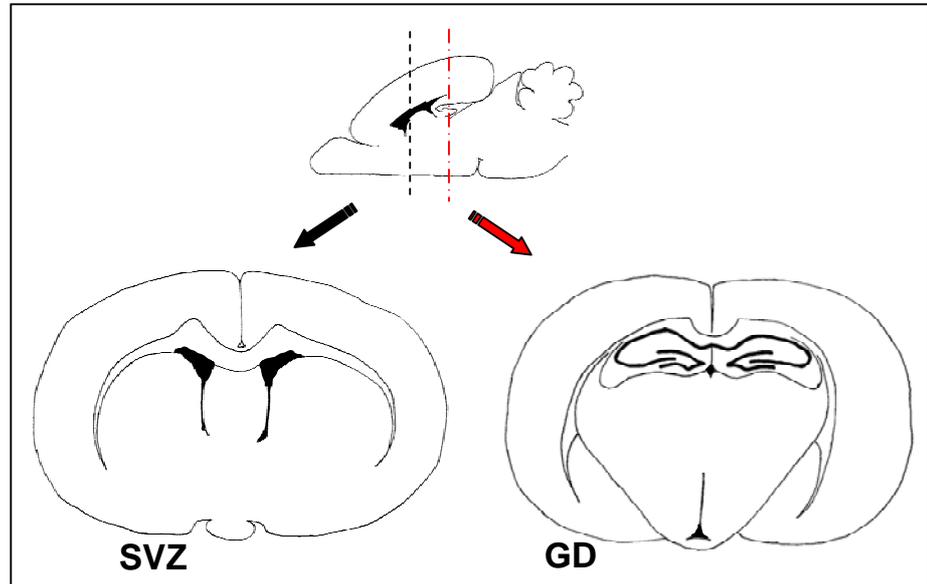


Figura 4 - Desenho esquemático de corte sagital do cérebro de rato adulto e cortes coronais indicando as regiões cerebrais analisadas: Zona Subventricular (SVZ) de 1.20 mm a -0.40 mm Bregma e Giro Dentado do hipocampo (GD) de 1.80mm a 4.80mm Bregma.

3.2.4- Procedimentos para determinação de mercúrio total e MeHg

Antes da perfusão com o fixador os tecidos a serem quantificados com relação a seus índices de Hg foram retirados dos animais sedados com éter. As concentrações de mercúrio total (THg) foram determinadas através da técnica de absorção atômica, FIMS (Perkin-Elmer) no sangue, cérebro, cerebelo, fígado e rins (controle) 7 ou 15 dias após a contaminação. Amostras de tecido foram colhidas do cérebro, hipocampo, cerebelo, fígado e rins e quantificadas para mercúrio orgânico e MeHg através da técnica de cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC-ECD, Shimadzu 14B), conforme o que se segue:

3.2.4.1- Metodologia para Quantificação de Hg Total

As amostras dos tecidos analisados (0,02g) foram submetidas à digestão ácida com 3 mL $H_2SO_4:HNO_3$ (1:1v/v) (Merck p.a.) e 1 mL de H_2O_2 concentrado (Merck p.a.) em um tubo de centrifuga de 5 mL e mantidos em banho Maria à 60°C, por 45 min. Após este período adicionou-se 5 mL da solução $KMnO_4$ a 5% (Merck p.a.) e a digestão prosseguiu pernoite. As concentrações de Hg total em solução de digestão ácida foram quantificadas no dia seguinte através do sistema *Flow Injection Mercury System*, Perkin-Elmer (FIMS–system), segundo Bastos *et al.* (1998).

3.2.4.2- Metodologia para quantificação de MeHg

Para as análises de MeHg foram empregados os métodos analíticos desenvolvidos por Akagi e Nishimura (1991) no *National Institute for Minamata*

Disease (NIMD) do Japão adaptadas no Laboratório de Radioisótopos Eduardo Penna Franca pela Dra. Helena do Amaral Kehrig (Kehrig & Malm, 1999). São métodos complexos, com alta sensibilidade, baseadas em um pré-tratamento com uma combinação de extrações com solventes e compostos orgânicos seguidas pela dosagem do MeHg por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (CG-DCE). Este pré-tratamento é de importância fundamental para que se obtenham extratos limpos, sem contaminantes e uma alta eficiência nas etapas de extração com ditizona. A digestão das amostras biológicas com uma solução alcoólica de hidróxido de potássio apresenta a vantagem de não formar emulsão e favorecer a total quebra das ligações das proteínas da matriz, formando uma solução muito límpida, homogênea e uniforme. Antes de se extrair o MeHg do meio com uma solução de ditizona em tolueno, deve-se adicionar ao mesmo uma solução do sal ácido tetra sódico etilenodiamina tetraacético com a finalidade de se prevenir o consumo excessivo da ditizona por algum outro íon metálico existente no meio.

As soluções de MeHg em ditizona tolueno sofrem, então, um processo de purificação, no qual se emprega uma solução alcalina alcoólica de sulfeto de sódio. A solução purificada de ditizonato de MeHg quando submetida ao cromatógrafo a gás, é convertida em cloreto de MeHg, onde o MeHg é identificado e quantificado através de um detector de captura de elétrons.

3.2.5- Delineamento Experimental

3.2.5.1- Proliferação Celular

Para avaliar os efeitos da intoxicação pelo MeHg sobre a proliferação nos sítios neurogênicos do rato adulto, tanto os animais intoxicados como os controle receberam injeções intraperitoniais de BrdU (Sigma, St. Louis, MO). Bromodeoxyuridine (5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU) é um nucleosídeo sintético, análogo da timidina, que incorpora-se ao DNA, durante a fase S do ciclo celular. Preparamos uma solução de 10mg/ml de BrdU dissolvida em NaOH 0,007N e injetamos um volume equivalente a 100mg/Kg, 6 e 14 dias após a intoxicação. Cada animal recebeu três injeções com intervalo de quatro horas e tiveram uma sobrevida de 24 horas, após a última injeção (Figura 3).

3.2.5.2- Determinação dos fenótipos celulares

Para identificarmos as células BrdU positivas, utilizamos a técnica de imuno-histoquímica. Associada à identificação de células proliferativas, utilizamos diversos outros marcadores de identidade neuronal e glial.

Anticorpos Primários: Para detecção de células em divisão: anti-BrdU (anticorpo monoclonal de camundongo, 1:3; Amersham), anti-PH3 (anticorpo policlonal de coelho, 1:200). Para detecção de células gliais do tipo astrócito: anti-GFAP (policlonal feito em coelho, 1:400; DAKO). Para a detecção de células

migratórias, anti-DCX (do inglês *doublecortin*, anticorpo policlonal feito em coelho 1:50; Santa Cruz). Para detecção de neurônios: anti-NeuN (monoclonal de camundongo, 1:200; Chemicon), anti-classe III β Tubulina (policlonal de coelho, 1:100). Para detecção de progenitores: anti-Nestina (monoclonal de camundongo, 1:400; Pharmingen). Para detecção de microglia: anti-CD-11b marcado com FITC (monoclonal de rato, 1:200; Pharmingen), anti-CD45 marcado com PE-Cy5 (monoclonal de rato, 1:200; Pharmingen) (resultados não mostrados).

Anticorpos Secundários: Alexa Fluor 488 (cabra anti-coelho IgG (H+L), 1:400; Molecular Probes), Alexa Fluor 488 (cabra anti-camundongo IgG (H+L), 1:400; Molecular Probes), Cy3 (cabra anti-camundongo IgG (H+L), 1:800; Jackson), Cy3 (cabra anti-coelho IgG (H+L), 1:800; Jackson).

Imuno-histoquímica:

Os cortes selecionados para reação imuno-histoquímica foram descongelados à temperatura ambiente, prosseguindo com a lavagem dos mesmos em água destilada por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, e apenas no caso de imuno-histoquímica para BrdU, os cortes são tratados previamente com HCl 2N a 37^o C por 30 minutos, afim de que se possa desnaturar o DNA, seguido pelo, tratamento com Tampão Borato 0,1M (pH 8,3), por 10 minutos retornando à temperatura ambiente. Tanto para a reação de BrdU assim como para as demais segue-se com um tratamento para permeabilização das membranas celulares, usando Triton 0,3%, por três vezes de 5 minutos; Pré-incuba-se os cortes com soro normal de cabra a 10% durante 30 minutos; incuba-se os cortes com anti-BrdU (nas

concentrações adequadas, em solução de NGS a 10% (PBS triton X100, 0,3%) pernoite; no dia seguinte, lava-se o material em PBS (pH7,4), três vezes por 5 minutos e incuba-se com o anticorpo secundário apropriado diluído em PBS por 2 horas à temperatura ambiente; lava-se novamente com PBS por três vezes, contracora-se com um marcador nuclear (0,3% DAPI por 3 minutos) e monta-se as lâminas com meio de montagem (N-Propil Galato, por exemplo).

As reações imuno-histoquímicas foram analisadas por microscópio óptico de fluorescência (Nikon) e as imagens digitalizadas utilizando a Câmera CoolSnap Photometrics (MediaCybernetics). Algumas imagens também foram analisadas através de microscópio confocal (Zeiss LSM 510 Meta - FIOCRUZ).

3.2.5.3- **Quantificação**

a-) Proliferação: Para quantificar a proliferação, os cortes foram imunoprocessados para BrdU e todos os núcleos fluorescentes foram contados ao longo de toda parede dorso-lateral dos ventrículos laterais e na extensão do GD de cada corte contabilizado. Estes foram contados a cada cinco cortes de 12 μ m dentro do intervalo rostro-caudal cujas estruturas usadas como referências caracterizam os níveis de bregma do Atlas Estereotáxico de 1.20mm a -0.40mm Bregma para a SVZ e 1.80mm a 4.80mm de Bregma para o GD do hipocampo. Para a identificação das estruturas presentes nos níveis escolhidos analisamos cortes coronais subseqüentes aos selecionados para imuno-histoquímica para BrdU. Esses cortes foram corados pela técnica de Nissl com o corante Cresil violeta, permitindo a visualização da citoarquitetonia cerebral. Comparamos então, as estruturas presentes nos referidos

níveis estereotáticos desta forma estabelecendo nossos níveis de contagem. Tanto na SVZ, quanto no hipocampo foram sempre coletados 4 cortes para cada lâmina, sendo 1 corte recolhido e 2 descartados. Este procedimento permitiu que a quantificação fosse feita em 20 cortes por nível de bregma, totalizando o número de 100 cortes analisados para a SVZ ou GD total de cada animal.

b-) Mitose: Para identificar as células que completaram o ciclo celular na SVZ, cortes foram imunoprocessados para BrdU e PH3 (fosfohistona), um marcador da fase M do ciclo celular, sendo contados todos os núcleos fluorescentes na parede dorsolateral dos ventrículos laterais de cada corte contabilizado.

c-) Gliose reativa: Avaliamos a gliose reativa subjacente à intoxicação mercurial quantificando a expressão de GFAP revelada por imuno-histoquímica. Para isso, utilizamos o programa *Image-Pro Express* que permite quantificar a intensidade de fluorescência na imagem digitalizada. Delimitamos no hipocampo o hilo, toda área compreendida subjacente à primeira camada de células do GD, local de distribuição das células GFAP positivas. Posteriormente os valores foram analisados pelo programa estatístico Prisma. Todas as reações imuno-histoquímicas dos animais controle e tratados para quantificação de fluorescência foram realizadas juntas.

d-) Células BrdU positivas no bulbo olfatório: Analisamos as lâminas ao microscópio NIKON e capturamos as imagens digitalizadas dos cortes imunoprocessados para BrdU com a objetiva de 40X. Posteriormente reconstruímos e digitalizamos cada uma das imagens, estabelecemos uma área para quantificação dos núcleos BrdU positivos. Esta área compreende um retângulo de 600µm x 300µm delimitada no

bulbo olfatório, localizada a partir da via migratória rostral (a RMS) até o limite da camada glomerular, conforme figura 30.

e-) Análise Estatística: As análises estatísticas foram feitas usando o programa *PRISMA* versão 6.0, realizando os seguintes testes: Teste t não pareado e ANOVA. As análises de variância foram feitas por ANOVA seguida de teste posteriori (Tukey) comparando o número de células BrdU⁺ entre cada condição de intoxicação e a condição controle. Os valores são apresentados como médias \pm desvio padrão.

Resultados

4.1 Intoxicação Mercurial *in vitro* e suas conseqüências sobre a rede astrocitária no cérebro pós-natal: comunicação celular mediada por junções comunicantes e permeabilização de membrana

A partir dos dois únicos artigos disponíveis na literatura, especificamente sobre os efeitos do MeHg interferindo sobre a comunicação intercelular tipo junções comunicantes em células ósseas e renais (Schirmacher *et al.*, 1998, Yoshida *et al.*, 1998), nós levantamos a hipótese de que efeito similar pudesse ser observado quando astrócitos cerebrais mantidos em cultura fossem expostos ao MeHg.

4.1.1- Níveis moderados de MeHg levam a inibição do carregamento de corante permeante à comunicação celular mediada por junção comunicante

Nossos experimentos com fluorocromos em modelos de carregamento/espalhamento de corante (*scrape loading*), com doses baixas de intoxicação mercurial, 500nM, 1µM ou 10µM durante no máximo 10 minutos de incubação, demonstraram que a comunicação celular mediada por junções comunicantes não é afetada. Tanto qualitativa quanto quantitativamente não detectamos nenhum efeito mensurável do MeHg sobre o acoplamento celular. Desde o tratamento com 500nM ou 1 µM de MeHg por 24 horas de incubação, quanto no protocolo de 10µM de MeHg por 10 minutos de incubação, o corante *Lucifer Yellow* difunde através da monocamada astrocitária, exibindo o mesmo padrão característico de onda de acoplamento juncional observado na situação controle (Figura 5). Também no mesmo padrão do controle, as células permeabilizadas com

o corante Rodamina Dextran foram observadas somente nas bordas do corte. Pouquíssimas células RD positivas foram observadas fora da região de corte.

Confirmamos nos ensaios de carregamento e espalhamento de corante, o envolvimento de junções comunicantes, através do bloqueio positivo com os bloqueadores juncionais reconhecidos, GA e CBX. Ambos os bloqueadores suprimem o padrão de onda de espalhamento de corante e a fluorescência do *Lucifer Yellow* se restringe às células diretamente carregadas nas bordas do corte, no mesmo padrão da disposição das células RD positivas.

Aumentamos gradativamente a concentração de MeHg assim como os tempos de incubação. Analisando as culturas tratadas com 10 μ M MeHg incubados por 30 minutos ou 30 μ M MeHg por 10 minutos de incubação detectamos uma diminuição significativa nos níveis de fluorescência do corante, compatível com os níveis de bloqueio juncional efetivado por CBX (Figura 6). O efeito sobre a comunicação juncional apresentou-se como uma resposta dependente da concentração de MeHg, porém mantendo o padrão de onda de espalhamento de corante.

Sabendo que os efeitos do MeHg são dependentes de concentração e de tempo, ampliamos nosso protocolo de intoxicação, na concentração de 30 μ M, incubados por 30 minutos. O conjunto de experimentos (n=10) revelou que as culturas incubadas por 30 minutos na presença de MeHg à 30 μ M leva à permeabilização extensiva da membrana em monocamadas, envolvendo praticamente toda a rede astrocitária (Figura 7).

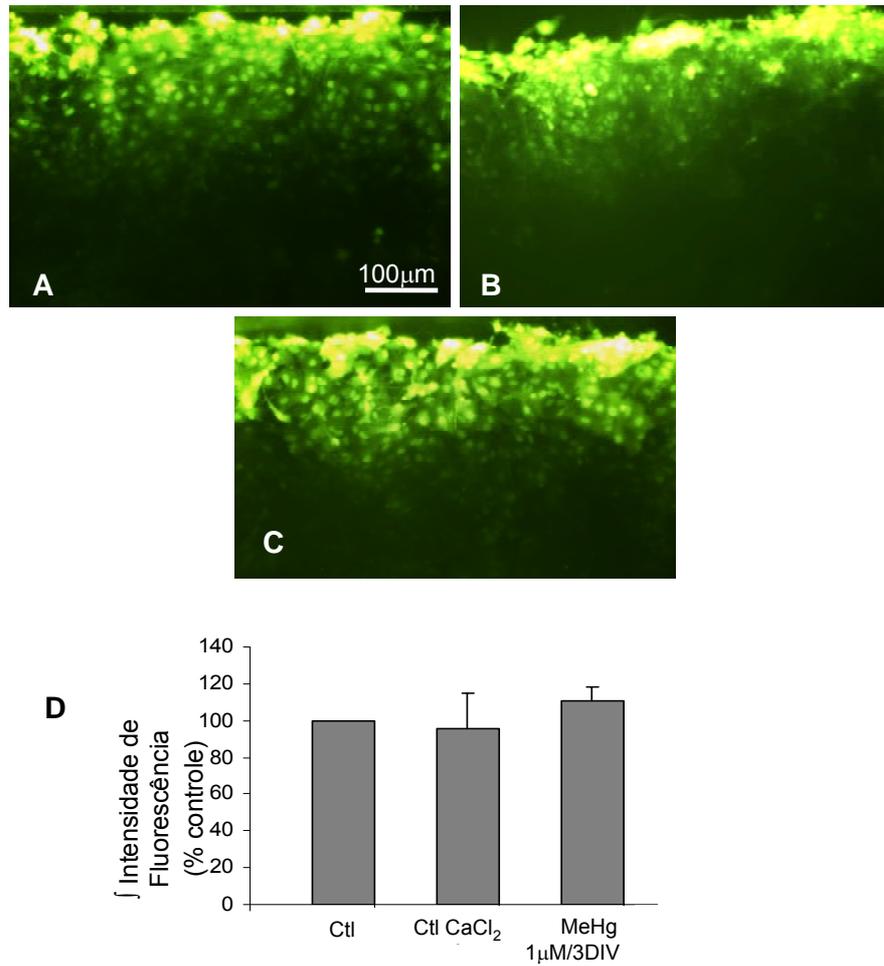


Figura 5- A Comunicação Juncional avaliada pela passagem de corante *Lucifer Yellow* não é afetada por baixa exposição ao MeHg. Controle (A), 1 μM MeHg incubado por 3 dias (B), 10 μM MeHg incubado por 10 minutos (C). Quantificação da intensidade de fluorescência das culturas tratadas com MeHg não apresenta diferença significativa quando comparado as porcentagens controle (D). Barras representam as médias ± dp. n=5

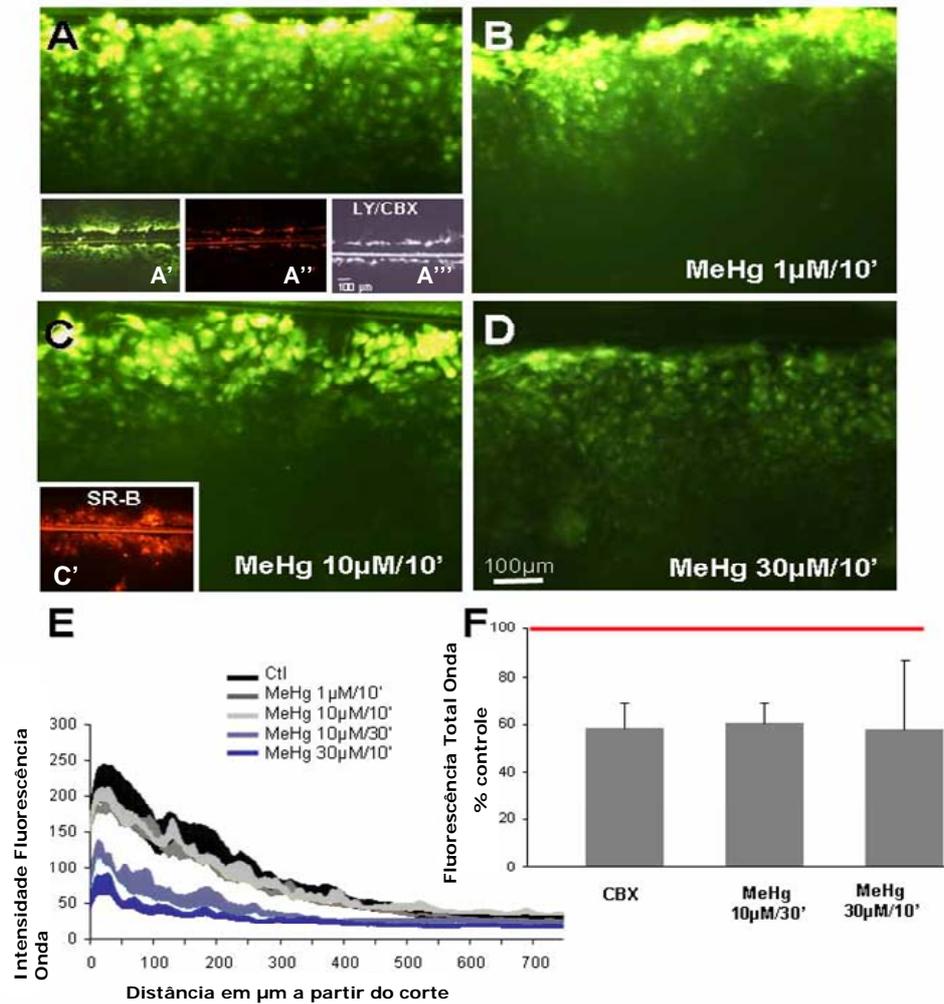


Figura 6- A Comunicação Juncional avaliada pela passagem de corante *Lucifer Yellow* é inibida por moderada exposição ao MeHg. Controle (A), 1μM MeHg incubado por 10 minutos (B), 10μM MeHg incubado por 10 minutos (C). A', imagem de LY nas margens do corte no padrão de espalhamento do corante em onda. A'', imagem de RD na mesma região de A'. A''', imagem de LY + CBX. C', imagem da fluorescência de SR-B nas margens do corte. 30μM MeHg incubado por 10 minutos (D). A quantificação da porcentagem da intensidade de fluorescência das culturas tratadas com 10μM MeHg/30 minutos ou 30μM MeHg/10 minutos apresenta diminuição na intensidade quando comparado as porcentagens controle (E). O tratamento com carbenoxolone (CBX), bloqueador juncional, apresenta valores similares quando comparado aos valores obtidos no tratamento com MeHg (F). Barras representam as médias ± dp. n=5

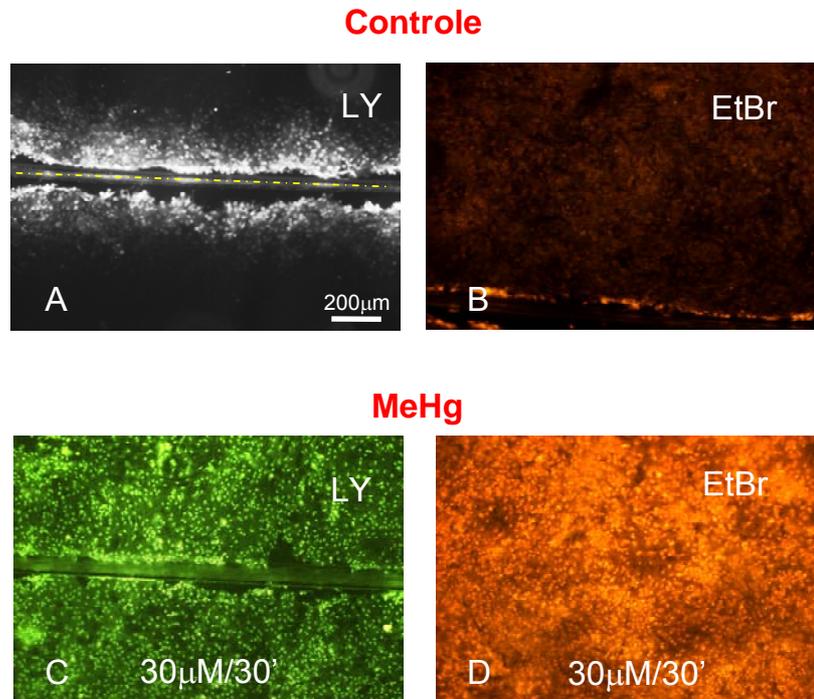
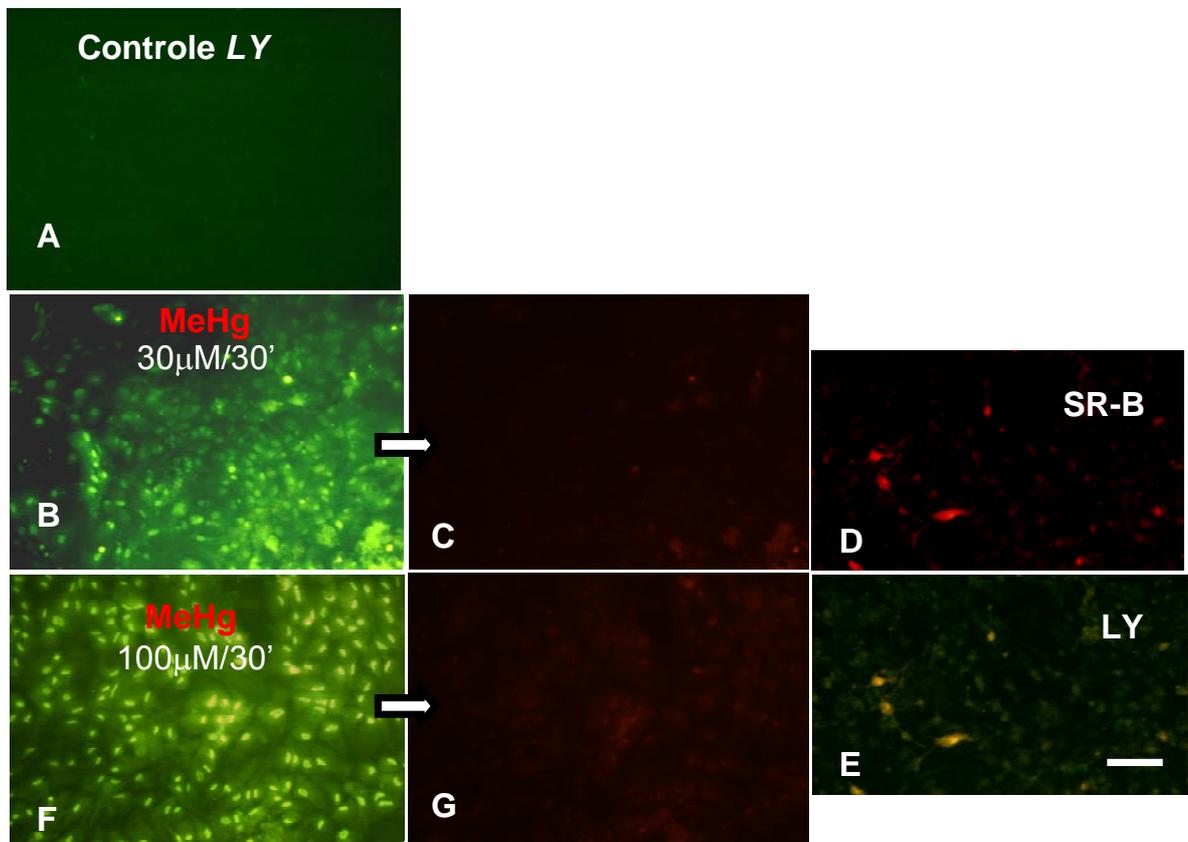


Figura 7 – Exposição ao MeHg 30μM incubado por 30 minutos revela permeabilização astrocitária nos ensaios de passagem de *Lucifer Yellow*. 30μM MeHg incubado por 30 minutos acarreta permeabilização de membrana por toda extensão da monocamada astrocitária, revelada pela passagem do corante *Lucifer Yellow* (C), comparado ao controle (A). Permeabilização do corante Brometo de Etídeo (EtBr) na condição controle restringe a superfície de corte (B) enquanto que na condição de MeHg estende-se por toda monocamada (D).

4.1.2- A Captação direta do corante é devido à abertura de grandes poros transmembrana

Visto que a permeabilização ao corante *LY* apresentada por astrócitos não seguia o padrão de frente de onda característico do espalhamento por junções comunicantes, hipotetizamos se poros poderiam estar sendo formados ou ativados na membrana na presença de MeHg. Conforme esperado para poros de natureza juncional (mas também para poros formados por receptores P2X7), a permeabilização restringiu-se a moléculas de baixo peso, como *LY* e *SR-B*, tendo sido excluídos fluorocromos de alto peso (RD 3000 Da). Além disto, a permeabilização de membrana foi observada mesmo sem lesão mecânica produzida na rede astrocitária (*scrape loading*). Deste modo, as células captaram o corante do meio de cultura de forma específica e não por ruptura da membrana devido a intoxicação, uma vez que a captação limitou-se a moléculas relativamente pequenas e tendo observado um efeito parcialmente reversível após a substituição do MeHg por meio controle (Figura 8).



Barra de calibração = 100 μm

Figura 8 – A permeabilização da monocamada astrocitária é restrita a pequenas moléculas e é parcialmente reversível. Controle (A). Incubação de 30 μM MeHg por 30 minutos gera extensiva permeabilização de membrana, apresentada pelo ensaio de carregamento e passagem do corante LY (B). O corante RD, de maior peso molecular, não é permeabilizado na presença de MeHg (C). Reversão do efeito após substituição para meio sem MeHg, Sulfo Rodamina-B (SR-B) (D), *Lucifer Yellow* (E). Incubação de MeHg 100 μM por 30 minutos gera semelhante permeabilização de membrana com o corante Lucifer Yellow (G), Rodamina Dextran não atravessa poros juncionais mesmo na presença de MeHg 100 μM (G).

4.1.3- Agentes desacoplantes e bloqueadores de hemicanais inibem a permeabilização induzida pelo MeHg

Para confirmar o envolvimento de poros juncionais na resposta à intoxicação mercurial, avaliamos os efeitos da permeabilização das membranas dos astrócitos incubados com CBX e LaCl₃, conhecidos respectivamente como desacoplante juncional e bloqueador de hemicanais de conexina. Além disso, testamos a ação de peptídeos miméticos contra alças extracelulares das conexinas, P26 e P27 (vide Material e Métodos desta Tese). Em todos estes tratamentos, concluímos pelo bloqueio da captação direta do fluorocromo LY em resposta à intoxicação mercurial, favorecendo a hipótese de envolvimento de poros de conexinas, na forma de hemicanais funcionais, conforme ilustrado nas Figuras 9 e 10.

4.1.4- Bloqueadores de receptores P2X7 inibem a permeabilização de membrana induzida pelo MeHg

O envolvimento de outros poros de membrana foi avaliado por três agentes bloqueadores de canais P2X7, os compostos ATP oxidado (oATP), MgCl₂ e ZnCl₂. Enquanto o tratamento com MgCl₂ (100µM) bloqueou totalmente a permeabilização astrocitária induzida por MeHg, a adição de oATP apresentou um bloqueio parcial, e a presença de ZnCl₂ não afetou esta permeabilização (Figura 11).

Em função deste resultado, e para confirmar a participação dos receptores ionotrópicos purinérgicos (P2X7); as monocamadas astrocitárias foram tratadas com o corante *Brilliant Blue G*, conhecido bloqueador destes canais. Como observado na figura 11 (A e B) a permeabilização da membrana astrocitária pelo corante foi

reduzida sugerindo mais uma vez que a abertura de poros P2X7 decorre da administração de MeHg.

Mediante o resultado dos bloqueadores de poros P2X7, realizamos um novo conjunto de experimentos (Figura 12), usando em seqüência, os bloqueadores de hemicanais, LaCl_3 e CBX na presença de ATP. Nossos resultados sugerem que na condição de permeabilização induzida pelo MeHg $30\mu\text{M}$ por 30 minutos, inicialmente abrem-se hemicanais não juncionais e subsequentemente, através da liberação de ATP, poros P2X7 seriam abertos. Este cenário foi mimetizado no experimento descrito acima.

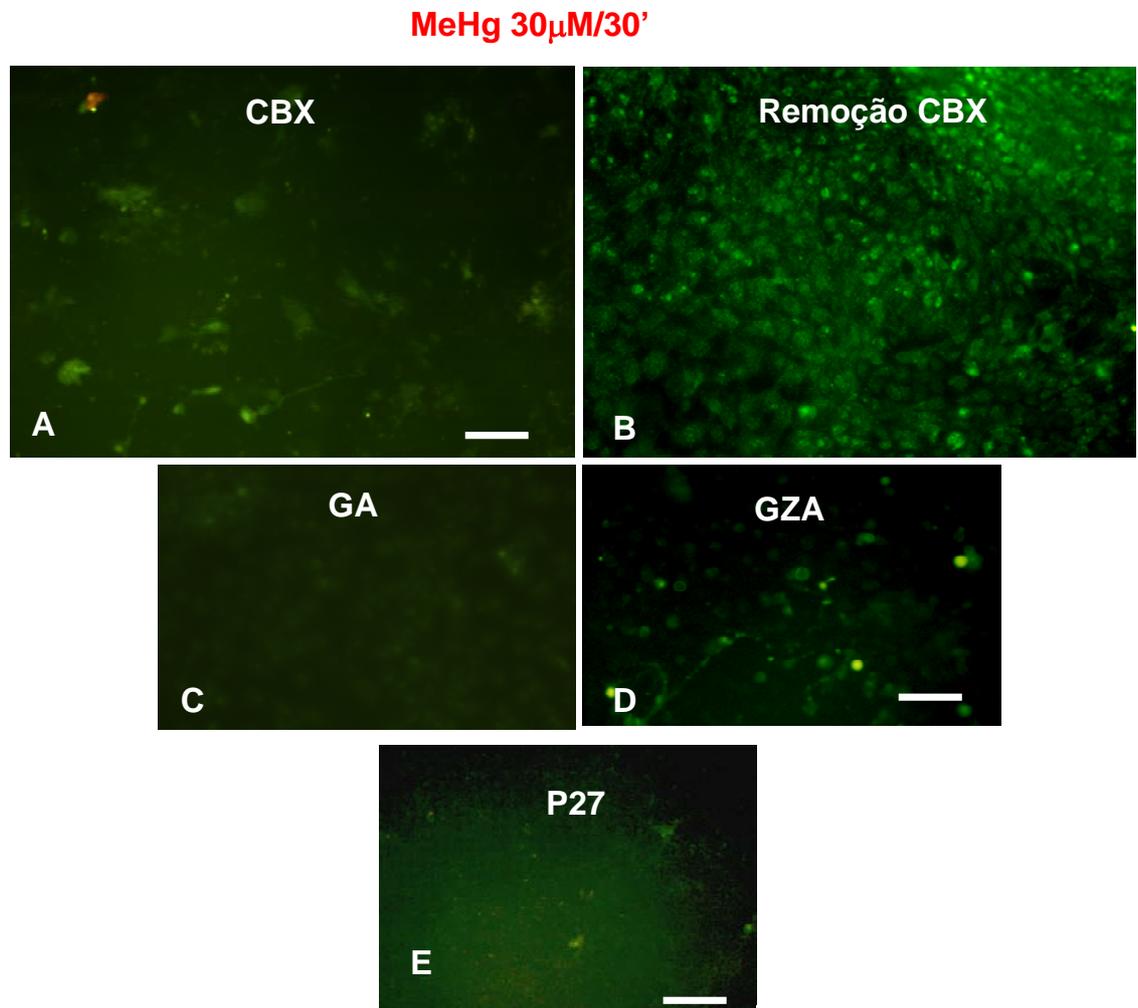


Figura 9- Bloqueadores de comunicação juncional bloqueiam a permeabilização astrocitária induzida pelo MeHg. A adição de Carbenoxolone 100 μ M (CBX) bloqueia a permeabilização gerada pela incubação de 30 μ M MeHg por 30 minutos (A). Reversão deste bloqueio é observada mediante a remoção de CBX, mantendo as culturas por 30 minutos em meio controle (B). A adição de 100 μ M de ácido glicirretínico (GA), agente bloqueador de comunicação juncional bloqueia a permeabilização (C). A adição de 100 μ M de ácido glicirrízico (GZ), análogo não bloqueador não bloqueia a permeabilização como esperado (D). Ensaio com Peptídeo mimético P27, bloqueador juncional, bloqueia a permeabilização. Barra de calibração = 100 μ m

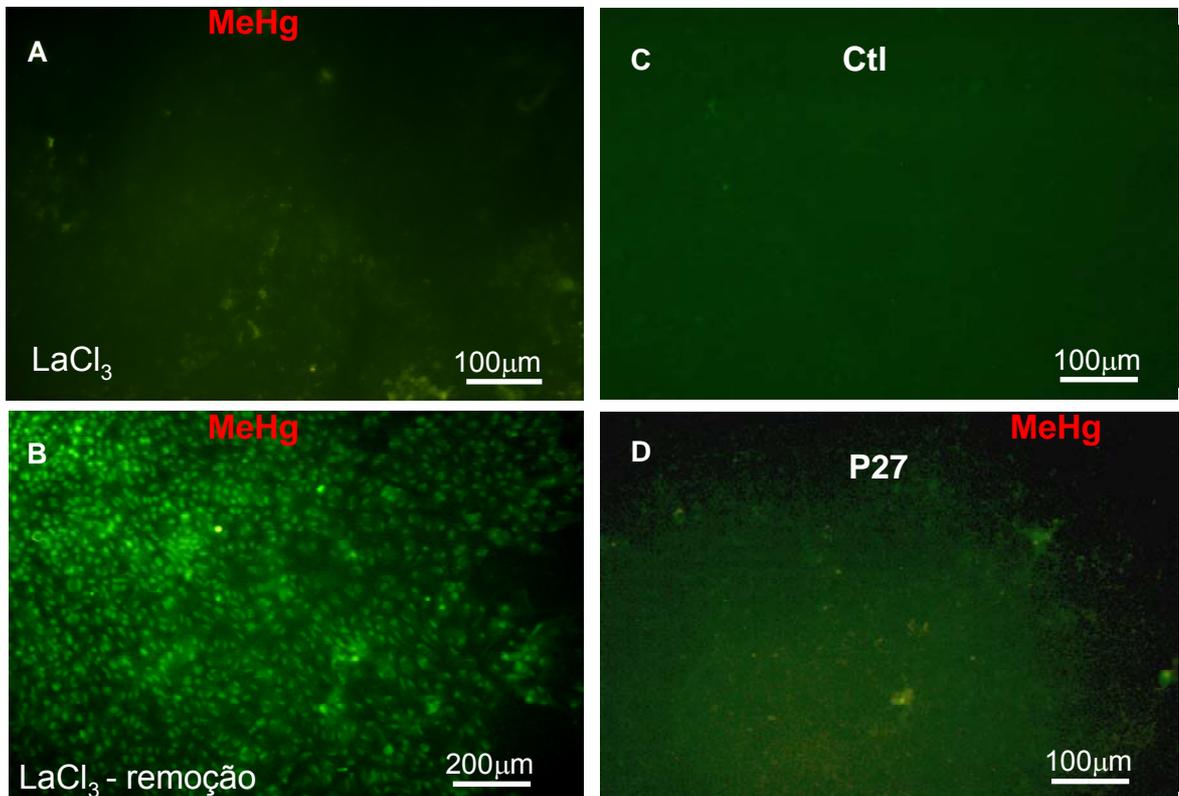


Figura 10 – A presença de Cloreto de Lantânio (LaCl₃), um bloqueador de hemicanais, inibe a permeabilização astrocitária induzida pelo MeHg. Culturas de monocamadas astrocitária tratadas com MeHg 30μM por 30 minutos na presença de LaCl₃ apresentam um bloqueio da permeabilização induzida pelo MeHg (A). A reversão da permeabilização extensiva por toda monocamada é observada 30 minutos após a remoção de LaCl₃ (B). Cultura controle (C), Peptídeo P27 (D).

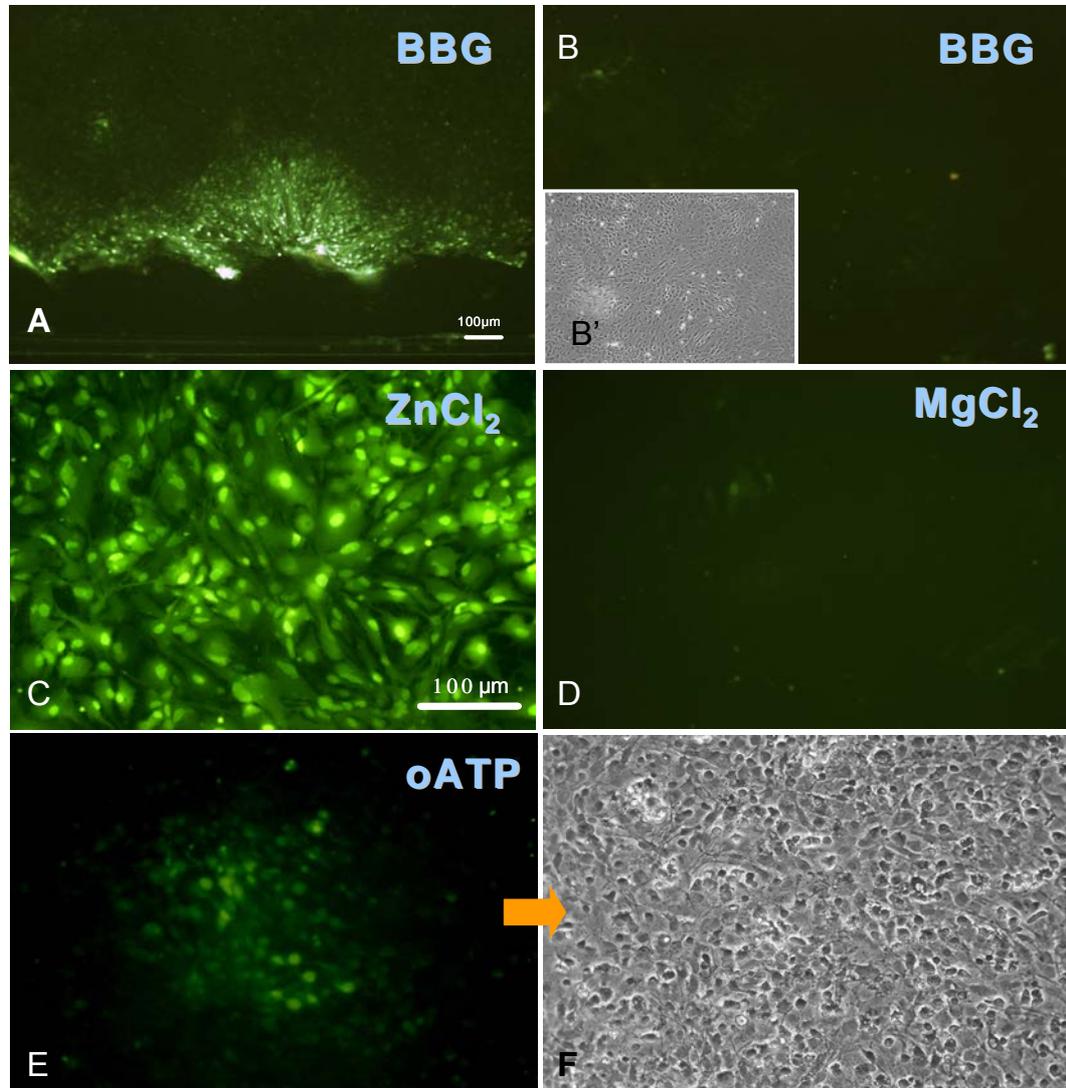


Figura 11 – Bloqueadores de canais P2X7 inibem a permeabilização astrocitária induzida pelo MeHg. A imagem da região do *scrape loading* mostra que o corante *Brilliant Blue G* (BBG), na concentração de 100 μ M, inibe a permeabilização induzida pelo MeHg (A) e distante da região de corte (B). Imagem de contraste de fase evidenciando a confluência da cultura (B'). A adição de cloreto de zinco, ZnCl₂, na concentração de 100 μ M, não bloqueia a permeabilização induzida pelo MeHg (C), enquanto que cloreto de magnésio, MgCl₂, 5mM, suprime completamente a permeabilização nas culturas tratadas com MeHg (D). A adição de ATP oxidado (oATP), 100 μ M/60 min. de exposição, inibe parcialmente a permeabilização (E). Microscopia óptica do mesmo campo em E, contraste de fase, mostrando a confluência da monocamada (F).

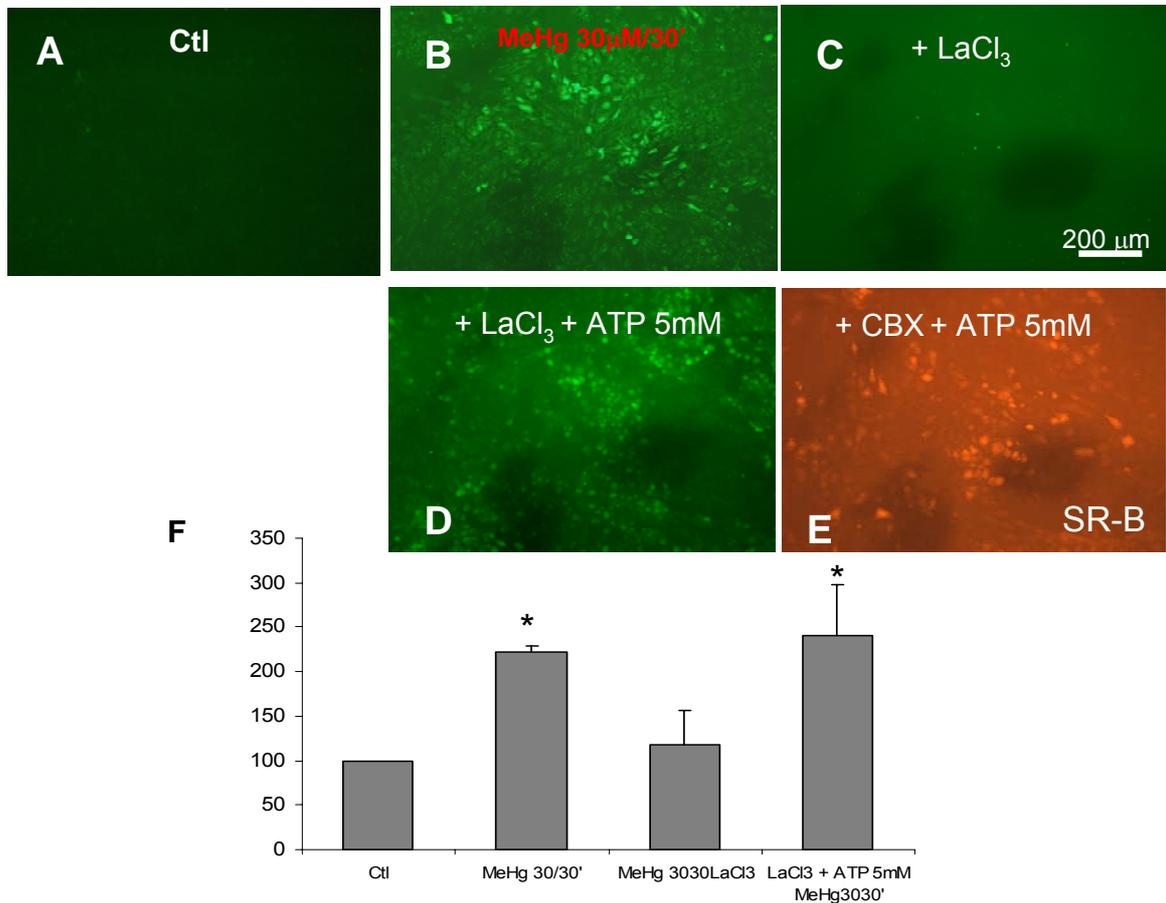


Figura 12 - A Captação de corante é estimulada por ATP na condição de permeabilização induzida pelo MeHg durante o bloqueio de hemicanais. Exposição ao LY na condição controle (A). A monocamada é permeabilizada na condição de MeHg 30 μ M por 30 minutos como revelada pela permeabilização com o corante LY (B). A permeabilização é suprimida na presença de LaCl₃ (C). Com a adição de ATP 5mM a permeabilização é restituída (D). Após lavagem e adição de CBX na presença de ATP provoca a permeabilização em grupos de células, evidenciado pela permeabilização do corante SR-B (E). Mesma monocamada em experimento contínuo de B a E. A quantificação dos níveis de fluorescência revela que o ATP é capaz de reverter o bloqueio na permeabilização provocada por LaCl₃.

4.1.5- Mudanças morfológicas na condição de permeabilização induzida pelo MeHg

Nas culturas tratadas com MeHg, foi observado dano/estresse celular, evidenciado por alterações morfológicas, como a condensação nuclear e a marcação alta para o corante *Acridine Orange* (AO), um marcador de sofrimento e/ou morte celular (Figura 13). Poucos núcleos alaranjados foram observados nas culturas controles, mantendo o citoplasma com coloração verde (Figura 13C), em relação às culturas tratadas com MeHg, onde um maior número de núcleos alaranjados marcados foi detectado (Figura 13D). Nessas culturas tratadas com 30 μ M de MeHg por 30 minutos detectamos que a fluorescência laranja, um indicador de desarranjo de nucleotídeo (DNA ou RNA), foi distribuída em proporções altas na monocamada astrocitária no citoplasma e menos freqüentemente no núcleo, indicando que este compartimento, ou vesículas neste compartimento, estão se tornando ácidas (seja devido a uma variação aniônica de pequenas moléculas ou mesmo prótons, ou a presença de RNA aumentado). Observamos também, a presença de núcleos exibindo fluorescência verde, o que representa a integridade do DNA, porém, um número grande de núcleos exibindo além do citoplasma, o núcleo alaranjado, em função da ligação do AO com a fita simples de DNA (ou com a conformação alterada do DNA em processo de degradação). A imagem apresentada na figura 13D mostra claramente que apesar do citoplasma se encontrar vermelho, evidenciando algum sofrimento celular ou síntese de proteína aumentada, os núcleos estão claramente verdes, indicando que no tempo de incubação as células ainda não entraram em apoptose.

Esta condição é ampliada a 100 μMol de MeHg, com a maioria dos núcleos positivos para AO. Assim, o dano de nucleotídeo citosólico parece antecipar ao desarranjo de DNA nuclear, como um sinal moderado de dano celular a 30 min de 30 μMol de MeHg.

4.1.6- Captação de [^3H]D-aspartato é alterada na condição de intoxicação pelo MeHg

Uma vez descrito os efeitos do MeHg sobre a rede astrocitária de ratos pós-natais, avaliamos a mobilização de glutamato nessas células tratadas com MeHg, visto que a excitotoxicidade induzida por glutamato pode ser um dos agentes desencadeadores da abertura de poros P2X7 (Duan *et al.*, 2003, Atkinson *et al.*, 2004). Utilizamos para tanto, ensaios de quantificação da captação de [^3H]D-Aspartato, um traçador análogo ao glutamato.

Como resultado, podemos verificar que ocorre uma diminuição da captação de [^3H]D-Aspartato por astrócitos em cultura na presença de MeHg, sugerindo uma inibição dos transportadores glutamatérgicos gliais, o que no contexto do Sistema Nervoso, implicaria numa maior presença de aminoácidos excitatórios no meio extracelular, e possivelmente excitotoxicidade.

Perguntamo-nos se a diminuição do D-aspartato no interior da célula se deveria não a um defeito no transportador, mas sim a sua saída através dos hemicanais ou poros P2X7 sabidamente abertos na condição de contaminação. Como resultado, verificamos que nem os bloqueadores para junções comunicantes ou hemicanais, nem os bloqueadores dos poros P2X7 alteraram os níveis de

captação de D-aspartato. Os testes estatísticos confirmaram a significância do bloqueio na captação de D-aspartato na condição de permeabilização de membrana pelo MeHg, tanto quanto, demonstrou a resistência aos inibidores de poros. (Figura 14).

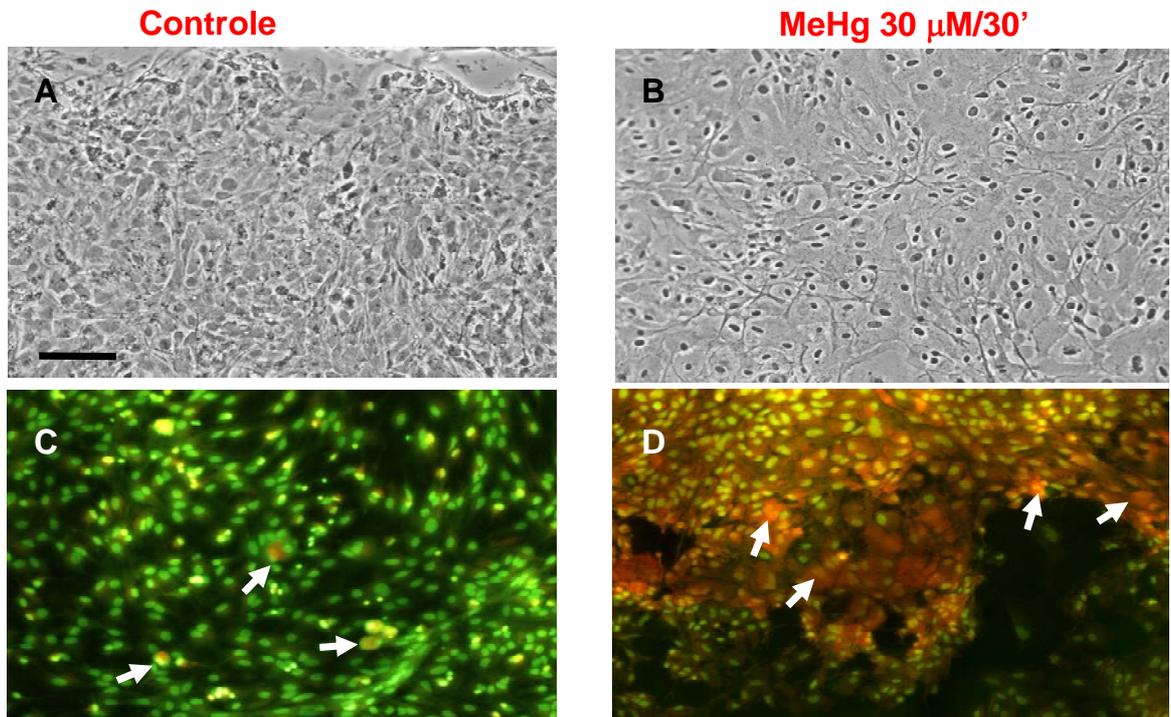


Figura 13 – Sinais estruturais de injúria na morfologia astrocitária induzida pelo tratamento das culturas com MeHg. O corante *Acridine Orange* revela dano celular induzido pelo tratamento com 30 μ M MeHg por 30 minutos (D), comparado a condição controle (C). Imagens de contraste de fase na condição controle (A) e na condição de intoxicação (B) evidenciam a condensação nuclear observada nas culturas tratadas com MeHg. Setas em D indicam a marcação citoplasmática e nuclear para AO, conforme descrito nos métodos. Marcação fluorescente de *Acridine Orange* para células vivas (verde) e para sofrimento e/ou morte ou celular (alaranjado/vermelho). Barra de calibração = 100 μ m

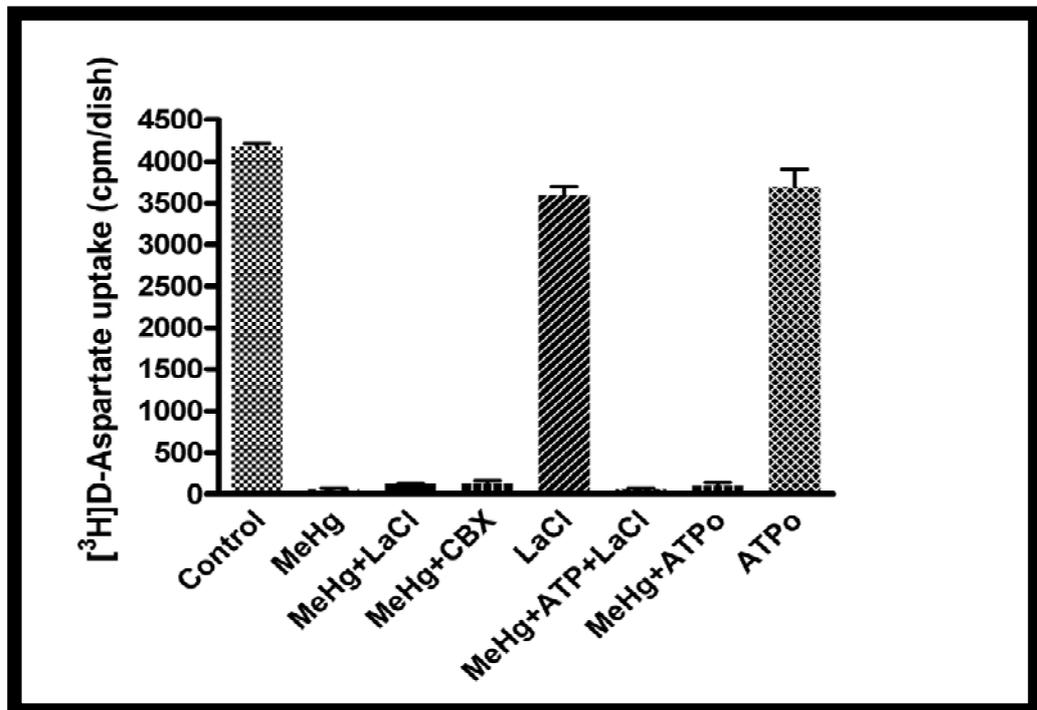


Figura 14 – Metilmercúrio bloqueia a captação de [3H]D-Aspartato em monocamada astrocitária. As culturas foram submetidas à incorporação de 0,25 μ Ci de [3H]D-Aspartato por 90 min, sendo nos últimos 30 minutos expostas a: MeHg, MeHg+LaCl, MeHg+CBX, LaCl, MeHg+ATP+LaCl, MeHg+ ATPo ou ATPo; As placas controle permaneceram os 90 minutos sem a presença de MeHg ou dos demais fármacos. MeHg 30 μ M, LaCl₃ 100 μ M, CBX100 μ M, ATP 100 μ M, ATPo 100 μ M. Análises estatísticas mostram uma diminuição na captação de D-aspartato nas condições de permeabilização da monocamada tratadas com MeHg em relação ao controle. Barras representam médias \pm dp. n=3

4.1.7 Conclusões:

- A intoxicação pelo MeHg *in vitro* diminui a captação de [³H]D-Asp em mais de 90%, sugerindo uma alteração dos transportadores de glutamato pelo tratamento.

- A Intoxicação de MeHg em baixas concentrações (5 a 10 µM incubados por 10 minutos), não interfere com a difusão de corante via comunicação juncional intercelular entre astrócitos em monocamada.

- Níveis mais moderados de intoxicação mercurial (10 µM/30 incubados por minutos e 30 µM incubados por 10 minutos) geram um bloqueio da comunicação celular mediada por junções comunicantes. Por outro lado, níveis elevados de intoxicação mercurial (30 µM/30 minutos) levam à permeabilização da membrana de astrócitos. Esses resultados não são explicados pela ruptura da membrana, pois estão limitados à moléculas pequenas, conhecidos como permeantes juncionais e este efeito é parcialmente reversível após a substituição do meio com MeHg para o meio controle.

- O envolvimento de conexons não justapostos é sugerido, uma vez que: 1- Os agentes bloqueadores de junções comunicantes como GA e CBX são inibidores em nosso sistema, enquanto que o seu análogo não funcional GZA é menos efetivo, 2- Compostos propostos como bloqueadores específicos de hemicanais como LaCl₃ (em concentrações no nível µM) e os peptídeos miméticos P26 e P27 (300 µg/ml;

NeoMPS, Strasbourg, France) suprimem a permeabilização de membrana enquanto mantém a difusão de corante intercelular inalterada.

- O envolvimento de receptores ionotrópicos P2X7, é sugerido como co-adjuvante nos efeitos da intoxicação mercurial sobre a permeabilização de membrana, pois todos os agentes bloqueadores da condutância de poros P2X7 utilizados (exceto $ZnCl_2$) atenuam significativamente os efeitos do MeHg sobre a permeabilização de membrana, mantendo apenas o espalhamento intercelular do corante por junções comunicantes.

- Os dados obtidos em nosso sistema sugerem a diminuição do transporte de aminoácidos excitatórios paralelo ao dano de DNA e a abertura de poros transmembrana, a saber, hemicanais funcionais e receptores ionotrópicos P2X7 ATP.

4.2 - **Análise do padrão de acumulação do mercúrio no encéfalo e nos outros órgãos.**

Com o intuito de avaliar a precisão de nosso modelo de intoxicação *in vivo*, quantificamos os níveis de THg nas amostras das estruturas encefálicas (cérebro e cerebelo) e nos demais órgãos-alvo (fígado, rins, sangue e pelo).

Investigamos também o padrão de distribuição do mercúrio orgânico na forma de MeHg, observando a afinidade deste metal com o SNC, uma vez que praticamente 100% do mercúrio total presente nas estruturas encefálicas apresentou-se na forma de MeHg.

Como trabalhamos com um protocolo de intoxicação que variou de 7 a 21 dias de sobrevivência após o dia da intoxicação, foi possível estabelecer um perfil do padrão de distribuição do THg e do MeHg, tanto nos órgãos detoxificadores quanto no SNC.

4.2.1 - **Quantificação e Padrão de Acumulação de Mercúrio Total (THg)**

Foi analisada a concentração e o padrão de acumulação de THg no fígado, rins, cérebro (hemisférios cerebrais), hipocampo e no sangue, tanto dos animais controle como dos animais intoxicados com MeHg.

Nos animais intoxicados com MeHg, decorridos 7, 15 e 21 dias de contaminação, as maiores concentrações nas médias de THg foram encontradas nos rins [**38,26 ± 4,9 µg.g⁻¹** (7d), 18,94 ± 1,4 µg.g⁻¹ (15d) e 21,74 ± 5,4 µg.g⁻¹ (21d)], seguidas pelo fígado [**8,1 ± 2,8 µg.g⁻¹** (7d), 6,36 ± 7,8 µg.g⁻¹ (15d) e 4,36 ± 1,2 µg.g⁻¹ (21d)]. No SNC os valores foram **2,66 ± 0,11 µg.g⁻¹** (7d), 1,1 ± 0,13 µg.g⁻¹ (15d) e

2,20 ± 0,4 µg.g⁻¹ (21d) para os hemisférios cerebrais, **2,37 µg.g⁻¹** (7d) para o hipocampo e **2,6 ± 0,11µg.g⁻¹** (7d), 1,23 ± 0,22 µg.g⁻¹ (15d), e 1,95 ± 0,1 µg.g⁻¹ (21d) para o cerebelo. O nível de THg no sangue foi de 21,22 ng.mL⁻¹ ± 0,19 ng.mL⁻¹ depois de 7 dias de intoxicação enquanto que, uma semana depois, a concentração diminuiu para 16,87 ng.mL⁻¹ ± 0,19 ng.mL⁻¹ (15 dias). Já no pelo a concentração de THg aumentou durante todo o período de intoxicação [1,00 µg.g⁻¹ ± 0,19 µg.g⁻¹ (7dias) e 24,97 µg.g⁻¹ ± 2,3 µg.g⁻¹ (15dias)]. Na seqüência das figuras abaixo, pode-se observar essas tendências:

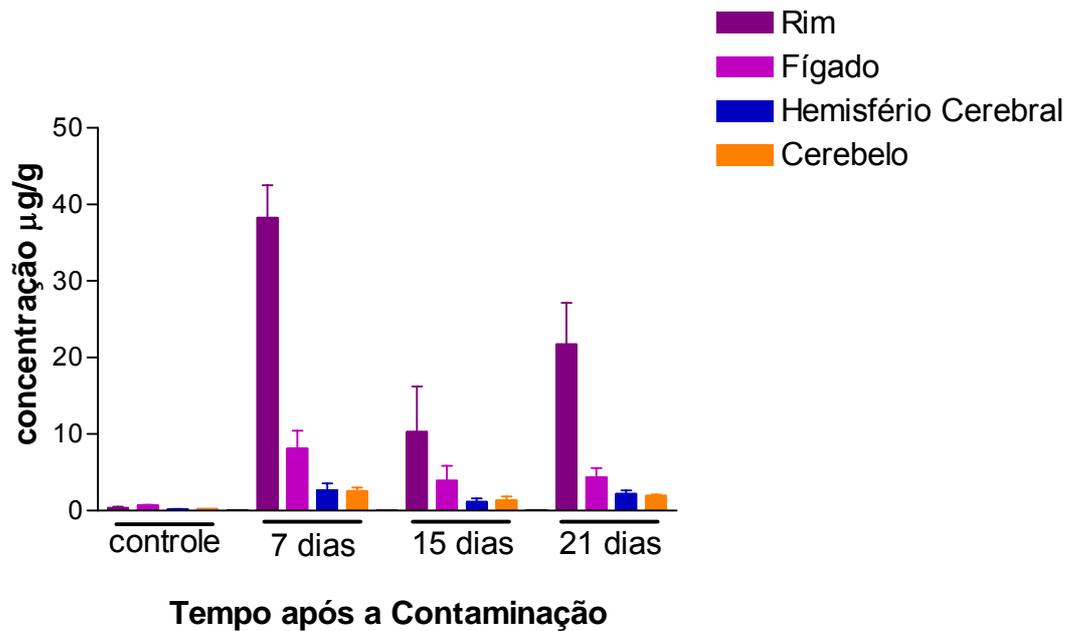


Figura 15- Concentração de mercúrio nos órgãos alvos. Concentração de Hg mensurada nos rins, fígado, hemisférios cerebrais e cerebelo de ratos wistar adultos (P60), controles e intoxicados com MeHg por 7 ou 15 dias após administração oral de dose única (5mg/Kg). As barras são as médias \pm dp., n=7.

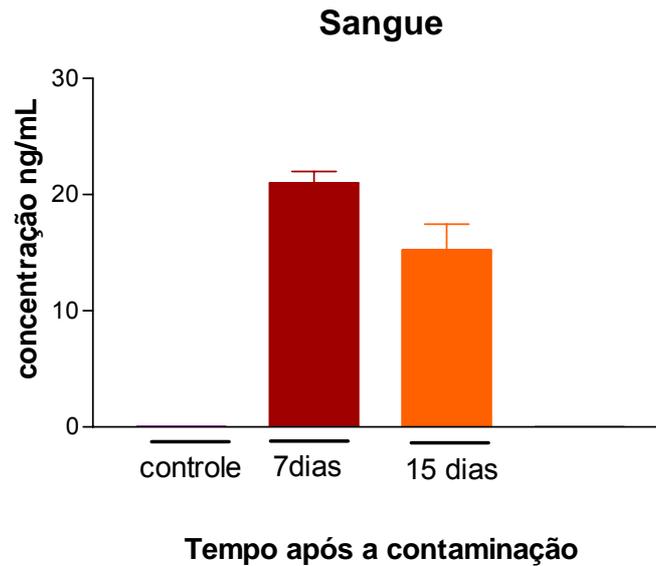


Figura 16- Concentração de mercúrio no sangue. Concentração de Hg quantificada em amostras de sangue de ratos wistar adultos (P60), controles e intoxicados com MeHg por 7 ou 15 dias após administração oral de dose única (5mg/Kg). As barras são as médias \pm dp., n=7

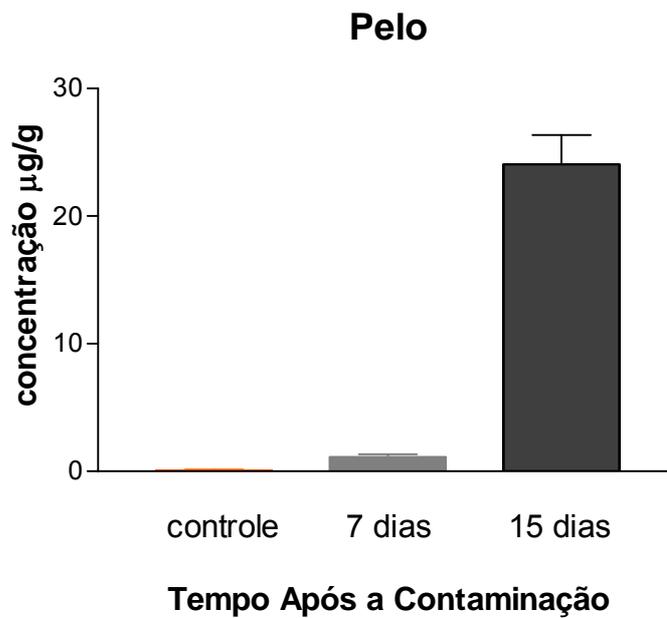


Figura 17- Concentração de mercúrio no pelo. Concentração de Hg em amostras de pelo de ratos wistar adultos (P60), controles e intoxicados com MeHg por 7 ou 15 dias após administração oral de dose única (5mg/Kg). As barras são as médias \pm dp., n=7

4.2.2 - Padrão de acumulação de mercúrio nos tecidos amostrados

Uma correlação altamente significativa (correlação de Pearson $R = 0.95$; $p < 0.05$ $n=5$) foi encontrada entre a concentração de THg no sangue e nos outros tecidos do corpo estudados.

Os testes de correlação foram estabelecidos entre o sangue e cada tecido amostrado, sendo analisados separadamente, porém no conjunto dos animais ($n=5$) sacrificados, 7 dias após a intoxicação aguda de MeHg. Foi observado um padrão muito semelhante de acumulação de THg entre o sangue e cada órgão (hemisférios cerebrais, cerebelo, fígado e rins), apresentando os seguintes valores: sangue e cérebro $R= 0.903$; sangue e cerebelo $R= 0.924$; sangue e fígado $R= 1.000$; sangue e rim $R= 0.944$; fígado e rim $R= 0.948$; cérebro e cerebelo $R= 0.999$; cérebro e rim $R= 0.994$; cérebro e fígado $R= 0.908$; cerebelo e rim $R= 0.998$; cerebelo e fígado $R= 0.928$. Porém, não observamos o mesmo padrão de acumulação entre sangue e pelo, cujo $R= 0.353$. Além disso, as concentrações de mercúrio foram altamente correlacionadas entre o fígado e os rins, o que já poderia ser esperado para órgãos de depuração, além de alta correlação entre estruturas encefálicas, hemisférios cerebrais e cerebelo ($R = 0.999$; $p < 0.05$), tabela 2.

Tabela 2: Correlação observada no padrão de acumulação de MeHg entre os órgãos alvo.

	SANGUE	PELO	CÉREBRO	CEREBELO	FÍGADO	RIM
SANGUE	1.000					
PELO	0.353	1.000				
CÉREBRO	0.903	-0.083*	1.000			
CEREBELO	0.924	-0.032	0.999	1.000		
FÍGADO	1.000	0.342	0.908	0.928	1.000	
RIM	0.944	0.026	0.994	0.998	0.948	1.000

Correlação de Pearson. R = 0.95; p < 0.05 n=5

Houve uma diferença significativa na concentração de THg entre os órgãos estudados decorridos 7 dias da intoxicação por MeHg (ANOVA, $F_{3, 14}=148,31$, $P=0,001$, Figura 18). Através do teste posteriori (Tukey HSD Multiple Comparisons) foi demonstrado que somente o cérebro e o cerebelo não tiveram diferenças significativas nas concentrações de mercúrio total, com valores inferiores quando comparados ao rim e fígado (ver tabela 3).

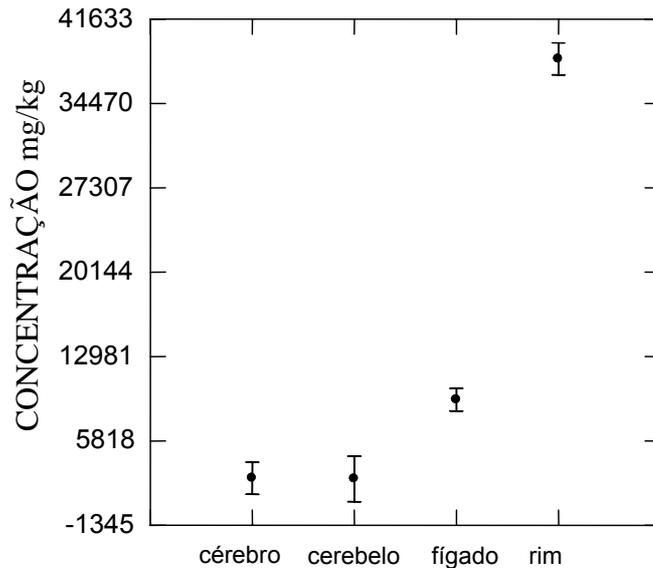


Figura 18- Concentração de mercúrio total nos órgãos alvo em sete dias pós intoxicação por MeHg.

Tabela 3: Análise dos órgãos intoxicados por MeHg após 7 dias (ANOVA seguida por teste a posteriori Tukey).

	cérebro	cerebelo	fígado	Rim
Cérebro	1,000			
cerebelo	1,000	1,000		
Fígado	0,006	0,033	1,000	
rim	0,000	0,000	0,000	1,000

Após 15 dias de intoxicação por houve uma diferença significativa na concentração de THg entre os órgãos estudados. (ANOVA, $F_{3, 24} = 11,594$, $P=0,001$, Figura 19). Através do teste posteriori (Tukey) foi demonstrado que somente o rim apresentou concentração significativamente maior com relação aos outros três órgãos (ver tabela 4).

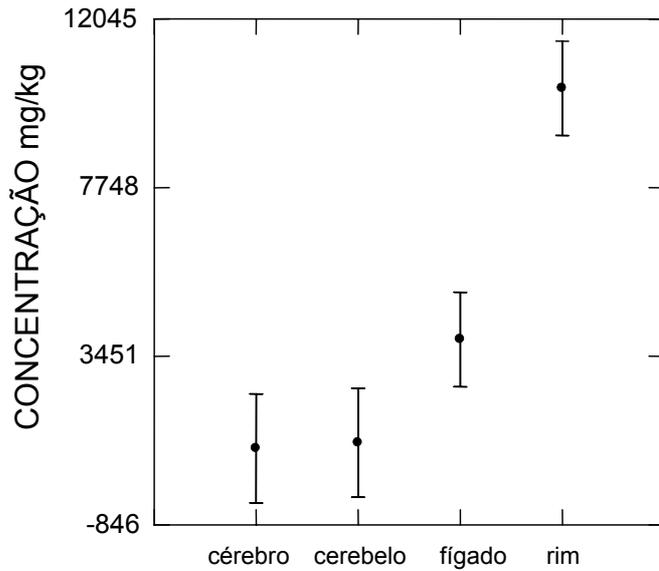


Figura 19 - Concentração de mercúrio total nos órgãos alvo em 15 dias pós intoxicação por MeHg.

Tabela 4: Análise dos órgãos intoxicados por MeHg após 15 dias (ANOVA seguida por teste a posteriori Tukey).

	cérebro	cerebelo	fígado	rim
cérebro	1,000			
cerebelo	1,000	1,000		
fígado	0,447	0,493	1,000	
rim	0,000	0,000	0,005	1,000

Também foi observado uma diferença significativa na concentração de THg entre os órgãos estudados decorridos 21 dias da intoxicação por MeHg (ANOVA, $F_{3,12} = 46,732$, $P = 0,001$, Figura 20). Através de teste posteriori (Tukey) foi demonstrado que somente o rim apresentou concentração significativamente maior com relação aos outros três órgãos (ver tabela 5).

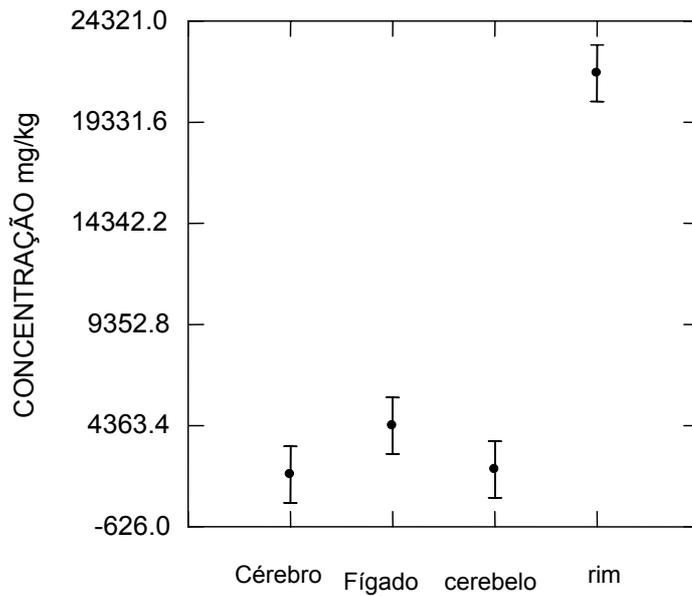


Figura 20 - Concentração de mercúrio total nos órgãos alvo em 21 dias pós intoxicação por MeHg.

Tabela 5: Análise dos órgãos intoxicados por MeHg após 21 dias (ANOVA seguida por teste a posteriori Tukey).

	cérebro	Fígado	cerebello	rim
Cérebro	1,000			
Fígado	0,624	1,000		
Cerebello	0,999	0,698	1,000	
rim	0,000	0,000	0,000	1,000

4.2.3 - Quantificação, Acumulação e Distribuição do MeHg

Os órgãos de depuração, rins e fígado, apresentaram as concentrações de MeHg mais altas decorridos 7 dias do tratamento ($14,21 \mu\text{g.g}^{-1} \pm 1,40\mu\text{g.g}^{-1}$ e $6,67 \mu\text{g.g}^{-1} \pm 0,20 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente). Uma semana depois, estes órgãos apresentaram uma diminuição na concentração de MeHg ($9,54 \mu\text{g.g}^{-1} \pm 0,28 \mu\text{g.g}^{-1}$ para os rins e $0,51 \mu\text{g.g}^{-1} \pm 0,26 \mu\text{g.g}^{-1}$ para o fígado). A concentração de MeHg diminuiu nos hemisférios cerebrais durante o período de experimento: $2,53 \mu\text{g.g}^{-1}$ (7 dias) e $0,44 \mu\text{g.g}^{-1}$ (15 dias). O mesmo se aplica ao cerebelo que apresentou $2,24 \mu\text{g.g}^{-1}$ (7 dias) e $0,84 \mu\text{g.g}^{-1}$ (15 dias) após a intoxicação.

Quase todo o mercúrio presente nas estruturas encefálicas encontra-se na forma orgânica de MeHg, que é a mais neurotóxica. Depois de 7 dias de tratamento, o fígado e os rins apresentaram 80% e 41% respectivamente de todo o mercúrio na forma orgânica (MeHg). Porém, uma semana depois, a porcentagem de MeHg aumentou ligeiramente nos rins (51%) e diminuiu no fígado (8%). Estes resultados sugerem que provavelmente, o maior mecanismo de demetilação do MeHg esteja ocorrendo no fígado. Estes resultados estão apresentados nas figuras 21, 22 e 23.

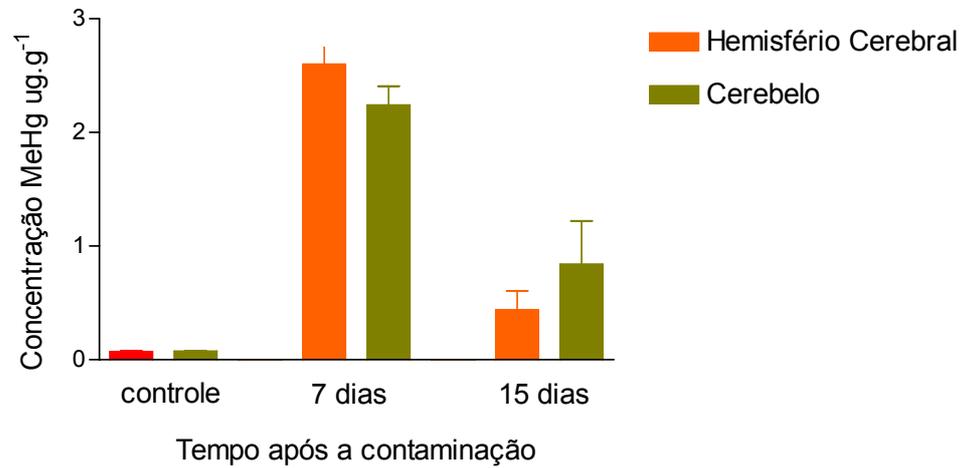


Figura 21- Concentração de Metilmercúrio nas estruturas cerebrais. Quantificação de MeHg nos hemisférios cerebrais e cerebelo de ratos wistar adultos (P60). Os resultados se referem aos animais dos grupos controle e intoxicados com MeHg por 7 ou 15 dias após administração oral de dose única (5 mg/Kg). Animais controles e animais intoxicados com MeHg por 7 ou 15 dias após administração oral de dose única (5mg/Kg). As barras são as médias \pm dp. n=7

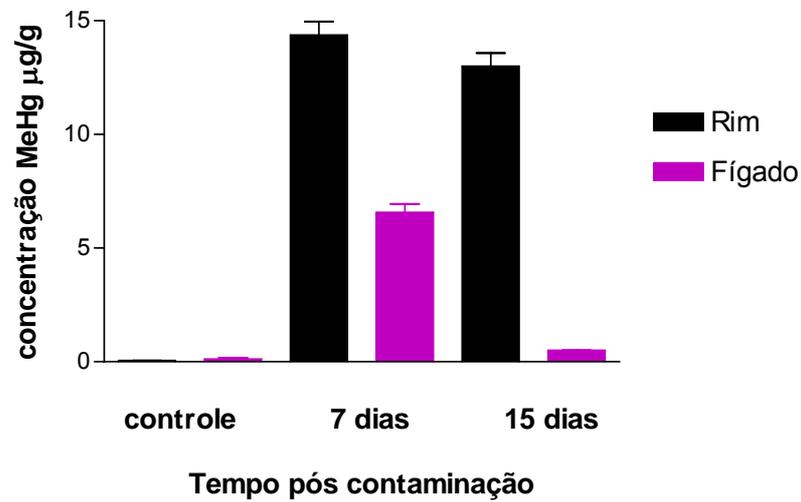


Figura 22- Concentração de metilmercúrio nos órgãos-alvo. Quantificação de MeHg nos rins e fígado de ratos wistar adultos (P60). Os resultados se referem aos animais nas condições controle e intoxicados com MeHg por 7 ou 15 dias após administração oral de dose única (5 mg/Kg). Animais controles e animais intoxicados com MeHg por 7 ou 15 dias após administração oral de dose única (5mg/Kg). As barras são as médias \pm dp. n=7

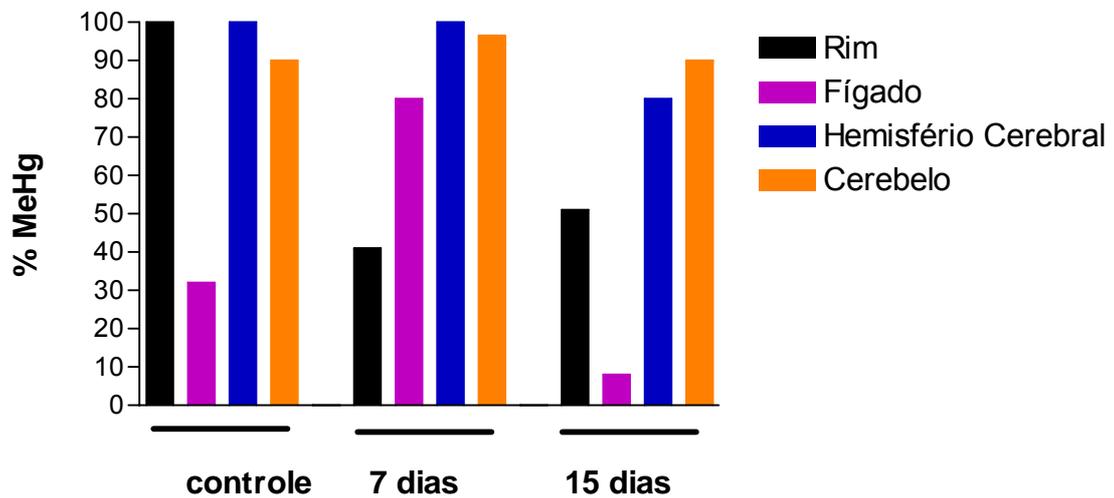


Figura 23- Porcentagem de MeHg nos Órgãos Alvos. Porcentagens de MeHg mensurada nos rins, fígado, hemisférios cerebrais e cerebelo de ratos Wistar adultos (P60), controles e intoxicados com MeHg por 7 ou 15 dias após administração oral de dose única (5mg/Kg).

Como observado, os hemisférios cerebrais e o cerebelo mantiveram alta porcentagem de MeHg, seja 7 ou 15 dias após a intoxicação oral (Figura 23). Contudo, nota-se que o cerebelo, sobretudo, mantém a maior estabilidade do MeHg decorridas duas semanas da intoxicação.

4.2.4 - Especificação das formas orgânicas de Mercúrio

Foi analisado a porcentagem de mercúrio orgânico total (Org-Hg) nos seguintes órgãos: fígado, cérebro e cerebelo dos animais controle e nos que foram intoxicados com MeHg. Verificou-se que os resultados encontrados tanto para o MeHg, quanto para o mercúrio orgânico total não apresentavam diferenças significativas nos órgãos estudados o que se conclui que todo mercúrio orgânico presente nos tecidos analisados estava como MeHg (Tabela 6).

Tabela 6: Média da porcentagem de MeHg e Mercúrio Orgânico no fígado, cérebro e cerebelo de rato adulto 15 dias após intoxicação aguda com MeHg.

Órgãos	THg/ μg	% MeHg	% Org- Hg
Fígado	6,36	20,78	25,57
Cérebro	1,11	48,50	48,68
Cerebelo	1,23	62,60	61,36

4.3 - Intoxicação Mercurial “in vivo” e suas conseqüências sobre os nichos neurogênicos do cérebro: hipocampo e zona subventricular

4.3.1- Aumento do número de células na fase S na SVZ com 24 horas de sobrevida de BrdU

Através da observação dos núcleos BrdU positivos na parede lateral do ventrículo lateral, foi constatado uma maior densidade de núcleos marcados na SVZ dos animais tratados (Figura 24B) comparado com os controle (Figura 24A). Após quantificação dos núcleos marcados detectamos um aumento (40%) no número de células que incorporaram BrdU durante a fase S na SVZ dos ratos adultos decorridos 7 e 15 dias após a contaminação mercurial em comparação com os animais controle (Figura 24E). Isto indica que mesmo após 15 dias da contaminação mercurial observamos alterações sobre a proliferação celular na SVZ. Por outro lado, não detectamos nenhuma diferença (Figura 24F) entre o número de células BrdU positivas no GD dos animais tratados (Figura 24D) e nos animais controle (Figura 24C), indicando que este modelo de lesão pode estar afetando diferencialmente o córtex cerebral e o hipocampo.

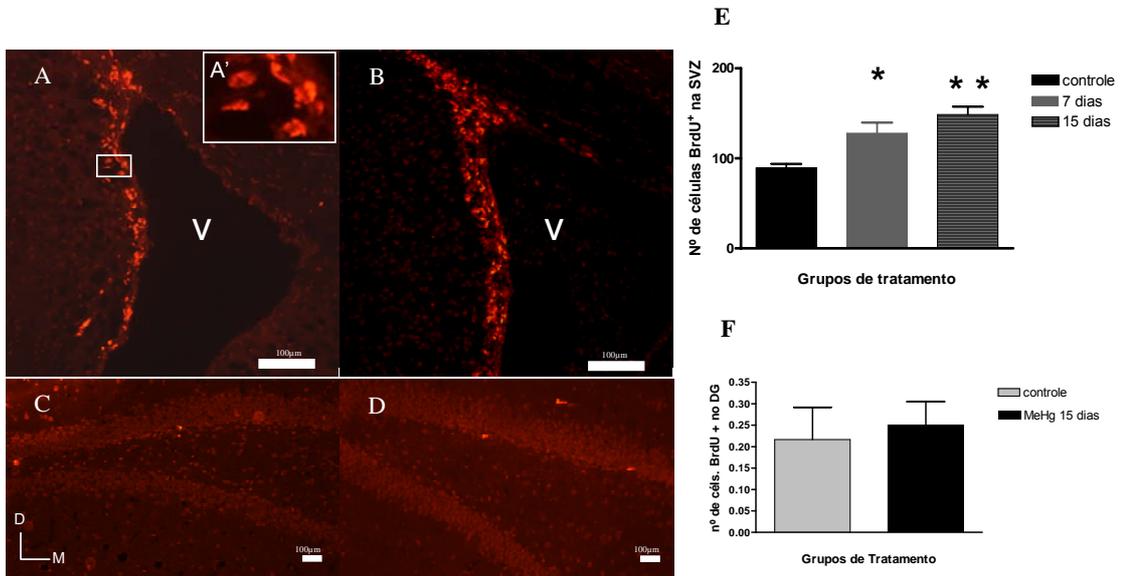


Figura 24- Intoxicação pelo metilmercúrio aumenta o número de células BrdU positivas na SVZ, mas não altera este número no GD. Imagens de imunofluorescência para BrdU em cortes coronais após sobrevivência de 24h pós injeção na SVZ (A) e GD (C) controles e na SVZ (B) e giro denteado (D) dos animais intoxicados pelo MeHg após 15 dias. A', imagem ampliada de caixa em A ilustrando núcleos BrdU positivos. (E) Quantificação do número de núcleos BrdU positivos presentes na parede ventricular, contados em intervalo antero-posterior especificado nos métodos, apresenta aumento significativo de núcleos BrdU positivos nos animais intoxicados em relação ao grupo controle (* = $P < 0,005$ e ** = $P < 0,001$ ANOVA). (F) Administração de MeHg não altera significativamente a incorporação de BrdU por células proliferativas no hipocampo como demonstrado pelo teste t. $n = 5$ por grupo. Barras representam as médias \pm dp.

4.3.2- Gliose Reativa

Sabemos que uma das respostas celulares decorrentes da lesão no SNC é a gliose reativa manifesta pela expressão do filamento intermediário GFAP nos astrócitos. Neste trabalho, verificamos que após a intoxicação mercurial, decorridos 7 ou 15 dias, os astrócitos do hilo hipocampal aumentam a expressão de GFAP, conforme os resultados obtidos por imuno-histoquímica (Figura 25 A e B) e pela quantificação da intensidade de fluorescência através do programa *Image Pro Express* (Figura 25E). Como observado, confirmamos um aumento de 38% nos níveis de fluorescência de GFAP no hipocampo dos animais tratados em relação aos controles.

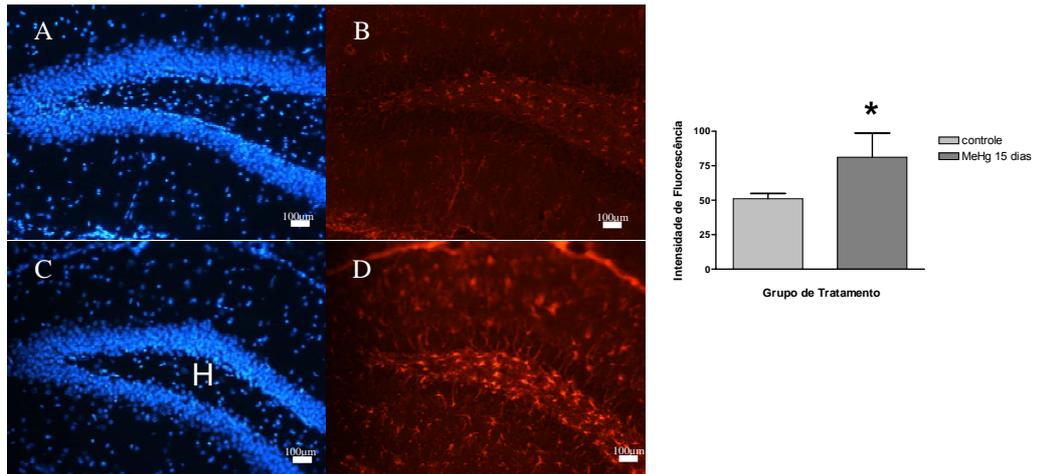


Figura 25- A Intoxicação pelo MeHg aumenta a expressão de GFAP no hipocampo. Cortes coronais com imunoreatividade para GFAP no GD controle (B) e tratado com MeHg (D). Marcação nuclear com DAPI (azul) no GD controle (A), e no GD dos animais intoxicados após 15 dias da administração de MeHg (C). Quantificação da expressão de GFAP apresenta aumento nos níveis de fluorescência de GFAP no hilo (H) do hipocampo dos animais tratados, quando comparados aos controles (E). $n = 5$ por grupo. Barras representam as médias \pm dp, teste t.

4.3.3- Identificação e quantificação das Células BrdU positivas

Considerando que os astrócitos são as células-tronco da SVZ, nos perguntamos se as células BrdU⁺ nos animais intoxicados expressam GFAP.

A fim de identificarmos o fenótipo das células que incorporaram BrdU na SVZ , hipocampo e terceiro ventrículo dos animais falso-operados e tratados com MeHg realizamos imuno-histoquímica GFAP e BrdU. Foram detectadas células duplamente marcadas para BrdU e GFAP na SVZ e no terceiro ventrículo dos animais tratados com MeHg. (Figuras 26 e 27).

4.3.4- Alteração no padrão de organização e distribuição de GFAP na SVZ nos animais tratados com MeHg

Analisando o padrão de disposição das células GFAP positivas na SVZ, podemos observar que o MeHg gera uma alteração na organização e distribuição celular a partir da parede dos ventrículos laterais. Detecta-se uma perda de organização na expressão de GFAP ao longo dos vasos sanguíneos, que normalmente estão dispostos perpendicularmente à parede dorso-lateral dos ventrículos laterais nos animais-controle. A disposição paralela das fibras GFAP positivas observadas na parede médio-lateral também é alterada (Figura 28).

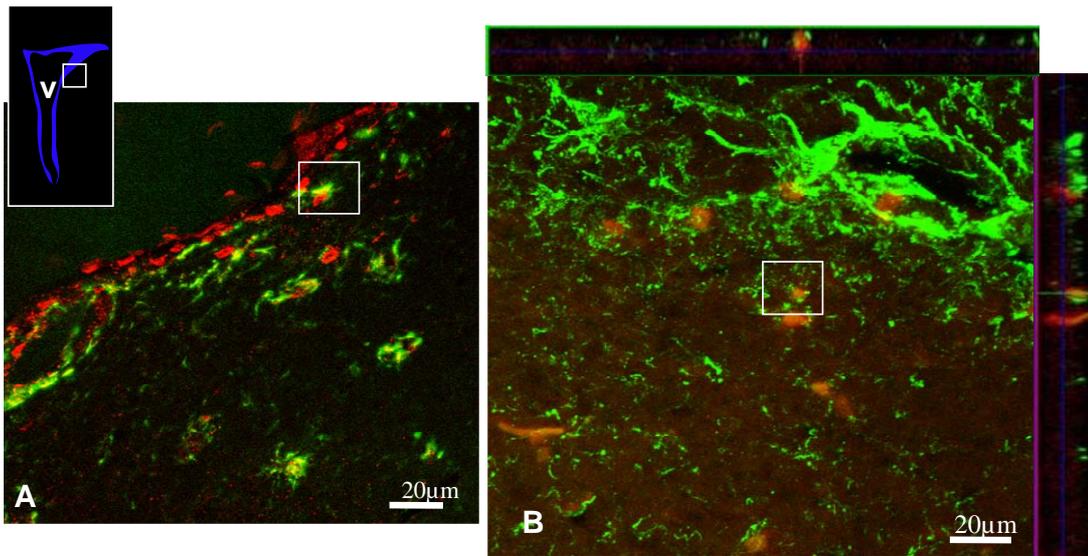


Figura 26- Expressão de BrdU e GFAP na SVZ de animais controle e intoxicados com MeHg: Alguns progenitores proliferando na SVZ são astrócitos. Imagem de microscopia confocal de cortes coronais com imunoreatividade para BrdU e GFAP após sobrevivência de 24h na SVZ controle (A) e na SVZ dos animais intoxicados pelo MeHg após 15 dias (B). Box em A e B apresentam corte ortogonal de uma célula de animais controle (A) e tratado com MeHg (B) demonstrando provável co-localização da marcação celular para BrdU e GFAP na SVZ. BrdU (vermelho), GFAP (verde).

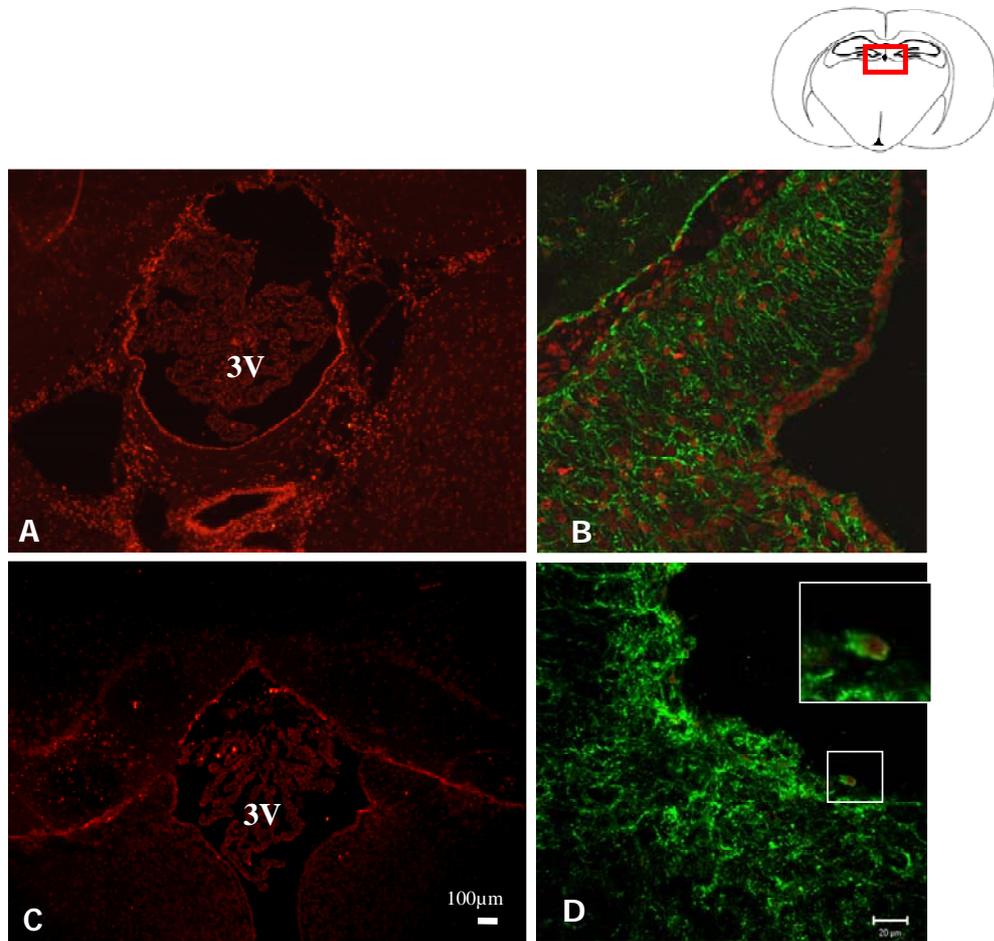


Figura 27 – Intoxicação pelo metilmercúrio aumenta a incorporação de BrdU no terceiro ventrículo do cérebro de ratos adultos. Imagens de microscopia confocal de material imunofluorescente da região dorsal do terceiro ventrículo em cortes coronais com reatividade para BrdU (A e C) ou BrdU/GFAP (B e D) após sobrevivência de 24h pós injeção de BrdU (controle C e D) e 15 dias após intoxicação mercurial (A e B). Imunohistoquímica para BrdU (vermelho) e GFAP (verde). Caixas em D ilustram uma célula duplamente marcada para BrdU e GFAP, em menor e maior aumento. Esquema no canto superior direito indica a posição de análise do terceiro ventrículo (3V).

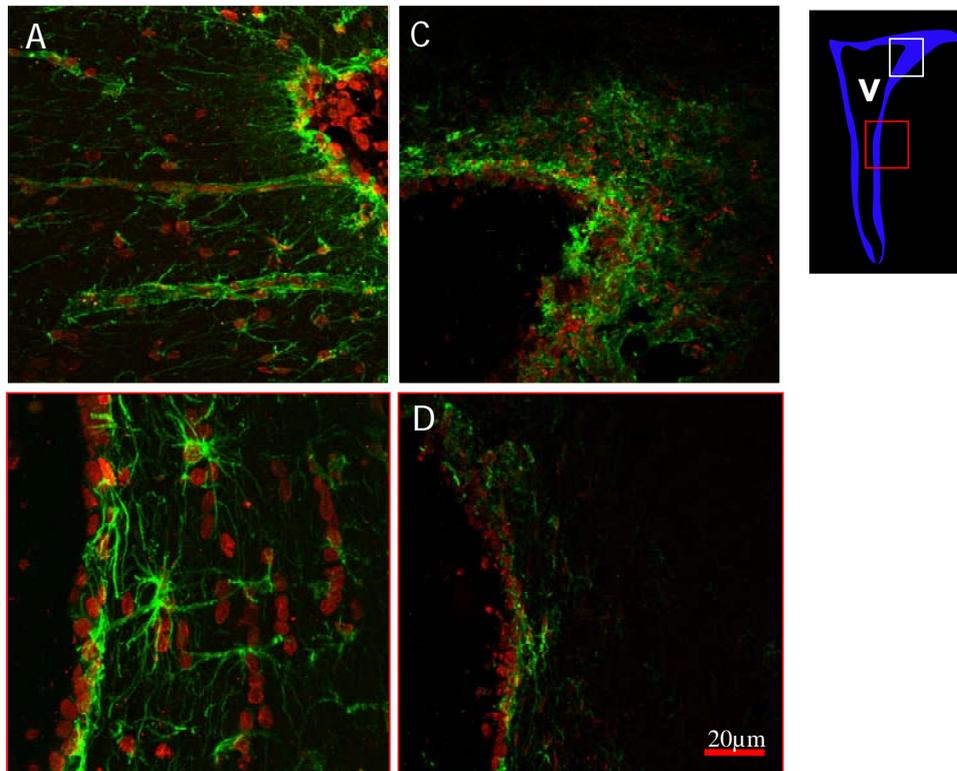


Figura 28 – Intoxicação pelo metilmercúrio resulta em mudanças no padrão de distribuição de GFAP na SVZ. Imagens de microscopia confocal colhidas na SVZ de material imunofluorescente para BrdU e GFAP em cortes coronais. A e B, em animais-controle após sobrevivência de 24h (A e B) e na SVZ dos animais intoxicados pelo MeHg após 15 dias (C e D). Imunohistoquímica para BrdU (vermelho) e GFAP (verde) revela alteração na distribuição e organização das células GFAP(+) a partir da parede lateral dos ventrículos laterais.

4.3.5 - O incremento no número de células em fase S na SVZ em animais intoxicados pode ser interpretado como aumento na neurogênese?

Uma vez tendo observado um aumento significativo no número de células BrdU⁺ na SVZ dos animais tratados e com 24 horas de sobrevida após a administração de BrdU, nos perguntamos se estas novas células BrdU positivas de fato completam o ciclo celular. Através de reação imuno-histoquímica para BrdU e fosfohistona H3 (PH3, marcador de fase G2/M do ciclo celular) observamos que algumas células BrdU⁺ dos animais intoxicados com MeHg com 7 dias de sobrevida de BrdU, e 15 dias pós-intoxicação mercurial estão duplamente marcadas com BrdU e PH3, indicando que pelo menos algumas células do animal intoxicado completaram a mitose (Figura 29).

Realizamos a quantificação de núcleos PH3 na SVZ dos animais tratados e controle decorridos 15 dias da intoxicação mercurial. As reações imuno-histoquímicas mostraram uma diminuição significativa no número de células PH3⁽⁺⁾ em relação ao controle, indicando que pelo menos uma parte daquelas células que incorporam BrdU na fase S na SVZ, provavelmente não completam o ciclo celular (Figura 30).

A fim de obtermos um resultado mais conclusivo sobre a relação entre o número de células BrdU e PH3 positivas nos animais controle e tratados com MeHg, decidimos pela inclusão de um novo grupo de animais, onde decorridos 7 dias da intoxicação mercurial, os mesmos receberam uma única injeção de BrdU (100mg/Kg) com sobrevida de 8 horas. Optamos por este protocolo, pois com base na literatura entendemos que a fase S no animal adulto compreende um período de aproximadamente 8 horas (Zhang *et al.*, 2006). Assim, quantificamos do número de

células que incorporaram BrdU na fase S e que em seguida completaram mitose, permitindo-nos inferir que o MeHg afeta o ciclo celular (Figura 31).

Uma consequência direta da diminuição de mitoses na SVZ poderia ser a de que um menor número de neuroblastos atingiria as camadas granulares e glomerulares do bulbo olfatório. Após 7 dias de intoxicação mercurial e 15 dias de sobrevida após a injeção de BrdU – tempo suficiente para a migração de neuroblastos até as camadas do bulbo olfatório – quantificamos o número de células imunoreativas para BrdU em um retângulo de área conhecida que abrangia toda a profundidade do bulbo olfatório – da SVZ/RMS até a camada glomerular. Observamos uma redução significativa (90%) no número de células BrdU⁺ dos animais tratados em relação aos animais controle que alcançaram o bulbo olfatório (Figura 32). Isto indica que o MeHg interfere com a geração de progenitores que dão origem a interneurônios do bulbo e possivelmente com a migração celular para o bulbo olfatório.

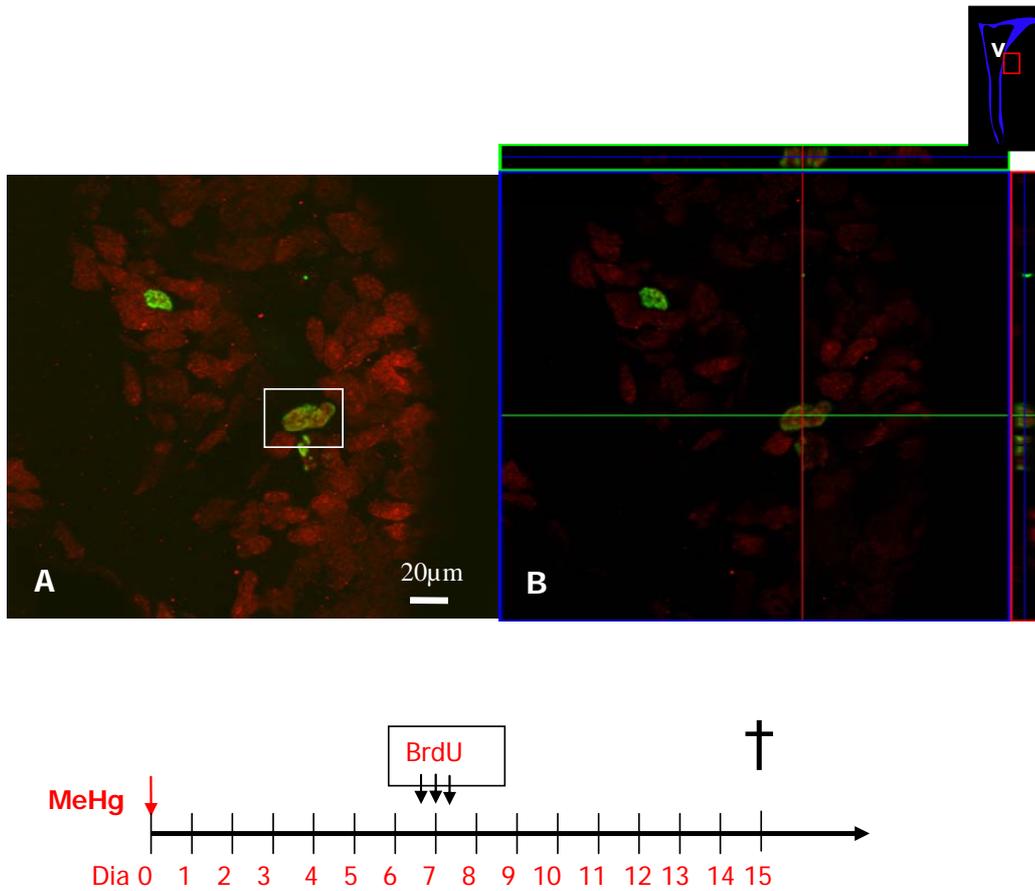


Figura 29 – Marcação de células positivas com os agentes BrdU e PH3 na SVZ: Algumas células BrdU(+) nos animais intoxicados com MeHg completam Mitose. Imunofluorescência para BrdU e PH3 após sobrevivência de 7 dias na SVZ dos animais intoxicados com MeHg (A). Em B, Imagem de microscopia confocal, demonstrando corte ortogonal da célula duplamente marcada, evidenciada pela caixa em A. Imunohistoquímica para BrdU (vermelho) e PH3 (verde).

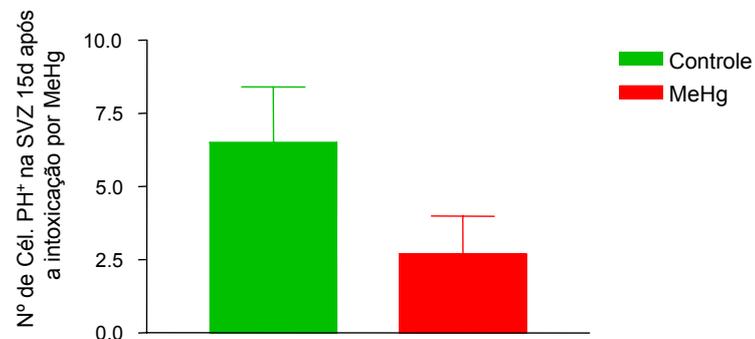


Figura 30 – Número de células PH3(+) na SVZ 15 dias após a intoxicação mercurial. Quantificação do número de células PH3(+) na SVZ dos animais controle e intoxicados com MeHg demonstra uma redução de 55% do número de células que completaram mitose 15 dias após a intoxicação por MeHg, comparado ao controle. Teste t, n = 3 por grupo. Barras representam as médias \pm dp.

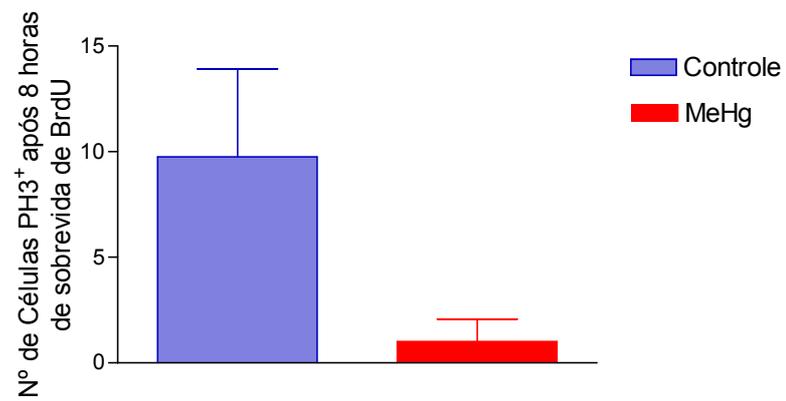


Figura 31 – Número de células PH3(+) na SVZ 7 dias após a intoxicação mercurial, com 8 horas de sobrevida de BrdU. Quantificação do número de células PH3(+) na SVZ dos animais intoxicados com MeHg demonstra uma redução de 85% do número de células que completaram mitose 7 dias após a intoxicação por MeHg, comparado ao controle. Teste t, n = 3 por grupo. Barras representam as médias ± dp.

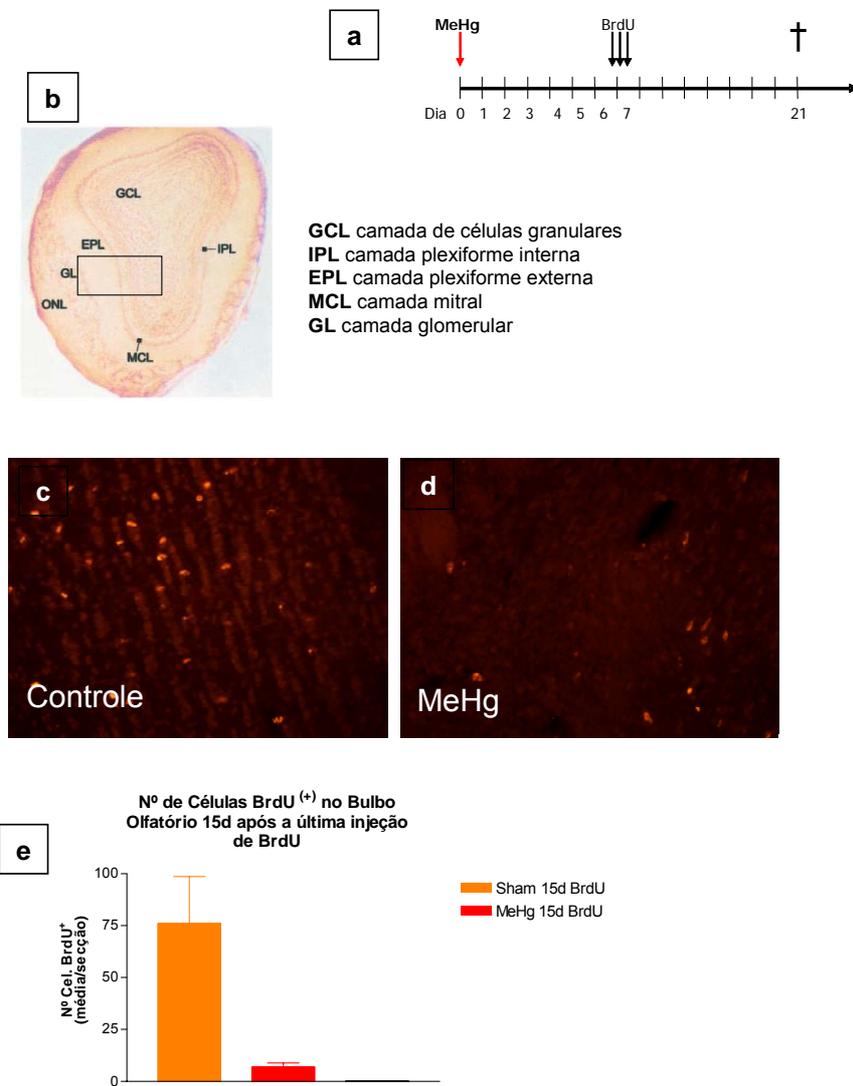


Figura 32 – Número de Células BrdU⁺ diminui no bulbo olfatório de ratos contaminados com MeHg. Desenho Experimental (a). A quantificação das células BrdU⁺ foi feita através da contagem dos núcleos positivos em cortes coronais, numa área de 600 x 300µM, englobando as diferentes camadas do bulbo olfatório (b) Imagens de imunofluorescência para BrdU no bulbo olfatório dos animais controle (c) e tratados com MeHg (d). Quantificação do número de núcleos BrdU⁺ no bulbo olfatório decorridos 15 dias após a última injeção de BrdU apresenta significativa redução de 90% no número de células BrdU⁺ que alcançaram o bulbo olfatório nos animais intoxicados em relação ao grupo controle, como demonstrado pelo teste t, com n = 5 por grupo. Barras representam as médias ± dp.

4.3.6 - Conclusões:

- A quantificação de Hg total 7, 15 e 21 dias após a intoxicação oral pelo MeHg revelou que praticamente 100% do mercúrio encefálico apresenta-se na forma orgânica mais neurotóxica (MeHg).
- Os resultados obtidos em relação à intoxicação pelo MeHg no organismo de ratos adultos, sugere a possível ocorrência de demetilação do MeHg no fígado.
- A intoxicação pelo MeHg aumenta em 40% o número de células a incorporar BrdU na SVZ de rato adulto no sétimo e décimo quinto dia após tratamento agudo com MeHg e com 24 horas pós-administração de BrdU.
- Por outro lado, não detectamos aumento na proliferação celular no GD, indicando que este modelo de lesão pode estar afetando diferencialmente o córtex cerebral e o hipocampo.
- O MeHg inibe em 85% a mitose de progenitores neurais na SVZ de rato adulto 15 dias após a intoxicação oral, indicando que pelo menos uma parte das células que incorporam BrdU na fase S na SVZ não completa o ciclo celular, possivelmente via arresto G2/M.
- A intoxicação mercurial diminui em 90% o número de células BrdU positivas que alcançam o bulbo olfatório com 15 dias de sobrevivência, indicando que o

MeHg interfere com a geração de progenitores para a SVZ e possivelmente com a migração de neuroblastos para o bulbo olfatório.

DISCUSSÃO

5.1 - Resposta das áreas proliferativas do cérebro adulto à intoxicação aguda pelo metilmercúrio

Este estudo demonstra que a intoxicação aguda pelo MeHg aumenta em 40% o número de células que incorporam BrdU durante a fase S na SVZ de ratos adultos em comparação com os animais controle. Este resultado surpreendente nos fez questionar se o acréscimo no número de células a incorporar BrdU na SVZ poderia ser realmente traduzido em aumento de proliferação celular. Mostramos que este aumento no número total de células em fase S não encontra correspondência no número de células que realiza mitose. Pelo contrário, há um decréscimo acentuado no número de células em mitose em comparação ao controle. Possivelmente, a lesão tecidual por intoxicação mercurial deflagra um sinal promotor de proliferação que, por razões que discutiremos subsequentemente, não se completa.

5.1.1 - A proliferação celular como resposta tecidual à lesão e os possíveis candidatos a promovê-la

5.1.1.1 - A adenosina trifosfato (ATP)

Atualmente, o ATP (adenosina trifosfato) extracelular é considerado capaz de modular a proliferação e a diferenciação de células-tronco no desenvolvimento e no adulto (Coppi *et al.*, 2007, Heo and Han, 2006, Mishra *et al.*, 2006, Weissman *et al.*, 2004, Ryu *et al.*, 2003).

Nossos resultados *in vitro* com intoxicação mercurial de astrócitos cerebrais pós-natais indicaram a possibilidade de que ATP seja liberado por estas células em condições de intoxicação mercurial aguda. A liberação de ATP foi deduzida indiretamente pelas evidências de abertura de poros resultante da ativação de receptores purinérgicos P2X7. Hipotetizamos, portanto que o mesmo efeito poderia ser obtido *in vivo*. Assim, o ATP, um candidato potencial a servir de sinal ativador da divisão celular, explicaria o resultado de aumento do número de células na fase S que encontramos na SVZ dos animais adultos intoxicados com MeHg. A SVZ sabidamente contém astrócitos considerados como as células-tronco desta camada germinativa (para revisão: Doetsch *et al.*, 1999, Gage, 2000). No entanto, outros progenitores intermediários estão presentes nesta região e poderiam também ser afetados diretamente pelo aumento de ATP extracelular.

Há, no entanto, evidências de que a regulação da proliferação pelo ATP possa ser positiva ou negativa. Células-tronco mesenquimais humanas obtidas de animais recém-natos (P0- P5) e mantidas em cultura liberam ATP espontaneamente, diminuindo os índices de proliferação (Coppi *et al.*, 2007). Esse grupo demonstrou que o ATP modula negativamente a proliferação, uma vez que obtiveram um aumento na proliferação induzido por antagonista do receptor purinérgico P2 não seletivo e pelo antagonista seletivo do receptor P2Y1. Contrariamente, na situação de intoxicação pelo metilmercúrio, o ATP poderia estar modulando positivamente a proliferação de progenitores neurais mantidos na SVZ adulta, talvez atuando com um deflagrador de proliferação prematura. A inibição do ciclo celular é geralmente considerada uma estratégia de proteção mediante um insulto tóxico, contudo tanto a SVZ quanto o GD em outros modelos de lesão também respondem aumentando os índices de proliferação, talvez como uma estratégia de reposição neuronal.

Yao-Hui *et al.* (2007) investigando os efeitos dos canais de potássio, sensíveis ao ATP, também sobre a proliferação e diferenciação de células pré-adipócitas de rato, demonstraram uma correlação entre a expressão dos canais de potássio sensíveis ao ATP e a proliferação dos pré-adipócitos: quando a expressão desses canais aumenta a proliferação dos pré-adipócitos é inibida. Por outro lado, França *et al.* (2007) demonstraram que o tratamento de culturas de células da retina embrionária com ATP aumenta a incorporação de [³H] timidina nas células que estão ciclando, porém, não induz células quiescentes a reentrarem no ciclo. Desta forma, podemos considerar que o efeito do ATP sobre a proliferação parece ser positivo nas células progenitoras neurais. Apesar da maioria dos trabalhos demonstrarem o efeito positivo do ATP sobre progenitores somente durante o desenvolvimento, nosso trabalho também tem como alvo progenitores neurais, porém na fase adulta, o que sabidamente mantém o potencial de célula progenitora, capaz de auto-renovação e diferenciação.

Diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos regulam a proliferação de células progenitoras durante o desenvolvimento do SNC. Atualmente há evidências crescentes de que na retina e no córtex cerebral em desenvolvimento, diversos neurotransmissores modulam a proliferação de células progenitoras (Martins *et al.*, 2006, dos Santos *et al.*, 2003, Pearson *et al.*, 2002). Neurotransmissores clássicos como o gaba, a glicina, o glutamato, a acetilcolina e não-clássicos como o ATP são liberados, via mecanismo vesicular e não vesicular, na retina imatura (Martins and Pearson, 2007).

Ryu *et al.* (2003) demonstraram que células-tronco neurais humanas, a partir do telencéfalo de embrião de 15 semanas de gestação, quando em cultura respondem ao ATP aplicado extracelularmente, aumentando a proliferação, um

evento mediado pela ativação da proteína cinase ribossomal p70S6. Essas células-tronco neurais apresentam receptores purinérgicos funcionais que estão associados com a mobilização do cálcio intracelular, cuja liberação de cálcio quase sempre acontece associada à proliferação. Um dos eventos preliminares na intoxicação pelo MeHg ao nível celular, é a alteração nos níveis de cálcio intercelular, reforçando nossa hipótese da ativação de poros P2X7 associado ao aumento na incorporação de BrdU nos animais tratados com MeHg.

Heo and Han (2006) demonstraram que o ATP estimula a proliferação de células-tronco embrionárias de camundongo através da ativação da via de PKC, PI3K/Akt e MAPKs e através dos receptores purinérgicos P2. Aplicando agonistas dos receptores P2X1 e P2X3 (AMP-CPP), um agonista do receptor P2Y (ATP-γS) e um agonista de P2X e P2Y (2-methylthio-ATP), os autores observaram um incremento na incorporação de [³H]timidina/BrdU.

No adulto, Mishra *et al.* (2006) demonstrou que neurosféricas cultivadas a partir da SVZ de camundongo expressam a ecto-nucleotidase2 e a isoforma da fosfatase alcalina tecido não específica, hidrolizando ATP extracelular para adenosina. Nas células da neurosfera o ATP evoca rápidas ondas transientes de Ca²⁺, mediadas exclusivamente pelos receptores nucleotídicos P2Y1 e P2Y2 e quando ativados por agonistas e baixas concentrações de adenosina aumentam a proliferação celular.

Com estes estudos, somado ao nosso resultado de ativação de poros P2X7 nas culturas astrocíticas pós-natais é possível inferir que o ATP agindo sobre as células-tronco neurais no adulto possa modular positivamente a proliferação de forma semelhante ao que ocorre durante o desenvolvimento. Uma hipótese plausível é que o ATP possa ser o agente ou um dos agentes promotores do aumento na

incorporação de BrdU que observamos na SVZ dos ratos adultos intoxicados com MeHg.

Recentemente, Lin *et al.* (2007) demonstraram que células progenitoras neurais nos dois nichos neurogênicos no cérebro adulto, os mesmos por nós estudados (SVZ e GD), expressam receptores purinérgicos P2Y e em resposta a antagonistas suprimem a proliferação e permitem a diferenciação em neurônios e glia *in vitro*. A remoção da inibição purinérgica faz retornar a proliferação de progenitores neurais. A presença desses receptores purinérgicos foi confirmada através de imuno-histoquímica para receptores purinérgicos P2Y1, P2Y2, P2Y4, assim como a co-localização de alta atividade de NTDPase (*Nucleoside Triphosphate Diphosphatase*), enzima que degrada ATP e que o exclui das áreas de transmissão purinérgica ativa, localizada na SVZ e no GD do cérebro de ratos adultos.

Estes dados reforçam nossa hipótese de que o aumento na incorporação de BrdU pelos progenitores na SVZ decorridos 7 ou 15 dias da intoxicação pelo MeHg possa ser explicado pela sinalização extracelular de ATP, uma vez que pelo menos nos ensaios em cultura de astrócitos derivados dos hemisférios cerebrais pós-natais, observamos a ativação de poros purinérgicos, P2X7 sensíveis ao ATP.

5.1.1.2 - O neurotransmissor glutamato como potencial regulador da neurogênese de animais intoxicados

A ativação do receptor de glutamato tem sido demonstrada como mais um provável agente regulador da proliferação celular. O glutamato tem um efeito anti-proliferativo sobre progenitores neuronais do córtex cerebral em desenvolvimento através dos receptores AMPA/Kainato (LoTurco *et al.*, 1995, Haydar *et al.*, 2000),

enquanto que a ativação do receptor NMDA tem um efeito proliferativo sobre células progenitoras do estriado (Luk *et al.*, 2003).

Embora o MeHg não afete somente os astrócitos, existe um conjunto de trabalhos que demonstra um papel chave para estas células como mediadoras da neurotoxicidade induzida pelo MeHg (Aschner *et al.*, 2007). Sabemos que o MeHg inibe a captação de glutamato e aspartato e estimula seu efluxo desencadeando a excitotoxicidade neuronal (Aschner *et al.*, 1993, Allen *et al.*, 2001, Shanker *et al.*, 2001).

Em nosso trabalho, confirmamos estes achados, determinando uma significativa diminuição na captação de aspartato (cerca de 90%) nas monocamadas astrocitárias tratadas agudamente com metilmercúrio. Hipotetizamos que o mesmo deve também estar ocorrendo *in vivo* e desta forma o aspartato/glutamato acumulado nos espaços extracelulares na SVZ possa atuar sinergisticamente com ATP, induzindo a proliferação que observamos na SVZ dos ratos adultos decorridos 7 e 15 dias da intoxicação aguda pelo MeHg. No entanto, ainda precisaremos testar se o glutamato ou o ATP tem efeito promotor da proliferação em nosso modelo. Tanto o glutamato como o ATP em concentrações elevadas podem ter efeitos deletérios sobre neurônios e astrócitos e desta forma, esta hipótese deve ser tratada com cautela.

Embasando nossos resultados, trabalhos recentes vêm apontando o glutamato como mais um agente modulador da neurogênese no adulto (Yao *et al.*, 2007, Melchiorri *et al.*, 2007, Nácher *et al.*, 2007), indicando a presença de alguns subtipos funcionais de receptores de glutamato nas células-tronco/progenitoras, envolvidos na regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência dessas células.

Em nosso modelo *in vitro* hipotetizamos também que o MeHg ativa a abertura de hemicanais de conexina presentes na membrana astrocitária permitindo a liberação de ATP (a presença de hemicanais também foi demonstrada em zonas proliferativas). O ATP liberado ativaria receptores purinérgicos (P2X7) abrindo poros, e também receptores P2Y reguladores de proliferação na SVZ. Os poros permitiriam a saída de glutamato e como consequência poderiam regular a proliferação de progenitores neurais na SVZ adulta. No entanto, dados obtidos neste trabalho não revelam diferenças significativas nas concentrações intracelulares de D-aspartato radioativo quando receptores P2X7 ou hemicanais são bloqueadores tanto para o efluxo quanto para o influxo de glutamato. O mais provável é que o glutamato se acumule no meio externo das células por via do bloqueio dos transportadores de glutamato (provavelmente do tipo GLAST, típico de astrócitos) promovido por MeHg.

5.1.1.3 - A resposta inflamatória como reguladora da proliferação

Além do ATP e do glutamato, uma variedade de citocinas tem sido apresentadas como moduladoras da proliferação e/ou diferenciação de progenitores neurais durante o desenvolvimento embrionário (Nakanishi *et al.*, 2007, Nagao *et al.*, 2007) ou na fase adulta em ambos os sítios neurogênicos, SVZ (Bauer & Patterson, 2006, Bonnert *et al.*, 2006) e hipocampo (Sehara *et al.*, 2007, Buckwalter *et al.*, 2006).

Neste trabalho, diferentemente do observado na SVZ, observamos que o GD do hipocampo, mesmo apresentando concentração similar de mercúrio (2,6 µg/g), quando comparado com os hemisférios cerebrais e cerebelo, não disparou nenhuma

resposta proliferativa em relação à intoxicação aguda pelo MeHg, indicando que este modelo de lesão pode afetar diferencialmente o córtex cerebral e o hipocampo.

Há evidências para um efeito diferencial sobre a proliferação na SVZ em relação ao hipocampo, por exemplo, em relação à realização de exercícios (Komitova *et al.*, 2005). Além disso, Arvidson *et al.* (2002) demonstraram que a reposição celular após lesão traumática ocorre primeiramente a partir de progenitores da SVZ, antes dos progenitores do GD. Alguns fatores poderiam explicar este contraste na modulação da neurogênese nestes dois nichos proliferativos tais como: heterogeneidade dos progenitores em relação ao repertório de receptores, especificidades do ambiente, o tipo de resposta inflamatória produzida em cada estrutura, entre outros.

Sehara *et al.* (2007) demonstraram que o fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF) aumenta a proliferação no GD de rato adulto após isquemia cerebral focal. Por outro lado, Bauer & Patterson (2006) analisando os efeitos do Fator de Inibição de Leucemia (LIF) sobre progenitores no cérebro adulto normal observaram uma redução na neurogênese na SVZ e no bulbo olfatório. LIF parece atuar promovendo a auto-renovação de células-tronco neurais adultas em detrimento do aparecimento de tipos celulares diferenciados. Este mesmo grupo demonstrou anteriormente (Bauer *et al.*, 2003) que LIF foi requerido para a proliferação de progenitores neuronais no cérebro adulto induzido por lesão, regenerando o epitélio do bulbo olfatório.

O papel das citocinas sobre a neurogênese no adulto ainda parece um assunto diverso e controverso. Buckwalter *et al.* (2006) demonstraram que TGF- β 1 (do inglês *transforming growth factor*) cronicamente aumentado inibe amplamente a

neurogênese hipocampal em camundongos idosos. Usando também a marcação para BrdU em camundongos transgênicos/TGF- β 1, os autores confirmaram a diminuição na neurogênese, seguida por uma diminuição similar na astrogliogênese. O tratamento preliminar de células progenitoras neurais com TGF- β 1 inibe a proliferação, sugerindo que TGF- β 1 afeta diretamente os progenitores antes de sua diferenciação em neurônios e astrócitos. O TGF- β 1 está correlacionado com a diferenciação de células de glia radial em astrócitos (para revisão: Gomes *et al.*, 2005). É possível que o TGF- β 1 esteja sendo liberado com a intoxicação mercurial levando ao aumento da gliose reativa no hipocampo. No entanto, não parece haver qualquer diferença na proliferação hipocampal do controle para o intoxicado. O balanço entre fatores como o ATP e o TGF- β 1 talvez possa explicar a diferença marcante entre estas duas zonas proliferativas.

O ATP extracelular liberado no tecido neural lesionado pode provocar astrogliose reativa ativando receptores purinérgicos associados com a proliferação de astrócitos normalmente quiescentes (Sriram *et al.*, 2004, Abbracchio *et al.*, 1994, Franke *et al.*, 1999, 2001, Neary *et al.*, 1994b). Segundo Fukada *et al.* (1998) e Washburn & Neary (2006) o fator transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) tem sido implicado na astrogliose reativa, desempenhando importante papel na regulação do ciclo celular de astrócitos do córtex cerebral pós-natal.

Em astrócitos, a expressão de STAT3 é positivamente regulada sob condições neuropatológicas tais como a encefalomielite autoimune (Jee *et al.*, 2001) e a isquemia (Justicia *et al.*, 2000), o que poderia auxiliar a explicar o aumento na expressão de GFAP que observamos no hilo hipocampal dos animais intoxicados pelo MeHg, mesmo na ausência de aumento de proliferação. Embora não tenhamos resposta de outros marcadores de resposta inflamatória tecidual à intoxicação pelo

MeHg, a gliose reativa está presente tanto no hipocampo, que apresenta um aumento significativo na expressão de GFAP, quanto na SVZ, onde o MeHg altera também o padrão de distribuição e organização das células GFAP positivas.

5.1.2 Incorporação de BrdU em células durante o ciclo celular ou em processo de morte?

Nossos resultados mostraram que mesmo após 15 dias da intoxicação aguda pelo MeHg, células progenitoras na SVZ de ratos adultos continuam apresentando um aumento na incorporação de BrdU, comparado aos controles. A marcação para BrdU nos animais intoxicados mantém o mesmo padrão dos controles, ou seja, não apresenta diferenças marcantes na morfologia nuclear indicativas de morte celular. No entanto, o número de células fosfohistona H3⁺ (marcadas com anticorpo que detecta a forma fosforilada da histona3), ou seja, aquelas que completaram mitose, também diminuiu, indicando que pelo menos uma parte das células que incorporam BrdU na fase S na SVZ não completou o ciclo celular. Segundo achados de outros autores este arresto no ciclo celular decorrente da intoxicação mercurial poderia ocorrer na fase G2/M durante as fases iniciais do desenvolvimento cerebral (Ponce *et al.*, 1994, Rodier *et al.*, 1984), no desenvolvimento cerebelar pós-natal (Sager & Matheson, 1998), assim como, na gliogênese pós-natal inicial (Kakita *et al.*, 2003).

A síntese de DNA por neurônios maduros que sofreram algum tipo de dano tem sido um mecanismo proposto como preliminar à morte celular (Liu & Greene 2001, Kuan *et al.*, 2004). Os resultados dos estudos de Kuan e colaboradores (2004) demonstrando um grande número de neurônios hipocampais duplamente marcados para BrdU e TUNEL em decorrência de um severo insulto isquêmico-hipóxico embasa de certa forma esta noção. No entanto, nenhuma evidência foi encontrada

pelos autores de que progenitores da SVZ e do GD do hipocampo tivessem entrado no ciclo celular a caminho de sua morte.

Kakita *et al.* (2003), avaliando os efeitos do MeHg sobre a gliogênese no período pós-natal inicial (P2), demonstraram que a intoxicação mercurial age alterando a migração radial e gerando um padrão de distribuição anormal. Apesar de não observarem diferença significativa no número de células BrdU⁺ nos animais intoxicados, esses autores observaram a tendência de um grande número de células BrdU⁺ acumularem nas camadas profundas (VI e V) das áreas motoras e sensoriais (P7) e na substância branca (P28), indicando a ocorrência de um possível atraso na migração ou a ocorrência de arresto G2/M. Em nossos resultados, não observamos células BrdU⁺ que partem da SVZ fora da rota migratória para o bulbo olfatório, mas observamos que um número muito reduzido dessas células alcançaram o bulbo olfatório após 15 dias de sobrevivência de BrdU, sugerindo também a ocorrência de arresto G2/M. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de que o MeHg interfira em outras fases do ciclo celular, alterando por exemplo, os níveis de expressão de ciclinas fase- específicas.

Zhang *et al.* (2006) mostraram que um insulto isquêmico causa diminuição na fase G1 do ciclo celular, resultando em um ciclo total menor, sem alteração nas fases S, G₂ e M. Miller e seus colaboradores (1989, 2005) demonstraram que a exposição ao etanol, outra substância neurotóxica, alonga o ciclo celular de progenitores dispostos na zona ventricular, possivelmente através de diminuição na expressão de ciclina D1, uma proteína da fase G1 do ciclo celular. Certamente esta é uma das novas etapas da continuidade de nosso trabalho, na tentativa de especificar a fase do ciclo celular bem como a maquinaria envolvida na resposta da intoxicação mercurial.

5.1.3 - Hipóteses para a interrupção do ciclo celular

Os efeitos do MeHg parecem ocorrer de forma diversa sobre a progressão do ciclo celular, inibindo a mitose em células de glioma (Miura *et al.*, 1978), induzindo arresto mitótico G2/M em células de mesencéfalo embrionário (Ponce *et al.*, 1994), em células embrionárias do encéfalo em E12 (Rodier *et al.*, 1984) e em neurônios cerebelares (Sager & Matheson, 1998).

Kim *et al.* (2007) examinaram o efeito do MeHg sobre a diferenciação de células de neuroblastoma (SH-SY5Y), induzidas pelo tratamento com ácido retinóico. O MeHg inibiu a diferenciação induzida pelo ácido retinóico em células SH-SY5Y por uma via dependente de ERK1/2 e PKC.

Consistente com nossos dados, os resultados de Gribble *et al.* (2005) indicam que baixas doses de MeHg causam inibição do ciclo celular de fibroblastos de camundongo embrionário *in vitro*, na ausência de citotoxicidade. Ponce *et al.* (1994) em cultura primária de mesencéfalo embrionário, demonstrou também padrões similares de arresto G2/M comparando MeHg e colchicina, um estabilizador de microtúbulos. Gribble *et al.* (2005) observaram um arresto temporário e recuperável em células p53^{-/-} (fibroblastos), seguindo o tratamento com 1.0 µM MeHg, levando à inibição de G2/M em 24 horas. Essa inibição foi abolida em 48 horas, sendo acompanhada por células progredindo para um novo ciclo em proporções similares aos controles.

De forma semelhante, nós observamos mudanças mínimas na viabilidade celular dos astrócitos mantidos *in vitro*, porém observamos efeitos significativos sobre a permeabilidade de membrana e comunicação juncional. Isso permite que estabeleçamos uma correlação com nossos resultados *in vivo*, uma vez que mesmo

decorridos 15 dias da intoxicação oral aguda não detectamos núcleos com morfologia condensada. No entanto, efeitos significativos sobre o ciclo celular foram observados com uma concentração *in vivo* de 2,6 µg/g de MeHg nas estruturas encefálicas analisadas. Esta concentração é consistente com estudos de Rodier *et al.* (1984) na zona ventricular embrionária e de Sager *et al.* (1984) na neurogênese do cerebelo P2, que indicaram que concentrações de 2 µg/gm *in vivo* e 3 µg/gm *in vitro* podem produzir mudanças específicas no ciclo celular neuronal de camundongo.

Neste contexto, nosso trabalho é o primeiro que demonstra o efeito *in vivo* do MeHg (intoxicação aguda) sobre progenitores neurais no adulto, nas áreas que mantêm potencial proliferativo no cérebro adulto saudável (SVZ e DG). Devido a grande resposta do cérebro pré-natal ao MeHg muitos são os trabalhos que tentam entender o mecanismo desta neurotoxicidade, porém o cérebro adulto mantém importante e talvez similar suscetibilidade à forma orgânica do mercúrio, o que lhe acarreta distúrbios também irreversíveis.

Miura *et al.* (1999) demonstraram que o MeHg causa fragmentação do DNA em células de neuroblastoma de camundongo e sugerem que o arresto na fase G2/M possa ocorrer através de alterações nos microtúbulos impedindo que o fuso mitótico efetue a separação dos cromossomos. Ou *et al.* (1999) buscando identificar os mecanismos moleculares subjacentes à inibição do ciclo celular pelo MeHg, avaliaram o envolvimento de p21, um gene regulador do ciclo celular, implicado nas fases G1 e G2 do arresto do ciclo celular, em células embrionárias e adultas de camundongo expostos ao MeHg. Os resultados demonstraram que o MeHg pode provocar a ativação de p21 em células embrionárias do SNC mantidas em cultura. A ativação da expressão de p21 observada neste estudo é consistente com efeitos

descritos previamente do MeHg sobre a cinética do ciclo celular (Ponce *et al.*, 1994) e sobre a inibição da síntese de DNA (Roy *et al.*, 1991), todos relacionados à intoxicação mercurial pré-natal.

5.2 - Cinética do metilmercúrio no organismo de roedor adulto

Nos humanos, assim como em outros mamíferos (por ex., cetáceos e ratos), o MeHg alcança o feto através da placenta (Marques *et al.*, 2007; Sakamoto *et al.*, 2002; Lewandowski *et al.*, 2002). A partir do período pós-natal, o MeHg é absorvido a partir da alimentação, principalmente através da ingestão de peixe, o que representa ainda nos tempos atuais uma importante preocupação para saúde pública (WHO, 1990). Analisou-se neste trabalho o padrão de acumulação do MeHg em ratos adultos, demonstrando que após 7 dias de uma intoxicação aguda, com dose única moderada (5mg/Kg), o MeHg preferencialmente se acumulou nas suas estruturas encefálicas. Como demonstramos nos resultados, praticamente 100% do mercúrio encontrado nos hemisférios cerebrais e no cerebelo apresentou-se na sua forma orgânica metilada; este fato indica um fácil trânsito do MeHg através da barreira hemato-encefálica.

5.2.1- **Sistema Nervoso Central: alvo principal do Metilmercúrio**

Na análise pós-morte de cérebros dos pacientes adultos portadores da Doença de Minamata, observou-se um acúmulo preferencial do MeHg no cerebelo e córtex cerebral visual e somestésico (Takeuchi *et al.*, 1989). Neste trabalho foram

quantificadas as concentrações de THg nos hemisférios cerebrais, no hipocampo e no cerebelo, bem como as concentrações de MeHg nos hemisférios cerebrais e cerebelo dos ratos adultos. As concentrações de Hg encontradas foram muito similares nessas estruturas encefálicas, nos três períodos de sobrevivência dos animais, após a intoxicação aguda (7, 15 e 21 dias). Talvez a diferença entre nosso resultado e o obtido através da análise pós-morte de cérebros dos pacientes adultos portadores da Doença de Minamata possa ser explicada em função dos diferentes modos de intoxicação. Enquanto uma vez que nos portadores da Doença de Minamata a intoxicação por MeHg foi crônica com baixas doses de MeHg, em nosso protocolo de trabalho, a intoxicação foi aguda, mediante administração de uma dose moderada única, administrada diretamente no estômago do animal. Assim, a concentração de MeHg aplicada no modelo de intoxicação aguda atinge todo o encéfalo, fato confirmado pelas semelhanças nas concentrações do metal observadas no hipocampo, hemisférios cerebrais e cerebelo, 7, 15 e 21 dias após a intoxicação.

Vale ressaltar que mesmo uma única dose moderada é capaz de provocar efeitos prolongados, uma vez que permanecem no cérebro por todo o período estudado (durante as 3 semanas). De fato, com base em nossos resultados *in vivo*, a dose única de MeHg parece afetar funções específicas por todo este tempo como, por exemplo, a neurogênese e gliose reativa no cérebro adulto. Algumas agências internacionais, que monitoram os níveis de exposição ao mercúrio orgânico (ATSDR, 1999; WHO, 1990), vêm confirmando a ocorrência de efeitos sutis decorrentes da intoxicação por doses subtóxicas de MeHg; ao mesmo tempo tem alertado quanto à severidade desta intoxicação e a necessidade de monitoramento de áreas potencialmente suscetíveis à contaminação ambiental e humana.

No cérebro, o MeHg pode ser convertido em mercúrio inorgânico e segundo alguns trabalhos, o íon de mercúrio inorgânico derivado de MeHg parece ser mais tóxico para o SNC do que a própria forma orgânica (Clarkson, 2002; Adachi & Kunimoto, 2005). No trabalho atual, no entanto, demonstramos que em todos os períodos de sobrevivência utilizados, as maiores porcentagens de mercúrio na forma orgânica foram encontradas nas estruturas encefálicas em comparação com os demais órgãos. Sugere-se, portanto, que o MeHg permaneceu estável no cérebro de roedores adultos durante as primeiras semanas após a intoxicação, fato consistente com dados prévios em humanos e roedores, indicando uma meia-vida longa para o MeHg nos organismos biológicos (WHO, 1990). A permanência do MeHg por tempos prolongados no SNC também é corroborada pela persistência de disfunções específicas.

5.2.2- *Relações entre mercúrio e metilmercúrio nos diferentes órgãos do rato adulto*

A análise da especiação das formas de mercúrio presentes no cérebro e cerebelo dos animais 15 dias após a intoxicação mostrou que realmente toda a forma orgânica de Hg encontra-se na forma MeHg. Isto reforça o nosso entendimento de que a maior parte do MeHg que atravessa a barreira hematoencefálica se mantém na forma orgânica mais neurotóxica, pelo menos nas duas primeiras semanas após o acesso ao cérebro. Contudo, evidências indicam que o metilmercúrio pode ser lentamente convertido em mercúrio inorgânico no organismo dos mamíferos. Segundo Clarkson (2002), o mercúrio inorgânico transformado pelo MeHg se acumula lentamente no SNC, onde reside por longos períodos. É possível que esta discrepância com a literatura se deva ao tempo de sobrevivência dos animais

Oliveira *et al.* (2001) analisando a distribuição de THg em fêmeas grávidas de hamsters e nos respectivos neonatos, também a partir de dose única de MeHg marcado radioativamente, demonstrou que a concentração de Hg²⁰³ nas mães foi maior nos rins, seguidos pelo fígado e cérebro. Entretanto, o Hg²⁰³ nos rins e fígado das mães apresentou-se principalmente como mercúrio inorgânico. Da mesma forma, nossos resultados em ratos adultos demonstraram que os rins e o fígado apresentaram as maiores concentrações de Hg. Contudo observamos que as concentrações de MeHg se mantêm inalteradas nos rins, enquanto que no fígado, as mesmas diminuem significativamente decorridas duas semanas da intoxicação pelo MeHg. Diferenças nas concentrações de mercúrio total e a sua relativa proporção nas formas orgânica e inorgânica no fígado dos vertebrados marinhos podem ser consideradas como conseqüências da interação de alguns fatores, tais como, dieta alimentar, eliminação e estocagem/detoxificação (Thompson & Furnes, 1989; André *et al.*, 1991). Neste trabalho, todos os animais intoxicados receberam exatamente a mesma dose oral de MeHg. Desta forma, as diferenças nas concentrações de Hg e MeHg encontradas entre os órgãos dos diferentes animais analisados se devem às diferenças individuais que podem incluir, diferenças na capacidade de eliminação ou estocagem das formas detoxificadas de mercúrio. Todos os animais incluídos no estudo apresentavam o peso médio de 260 g e eram separados da mãe a partir do primeiro mês de vida, recebendo a partir de então, a mesma dieta alimentar. Deste modo, podemos descartar diferenças em função de dieta.

5.2.3- **Metilmercúrio: padrão de acumulação e desmetilação em mamíferos**

Decorridos 15 dias da administração oral de dose única de MeHg a porcentagem de MeHg em relação ao mercúrio total aumentou ligeiramente nos rins (51%) e diminuiu drasticamente no fígado (8%). A desmetilação é um processo de transformação de mercúrio orgânico em uma forma inorgânica complexada menos tóxica, e que poderia explicar esta diminuição da forma orgânica no fígado. Tanto o fígado como os rins funcionam no organismo como órgãos detoxificadores, o que já é bem demonstrado para excreção de outras substâncias tóxicas, incluindo o mercúrio na forma inorgânica. Por outro lado, pouco se conhece sobre o mecanismo de desmetilação do MeHg no fígado, assim como em outras vísceras. Nossos resultados sugerem que a desmetilação do MeHg possa estar ocorrendo neste órgão, não descartando a possibilidade de que a desmetilação também possa ocorrer no próprio trato digestório (não analisado).

Difícilmente poderíamos explicar nossos resultados pela excreção do MeHg. Como descrito por Turner *et al.* (1975), nas fezes a forma de mercúrio presente está principalmente na forma inorgânica, enquanto que a forma orgânica liberada nos intestinos a partir da bile é reabsorvida na corrente sanguínea, formando o ciclo entero-hepático do MeHg. Ademais nossos resultados de mercúrio total indicam que boa parte do mercúrio presente no fígado se encontra na forma inorgânica.

Elevadas concentrações de mercúrio têm sido encontradas em alguns mamíferos e aves marinhas (por ex., golfinhos, albatroz) que se alimentam de peixes (Ikemoto *et al.*, 2004). Alguns estudos propõem a ocorrência de interações químicas entre o mercúrio e o selênio, indicando a existência de um possível mecanismo que conduza a detoxificação do MeHg em uma forma de mercúrio inorgânica ligada ao

Se, inerte e menos tóxica para os mamíferos, onde no produto final são encontrados os grânulos inertes de seleneto de mercúrio (HgSe) em uma razão equimolar (para revisão: Leonzio *et al.*, 1992; Endo *et al.*, 2002; Cuvin-Aralar & Furness, 1991).

Evidência direta da ocorrência de um produto mercurial menos tóxico derivado da interação entre mercúrio e selênio foi demonstrada pela primeira vez por Martoja & Viale (1977), que identificaram no fígado de golfinhos grânulos minerais insolúveis compostos de seleneto de mercúrio. Numa análise histológica mais específica, Nigro e Lenzio (1996), hipotetizaram que a precipitação de seleneto de mercúrio ocorreria principalmente no interior de macrófagos. Trabalhos recentes começam a apontar novas evidências sobre o papel do selênio no processo de desmetilação do metilmercúrio. Endo *et al.* (2002) observaram uma alta correlação entre as concentrações molares de THg e selênio no fígado e rins de mamíferos marinhos, apoiando a idéia de que a formação de um complexo de Hg-Se provavelmente contribua para a destoxificação através da conversão da forma metilada de mercúrio em Hg-Se no organismo de cetáceos permitindo acúmulo de Hg no fígado.

Kehrig *et al.* (2004) analisando as correlações entre mercúrio e selênio em tecidos de peixes e mamíferos da costa brasileira demonstraram que somente as espécies de mamíferos estudadas apresentaram relação significativa entre as concentrações molares de mercúrio e selênio (1:1), sugerindo a possível formação do composto seleneto de mercúrio, como uma estratégia de destoxificação via desmetilação do MeHg no fígado. Recentemente, Seixas *et al.*, (2007) estudando outra espécie de golfinho da costa brasileira mostraram uma correlação entre Se e Hg de 4:1, sugerindo que nem sempre a relação é equimolar. Em nosso estudo, apesar de ainda não termos os resultados da análise da presença de grânulos de

seleneto de mercúrio no fígado dos ratos adultos intoxicados pelo MeHg, pode-se considerar a possibilidade de que a desmetilação esteja ocorrendo no fígado, uma vez que a concentração de MeHg neste órgão diminui significativamente durante todo período de sobrevivência dos animais após a intoxicação aguda.

Estudos na Amazônia brasileira demonstraram que a concentração de Hg no cabelo de mulheres foi independente da idade gestacional, porém detectaram baixa concentração de Se nas mulheres grávidas, indicando talvez a exigência de alto consumo mineral necessário ao metabolismo fetal durante a gravidez, ao mesmo tempo incluindo um mecanismo protetor aos efeitos citotóxicos do mercúrio (Pinheiro *et al.*, 2005).

5.3 - Respostas de astrócitos à intoxicação aguda pelo metilmercúrio

Nosso estudo *in vitro* demonstra que a intoxicação aguda pelo metilmercúrio inibe a comunicação astrocitária mediada por junção comunicante a partir da concentração de 10 μ M por 30 minutos de incubação. Ampliando a concentração para 30 μ M por 30 minutos de incubação, toda a monocamada astrocitária se apresenta permeabilizada, situação observada pelo carregamento direto do permeante *Lucifer Yellow*, não se reconhecendo mais o padrão convencional de onda de espalhamento de corante, típico para a comunicação juncional em monocamadas confluentes de células acopladas, revelada pela técnica de *scrape loading*. Ensaios com corantes de grande peso molecular indicaram que a permeabilização observada não se deve à ruptura da membrana. Tais resultados

nos levaram a hipotetizar que o MeHg estaria alterando a permeabilidade da membrana dos astrócitos, abrindo hemicanais conexina 43, além de outros possíveis poros de membrana, como hemicanais panexina e poros purinérgicos. Nossos experimentos revelaram também o bloqueio da permeabilização astrocitária evocada por MeHg com os peptídeos miméticos para as alças extracelulares de Cx43, P26 e P27, enfraquecendo a possibilidade de envolvimento significativo de panexinas (insensíveis a estes peptídeos por ausência total de homologia estrutural com a classe das conexinas) e de poros associados a receptores P2X7. Em condições de intoxicação mercurial, poros atribuíveis à ativação de P2X7 nestes astrócitos em cultura também estiveram ausentes em nossos registros eletrofisiológicos (classe de ensaios não incluídos nesta tese – colaboração Xavier, R. e Alves, L.A. – FIOcruz), enquanto detectamos consistentemente a abertura de canais do tipo poros atribuíveis em termos de condutância unitária e sensibilidade farmacológica, aos hemicanais de conexinas). Nossos resultados com manobras de carregamento direto de corantes (*dye uptake*) sugeriram, no entanto, a possibilidade de que através dos hemicanais, o ATP pudesse estar sendo secretado para o meio extracelular, levando à permeação de fluorocromos através da abertura de poros P2X7. Além disso, confirmamos que o sistema de captação de aminoácidos excitatórios também é alterado com a intoxicação mercurial.

5.3.1 - *Junções comunicantes são afetadas por intoxicação mercurial*

Como demonstrado na literatura, os efeitos do MeHg são dependentes de tempo e concentração (Sakamoto *et al.*, 2004, Burbacher *et al.*, 1990, Amin-Zaki *et*

al., 1981, Harada, 1978), incluindo desde efeitos sutis a deficiências cerebrais irreversíveis.

Demonstramos com este trabalho que baixas concentrações de MeHg (500 nM por 3 dias, 1 e 10 μ M por 10 minutos de incubação) não afetam a comunicação celular mediada por junções comunicantes nos astrócitos dos hemisférios cerebrais pós-natal testados aqui. Contudo, na concentração de 10 μ M de MeHg detectamos uma diminuição na comunicação juncional quando o tempo de incubação foi ampliado para 30 minutos.

Apenas três estudos anteriores relacionaram aos efeitos do MeHg sobre a comunicação juncional. Schirmacher *et al.* (1998), demonstraram que a comunicação juncional em osteoblastos de roedor é bloqueada em 45% na concentração de 1 μ M por 20 minutos de incubação. Ampliando a concentração para 10 μ M por 30 minutos de incubação a comunicação juncional foi bloqueada em 79%. Yoshida *et al.* (1998) em células tubulares proximais renais demonstraram que a comunicação juncional é completamente bloqueada após 20 minutos do tratamento das culturas com 30 μ M de MeHg. Além desses, Zefferino *et al.* (2005) demonstraram que a comunicação juncional em queratinócitos humanos também é bloqueada quando as culturas são tratadas por 24 horas com 250nM de MeHg.

Ainda que *in vitro*, nosso trabalho é o primeiro a demonstrar, que a comunicação juncional em astrócitos é alterada pelo MeHg, mesmo em doses únicas e moderadas de intoxicação. O bloqueio da comunicação juncional astrocitária corrobora parcialmente os achados anteriores, confirmando uma resposta celular dependente de concentração. É importante observar que a conexina 43, principal conexina dos astrócitos, também é a conexina principal nos outros modelos testados, gerando a expectativa de padrões similares de resposta ao MeHg. Nossos

resultados com as culturas primárias de astrócitos de rato, no entanto, contrastam, de um modo geral, com os encontrados nos outros sistemas. Justificando estas diferenças poderíamos sugerir a possibilidade de arranjos multi-protéicos diferentes (parceiros moleculares), na dependência do tipo celular envolvido e das condições de cultura, conforme, revisto recentemente quanto às associações das conexinas, incluindo a Cx43, com diferentes proteínas, sejam estas proteínas de membrana, de citoesqueleto, catalíticas ou reguladoras (Hervé *et al.*, 2004).

5.3.2 - *Intoxicação mercurial provoca permeabilização da membrana astrocitária: o papel de hemicanais e poros P2X7*

Nosso trabalho demonstra também pela primeira vez, que uma concentração moderada de intoxicação pelo MeHg (30 μ M por 30 minutos) gera alterações na permeabilidade da membrana astrocitária. Vimos que se deve à abertura de poros, e que estes poros seriam atribuíveis a abertura de hemicanais de conexina e ativação de receptores P2X7 com abertura de poros associados a estes. Reforçando a hipótese de envolvimento de hemicanais temos a inibição do carregamento direto do fluorocromo *Lucifer Yellow* na presença de bloqueadores juncionais clássicos e que sabidamente bloqueiam hemicanais (CBX, GA, GZ e LaCl₃), assim como, na presença de bloqueadores de poros P2X7 (BBG, MgCl₂ e oATP). Em circunstâncias de lesão, o bloqueio ou a ampliação da comunicação juncional podem ser interpretados como mecanismos celulares de retenção da toxicidade num compartimento tecidual ou dissipação desta na rede celular, respectivamente. É possível que este seja um aspecto positivo da resposta astrogliar ao sofrimento celular causado por MeHg. Uma vez que o MeHg competiria com sítios moleculares

de ligação ao cálcio, e sabendo que níveis altos de cálcio (intra e/ou extracelular) têm sido classicamente associados ao fechamento dos canais juncionais (Loewenstein *et al.*, 1992), poder-se-ia postular este como um dos possíveis mecanismos pelos quais a intoxicação por este agente mercurial poderia estar inibindo o acoplamento elétrico em astrócitos.

A possibilidade de carregamento do fluopermeante por perda de integridade da membrana astrocitária foi descartada neste trabalho, uma vez que o carregamento provocado por MeHg limita-se a moléculas pequenas, responde aos inibidores farmacológicos de comunicação juncional, aos bloqueadores de poros purinérgicos e é um fenômeno reversível mediante remoção do MeHg. Concluimos, portanto, que o carregamento de corante pela monocamada astrocitária seja um fenômeno mediado por poro.

Nossas evidências demonstram que a permeabilização da membrana astrocitária induzida pelo MeHg *in vitro* é em grande parte devida à abertura de *conexons* não justapostos, os hemicanais, conclusão sustentada pelos seguintes pontos: 1- esses poros mostraram-se permeáveis a fluorocromos conhecidos como permeantes de junções comunicantes, 2- o carregamento de *Lucifer Yellow* é inibido através dos bloqueadores de junção comunicante (CBX, GZ, GZA), 3- o carregamento é totalmente abolido na presença de LaCl_3 , um conhecido bloqueador seletivo de hemicanais (Contreras *et al.*, 2002), 4. o carregamento é totalmente inibido por peptídeos miméticos de alças extracelulares de conexinas (resultados não mostrados realizados por Maira Monteiro Fróes no laboratório do Dr. Christian Giaume, Collège de France, Paris, França).

Nossas manobras farmacológicas em ensaios de captação de corante sugerem também a contribuição de poros P2X7 para explicar o carregamento direto

de *Lucifer Yellow* em condições de 30 μ M de MeHg por 30 minutos de incubação. Mesmo não tendo detectado um bloqueio total do carregamento como observado com os bloqueadores de hemicanais, o carregamento foi significativamente atenuado pelos reconhecidos bloqueadores de poros P2X7 (BBG, MgCl₂, oATP). A monocamada astrocitária na presença de BBG e oATP mantinha ainda conjuntos de células exibindo captação de corante. Isto sugere que a monocamada astrocitária apresenta sub-populações de astrócitos que são resistentes ao bloqueio purinérgico e que, talvez, apresentem prevalência de hemicanais Cx43 sobre os poros P2X7. Hofer e Dermietzel (1998) demonstraram resultados similares em culturas de astrócitos corticais permeabilizados por baixos níveis de cálcio.

Considerando que os bloqueadores juncionais aboliram completamente a permeabilização da membrana dos astrócitos induzida pelo MeHg, hipotetizamos que a permeabilização mediada por hemicanal de Cx43 poderia estar anterior à ativação de receptores P2X7 e à formação de poros de P2X7. Alguns grupos vêm demonstrando que hemicanais são poros putativos para liberação de ATP por astrócitos (Cotrina *et al.*, 1998, Stout *et al.*, 2002, Pearson *et al.*, 2005a). No nosso modelo, sugerimos que o ATP poderia estar sendo secretado por hemicanais e, quando na ambiência extracelular, ativaria receptores P2X7, o que levaria à abertura de poros P2X7.

De fato, a liberação de ATP mediada por hemicanais de conexina foi demonstrada por Zhao *et al.* (2005), indicando que hemicanais CX43 nas células suporte cocleares liberam ATP em condições fisiológicas. Além disso, esses autores demonstraram que concentrações nanomolares de ATP extracelular podem alterar a eletromotilidade das células ciliadas externas através da ativação de receptores purinérgicos P2.

Alguns estudos, contudo, têm descartado o envolvimento de conexinas na ativação do receptor P2X7 e captação de corante (Steinberg & Di Virgilio, 1991; Hickman *et al.*, 1996).

Recentemente, as panexinas vêm sendo demonstradas como mais uma família de proteínas que pode participar da formação do poro associado ao receptor P2X7. Pelegrin & Surprenat (2006), demonstraram que a Panx1 de mamífero funciona como um hemicanal quando expressa ectopicamente, permitindo a captação do corante. Recentemente, Thompson e colaboradores (2006) e Pelegrin e Surprenant (2006) demonstraram que LaCl_3 não tem nenhum efeito sobre as correntes mediadas por Panx1 ou sobre a captação de corante em oócitos. Ainda, Locovei e colaboradores (2007) demonstraram que panexina1 parece ser o substrato molecular para a permeabilização do poro recrutado no complexo de sinalização P2X7R, uma vez que o CBX (100 μM) somente suprimiu as correntes induzidas pelo ATP quando as células expressavam tanto o receptor quanto as panexinas.

Uma atividade semelhante à hemicanal foi também demonstrada em neurônios hipocâmpais em resposta a um evento isquêmico de privação de oxigênio e glicose. Neste caso, a atividade foi atribuída à ativação de um canal Panx1, baseando-se nos resultados de inibição obtidos com CBX e LaCl_3 (Thompson *et al.*, 2006).

Deste modo, apesar de nossos resultados com LaCl_3 e com peptídeos miméticos para alças extracelulares de conexinas (e somente destas, pois panexinas não guardam qualquer homologia primária com conexinas) P26 e P27, terem revelado bloqueio quase total da permeabilização do corante LY induzido por MeHg, não podemos descartar a possibilidade da participação de canais panexinas, em

níveis indetectáveis pelos nossos métodos, nas nossas condições experimentais, nem tampouco seu envolvimento com os poros P2X₇. Talvez a formação do poro possa requerer componentes adicionais, estando a ativação do poro de panexina subjacente a ativação do hemicanal CX43.

Reforçando muitas destas conclusões, e refutando outras, dispomos de resultados com a técnica de *patch clamp* não incluídos nesta tese, pois realizados por colaboradores deste trabalho, não diretamente pela autora desta tese. Na configuração *cell attached*, observamos que em resposta ao tratamento com MeHg 30 uM por 30 min, registrávamos consistentemente a atividade de canais iônicos de condutância unitária em torno de 200 pS. Estas aberturas de canais eram bloqueáveis por inibidores conhecidos de canais juncionais completos e hemicanais, predominantemente caracterizados em modelos nos quais a conexina 43 era a proteína juncional predominante [carbenoxolone (10uM para hemicanais ou 100uM para canais completos), heptanol (1 mM), ácido 18-alfa glicerretínico (100uM) e o LaCl₃ (100uM; só para hemicanais)] . Por outro lado, esta atividade de alta condutância não era bloqueada por antagonistas do receptor P2X₇, como o ATP oxidado (300 uM), BBG (10 uM) ou KN-62 (10uM), em concentrações amplamente usadas na literatura como sendo eficazes para bloquear o poro associado ao receptor P2X₇.

O fato dos antagonistas do receptor P2X₇ não terem bloqueado o poro ativado por MeHg em nossos astrócitos nos ensaios eletrofisiológicos, é de certa forma inesperado frente às evidências farmacológicas de participação desta classe de poros em nossos ensaios de carregamento direto de corantes. Esta ausência de inibição à eletrofisiologia desfavorece, portanto, a hipótese de participação do poro do receptor P2X₇, pelo menos dentro de condições de configuração *cell attached*,

nas quais os inibidores e os agonistas são aplicados no banho, fora do microeletrodo de registro. Estamos testando condições *whole cell*, que acreditamos serão importantes na distinção entre as limitações de ordem técnica e a identidade destes poros. Além disso, os valores de condutância unitária, já registrados, para o poro associado ao receptor P2X₇ são em torno de 400 pS (Coutinho-Silva *et al.*, 1997 e Faria *et al.*, 2005), que seriam o dobro da condutância unitária registrada para os astrócitos tratados com MeHg (30uM) por 30 minutos. Esta informação foi confirmada em nossos experimentos utilizando cultura primária de astrócitos de camundongo, na qual tratamos esta célula com ATP (1mM), e registramos valores de condutância unitária em torno de 400 pS.

Uma interpretação alternativa dos poros abertos após o tratamento com o MeHg seria a atividade de hemicanais formados por panexinas. Sabe-se que estas proteínas formam hemicanais funcionais em óocitos de *Xenopus* (Bruzzone *et al.*, 2004). Além disso, a literatura vem recentemente propondo que os poros que se abrem em resposta à ativação do receptor P2X₇ seriam poros de panexina (Pelegri e Surprenant, 2007; Locovei *et al.*, 2007). Os valores de condutância unitária, já descritos, para o poro da panexina estão em torno de 500 pS, Bao *et al.*, (2004); Thompson *et al.*, (2006), portanto, cerca de 2,5X maior do que registramos após tratamento com MeHg (30 uM) por 30 min, por critérios biofísicos. Ainda à eletrofisiologia, testamos o efeito do ácido fluofenâmico (100uM) e a carbenoxolona (10uM) em baixa concentração (dados não incluídos nesta tese, conforme mencionado anteriormente). Segundo Bruzzone e colaboradores (2004), estas drogas, nestas concentrações, seriam capazes de bloquear as condutâncias associadas aos poros de panexinas, mas não afetariam os poros de conexinas. Observamos que após o tratamento com MeHg (30 uM) por 30 min, tanto o ácido

fluofenâmico (100 μM) quanto a carbenoxolona em baixa concentração (10 μM), não bloquearam a abertura do canal com condutância unitária de 200 pS. Reunimos, portanto, até o momento, evidências de que as panexinas (panexina 1) não estariam participando de forma significativa na captação de corantes e nas atividades elétricas de alta condutância, registradas nos astrocitos em cultura em resposta ao tratamento com MeHg.

Apesar da expressão ectópica de Panx1 em oócitos de *Xenopus* resultar em correntes de membrana semelhantes à hemicanal, que permitiria a liberação de ATP (Barbe *et al.*, 2006) e da evidência indireta de Panx1 na liberação de ATP em eritrócitos em resposta a uma estimulação osmótica ou mecânica (Locovei *et al.*, 2006a), carecemos ainda, na literatura, de evidências diretas da atividade eletrofisiológica das panexinas *in situ*.

5.3.3 - Astrócitos cerebrais como candidatos a moduladores da neurotoxicidade induzida pelo MeHg: prejuízos na captação de glutamato

A excitotoxicidade por glutamato pode sabidamente ser um agente desencadeador da abertura de poros P2X7 (Duan *et al.*, 2003, Atkinson *et al.*, 2004). Em nosso modelo observamos uma inibição da captação de [^3H]D-Aspartato, mediada pelo MeHg, confirmando resultados de outros grupos. Vários desses grupos vêm demonstrando que o MeHg inibe a captação de glutamato e aspartato e estimula seu efluxo, aumentando a concentração de glutamato no fluido extracelular e possivelmente sensibilizando neurônios por lesão excitotóxica (Brookes *et al.*, 1989, Aschner *et al.*, 1993, Dave *et al.*, 1994 Shanker e Aschner *et al.*, 2001)

Alguns trabalhos apontam os hemicanais como possíveis vias de difusão passiva de glutamato (Nicholls e Attwell, 1990, Nedergaard *et al.*, 2002). Takano *et al.* (2005) demonstraram através de registros eletrofisiológicos (do tipo “*whole-cell attached*”) da membrana de astrócitos em cultura, evidência direta para um papel do ATP na regulação de um canal permeável ao glutamato. Deste modo, considerando que o MeHg ativa a abertura de poros de membrana permeáveis ao ATP, possivelmente o glutamato seria acumulado no meio extracelular, explicando pelo menos parcialmente a excitotoxicidade neuronal acarretada pelo MeHg *in vivo*. Contudo, nossos ensaios de captação de D-Aspartato *in vitro*, não indicam o envolvimento desses poros na diminuição de D-Aspartato intracelular induzida pelo MeHg, sugerindo que a homeostase do glutamato em nosso protocolo possa estar sendo alterada via disfunção dos próprios transportadores, o que também geraria a excitotoxicidade neuronal.

No sistema nervoso, os astrócitos são considerados como os principais acumuladores de MeHg (Charleston *et al.*, 1996, Aschner, 1996, Aschner *et al.*, 2000) e, portanto, é a eles atribuído um papel de mediadores da neurotoxicidade induzida pelo MeHg (para revisão: Aschner *et al.*, 2007). Allen e colaboradores (2001) demonstraram que o MeHg seletivamente inibe o transporte astrocitário de cistina e cisteína e, com isso, afeta adversamente seu status redox, diminuindo os níveis de glutatona intracelular. Em outros tecidos, Pinheiro *et al.* (2007) demonstram também, correlação significativa entre altas concentrações de mercúrio no cabelo de mulheres viventes em populações sob influência de garimpos de ouro na Amazônia, conteúdo de glutatona alto e atividade de catalase baixa, sugerindo que a intoxicação crônica pelo mercúrio possa esvaziar as reservas e reduzir a

atividade enzimática antioxidante, o que pode ser usado como um marcador periférico importante.

A disfunção neuronal induzida pelo MeHg parece ser secundária aos distúrbios nos astrócitos (Brookes, 1992). Nossos resultados *in vivo* demonstram inicialmente que o MeHg estimula a proliferação, contudo, as novas células não alcançam o bulbo olfatório, como observado nos animais controle, indicando que o MeHg provavelmente dispara uma seqüência de eventos adversos sobre a rede neuronal. A co-aplicação *in vitro* de concentrações não tóxicas de mercúrio com glutamato resulta no surgimento de lesões neuronais típicas observadas em circunstância excitotóxica (Aschner *et al.*, 2007).

Conclusões Gerais

Muitos estudos já foram desenvolvidos com crianças intoxicadas pelo MeHg no período fetal, indicando a ocorrência de deficiências neuropsicológicas possivelmente associados à exposição intra-uterina. Outros estudos focalizaram o diagnóstico de anormalidades no SNC decorrentes da intoxicação pós-natal, apontando defeitos na migração de jovens neurônios e de progenitores gliais pós-natais, que poderiam estar subjacentes à deficiências cognitivas conseqüentes à intoxicação mercurial.

Esse estudo demonstrou que o MeHg tem fácil acesso ao encéfalo de mamífero adulto, mantendo após uma intoxicação aguda, maior estabilidade das concentrações no cérebro e cerebelo, justificando a alta neurotoxicidade observada nos estudos *in vivo* e *in vitro*.

Nosso trabalho indica que a intoxicação pelo MeHg, afeta a neurogênese mantida do cérebro adulto especificamente a partir da SVZ no seu processo de geração de neurônios para o bulbo olfatório. A resposta dos progenitores da SVZ à intoxicação mercurial, inicialmente levando um grande número de células a entrar em fase S pode representar uma tentativa de reparo do sistema nervoso abrindo caminhos para o monitoramento de fatores que maximizam a sobrevivência dessas novas células e a sua integração nos circuitos cerebrais. O número reduzido de novos neurônios que efetivamente alcançam o bulbo olfatório após a intoxicação pelo MeHg pode ser a origem de distúrbios olfativos e cognitivos, manifestações clínicas da Doença de Minamata. A gliose reativa, a permeabilização da membrana astrocitária, o bloqueio de junções comunicantes e de captação de glutamato por esta população celular são alguns dos efeitos fisiológicos à intoxicação mercurial.

Considerando as evidências crescentes de um papel dos astrócitos nos circuitos neurais e sua nova função como célula-tronco no cérebro adulto, nossos resultados sugerem que a intoxicação mercurial provocaria um desequilíbrio importante na homeostase cerebral.

Perspectivas

Pretendemos aprofundar nossas análises quanto aos efeitos do MeHg sobre o ciclo celular, tanto no que tange os mecanismos que ativam a entrada no ciclo celular como os que provocam sua interrupção. Pretendemos explorar os efeitos do MeHg sobre a proliferação e migração celular e sobre a interação astrócitos/ neuroblastos em modelos de explantes de SVZ. Visto que obtivemos efeitos específicos sobre a população astrocitária indicando a abertura de poros P2X7, é possível que o ATP assim como o glutamato potencialmente presentes nestas culturas pudessem servir de sinal ativador da divisão celular explicando o resultado de aumento das células na fase S que encontramos *in vivo*. Sabemos que o MeHg, como descrito na literatura, pode atuar sobre a progressão do ciclo celular, contudo gostaríamos de definir quais os mecanismos subjacentes ao arresto do ciclo celular e em que fase do ciclo progenitores da SVZ interrompem sua proliferação.

REFERÊNCIAS

Abbracchio, M. P., Saffrey, M. J., Hopker, V., Burnstock, G. Modulation of astroglial cell-proliferation by analogs of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. **Neuroscience**, 59: 67–76, 1994.

Akagi, H. & Nishimura, H. **Speciation of mercury in the environment**. In: Suzuki, T.; Nobumassa, I.; Clarkson, T.W. (Eds.): *Advances in mercury toxicology*. Plenum, New York, pp. 53-76, 1991.

Adachi, T. & Kunimoto, M. Acute Cytotoxic Effects of Mercuric Compounds in Cultured Astrocytes Prepared from Cerebral Hemisphere and Cerebellum of Newborn Rats. **Biology Pharmacology Bulletin**, 28: 2308-2311, 2005.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). **Toxicological profile for mercury**. US Department of Health and Human Services, 1999.

Aimone, J. B., Wiles, J., Gage, F. H. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. **Nature Neuroscience**, 9: 723-727, 2006.

Allen, J. W., Mutkus, L. A., Aschner, M. Methylmercury-mediated inhibition of 3H-D-aspartate transport in cultured astrocytes is reversed by the antioxidant catalase. **Brain Research**, 902: 92-100, 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**, 894: 131-140, 2001b.

Altman, J. & Gopal, D. Das. Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats. **Journal Comparative Neurology**, 124: 319-336, 1965.

Alvarez-Buylla, A., Lim, D. A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. **Neuron**, 41: 683-686, 2004.

Amin-zaki, L., Majeed, M. A., Greenwood, M. R., Elhassani, S. B., Clarkson, T. W. R., Doherry, A. Methylmercury poisoning in the Iraqi suckling infant: a longitudinal study over five years. **Journal Applicable Experimental Toxicology**, 1: 210–214, 1981.

Amorim, M. I. M., Mergler, D., Bahia, M. O., Dubeau, H., Miranda, D., Lebel, J., Burbano, R. R. & Lucotte, M. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, 72: 497-507, 2000.

André, J. M., Boudou, A., Ribeyre, F., Bernhard, M. Comparative study of mercury accumulation in dolphins (*Stenella Coeruleoalba*) from French Atlantic and Mediterranean coasts. **Science of the Total Environment**, 104: 191–209, 1991.

Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. **Annual Review Physiology**, 63:795-813. 2001.

Arito H., Takahashi M. Effect of methylmercury on sleep patterns in the rat. In: Suzuki T, Imura N, Clarkson TW, eds. **Advances in Mercury Toxicology**. New York, NY: Plenum Press, 381-394, 1991.

Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., Lindvall, O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **Nature Medicine**, 8: 963–970, 2002.

Aschner M., Du, Y. L., Gannon, M., Kimelberg, H. K. Methylmercury-induced alterations in excitatory amino acid transport in rat primary astrocyte cultures. **Brain Research**, 602: 181-186, 1993.

Aschner, M. Methylmercury in astrocytes - what possible significance? **Neurotoxicology**, 17: 93-106, 1996

Aschner, M., Clarkson T. W. Uptake of methylmercury in the rat brain: effects of amino acids. **Brain Research**, 462: 31–39, 1988.

Aschner, M., Yao, C. P., Allen, J. W., Tan, K. H. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. **Neurochemistry International**, 37: 199-206, 2000.

Aschner, M., Syversen T. Methylmercury: recent advances in the understanding of its neurotoxicity. *Therapeutic Drug Monitoring*, 27: 278-83, 2005.

Aschner, M., Syversen, T., Souza, D. O., Rocha, J. B. T. & Farina, M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 40: 285-291, 2007.

Atkinson, L., Batten, T. F., Moores, T. S, Varoqui, H., Erickson, J. D., Deucars, J. Differential co-localisation of the P2X7 receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS. **Neuroscience**, 123: 761-768, 2004.

Bao, L., Locovei, S., Dahl, G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. **FEBS letters**, 572: 65-8, 2004.

Barbe, M.T., Monyer, H., Bruzzone, R. Cell–cell communication beyond connexins: the pannexin channels. **Physiology**, 21:103–114, 2006.

Bastos, W. R., Pinto, F. N., Malm, O., Pfeiffer, W. C. P. **Desenvolvimento de técnicas de Digestão e Controle de Qualidade Analítico na determinação de Hg em Amostras Ambientais e Humanas**. Proceedings of the XI Chemrawn Meeting on Environmental Analytical Chemistry, Montevideo, Uruguay, 1998.

Bauer, S., Rasika, S., Han, J., Mauduit, C., Raccurt, M., Morel, G., Jourdan, F., Benahmed, M., Moyse, E., Patterson, P. H. Leukemia inhibitory factor is a key signal

for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. **Journal Neuroscience**, 23: 1792–1803, 2003.

Bauer, S. & Patterson, P. H. Leukemia Inhibitory Factor Promotes Neural Stem Cell Self-Renewal in the Adult Brain. **The Journal of Neuroscience**, 26: 12089 –12099, 2006.

Belletti, S., Orlandini, G., Vettori, M. V., Mutti, A., Uggeri, J., Scandroglio, R. Time course of methylmercury effects on C6 glioma cells: submicromolar concentrations induce oxidative DNA damage and apoptosis. **Journal Neuroscience Research**, 70: 703-11, 2002.

Bennett, M. V., Zukin, R. S. Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. **Neuron**, 41: 495-511, 2004.

Beyer, M., Gimsa, U., Eyu Poglu, I. Y., Hailer, N. P. & Nitsch, R. Phagocytosis of Neuronal or Glial Debris by Microglial Cells: Upregulation of MHC Class II Expression and Multinuclear Giant Cell Formation In Vitro. **GLIA**, 31: 262-266, 2000.

Bezzi, P., Domercq, M., Vesce, S., Volterra, A. Neuron-astrocyte cross-talk during synaptic transmission: physiological and neuropathological implications. **Progress in Brain Research**, 132:255-65, 2001.

Bittman, K., Owens, D. F., Kriegstein, A. R., LoTurco, J. J. Cell Coupling and Uncoupling in the Ventricular Zone of Developing Neocortex. **The Journal of Neuroscience**, 17: 7037-7044, 1997.

Bittman, K. S., LoTurco, J. J. Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors. **Cerebral Cortex**, 9: 188-195, 1999.

Bonnert, T. P., Bilsland, J. G., Guest, P. C., Heavens, R., McLaren, D., Dale, C., Thakur M., McAllister, G., Munoz-Sanjuan, I. Molecular characterization of adult mouse subventricular zone progenitor cells during the onset of differentiation. **European Journal of Neuroscience**, 24: 661-675, 2006.

Brandle, U., Guenther, E., Irrle, C., Wheeler-Schilling, T. H. Gene expression of the P2X receptors in the rat retina. **Molecular Brain Research**, 59: 269–272, 1998.

Brookes, N., Kristt, D. A. Inhibition of amino acid transport and protein synthesis by HgCl₂ and methylmercury in astrocytes: selectivity and reversibility. **Journal Neurochemistry**, 53: 1228-1237, 1989.

Brookes, N. *In vitro* evidence for the role of glutamate in the CNS toxicity of mercury. **Toxicology**, 76: 245-256, 1992.

Brow, J., Cooper-Kuhn, C. M., Kempermann, G. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. **European Journal of Neuroscience**, 17: 2042-46, 2003.

Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A., Monyer, H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100(23):13644-9, 2003.

Buckwalter, M. S., Yamane, M., Coleman, B. S., Ormerod, B. K., Chin, J. T., Palmer, T., Wyss-Coray, T. Chronically Increased Transforming Growth Factor- β 1 Strongly Inhibits Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. **American Journal of Pathology**, 169: 154-164, 2006.

Bukauskas, F. F., Bukauskiene, A., Bennett, M. V., Verselis, V. K. Gating properties of gap junction channels assembled from connexin43 and connexin36 fused with green fluorescent protein. **Biophysical Journal**, 81: 137-52, 2001.

Burbacher, T., Grant, K., Mottet, N. K. Retarded object permanence development in methylmercury exposed *Macaca fascicularis* infants. **Developmental Psychology**, 22: 771-776, 1986.

Burbacher, T. M., Rodier, P. M., Weiss, B. Methylmercury developmental neurotoxicity: a comparison of effects in humans and animals. **Neurotoxicology and Teratology**, 12: 191-202, 1990.

Burnstock, G. Purinergic nerves. **Pharmacological Reviews**. 24: 509 – 581, 1972

Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Science**. 64: 1471 – 1483, 2007

Chang, L. W., & Hartmann, H. A. Electron microscopic histochemical study on the localization and distribution of mercury in the nervous system after mercury intoxication. **Experimental Neurology**, 35: 122-137, 1972a.

Chang, L. W., Neurotoxic effects of mercury. **Environmental Research**, 14: 329-373, 1977.

Chang, Q., Balice-Gordon, R.J. Gap junctional communication among developing and injured motor neurons. **Brain Research Reviews**, 32: 242-249, 2000.

Chanson, M., Derouette, J. P., Roth, I., Foglia, B., Scerri, I., Dudez, T., Kwak, B. R. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1711: 197-207, 2005.

Charleston, J. S., Body, R. L., Bolender, R. P., Mottet, N. K., Vahter, M. E., Burbacher, T. M. Changes in the number of astrocytes and microglia in the thalamus of the monkey *Macaca fascicularis* following longterm subclinical methylmercury exposure. **Neurotoxicology**, 17: 127-138, 1996.

Chen, Y. & Swanson, R. A. Astrocytes and Brain Injury. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 23: 137-149, 2003.

Choi, B. H., Lapham, L. W., Amin-zaki, L., Saleem, T. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization and diffuse white matter astrocytosis of

human fetal brain. A major effect of methylmercury poisoning in utero. **Journal of Neuropathol and Experimental Neurology**, 37: 719– 733, 1978.

Choi, B. H., Matthias, S. C. Cortical dysplasia associated with massive ectopia of neurons and glial cells within the subarachnoid space. **Acta Neuropathology (Berl)**, 73: 105-109, 1987.

Choi, B. H. The effects of methylmercury on the developing brain, **Progress in Neurobiology**, 32: 447– 470, 1989.

Choi, B. H. Effects of methylmercury on neuroepithelial germinal cells in the developing telencephalic vesicles of mice. **Acta Neuropathology**, 81: 359 –365, 1991.

Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Ballerini, P., Ambrosini, G., Giuliani, P., Tiboni, G. M., Caciagli, F. Effects of exogenous ATP and related analogues on the proliferation rate of dissociated primary cultures of rat astrocytes. **The Journal of Neuroscience**, 39:556-66, 1994.

Clark, W. M., Lauten, J. D., Lessov, N., Woodward, W. & Coull, B.M. Time course of ICAM-1 expression and leukocyte subset infiltration in rat forebrain ischemia. **Molecular and Chemical Neuropathology**, 26: 213-230, 1993.

Clarkson, T. W. The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspectives**, 110: 11-23, 2002.

Contreras, J. E., Sanchez, H. A., Eugenin, A. E., Speidel, D., Theis, M., Willecke, K., Bukauskas, F. F., Bennett, M. V. L., Saez, J. C. Voltage opens unopposed gap junction hemichannels formed by a connexin 32 mutant associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99: 495-500, 2002.

Coppi, E., Pugliese, A. M., Urbani, S., Melani, A., Cerbai, E., Mazzanti, B, Bosi, A., Saccardi, R., Pedata, F. ATP Modulates Cell Proliferation and Elicits Two Different Electrophysiological Responses in Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, 25: 1840-1849, 2007.

Costa, L. G., Aschner, M., Vitalone, A., Syversen, T. & Soldin, P. O. Developmental Neuropathology of Environmental Agents, **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, 44:87–110, 2004.

Cotrina, M. L., Kang, J., Lin, J. H., Bueno, E., Hansen, T. W., He, L., Liu, Y., Nedergaard, M. Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions. **Journal of Neuroscience**, 18: 2520–2537, 1998.

Coutinho-Silva, R., Persechini, P. M. P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. **The American journal of physiology. Cell physiology**, 273: C1793-800, 1997.

Cuvin-Aralar, M. L. A., Furness, R. W. Mercury and selenium interaction. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 21: 348–364, 1991.

Dave, V., Mullaney, K. J., Goderie, S., Kimelberg, H. K., Aschner, M. Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: effects on D-aspartate and serotonin uptake. **Developmental Neuroscience**, 16: 222–231, 1994.

Davidson, P. W., Myers, G. J. Cox, C., Shamlaye, C. F., Marsh, D. O., Tanner, M. A. Berlin, M., Sloane-Reeves, J., Cernichiari, E., Choisy, O., Choi, A., Clarkson, T. W. Longitudinal neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from a maternal fish ingestion: outcomes at 19 and 29 months, **Neurotoxicology**, 16: 677–688, 1995.

Doetsch, F., Caillé, I., Limm, D. A., Garcia-Verdugo, M., Alvarez-Buylla, A. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain, **Cell Press**, 97: 703–716, 1999.

Dos Santos, A. A., Medina, S. V., Sholl-Franco, A., de Araujo, E. G. PMA decreases the proliferation of retinal cells in vitro: the involvement of acetylcholine and BDNF. **Neurochemistry International**, 42: 73–80, 2003.

Duan, S., Anderson, C. M., Keung, E. C., Chen, Y., Chen, Y., & Swanson, R. A. P2X7 Receptor-Mediated Release of Excitatory Amino Acids from Astrocytes. **The Journal of Neuroscience**, 23: 1320–1328, 2003.

Duan, S., Neary, J.T. P2X(7) receptors: properties and relevance to CNS function. **Glia**, 54:738–46, 2006

Elliott, R. And Philip, I . M. Dynamics of Acridine Orange-Cell Interaction I. Interrelationships of Acridine Orange Particles And Cytoplasmic Reddening. **The Journal of Cell Biology**, X8 (2): 237–250, 1963.

el-Fouly, M. H., Trosko, J. E., Chang, C. C. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. **Experimental Cell Research**, 168: 422–30, 1987.

Endo, T., Haraguchi, K., Sakata, M. Mercury and selenium concentrations in the internal organs of toothed whales and dolphins marketed for human consumption in Japan. **The Science of the Total Environment**, 300: 15–22, 2002.

Eng, L. F. & Ghirnikar, R. S. GFAP and Astrogliosis. **Brain Pathology**, 4: 229–237, 1994.

Enwere, E., Shingo, T., Gregg, C. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. **Journal of Neuroscience**, 24: 8354–65, 2004.

Eskes, C., Honegger, P., Juillerat-Jeanneret, L., Monnet-Tschudi, F. Microglial Reaction Induced by Noncytotoxic Methylmercury Treatment Leads to

Neuroprotection via Interactions With Astrocytes and IL-6 Release. **Glia**, 37: 43-52, 2002.

Eto, K., Oyanagi, S., Itai, Y., Tokunaga, H., Takizawa, Y., Suda, I. A fetal type of Minamata disease. An autopsy case report with special reference to the nervous system. **Molecular and Chemical Neuropathology**, 16: 171-86, 1992.

Eto, K. Pathology of Minamata disease. *Toxicol Pathol.*, 25(6):614-23. Erratum in: **Toxicologic Pathology**, 26: 741, 1997.

Eto, K., Yasutake, A., Kuwana, T., Korogi, Y., Akima, M., Shimozeki, T. Tokunaga, H., Kaneko, Y. Methylmercury poisoning in common marmosets – A Study of Selective Vulnerability Within the Cerebral Cortex. **Toxicologic Pathology**, 29: 565-57, 2001a.

Eto, K., Yasutake, A., Korogi, Y., Akima, M., Shimozek, i T., Tokunaga, H., Kuwana, T., Kaneko, Y. Methylmercury poisoning in common marmosets--MRI findings and peripheral nerve lesions. **Toxicologic Pathology**, 30: 723-34, 2001b.

Eto, K., Tokunaga, H., Nagashima, K., Takeuchi, T. An autopsy case of minamata disease (methylmercury poisoning) pathological viewpoints of peripheral nerves. **Toxicologic Pathology**, 30: 714-22, 2002.

Evans W. H., Martin, P. E. Gap junctions: structure and function (Review). **Molecular Membrane Biology**, 19:121-36, 2002.

Faria, R. X., Defarias, F. P., Alves, L. A. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? **American journal of physiology. Cell physiology**, 288: C260-71, 2005.

Fehling, C., Abdulla, M., Brun, A. Methylmercury poisoning in the rat: A combined neurological, chemical, and histopathological study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 33: 27-37, 1975.

França, G. R., Freitas, R. C. C., Ventura, A. L. M. ATP-induced proliferation of developing retinal cells: regulation by factors released from postmitotic cells in culture. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 25: 283–291, 2007.

Franke, H., Krugel, U., Illes, P. P2 receptor-mediated proliferative effects on astrocytes in vivo. **Glia**, 28: 190–200, 1999.

Franke, H., Krugel, U., Schmidt, R., Grosche, J., Reichenbach, A., Illes, P. P2 receptor-types involved in astrogliosis in vivo. **British Journal of Pharmacology**, 134: 1180–1189, 2001.

Fróes M. M, Correia A. H., Garcia-Abreu, J., Spray, D.C. Campos de Carvalho AC, Neto MV. Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 96: 7541-6, 1999.

Fróes, M. M. & Menezes, J. R. L. Coupled Heterocellular Arrays in the Brain. **Neurochemistry International**, 41: 367-375, 2002.

Fróes, M. M., Ignácio, A. A., Guimarães, F., Malm, O., Reis, R., Hedin-Pereira, C. Methylmercury *In Vitro* Intoxication Impairs [³H]D-Aspartate Uptake and Increases Astrocyte Permeability In Monolayers. In: Annual Meeting Society for Neuroscience, 2005, Washington D.C.

Fukada, T., Ohtani, T., Yoshida, Y., Shirogane, T., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., Hirano, T. STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G(1) to S cell-cycle transition. **The EMBO Journal**, 17: 6670–6677, 1998.

Gage, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, 287: 1433-38, 2000.

Gatti, R., Belletti, S., Uggeri, J., Vettorib, M. V., Muttic, A., Scandroglio, R., Orlandini, G. Methylmercury cytotoxicity in PC12 cells is mediated by primary glutathione depletion independent of excess reactive oxygen species generation. **Toxicology**, 204: 175-185, 2004.

Geelen, J. A., Dormans, J. A., Verhoef, A. The early effects of methylmercury on the developing rat brain. **Acta Neuropathology**, 80: 432– 438, 1990.

Goldman, S. Glia as Neural Progenitor Cells. **Trends in Neurosciences**, 26: 590-596, 2003.

Gomes, F. C., Sousa, V, O., Romão, L. Emerging roles for TGF-b1 in nervous system development. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 23: 413–424, 2005.

Götz, M. E., Koutsilieri, E., Riederer, P., Ceccatelli, S., Daré, E. Methylmercury induces neurite degeneration in primary culture of mouse dopaminergic cells. **Journal of Neural Transmission**, 109: 597-605, 2002.

Götz, M. & Huttner, W. B. The Cell Biology of Neurogenesis. **Nature Reviews** 6: 777-788, 2005.

Gould, E., Tanapat, P., Hastings, N. B., Shors, T.J. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. **Trends in Cognitive Sciences**, 3: 186-192, 1999.

Grandjean, P., Weihe P., White, R. F., Debes, F. Cognitive performance of children prenatally exposed to "safe" levels of methylmercury. **Environmental Research**, 77:165-72, 1998.

Greenwood, D., Yao, W. P., Housley, G. D. Expression of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the retina. **NeuroReport**, 8: 1083–1088, 1997.

Gribble, E. J., Hong, S. W., Faustman, E. M. The magnitude of methylmercury-induced cytotoxicity and cell cycle arrest is p53-dependent. **Birth Defects Research Parte A: Clinical and Molecular Teratology**, 73: 29-38, 2005.

Harada, M. Congenital Mianmata Disease: Intrauterine Methylmercury poisoning. **Teratology**, 18: 285-288, 1978.

Haydar, T. F., Wang, F., Schwartz, M. L., Rakic, P. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. **Journal of Neurosci**, 20: 5764–5774, 2000.

Heo, J. S, Han, H. J. ATP Stimulates Mouse Embryonic Stem Cell Proliferation via Protein Kinase C, Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt, and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways. **Stem Cells**, 24: 2637-2648, 2006.

Herculano-Houzel, S., Mota, B. & Lent, R. Cellular scaling rules for rodent brains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 32:12138-12143, 2006.

Hervé J. C. The connexins. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1711: 97-98, 2004.

Hickey, W. F., Vass, K, Lassmann H. Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. **Journal of Neuropathol and Experimental Neurology**, 51: 246–256, 1992.

Hickman, S. E., Semrad, C. E., Silverstein, S. C. P2Z purinoceptors. **Ciba Foundation Symposium**, 198: 71–83, 1996.

Hirano, M., Mitsumori, K. Suasue, Y. Further study on methylmercury chloride in ICR mice. **Nippon Juiga Ku Zasshi**, 48: 127-35, 1986.

Hofer, A., Dermietzel, R. Visualization and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes. **Glia**, 24: 141-54, 1998.

Iacobas, D. A, Suadicani, S. O., Iacobas, S., Chrisman, C., Cohen, M. A., Spray, D. C., Scemes, E. Gap junction and purinergic P2 receptor proteins as a functional unit: insights from transcriptomics. **The Journal of membrane biology**, 217: 83-91, 2007.

Ignácio, A. A., Costa, M. B., Kehrig, H. A., Malm, O., Hedin-Pereira, C. Methylmercury Contamination Increases Proliferation In The Subventricular Zone of Adult Rats, In: Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington, 2005.

Ignácio, A. A., Muller, Y. M., Carvalho, M. S., Nazari, E. M. Distribution of microglial cells in the cerebral hemispheres of embryonic and neonatal chicks. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 38: 1615-1621, 2005a.

Inouye, M., Kajiwara, Y. Developmental disturbances of the fetal brain in guinea-pigs caused by methylmercury. **Archives of Toxicology**, 62: 15-21, 1988.

Ikemoto, T., Kunito, T., Tanaka, H., Baba, N., Miyazaki, N., Tanabe S. Detoxification Mechanism of Heavy Metals in Marine Mammals and Seabirds: Interaction of Selenium with Mercury, Silver, Copper, Zinc, and Cadmium in Liver. **Arch. Environmental of Contamination and Toxicology**, 47: 402–413, 2004.

Jacques-Silva, M. C., Rodnight, R., Lenz, G., Liao, Z., Kong, Q., Tran, M., Kang, Y., Gonzalez, F.A., Weisman, G. A, Neary, J. T. P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. **British Journal of Pharmacology**, 141(7):1106-17, 2004.

Jee, Y., Kim, G., Tanuma, N., Matsumoto, Y. STAT expression and localization in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J Journal of Neuroimmunology*, 114: 40–47, 2001.

Jensen, M. B., Gonzalez, B., Castellano, B., Zimmer, J. Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration: a histochemical and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesions. **Journal Experimental Brain Research**, 98: 245-260, 1994.

Jiang, J. & Gu, S. Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1711: 208-214, 2005.

Jin, K., Minami, M., Lan, J. Q., Mao, X. O., Bateur, S., Simon, R. P., Greenberg, D. A. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98: 4710-4715, 2001.

Jin, K., Peel, A. L., Mao, X. O. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101: 343-347, 2004.

Jorgensen, M. B., Finsen, B. R., Jensen, M. B., Castellano, B., Diemer, N. H. & Zimmer, J. Microglial and Astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. **Exp. Neurol**, 120: 70-88, 1993.

Justicia, C., Gabriel, C., Planas, A. M. Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: Signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes. **Glia**, 30: 253–270, 2000.

Kakita, A., Inenaga, C., Sakamoto, M., Takahashi, H. Disruption of Postnatal Progenitor Migration and Consequent Abnormal Patter of Glial Distribution in the Cerebrum Following Administration Administration of Methylmercury. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 68: 835-847, 2003.

Kehrig, H. A. & Malm, O. Methylmercury in fish as a tool for understanding the Amazon mercury contamination. **Applied Organometallic Chemistry**, 13: 689-696, 1999.

Kehrig, H. A., Seixas, T. G., Baeta, A., Lailson-Brito, J. Jr., Moreira I, Malm, O. Total mercury, methylmercury and selenium in the livers and muscle of different fishes and a marine mammal from a tropical estuary-Brazil. **RMZ-M&G**, 51: 1111-1114, 2004.

- Kim, Y. J., Kim, Y. S., Kim, M. S., Ryu, J. C. The inhibitory mechanism of methylmercury on differentiation of human neuroblastoma cells. **Toxicology**, 234: 1-9, 2007.
- Kitabatake, Y., Sailor, K. A., Ming, G. L., Song, H. Adult neurogenesis and hippocampal memory function: new cells, more plasticity, new memories? **Neurosurg Clin N Am**, 18:105-13, 2007.
- Köles, L., Fürst, S., Illes, P. Purine ionotropic (P2X) receptors. **Current Pharmaceutical Design**, 13:2368-84, 2007.
- Komitova, M., Zhao, L. R., Gidö, G., Johansson, B.B., Eriksson, P. Postischemic exercise attenuates whereas enriched environment has certain enhancing effects on lesion-induced subventricular zone activation in the adult rat. **European Journal of Neuroscience**, 9: 2397-2405, 2005.
- Kreutzberg, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neuroscience**, 19: 312–318, 1996.
- Kuan, C. Y., Schloemer, A. J., Lu, A., Burns, K. A., Weng, W. L., Williams, M. T., Strauss, K. I., Vorhees, C.V., Flavell, R. A., Davis R. J., Sharp, F.R., Rakic, P. Hypoxia ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. **Journal of Neuroscience**, 24: 10763-72, 2004.
- Kunimoto, M., Suzuki, T. Selective down-regulation of 440 kDa ankyrinB associated with neurite retraction. **Neuroreport**, 6: 2545-8, 1995.
- Le Feuvre, R., Brough, D., Rothwell, N. Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. **European Journal of Pharmacology**, 447: 261– 269, 2002.
- Le Feuvre, R.A., Brough, D., Touzani, O., Rothwell, N.J. Role of P2X7 receptors in ischemic and excitotoxic brain injury in vivo, **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 23: 381-4, 2003.
- Lenz, G., Gottfried, C., Luo, Z. J., Avruch, J., Rodnight, R., Nie, W. J., Kang, Y. and Neary, J. T. P2Y purinoceptor subtypes recruit different Mek activators in astrocytes. **British Journal of Pharmacology**, 129: 927-936, 2000.
- Leonzio, C., Focardi, S., Fossi, C. Heavy metals and selenium in stranded dolphins of the northern tyrrhenian (NW mediterranean). **Science Total Environmental**, 119: 77-84, 1992.
- Lewandowski, T. A., Pierce, C. H., Pingree, S. D., Hong, S., Faustman, E. M. Methylmercury distribution in the pregnant rat and embryo during early midbrain organogenesis. **Teratology**, 66: 235-41, 2002.
- Lie, D. C., Song, H., Colamarino, S. A., Ming, G. L & Gage, F. H. Neurogenesis in the Adult Brain: New Strategies for Central System Diseases. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, 44: 399- 421, 2004.

Lin, J. H. C., Takano, T., Arcuino, G., Wang, X., Hu, F., Darzynkiewicz, Z., Nunes, M., Goldman, S. A., Nedergaard, M. Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. **Developmental Biology**, 302: 356–366, 2007.

Lindstrom, H., Luthman, J, Oskarsson, A. Effects of long-term treatment with methyl mercury on the developing rat brain. **Environmental Research**, 56: 158-169, 1991.

Liu, D. X., Greene, L. A. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. **Cell Tissue Research**, 305: 217–228, 2001.

Locovei, S., Bao, L., Dahl, G. Pannexin1 in erythrocytes: function without a gap. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103: 7655–7659, 2006a.

Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D.C., Dahl, G. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X7 receptor death complex. **FEBS Letter**, 581(3): 483-8, 2007.

Loewenstein, W.R., Rose, B. The cell-cell channel in the control of growth. **Seminars in cell biology**, 3(1): 59-79, 1992.

LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J., Davis, M. B., Kriegstein, A. R. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. **Neuron**. 15: 1287–1298, 1995.

Luk, K. C., Kennedy, T. E., Sadikot, A. F. Glutamate promotes proliferation of striatal neuronal progenitors by an NMDA receptor-mediated mechanism. **Journal of Neuroscience**, 23: 2239–2250, 2003.

Marques, R. C., Garrofe, D. J., Rodrigues, B. W., de Freitas, R. M., de Freitas, F. M., Malm, O. Maternal mercury exposure and neuro-motor development in breastfed infants from Porto Velho (Amazon), Brazil. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 210: 51-60, 2007.

Martens, D. J., Seaberg, R. M., van der Kooy, D. In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. **European Journal of Neuroscience**, 16: 1045-1057, 2002.

Martins, R. A., Linden, R., Dyer, M. A., Glutamate regulates retinal progenitors cells proliferation during development. **European Journal of Neuroscience**, 24: 969-980, 2006.

Martins, R. A. P. & Pearson, R. A. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. **Brain Research**, Article in Press, 2007.

Martoja, R., Viale, D. Accumulation de granules de seleniure mercurique dans le foie d'odontocetes (Mammiferes,Cetaces): un mecanisme possible de detoxication du

methylmercure par le selenium. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles**, 285: 109-112, 1977.

Matsumoto, H., Koya, G., Takeuchi, T. Fetal Minamata disease. A neuropathological study of two cases of intrauterine intoxication by a methyl mercury compound. **J Neuropathology Experimental Neurology**, 24: 563–574, 1964.

Melchiorri, D., Cappuccio, I., Ciceroni, C., Spinsanti, P., Mosillo, P., Sarichelou, I., Sale, P., Nicoletti, F. Metabotropic glutamate receptors in stem/progenitor cells. **Neuropharmacology**, 53: 473-80, 2007.

Menezes, J. R., Marins, M., Alves J. A., Froes, M. M., Hedin-Pereira, C. Cell migration in the postnatal subventricular zone. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 35: 1411-21, 2002.

Menn, B., Garcia-Verdugo, J. M., Yaschime, C., Gonzales-Peres, O., Rowitch, D., Alvarez-Buylla, A. Origin of Oligodendrocytes in the Subventricular Zone of the Adult Brain. **The Journal of neuroscience**, 26: 7907-7918, 2006.

Merkle, F., Tramonti, A. D., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101: 17528-17532, 2004.

Miller, M. W. Effects of prenatal exposure to ethanol on neocortical development. II. Cell proliferation in the ventricular and subventricular zones of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, 287: 326– 338, 1989.

Miller, M. W. & Bruns, M. B. Auxillary proliferative zones in the developing world and adult central nervous system: lessons from studies on the effects of ethanol, in *Mammalian Subventricular Zones: Their Roles in Brain Development, Cell Replacement and Disease*. Levison, S. ed., Chapter 10. Springer, New York, 2005.

Milenkovic, I., Weick, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A. P2Y Receptor-mediated stimulation of Müller glial cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 44: 1211–1220. 2003

Miranda-Contreras, L., Ramírez-Martens, L.M., Benítez-Díaz, P.R., Peña-Contreras, Z.C., Mendoza-Briceño, R.V., Palacios-Prü, E. L. Levels of amino acid neurotransmitters during mouse olfactory bulb neurogenesis and in histotypic olfactory bulb cultures. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 18:83-91, 2000.

Mishra, S. K., Braun, N., Shukla, V., Füllgrabe, M., Schomerus, C., Korf, H., Gachet, C., Ikehara, Y., Sévigny, J., Robson, S. and Zimmermann, H. Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. **Development**, 133: 675-684, 2006.

Mitisumori, K., Maita, K., Shuasue Y Chronic toxicity of methylmercury Chloride in rats: pathological study. **Nippon Juigaku Zasshi**, 46: 549-57, 1984.

Mitchell, C. H. Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space. **The Journal of Physiology**, 534: 193–202, 2001.

Miura, K, Suzuki, K, Imura, N. Effects of methylmercury on mitotic mouse glioma cells. **Environmental Research**, 17: 453– 471, 1978.

Miura, K., Koide, N., Himeno, S., Nakagawa, I., and Imura, N. The involvement of microtubular disruption in methylmercury-induced apoptosis in neuronal and nonneuronal cell lines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 16: 279–288, 1999.

Monnet-Tschudi, F., Zurich, M. G., Honerger, P. Comparison of the developmental effects of two mercury compounds on glial cells and neurons in aggregate cultures of rat Telencephalon. **Brain Research**, 741: 52-59, 1996.

Monnet-Tschudi, F. Induction of Apoptosis by Mercury Compounds Depends on Maturation and Is Not Associated With Microglial Activation. **Journal of Neuroscience Research**, 53: 361-367, 1998.

Moreno, A. P., Rook, M. B., Fishman, G. I., Spray, D. C. (Gap junction channels: distinct voltage-sensitive and insensitive conductance states. **Biophysical Journal**, 67:113-119, 1994.

Morken, T. S., Sonnewald, U., Aschner, M and Syversen, T Effects of Methylmercury on Primary Brain Cells in Mono- and Co-cultures. **Toxicological Sciences**, 87: 169–175, 2005.

Mottet, N. K., Ferm, V. H. The congenital teratogenicity and perinatal toxicity of metals. In: **Reproductive and Developmental Toxicity of Metals** (Clarkson T. W., Nordberg G. F., Sager, P. R.). New York:Plenum, 93–125, 1983.

Murabe, Y. & Sano, Y. Morphological studies on neuroglia. **Journal Cell and Tissue Research**, 225: 469-485, 1982.

Myers, G.J., Davidson, P.W., Cox, C., Shamlaye, C.R., Tanner, M.A., Marsh, D.O., Cernichiari, E., Lapham, L.W., Berlin, M., Clarkson,T.W. Summary of Seychelles child development study on the relationship of fetal methylmercury exposure to neurodevelopment. **Neurotoxicology**, 16: 711–716, 1995.

Myers, G. J., Davidson, P. W. Prenatal methylmercury exposure and children: neurologic, developmental, and behavioral research. **Environmental Health Perspectives**, 106: 841-847, 1998.

Nácher, J., Varea, E., Blasco-Ibáñez J. M., Gómez-Climent, M. A, Castillo-Gómez, E., Crespo, C., Martínez-Guijarro, F. J., McEwen, B. S. N-methyl-d-aspartate

receptor expression during adult neurogenesis in the rat dentate gyrus. **Neuroscience**, 144: 855-64, 2007.

Nagao, M., Sugimori, M., Nakafuku, M. Cross talk between notch and growth factor/cytokine signaling pathways in neural stem cells. **Molecular and Cellular Biology**, 27: 3982-94, 2007.

Nakanishi, M., Niidome, T., Matsuda, S., Akaike, A., Kihara, T., Sugimoto, H. Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. **European Journal of Neuroscience**, 25: 649-58, 2007.

Neary, J. T., Zhu, Q. Signaling by ATP receptors in astrocytes. **Neuroreport**, 5: 1617-20, 1994a.

Neary, J. T., Whittemore, S. R., Zhu, Q. Norenberg MD Synergistic activation of DNA synthesis in astrocytes by fibroblast growth factors and extracellular ATP. **Journal of Neurochemistry**, 63: 490-4, 1994b.

Nedergaard, M., Takano, T., Hansen, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. **Nature Review Neuroscience**, 3: 748–755, 2002.

Nicholls, D., Attwell, D. The release and uptake of excitatory amino acids. **Trends in Pharmacological Sciences**, 11: 462–468, 1990.

Nigro, M., Leonzio, C. Intracellular storage of mercury and selenium in different marine vertebrates. **Marine Ecology Progress Series**, 135: 137-143, 1996.

North, R. A., Surprenant, A. Pharmacology of cloned P2X receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 40: 563-80, 2000.

North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiology Review*, 82: 1013-1067, 2002.

Oliveira, R. B., Malm, O., Guimarães, J. R. D. Distribution of Methylmercury and Inorganic Mercury in Neonate Hamsters Dosed with Methylmercury During Fetal Life. **Environmental Research**, 86: 73-79, 2001.

Ordy, J. M., Wengenack, T. M., Bialobok, P., Rodier, P., Baggs, R. B., Dunlap, W. P. & Kates, B. Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocytes reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. **Experimental Neurology**, 119: 128-139, 1993.

Ou, Y. C., Thompson, S. A., Ponce, R. A., Schroeder, J., Kavanagh, T. J., Faustman, E. M. Induction of the cell cycle regulatory gene p21 (Waf1, Cip1) following methylmercury exposure in vitro and in vivo. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 157: 203-212, 1999.

Owens, D. F. & Kriegstein, A. R. Patterns of Intracellular Calcium Fluctuation in Precursor Cells of the Neocortical Ventricular Zone. **The Journal of Neuroscience**, 18: 5374-5388, 1998.

Panchin, Y.V. Evolution of gap junction proteins—the pannexin alternative. **Journal Experimental Biology**, 208: 1415–1419, 2005.

Parent, J. M., Velex, Z., S., Gong, G. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. **Annals of Neurology**, 52: 802-13, 2002a.

Parent, J. M., Valentin, V., Lowenstein, D. H. Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. **The Journal of Neuroscience**, 22: 3174-88, 2002b.

Pearson, R., Catsicas, M., Becker, D., Mobbs, P. Purinergic and muscarinic modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. **The Journal of Neuroscience**, 22: 7569–7579, 2002.

Pearson, R. A, Dale, N., Llaudet, E., Mobbs, P. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. **Neuron**, 46: 731-44, 2005a.

Pearson, R. A., Luneborg, N. L., Becker, D. L., Mobbs, P. Gap junctions modulate interkinetic nuclear movement in retinal progenitor cells. modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. **The Journal of Neuroscience**, 25: 10803–10814, 2005b.

Petito, C. K., Mogello, S., Felix, J. C. & Lesser, M. L. The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 10: 850-859, 1990.

Pelegri, P., Surprenat, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7. **The EMBO Journal**, 25(21): 5071-82, 2006.

Pinheiro, M.C., Macchi, B.M., Vieira, J.L., Oikawa, T., Amoras, W.W., Guimarães, G.A., Costa, C.A., Crespo-López, M.E., Herculano, A.M., Silveira, L.C., do Nascimento, J.L. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: A comparative study in the Amazon. **Environmental Research**. 2007.

Pinheiro, M.C., Müller, R.C., Sarkis, J.E., Vieira, J.L., Oikawa, T., Gomes, M.S., Guimarães, G.A., do Nascimento, J.L., Silveira, L.C. Mercury and selenium concentrations in hair samples of women in fertile age from Amazon riverside communities. **Science Total Environmental**, 349: 284 -288, 2005.

Ponce, R. A, Kavanagh, T. J, Mottet, N. K. Effects of methyl mercury on the cell cycle of primary rat CNS cells in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 127: 83–90, 1994.

Potucek, Y.D., Crain, J.M., Watters, J.J. Purinergic receptors modulate MAP kinases and transcription factors that control microglial inflammatory gene expression. **Neurochemistry International**, 49:204-14, 2006.

Ridet, J. L., Malhotra, S. K., Privat, A., Gage, F. H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends in Neuroscience**, 20: 570-7, 1997.

Rodier, P. M, Aschner, M., Sager, P. R. Mitotic arrest in the developing CNS after prenatal exposure to methylmercury. **Neurobehav Toxicology Teratol**, 6: 379 –385, 1984.

Rouach, N., Avignone, E., Meme, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F., Giaume, C. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. **Biology of the Cell**, 94: 457-75, 2002.

Roy, C., Prasad, K. V, Reuhl, K. R., Little, J. E, Valentine, B. K, Brown, D. L. Taxol protects the microtubules of concanavalin A-activated lymphocytes from disassembly by methylmercury, but DNA synthesis is still inhibited. **Experimental Cell Research**, 195(2):345-52, 1991.

Ryu, J. K., Choi, H. B., Hatori, K., Heisel, R. L., Pelech, S. L., McLarnon, J. G., & Kim, S. U. Adenosine Triphosphate Induces Proliferation of Human Neural Stem Cells: Role of Calcium and p70 Ribosomal Protein S6 Kinase. **Journal of Neuroscience Research**, 72: 352–362, 2003.

Sáez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F., Bennett, M. V. Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1711: 215-24, 2005.

Sager, P. R., Aschner, M. & Rodier, P. M. Persistent, Differential Alterations in Developing Cerebellar Cortex of Male and Female Mice After Methylmercury Exposure **Developmental Brain Research**, 12: 100-111, 1984.

Sager, P. R. & Matheson, D. W. Mechanisms of Neurotoxicity Related to Selective Disruption of Microtubules and Intermediate Filaments. **Toxicology**, 49: 479-492, 1998

Sakamoto, M., Kakita, A., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Nakano, A. Akagi, H. Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study with consecutive and moderate dose exposure throughout gestation and lactation periods. **Brain Research**, 949: 51-59, 2002a.

Sakamoto, M., Kubota, M., Matsumoto, S., Nakano, A. & Akagi, H. Declining risk of methylmercury exposure to infants during lactation. **Environmental Research**, 90: 185-189, 2002b.

Sakamoto, M., Kakita, A., Bezerra R. O., Sheng H. P., Takahashi, H. Dose-dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. **Developmental Brain Research**, 152: 171– 176, 2004.

Sakaki, Y., Fukuda, Y., Yamashita, M. Muscarinic and Purinergic Ca²⁺ mobilizations in the neural retina of early embryonic chick. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 14: 691–699, 1996.

Sakaue, M., Takanaga, H., Adachi, T., Hara, S., Kunimoto, M. Selective disappearance of an axonal protein, 440-kDa ankyrinB, associated with neuronal degeneration induced by methylmercury. **Journal of Neuroscience Research**, 73: 831-9, 2003.

Sanfeliu, C., Sebastia, J., Cristofol, R., Rodriguez-Farre, E. Neurotoxicity of organomercurial compounds. **Neurotoxicology Research**, 5: 283-305, 2003.

Sass, J. B., Haselow, D. T. & Silbergeld, E. K. Methylmercury-Induced Decrement in Neuronal Migration May Involve Cytokine-Dependent Mechanisms: A Novel method to Assess Neuronal Movement *in Vitro*. **Toxicological Sciences**, 63: 74-81, 2001.

Schlett, K. Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 6: 949-60, 2006.

Schiffer, D., Giordana, M. T., Migheli, A., Giaccone, G., Pezzotta, S. & Mauo, A. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in experimental glial reaction of the rat brain. **Brain Research**, 374: 110-118, 1986.

Schirmmayer, K., Wiemann, M., Bingmann, D., Büsselberg, D. Effects of Lead, Mercury, and Methylmercury on gap Junctions and [Ca²⁺]_i in Bone Cells. **Calcified Tissue International**, 63: 143-139, 1998.

Schroeter, M., Schiene, K., Kraemer, M., Hagemann, G., Weigel, H., Eysel, U.T., Witte, O.W. & Stoll, G. Astroglial responses in photochemically induced focal ischemia of the rat cortex. **Experimental Brain Research**, 106: 1-6, 1995.

Sehara, Y., Hayashi, T., Deguchi, K., Zhang, H., Tsuchiya, A., Yamashita, T., Lukic, V., Nagai, M., Kamiya, T., Abe, K. G-CSF enhances stem cell proliferation in rat hippocampus after transient middle cerebral artery occlusion. **Neuroscience Letters**, 418: 248-52, 2007.

Seixas, T. G., Kehrig, H. A., Fillman, G., Di Benedetto, A. P. M., Souza, C. M. M., Secchi, E. R., Moreira, I., Malm, O. Ecological and biological determinants of trace elements accumulation in liver and kidney of *Pontoporia blainvillei*. **Science of the Total Environment**, 385: 208-220, 2007.

Seki, T., Arai, Y. Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. **Neuroreport**, 6: 2479–82, 1995.

Shanker, G., Aschner, M. Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport. modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. **The Journal of Neuroscience Research**, 66: 998-1002, 2001.

Shanker, G., Allen, J. W., Mutkus, L. A., Aschner, M. The uptake of cysteine in cultured primary astrocytes and neurons. **Brain Research**, 902: 156-163, 2001.

Shanker, G., Aschner, M. Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants. **Molecular Brain Research**, 110: 85-91, 2003.

Smith, G. H. & Hale, J. H. Macrophage/microglia regulation of astrocytic tenascin: synergistic action of transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor. **The Journal of Neuroscience**, 17: 9624-9633, 1997.

Söderström, K. O., Parvinen, L.M and Parvinen, M. Early detection of cell damage by supravital acridine orange staining. **Journal Cellular and Molecular Life Sciences**, 33(2): 265-266, 1977.

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? **Journal of Biology Chemistry**, 279: 19936–19947, 2004.

Steinberg, T. H., Di Virgilio, F. Cell-mediated cytotoxicity: ATP as an effector and the role of target cells. **Current Opinion Immunology**, 3:71–75, 1991.

Stoll, G., Jander, S., & Schroeter. Inflammation and Glial Responses in Ischemic Brain Lesions. **Progress in Neurobiology**, 56: 149-171, 1998.

Stoltenburg-Didinger, G. & Markwort, S. Prenatal Methylmercury Exposure Results in Dendritic Spine Dysgenesis in Rats. **Neurotoxicology and Teratology**, 12: 573-576, 1990.

Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C., Charles, A. C. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. **Journal of Biology Chemistry**, 277: 10482–10488, 2002.

Sugioka, M., Fukuta, Y., Yamashita, M. Ca²⁺ responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina. **Journal of Physiology**, 493: 855–863, 1996.

Takano T., Kang J., Jaiswal J. K., Simon, S. M., Lin, J. H.C., Yu, Y., Li, Y., Yang, J., Diemel, G., Zielke, H. & Nedergaard, M. Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102: 16466-71, 2005.

Takeuchi, T. **Pathology of Minamata disease**, in: **Study Group of Minamata Disease report, Minamata Disease**, Kumamoto Univ., Kumamoto, Japan,141–228, 1968.

Takeuchi, T., Eto, K., Tokunaga, H. Mercury level and histochemical distribution in a human brain with Minamata disease following a long-term clinical course of twenty-six years. **Neurotoxicology**, 10: 651-657, 1989.

Takeuchi, T., Eto, K., Kinjo, Y., Tokunaga, H. Human brain disturbance by methylmercury poisoning, focusing on the long-term effect on brain weight. **Neurotoxicology**, 17: 187-190, 1996.

Tanapat, P., Galea, L. A, Gould, E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 16: 235-9, 1998.

Taupin, P. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: functionality and potential clinical interest. **Medical Science Monitor**, 11: 247-252, 2005.

Thompson, D. R., Furness, R. W. The chemical form of mercury stored in south Atlantic seabirds. **Environmental Pollutant**, 60: 305–317, 1989.

Thompson, R. J., Zhou, N., MacVicar, B. A. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. **Science**, 312: 924-927, 2006.

Thoreson, W. B., Witkovsky, P. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, 18: 765-810, 1999.

Tower, D. B., Young, O. M. The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to wale. **Journal of Neurochemistry**, 20: 269-278, 1973.

Tropepe, V., Craig, C. G., Morshead, C. M., van der Kooy, D: Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. **Journal of Neuroscience**, 17: 7850–59, 1997.

Tsuzuki, Y. Effect of chronic methylmercury exposure on activities of neurotransmitter enzymes in rat cerebellum. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 60: 379-381, 1981.

Turner, M. D., Kilpper, R. W., Smith, J. C., Marsh, D. O. & Clarkson, T. W. Studies on volunteers consuming methylmercury in tuna fish. **Clinical Research**, 23: 2, 1975.

Vela, J. M., Yáñez, A., Gonzales, B., Castellano, B. Time Course of Proliferation and Elimination of Microglia/Macrophages in Different Neurodegenerative Conditions. **Journal of Neurotrauma**, 19: 1503 -1520, 2002.

Venance, L., Glowinski, J., Giaume, C. Electrical and chemical transmission between striatal GABAergic output neurones in rat brain slices. **Journal of Physiology**, 559: 215-30, 2004.

Washburn, K. B. & Neary, J. T. P2 Purinergic Receptors Signal To Stat3 In Astrocytes: Difference In Stat3 Responses To P2y and P2x Receptor Activation. **Neuroscience**, 142: 411-423, 2006.

Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C., Reynolds, B.A. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. **Journal of Neuroscience**, 16: 7599-7609, 1996.

Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C. & Kriegstein, A. R. Calcium Waves Propagate through Radial Glial Cells and Modulate Proliferation in the Developing Neocortex, **Neuron**, 43: 647–661, 2004.

Wheeler-Schilling, T. H., Marquardt, K., Kohler, K., Jabs, R., Guenther, E. Expression of purinergic receptors in bipolar cells of the rat retina. **Brain Research. Molecular Brain Research**, 76: 415–418, 2000.

Wheeler-Schilling, T. H., Marquardt, K., Kohler, K., Guenther, E., Jabs, R. Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells. **Brain Research. Molecular Brain Research**, 92: 177–180. 2001.

Wolf, M. K. And Aronson, S. B. Growth, Fluorescence And Metachromasy of Cells Cultured In The Presence Acridine Orange. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 9: 22-29, 1961.

World Health Organization (WHO), International Program on Chemical Safety. **Environmental Health Criteria 101: Methylmercury**. World Health Organization, Geneva, 1990: 60-99.

Xu, Y., Tamamaki, N., Noda, T., Kimura, K, Itokazu, Y, Matsumoto, N, Dezawa, M, Ide, C. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. **Experimental Neurology**, 192: 251-64, 2005

Yao, H., Gao, J., Feng, Y.B., Pang, Z.Y, Chi, Z.F. 4R-APDC decreases cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats: the effect of 2R, 4R-APDC on cell proliferation, **Neuroreport**, 18: 1459-6, 2007

Yao-Hui, W., Hai-Yan, Z., Na-Lin, Q., Shang-Bin, Y., Sheng-Yuan, L. Involvement of ATP-sensitive potassium channels in proliferation and differentiation of rat preadipocytes. **Acta Physiologica Sinica**, 59: 8-12, 2007.

Ye, Z. C, Wyeth, M. S, Baltan-Tekkok, S., Ransom, B. R. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. **Journal of Neuroscience**, 23(9):3588-96, 2003.

Yong, V. W., Moudjian, R., Yong, F. P., Ruijs, T. C., Freedman, M. S., Cashman, N. & Antel, J. P. Gamma- interferon promotes proliferation of adult human astrocytes *in vitro* and reactive gliosis in the adult mouse brain *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 88: 7016-7020, 1991.

Yoshida, M., Kujiroka, T., Hara, M., Nakazawa, H., Sumi, Yawara. Methylmercury inhibits gap junctional intercellular communication in primary cultures of rat proximal tubular cells. **Archives of Toxicology**, 72: 192-196, 1998.

Zahir, F., Rizwi, S.J., Haq, S.K., Khan, R.H Low dose mercury toxicity and human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 20: 351-360, 2005.

ZappalÀ, A. Li Volti, G., Serapide, M. F., Pellitteri, R. ,Falchi, M. ,La Delia, F. , Cicirata, V., Cicirata, F. Expression of pannexin2 protein in healthy and ischemized brain of adult rats. **Neuroscience**,148: 653-67, 2007.

Zefferino, R., Elia, G., Lasalvia, M., Piccoli, C., Boffoli, D., Capitanio, N., Ambrosi, L. The study of gap junctional intercellular communication in keratinocytes as screening of promoter effect induced by industrial and environmental toxic substances. **La Medicina del Lavaro**, 96: 222-30, 2005.

Zhang, R. L., Zhang, Z. G., Lu, M., Wang, Y., Yang, J. J., Chopp, M. Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 26: 8578-63, 2006.

Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlen, M., Cassidy, R. M, Johansson, C. B., Brismar, H., Shupliakov O., Frisen J, Janson A. M. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 100: 7925-7930, 2003.

Zhao, H. B, Yu, N., Fleming, C. R. Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102:18724-18729, 2005.

ANEXO I

Solução de Cloreto de Bromo

Preparo da solução de 50 ml de solução de Cloreto de Bromo (BrCl)

- 0,55 g de KBrO_3
- 0,75 g de KBr
- 10 ml de H_2O
- 40 ml de HCl
- Colocar os sais em uma garrafa de vidro preto
- Adicionar a água
- Adicionar o ácido com muito cuidado (reage formando uma fumaça densa e tóxica, enquanto ocorre a solubilização do KBrO_3) em banho de gelo
- A garrafa de vidro da solução de BrCl deve ser envolta com papel de alumínio a temperatura ambiente.
- Geralmente deve-se empregar esta solução na razão de 1 % v/v

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)