



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**AÇÕES DO CHUMBO SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL:
ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES**

THAÍS POSSER

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2005

**AÇÕES DO CHUMBO SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL:
ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre
em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA – CCB - UFSC
FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2005**

**AÇÕES DO CHUMBO SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL:
ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES**

THAÍS POSSER

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na Área de Concentração de Neurofisiologia e Comportamento

Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Coordenadora do Curso

Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal (Presidente)
Departamento de Bioquímica – CCB – UFSC

Prof. Dr^a. Christiane Gazzana Salbego
Departamento de Bioquímica – UFRGS

Prof. Dr^a Andréa Gonçalves Trentin
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – CCB – UFSC

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes últimos dois anos, muitas pessoas contribuíram para que este trabalho deixasse de ser apenas um projeto para se tornar uma Dissertação de Mestrado. Deste modo gostaria de agradecer...

A minha mãe Antônia, meu pai Juci, meu irmão Renan e minha irmã Aline por terem me apoiado e me encorajado a prosseguir com meus estudos.

Ao Professor Vivaldo Moura-Neto, pela orientação e amizade durante minha estada no Rio de Janeiro, juntamente com a equipe de seu laboratório na UFRJ. Entre estes um agradecimento especial para, Cláudia, Luciana, Sheila, Jane, Rose, Cris e Rafael, que muito contribuíram para a realização dos primeiros experimentos em cultura de células.

À Professora Andréia G. Trentin e sua equipe por ter colaborado com a última e mais importante etapa do meu trabalho, especialmente ao colega Ricardo, pela grande ajuda na condução dos experimentos com células C6.

Aos Professores Nelson, Carla, Ana Lúcia, Alcir e Marcelo pela amizade, companheirismo e valiosos ensinamentos.

Aos Professores da UFRJ com os quais convivi e aprendi muito: Leny, Maira, Garcia, Sandra entre outros.

Aos professores das disciplinas do Mestrado que muito colaboraram para minha formação.

À professora Christiane G. Salbego e sua equipe da UFRGS pela colaboração nas revelações de Akt.

Aos colegas de laboratório, Camila, Samira, Sandro, Bettina, Carina, Patrícia, Sandra, Cris, Helena, Tiago, Rossana e muitos outros com quem tive a oportunidade de conviver e compartilhar experiências.

Ao Secretário da Pós-Graduação Nivaldo pela paciência, dedicação e por ter ajudado a “quebrar muitos galhos”.

Aos membros da banca por terem aceitado avaliar meu trabalho neste período de férias e próximo do Carnaval.

Ao Prof. Rodrigo B. Leal, por ter me dado oportunidade de realizar este trabalho, o qual muito contribuiu para a minha formação intelectual e pessoal. Além disso, pela amizade, ajuda e conselhos.

Sobretudo, não posso deixar de agradecer imensamente ao Jeferson, por ter estado ao meu lado durante todo este período.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IV
ABSTRACT	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Contaminação Ambiental por Chumbo.....	1
1.2- O Chumbo e o SNC.....	5
1.2.1- Absorção e Incorporação	5
1.2.2- Relação do Chumbo com a Maturidade do SNC	6
1.2.3- Ação do Chumbo no Sistema de Sinalização Celular	7
1.3- A Via das MAPKs.....	10
1.3.1- p38 ^{MAPK}	12
1.3.2- JNK	13
1.3.3- ERK.....	15
1.4- Resistência das Células aos Efeitos do Chumbo - Proteínas Hsps e Akt.....	17
1.5- Importância das Culturas Celulares no Estudo da Neurotoxicidade do Chumbo	21
2- OBJETIVOS	24
2.1- Objetivo Geral.....	24
2.2- Objetivos Específicos.....	24
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1- Animais	25
3.2- Reagentes	25
3.3- Equipamentos	26
3.4- Preparação de Culturas de Astrócitos Corticais	26
3.5- Preparação de Culturas de Células de Glioma U373 humano	27
3.6- Preparação de Culturas de Células de Glioma C6 de rato.....	28
3.7- Tratamento das Células	29
3.8- Imunocitoquímica	30

3.9- Determinação da Viabilidade Celular Através da Medida da Redução do MTT.....	30
3.10- Determinação da Viabilidade celular Através da Contagem de Células.....	31
3.11- Separação de Proteínas.....	32
3.12- Eletrotransferência	33
3.13- Imunodeteção	33
3.14- Dosagem de Proteínas	35
3.15- Análise Estatística	35
4- RESULTADOS.....	36

PARTE 1

4.1- Análise da viabilidade celular através da medida de redução do MTT em cultura de células de glioma humano U373 e astrócitos corticais após tratamento com Chumbo.....	37
4.2- Análise da viabilidade celular em cultura de linhagem de glioma U373 e astrócitos corticais através da contagem do número de células após tratamento com Chumbo.....	40
4.3- Morfologia de culturas primárias de astrócitos corticais incubadas com Chumbo através de imunocitoquímica para Vimentina	43

PARTE 2

4.4- Análise da viabilidade celular pela medida da redução do MTT em cultura de células de glioma C6 de rato após tratamento com Chumbo	46
4.5- Análise da viabilidade celular em cultura de células de glioma C6 de rato através da contagem do número de células após tratamento com Chumbo	48
4.6- Efeito do Chumbo sobre a morfologia de células de glioma C6 de rato após tratamento com Chumbo	50
4.7- Análise da fosforilação de p38 ^{MAPK} em cultura de células de glioma C6 de rato incubadas com Chumbo.....	53
4.8- Análise da fosforilação de JNK1/2 em culturas de células de glioma C6 de rato incubadas com Chumbo.....	55
4.9- Análise da fosforilação de ERK1/2 em culturas de células de glioma C6 de rato incubadas com Chumbo.....	57
4.10- Análise da fosforilação e conteúdo total de Akt em culturas de células de glioma C6 de rato incubadas com Chumbo.....	59

4.11- Análise do imunoconteúdo de Hsp27 e Hsp70 em culturas de células de glioma C6 de rato incubadas com Chumbo	61
4.12- Análise da viabilidade celular pela medida da redução do MTT em culturas de células de glioma C6 de rato após tratamento com Chumbo e PD098059.....	64
4.13- Análise da viabilidade celular através da medida da redução do MTT em culturas de células de glioma C6 de rato após tratamento com Chumbo e SB203580	67
5- DISCUSSÃO	69
6- CONCLUSÕES	78
7- PERSPECTIVAS	81
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

RESUMO

A contaminação ambiental pelo Chumbo representa um importante problema de saúde pública. O Chumbo é um agente neurotóxico que pode causar déficits cognitivos permanentes, principalmente em crianças. Entretanto, seu mecanismo de ação a nível bioquímico e celular no sistema nervoso central (SNC) não está totalmente esclarecido. É bem documentado que o Chumbo pode modular as vias de sinalização celular, sem produzir morte proeminente em alguns tipos celulares. Em dados prévios, nosso grupo demonstrou que o Chumbo pode ativar a via de $p38^{MAPK}$, levando ao aumento da fosforilação de Hsp27 em culturas de células cromafins bovinas e de neuroblastoma. Adicionalmente, foi demonstrado que o metal pode estimular a fosforilação de ERK1/2 e $p38^{MAPK}$, sem afetar a viabilidade celular no hipocampo de animais expostos ao metal na fase de desenvolvimento rápido do SNC. Neste trabalho, foi realizado um estudo dos efeitos do Chumbo sobre a modulação de MAPKs e viabilidade celular, utilizando modelos de culturas de células de glioma C6 de rato, glioma U373 humano e astrócitos corticais, visando caracterizar as ações do metal sobre tipos celulares específicos. As células foram incubadas com Chumbo 0,1, 1 e 10 μ M por 24-72h. As MAPKs foram analisadas através de “western blotting”. A viabilidade celular foi analisada pela medida de redução do MTT e contagem celular. Os resultados mostraram que o Chumbo em concentração muito baixa (0,1 μ M; 24h) aumentou o número de células nas culturas de glioma U373 e astrócitos. Este mesmo efeito foi observado em células de glioma C6 após 24h de incubação. O Chumbo na concentração mais alta (10 μ M) durante 24h não modificou a viabilidade das células de glioma U373 e de astrócitos. Entretanto, no modelo de glioma C6, o Chumbo diminuiu o número de células após 24 e 48 horas de incubação e diminuiu a capacidade celular de redução do MTT em 48 e 72h. Foi analisada a morfologia dos astrócitos imunomarcados com anticorpo anti-Vimentina em resposta ao Chumbo (0,1-10 μ M) por 24 horas e não foi observada alteração. O Chumbo também modulou a via das MAPKs em culturas de glioma C6 de rato após 24 horas de incubação. Desta forma, Chumbo 10 μ M estimulou a fosforilação de $p38^{MAPK}$ e Chumbo 1 e 10 μ M estimulou a fosforilação ERK1. Não houve alteração na fosforilação de JNK1/2 em resposta ao Chumbo. Em estudos de viabilidade através da medida de redução do MTT, verificamos que a viabilidade celular das culturas de glioma C6 de

rato depende de p38^{MAPK} e ERK1/2, à medida que o uso de SB203580 e PD098059, inibidores destas enzimas respectivamente, diminuíram significativamente a viabilidade das culturas. O Chumbo (10µM) exerceu um efeito aditivo com o inibidor de p38^{MAPK}, SB203580 (10µM), sobre a viabilidade celular, indicando que o efeito do metal pode ser independente da ativação de p38^{MAPK}. O tratamento por 24 horas com Chumbo levou a um aumento da expressão de Akt, que foi acompanhado de aumento, de mesma magnitude, da fosforilação da enzima. Não foi observada alteração do conteúdo total de Hsp27 ou Hsp70. Estes dados contribuem para a compreensão de que o Chumbo pode agir sobre vias de sinalização celular que regulam proliferação e sobrevivência em linhagens celulares que são modelos funcionais de astrócitos.

Financiado por CAPES/PROCAD, CAPES, CNPq e International Society for Neurochemistry.

ABSTRACT

The environmental contamination by lead is an important health problem. Lead is a neurotoxic pollutant that produces permanent cognitive deficits in children. In spite of numerous studies, the biochemical and cellular actions of lead in the central nervous system (CNS) are not completely established. Lead may modulate cellular signal transduction pathways without causing drastic changes on cell viability in many cell models. Previous studies of our group have shown that lead may activate p38^{MAPK} pathway and increase the phosphorylation state of heat shock protein 27kDa (Hsp27) in bovine chromaffin cells and neuroblastoma cell line. Additionally, lead causes a stimulation of ERK1/2 and p38^{MAPK} pathway, without changes in cell viability, in the hippocampus of rats exposed to the metal in a period of rapid brain growth. The present work was undertaken in order to show modulation of MAPKs and cell viability in cell culture models of astrocytes and gliomas U373 and C6. Cells were exposed 24-72h with lead acetate 0.1, 1 and 10 μ M. The MAPK pathways were analyzed by western blotting. Cell viability was analyzed by measurement of cellular capacity to reduce MTT and by cell counting. The results showed that lead (0.1 μ M) increases the cell number of glioma U373 and astrocytes at 24h incubation and glioma C6 at 48h incubation. Cell incubation with lead at higher concentration (10 μ M) during 24h did not change the viability of glioma U373 and astrocytes. However, in the model of glioma C6 cell line the higher lead concentration (10 μ M) causes decrease of cell viability measured by MTT reduction or cell counting in periods of 24-72h. Astrocytes exposed to lead (0.1-10 μ M; 24h) did not show changes in morphology analysed by the immunocytochemical staining for vimentin. In the same cell model, lead (10 μ M; 24h) increases the phosphorylation of p38^{MAPK}, and lead (1 and 10 μ M) increases the phosphorylation of ERK1. The phosphorylation level of JNK was not changed by lead. The action of lead on p38^{MAPK} was apparently independent of its effect on cell viability, since the study using the p38^{MAPK} inhibitor, SB203580 (10 μ M) and lead (10 μ M) shows additive action of both treatments. The content of AKT was increased by all concentration of lead; this effect was accompanied by a similar increase at AKT phosphorylation. The content of Hsp27 and Hsp70 were not modified by lead treatment. The present data contribute with the understanding that lead act on fundamental cell signaling pathways that are involved

with regulation of cell growth and surviving in cell lines that are functional models of astrocytes.

Supported By CAPES/PROCAD, CAPES, CNPq e International Society for Neurochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Concentração de Chumbo em amostras de neve da Groenlândia a partir de 800a.C.	1
Figura 02- Correlação entre o aumento de Chumbo na gasolina e a concentração sanguínea de Chumbo na população	2
Figura 03- Diagrama esquemático do sistema de fosforilação de proteínas	8
Figura 04- Cascata de sinalização de p38 ^{MAPK} , JNK1/2 e ERK1/2	11
Figura 05- Estrutura molecular de SB203580	13
Figura 06- Estrutura molecular de PD098059.....	16
Figura 07- Regulação das vias de sobrevivência celular por Akt	19
Figura 08- Imunodeteção de um polipeptídeo através de quimiluminescência	34
Figura 09- Efeito do Chumbo sobre a viabilidade celular pela medida da redução do MTT em culturas de células de glioma U373 tratadas por 24 horas	38
Figura 10- Efeito do Chumbo sobre a viabilidade celular pela medida da redução do MTT em culturas primárias de astrócitos tratadas por 24 horas	39
Figura 11- Efeito do Chumbo sobre o número de células em culturas de células de glioma U373 tratadas por 24 horas	41
Figura 12- Efeito do Chumbo sobre o número de células em culturas primárias de astrócitos tratadas por 24 horas	42
Figura 13- Imunocitoquímica para Vimentina em culturas primárias de astrócitos tratadas por 24 horas com Chumbo	44
Figura 14- Efeito do Chumbo sobre a viabilidade celular pela medida da redução do MTT em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24, 48 e 72 horas	47
Figura 15- Efeito do Chumbo sobre o número de células em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 e 48 horas	49
Figura 16- Efeito do Chumbo sobre a morfologia de cultura de células de glioma C6 após 24 horas de incubação através de microscopia invertida de contraste de fase	51
Figura 17- Efeito do Chumbo sobre a morfologia de cultura de células de glioma C6 após 48 horas de incubação através de microscopia invertida de contraste de fase.....	52
Figura 18- Efeito do Chumbo sobre a fosforilação da proteína p38 ^{MAPK} em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 horas	54

Figura 19- Efeito do Chumbo sobre a fosforilação da proteína JNK1/2 em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 horas.....	56
Figura 20- Efeito do Chumbo sobre a fosforilação da proteína ERK1/2 em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 horas.....	58
Figura 21- Efeito do Chumbo sobre a fosforilação (A) e conteúdo total (B) da proteína Akt em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 horas.....	60
Figura 22- Efeito do Chumbo sobre o conteúdo total da proteína Hsp27 em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 horas.....	62
Figura 23- Efeito do Chumbo sobre o conteúdo total da proteína Hsp70 em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 horas.....	63
Figura 24- Efeito do PD098059 sobre fosforilação de ERK1/2 (A) e viabilidade celular medida pela redução do MTT (B) cultura de células de glioma C6 após a exposição ao Chumbo.....	65
Figura 25- Efeito do Chumbo e PD098059 sobre a viabilidade celular pela medida da redução do MTT em culturas de células de glioma C6.....	66
Figura 26- Efeito do Chumbo e SB203580 sobre a viabilidade celular pela medida da redução do MTT em culturas de células de glioma C6.....	68
Figura 27- Resumo ilustrativo dos resultados obtidos neste trabalho.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP: monofosfato de adenosina
AMPc: monofosfato de adenosina cíclico
AP-1: proteína ativadora 1
ASK1: quinase reguladora de sinal apoptótico -1
ATF: fator indutor de apoptose
ATP: trifosfato de adenosina
ATP7A: ATPase transportadora de Cobre 7A
BAD: Proteína de morte associada a Bcl-2
Bax: Proteína X associada a Bcl-2
Bcl-2: Proteína de células B de linfoma-2
BSA: albumina sérica bovina
CaMK: proteína quinase cálcio/calmodulina dependente
CREB: Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
DCT-1: Transportador de metais divalentes 1
DMSO: dimetil sulfóxido
DMEM-F12: “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” com mistura de nutriente F-12
DNA: ácido desoxirribonucléico
DTT: ditioneitol
ECL: quimiluminescência
EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético
ERK: quinase regulada por sinal extracelular
FITC: isotiocianato de fluoresceína
FKHR: fator de transcrição da família “forkhead”
Gap-43: proteína associada ao crescimento 43kDa
GEF: fatores de troca de nucleotídeos da guanina
GFAP: proteína fibrilar glial ácida
GMP: monofosfato de guanosina
GMPc: monofosfato de guanosina cíclico
Grb2: proteína ligante de receptor de fator de crescimento 2
GRP78: proteína de 78kDa regulada por glicose
GSK: quinase da glicogênio sintase

GTP: guanosina trifosfato
HEPES: ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
HO-1: heme-oxigenase 1
HSF: fator de choque térmico
Hsp: proteína de choque térmico
I κ B: inibidor de NF κ B
JIP: proteínas de interação com JNK.
JNK: quinase c-Jun NH₂-terminal
LTD: depressão de longa duração
LTP: potenciação de longa duração
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
MAPKAPK2: quinase 2 ativada por proteína quinase ativada por mitógeno
MAPKK: quinase da proteína quinase ativada por mitógeno
MAPKKK: quinase da quinase da proteína quinase ativada por mitógeno
MBP: proteína básica da mielina
MEK: quinase da proteína quinase regulada por sinal extracelular
MEKK: quinase da quinase da proteína quinase regulada por sinal extracelular
MKK: quinase da proteína quinase ativada por mitógeno
MLK: quinase de linhagem mixta
MTT: brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium
NBT: “nitro blue tetrazolium”
NF κ B: fator de transcrição nuclear kappa B
NMDA: N-metil D-aspartato
p38^{MAPK}: proteína quinase ativada por mitógeno de 38 kDa
PBS: tampão salina fosfato
PDK-1: proteína quinase 1 dependente de quinase fosfatidil inositol 3
PI3K: fosfatidil inositol 3 quinase
PKC: proteína quinase C
PP1: proteína fosfatase 1
PP2A: proteína fosfatase 2A
Raf: quinase serina/treonina de 74 kDa
Ras: proteína G de 21kDa
ROS: espécies reativas de oxigênio
SAPK: proteína quinase ativada por estresse

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SFB: soro fetal bovino

SNC: sistema nervoso central

SOS: “son of sevenless”

TAK: quinase ativada por fator de crescimento transformante

TBS: tampão tris-salina

TBS-T: tampão tris-salina com Tween-20

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

TNF α : fator de necrose tumoral α

WHO: World Health Organization

1 - INTRODUÇÃO:

1.1 - Contaminação ambiental por Chumbo

O Chumbo é um metal amplamente utilizado pela sociedade, sendo que desde tempos remotos têm-se indícios de sua extração e utilização (Silbergeld, 1997; Gidlow, 2004).

Estudos conduzidos por Patterson, na década de 50, investigando a razão isotópica de certos minerais, apresentaram dados retrospectivos mostrando a exacerbada contaminação ambiental por metais (Patterson, 1953). Estudos em amostra de gelo e solo mostraram que os níveis de Chumbo estavam muito acima do esperado com base no fluxo natural do elemento, mostrando que a atividade humana aumentou severamente os níveis ambientais do metal (Needleman, 2000). O gráfico abaixo (Fig. 01) demonstra que com o aumento da atividade industrial houve um aumento na concentração de Chumbo no ambiente.

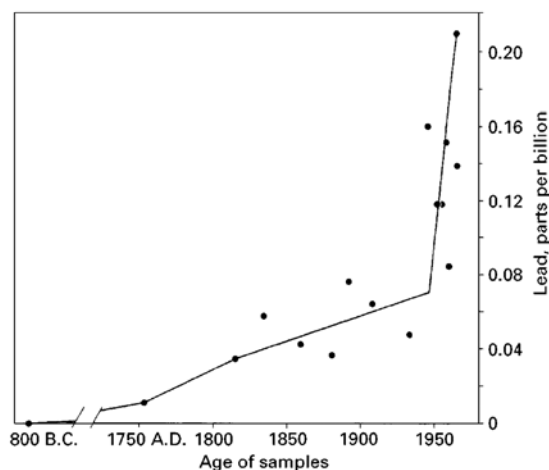


Fig. 01- Concentração de Chumbo em amostras de neve da Groenlândia a partir de 800 a.C., (obtido de Morozumi *et al*, 1969).

O uso indiscriminado de compostos de Chumbo tetraetilados (TEL) como aditivos na gasolina durante as décadas de 20 a 80 teve grande participação no aumento da contaminação ambiental por Chumbo (Needleman, 2000).

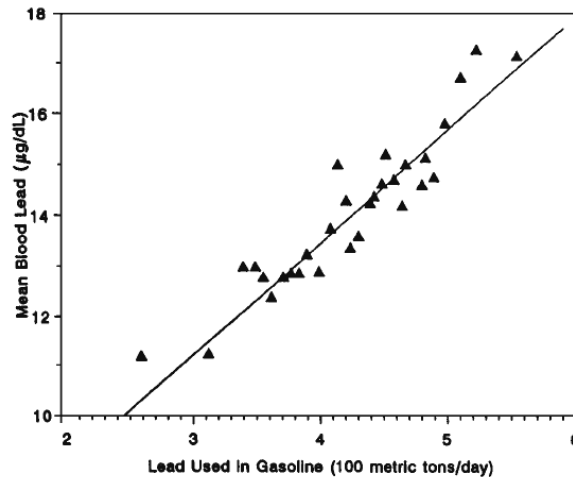


Fig. 02- Correlação positiva entre o aumento do uso de Chumbo na gasolina e a concentração sanguínea de Chumbo na população dos Estados Unidos durante o período de 1976 a 1980 (obtido de Annest *et al.*, 1983).

Durante boa parte do século 20, outra significativa fonte de Chumbo foram tintas contendo até 45% de Chumbo em sua fórmula, sendo este reduzido somente após o ano de 1977 (Silbergeld, 1997). Desse modo, antigas habitações constituem atualmente um risco de intoxicação, uma vez que ainda pode haver substancial liberação de Chumbo para a atmosfera (Clark *et al.*, 1985), contribuindo para a contaminação por exposição ocupacional.

Segundo a World Health Organization (WHO, 1989), a principal forma de dispersão das partículas de Chumbo é através do ar (cerca de 20%), as quais podem permanecer em suspensão por dias, podendo ser carregadas pela chuva, assim acumulando-se na água e no solo. Grande acúmulo de Chumbo ocorre próximo às fontes de descarga do metal em áreas metropolitanas com tráfego pesado. A concentração de Chumbo no ar é maior em grandes cidades do que em áreas suburbanas. Entretanto, regiões muito remotas do planeta podem sofrer acúmulo do metal.

A mineração do carvão e a extração de Chumbo, juntamente com seu refinamento podem representar também uma outra importante forma de contaminação ambiental (Porto, 1989; Jarup *et al.*, 1998; Bressler *et al.*, 1999; Koller *et al.*, 2004).

Os efeitos do envenenamento por Chumbo são conhecidos desde a antiguidade. Até o início do século XX a contaminação por Chumbo era reconhecida somente como uma enfermidade de adultos oriunda de exposição ocupacional. Em 1890 foram descobertos os primeiros casos de intoxicação por Chumbo em crianças. Apesar disso, apenas em 1920 foi formalmente assumido que as crianças consistem numa população de risco à exposição ao Chumbo (Koller *et al.*, 2004), hoje representando um importante problema de saúde pública no mundo (Silbergeld, 1997; Koller *et al.*, 2004).

Essa maior suscetibilidade em crianças deve-se a 3 fatores principais: contaminação pela ingestão de Chumbo; maior absorção através do trato gastrintestinal e maior vulnerabilidade do sistema nervoso em relação à população adulta (Koller *et al.*, 2004).

As características clínicas do envenenamento por Chumbo incluem: dor abdominal e sintomas neurológicos de encefalopatia, que incluem dores de cabeça e confusão. Em casos severos da enfermidade podem ocorrer falência renal e convulsões. Uma intoxicação ainda maior pode agravar o quadro para coma e morte do indivíduo (Koller *et al.*, 2004).

Atualmente, sabe-se que não apenas doses altas, mas também doses muito baixas de Chumbo, podem estar associadas com neurotoxicidade (Silbergeld, 1997). Canfield *et al.* (2003) mostraram declínio da função cognitiva em crianças cujos níveis sanguíneos de Chumbo nunca estiveram acima dos níveis delimitados pela WHO (10ug/dl), sugerindo uma revisão nas margens de segurança.

Nos últimos 40 anos, os níveis sanguíneos de Chumbo observados na população têm caído significativamente. Durante a década de 1970, não eram raros níveis de 40µg/dl na população infantil. Atualmente, estudos apontam para níveis de 2-4 µg/dl. Apesar disso, estes níveis basais ainda constituem um risco de vida, uma vez que na sociedade pré-industrial, os níveis basais estimados eram 100 ou 1000 vezes menores (Owen & Flegal, 1998; Koller *et al.*, 2004).

Os estudos relacionados à toxicidade do Chumbo e o SNC são muito contraditórios. A gravidade de seus efeitos depende de vários fatores, entre eles a intensidade e o tipo de exposição, a idade dos indivíduos (Correa *et al.*, 2004) e também fatores demográficos e sociais (Silbergeld, 1997).

O período de desenvolvimento é o estágio mais suscetível à toxicidade do Chumbo, tanto em crianças quanto em animais (Poblano *et al.*, 2001). Exposição ao Chumbo durante o desenvolvimento de ratos acarretou acúmulo do metal no hipocampo e causou déficits de memória (Jett *et al.*, 1997) prejudicou a indução de LTP no giro denteado (Gilbert *et al.*, 1996), causou alterações no comportamento motor (Rodrigues *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Cory-Slechta *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 2001) e morte apoptótica em células hipocampais de ratos (Sharifi *et al.*, 2002). Além disso, houve mal formação de regiões cerebrais (Wilson *et al.*, 2000), redução na ramificação dendrítica e densidade sináptica no córtex cerebral de ratos (Petit & LeBoutillier, 1979) expostos ao Chumbo.

Estes efeitos têm sido atribuídos em parte a ações do Chumbo sobre a neurotransmissão glutamatérgica. Tem sido demonstrado que o Chumbo modula a ativação e diminui a afinidade do MK 801 por receptores NMDA (Cory-Slechta *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2004), altera a expressão de RNAm de subunidades NR-1 do receptor

NMDA no hipocampo (Guilarte *et al.*, 2003) e altera durante o desenvolvimento a composição de subunidades que compõem o receptor NMDA (Toscano *et al.*, 2002).

1.2 - O Chumbo e o SNC

1.2.1 - Absorção e Incorporação

Seres humanos e animais podem sofrer exposição ao Chumbo através da ingestão de água ou alimento além do solo e poeira contaminados (Goyer, 1971; WHO, 1989; Trotter, 1990).

Uma vez na corrente sanguínea, o Chumbo pode cruzar rapidamente a barreira hematoencefálica através de mecanismos não específicos de captação de Chumbo (Bradbury & Deane, 1993). Sistemas de transporte, como canais de Cálcio do tipo-L, presentes na membrana de neurônios cerebelares em cultura (Mazzolini *et al.*, 2001) e astrócitos (Legare *et al.*, 1998) facilitam o influxo de Chumbo, principalmente na presença de estímulos despolarizantes ou neurotransmissores. Os metais podem compartilhar alguns mecanismos de entrada, distribuição e armazenamento nas células cerebrais. Os transportadores 1 (DCT1), também conhecidos como transportadores de metais divalentes, são transportadores de Cobre presentes em neurônios hipocâmpais, mas que também podem transportar outros íons metálicos, como Manganês e Chumbo (Tiffani-Castiglioni & Qian, 2001).

No cérebro, o Chumbo se acumula nos astrócitos, que captam e acumulam este metal em sítios intracelulares como lisossomos, mitocôndria e núcleo, desse modo protegendo neurônios mais vulneráveis dos efeitos tóxicos deste metal (Lindahl *et al.*, 1999; Tiffani-Castiglioni & Qian, 2001; Qian *et al.*, 2001). A astrogliia possui muitas características que permitem a elas servirem como depósitos de metais no cérebro. Entre estas, podemos citar a presença de processos celulares denominados pés

terminais rodeando toda a superfície vascular do cérebro e da piamáter. A associação dos pés terminais dos astrócitos com os vasos sanguíneos é importante pelo fato de que os astrócitos podem prover um canal ligando o sangue e os neurônios mais profundos do parênquima cerebral permitindo a passagem de íons e metabólitos (Tiffany-Castigliani *et al.*, 1986). Além disso, a localização do corpo celular dos astrócitos entre as células neuronais e o endotélio dos capilares compondo a barreira hematoencefálica faz dos astrócitos as primeiras células do parênquima cerebral a entrar em contato com metais que ultrapassam esta barreira (Tiffany-Castiglioni *et al.*, 1989).

Metalotioneínas são proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína com alta afinidade por íons metálicos divalentes e radicais livres, equilibrando com isso o ambiente celular e diminuindo os efeitos neurotóxicos destes compostos. Astrócitos possuem altos níveis de metalotioneínas I e II (contrastando com baixos níveis encontrados em neurônios). Além disso, possuem elevados níveis de glutathione, um tripeptídeo responsável por grande parte do potencial redox presente no citoplasma e expressam diversas proteínas carreadoras de metal como a ceruloplasmina e ATP7A (Hamer, 1986; Tiffany-Castiglioni & Qian, 2001). A presença destas proteínas pode permitir aos astrócitos quelar metais livres no cérebro, desse modo exercendo ação neuroprotetora .

1.2.2 - Relação do Chumbo com a maturidade do SNC

Muitos estudos *in vitro* têm conseguido correlacionar o efeito neurotóxico do Chumbo com diferentes estágios de desenvolvimento do SNC. Sharifi *et al.* (2002) demonstraram que o hipocampo de animais jovens tratados com Chumbo é mais suscetível ao aparecimento de células apoptóticas e ao aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, em comparação aos animais adultos. Culturas imaturas de

agregados de células telencefálicas de ratos expostas ao Chumbo apresentaram alterações morfológicas de astrócitos acompanhadas de morte com ativação da microglia, sendo que este efeito foi pouco pronunciado em culturas maduras (Zurich *et al.*, 2002). Células progenitoras de oligodendrócitos expostas ao Chumbo apresentaram atraso na diferenciação e maior suscetibilidade às ações do metal quando comparado às células maduras (Deng *et al.*, 2001). A exposição prolongada ao Chumbo pode causar morfologia hipertrófica de astrócitos hipocámpais e cerebelares observadas através da imunomarcagem para Vimentina (Selvin-Testa *et al.*, 1994). Além disso, estudos *in vivo* demonstraram variação na expressão cerebelar de GFAP (proteína fibrilar ácida da glia), Gap 43 (proteína associada ao crescimento 43) e MBP (proteína mielínica básica) ao longo do desenvolvimento pós natal de ratos tratados cronicamente com Chumbo (Zawia & Harry, 1996). Buchheim *et al.*, (1994) demonstraram que o tratamento pré e pós natal com Chumbo em macacos *Rhesus* pode causar um atraso na diferenciação astrocítica, bem como persistência tardia de glia radial.

1.2.3 - Ação do Chumbo no Sistema de Sinalização Celular

Nos organismos multicelulares, as células necessitam utilizar vias de sinalização para comunicar-se entre si e para comandar diversas funções relacionadas à migração, proliferação, diferenciação e morte (Davis, 2000).

Neste processo, a fosforilação de proteínas representa uma via comum e de fundamental importância. Na prática, todos os tipos de sinais extracelulares, dentro ou fora do SNC, são conhecidos por produzir muitos de seus efeitos fisiológicos, através da regulação do estado de fosforilação de proteínas específicas em suas células alvo (Robinson & Cobb, 1997; Hunter, 2000; Greengard, 2001).

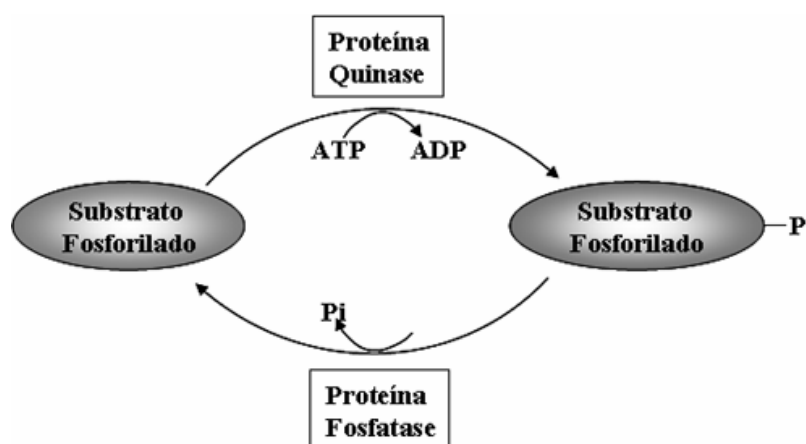


Fig. 03 – Diagrama esquemático do sistema de fosforilação de proteínas.

Um sistema de fosforilação de proteínas consiste de: uma proteína quinase, uma proteína fosfatase e um substrato protéico. Estes componentes interagem de acordo com a figura 3. Proteínas quinases são classificadas como proteínas serina/treonina ou tirosinas quinases que são capazes de fosforilar substratos protéicos em resíduos de serina/treonina ou tirosina. Em todos os casos, as proteínas quinases catalisam a transferência de um grupo fosfato γ do ATP para o grupo hidroxila no respectivo resíduo de aminoácido em seu substrato protéico. Este grupo fosfato altamente negativo altera a conformação da proteína alvo alterando sua função ou atividade. Proteínas fosfatases catalisam a clivagem desta ligação fosfoéster presente no substrato protéico através da reação de hidrólise (Nestler & Greengard, 1999).

Sinais extracelulares ou primeiros mensageiros incluem uma variedade de neurotransmissores, hormônios, fatores tróficos, bem como a luz e os próprios impulsos nervosos. Estes sinais indiretamente levam à fosforilação de proteínas pelo aumento da concentração de segundos mensageiros intracelulares ou através da estimulação de receptores com atividade quinásica (exemplo: receptores tirosina quinases). Entre as

proteínas quinases melhor estudadas no cérebro estão as dependentes de AMPc, GMPc, Cálcio e diacilglicerol (Nestler & Greengard, 1999).

Tem sido bem documentado que o Chumbo pode interagir com uma variedade de moléculas envolvidas na sinalização celular, entre elas receptores NMDA, canais de Cálcio (Kiss & Osipenko, 1994), proteínas ligantes de Cálcio e proteínas quinases dependentes de Cálcio (Long *et al.*, 1994; Bressler *et al.*, 1999).

O Chumbo afeta o mecanismo de liberação de neurotransmissores (Bressler *et al.*, 1996), causa ativação de proteínas Cálcio-moduladas (Bressler *et al.*, 1999) e altera a atividade de enzimas como adenilato ciclase (Sandhir *et al.*, 1994; Rodrigues *et al.*, 1999).

A proteína quinase C (PKC) é classicamente apontada como um alvo importante para a ação do Chumbo (Markovac & Goldstein, 1988; Murakami *et al.*, 1993; Rajanna *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003;). Além disso, via calmodulina, a proteína quinase Ca^{2+} /calmodulina dependente (CaMK) e a proteína fosfatase 2B (calcineurina) podem representar alvos para a ação do Chumbo (Vig & Nath, 1991; Kern & Audesirk, 1995; Kern & Audesirk, 2000; Kern *et al.*, 2000). Recentemente, também foi descrito que o Chumbo pode modificar a expressão de fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1 (Ramesh *et al.*, 1999).

1.3 - A Via das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)

Proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) compõem um grupo de proteínas serina-treonina quinases cuja função e regulação tem sido conservadas ao longo da evolução desde organismos unicelulares como leveduras a organismos complexos como o homem (Nebreda & Porras, 2000; Martín-Blanco, 2000; Schlessinger, 2000; Chang & Karin, 2001; Johnson & Lapadat, 2002).

As MAPKs conduzem, amplificam e integram sinais originados de uma diversidade de estímulos extracelulares recebidos na superfície da célula. Entre estes sinais estão fatores de crescimento, toxinas, citocinas ou estresse ambiental (Tibbles & Woodgett, 1999; Martín-Blanco, 2000; Chang & Karin, 2001). O resultado disto inclui a execução de respostas celulares como proliferação, diferenciação, desenvolvimento, inflamação ou apoptose (Davis, 2000; Dong & Bode, 2003).

Nos mamíferos, as MAPKs são agrupadas em pelo menos quatro famílias com base na similaridade das seqüências de aminoácidos, mecanismos de regulação por proteínas colocadas acima na via de sinalização e sensibilidade à ativação (Robinson & Cobb, 1997).

Estas famílias compreendem as proteínas quinases ativadas por estresse (SAPKs) que incluem as JNKs ou Jun quinases, composta por JNK1/2/3 (Tibbles & Woodget, 1999), a proteína ativada por estresse p38^{MAPK} composta por proteínas p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ (Martín-Blanco, 2000) e a ERK1/2, uma das famílias de MAPKs melhor estudada no cérebro (Chang & Karin, 2001). Todas as MAPKs são ativadas por dupla fosforilação em resíduos de treonina e tirosina (Yang *et al.*, 2003).

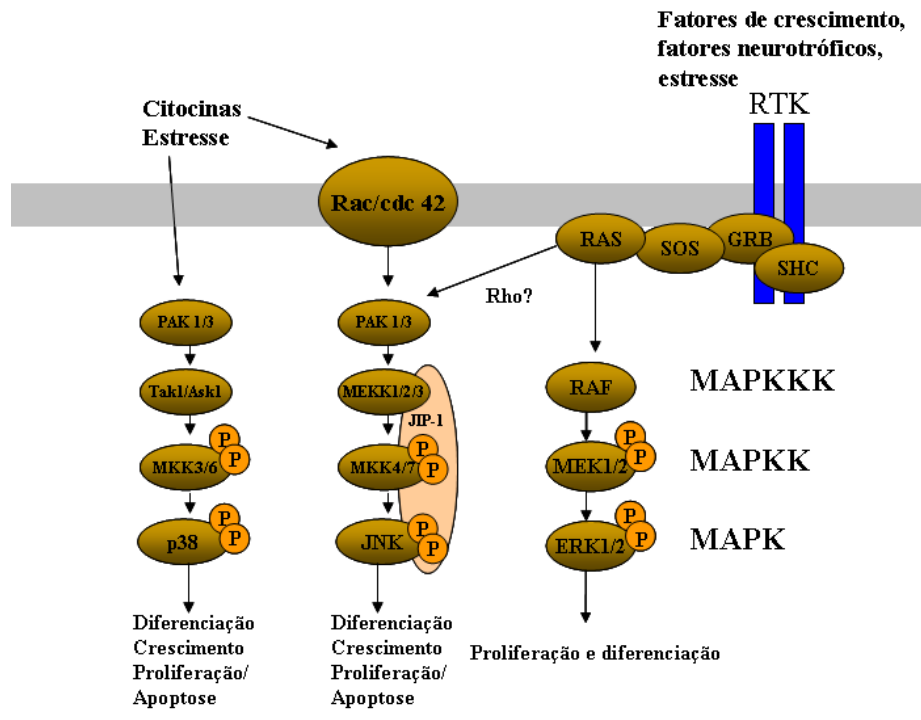


Fig. 04 – Cascata de sinalização de p38^{MAPK}, JNK1/2 e ERK1/2.

A cascata de sinalização das MAPK compõe-se de uma cascata de três quinases (Fig.04) a qual se inicia pela chamada MAP quinase quinase quinase (MAPKKK). Esta, por sua vez, ativa uma segunda quinase, a MAPKK através da fosforilação de resíduos de serina e treonina. A ativação da MAPKK, é responsável pela subsequente fosforilação de MAP quinases em resíduos de treonina e tirosina (Robinson & Cobb, 1997; Keyse, 2000; Hunter, 2000; Yang *et al.*, 2003).

Os principais alvos das MAPKs são os fatores de transcrição. Para que haja fosforilação destes fatores, as MAPKs podem translocar-se do citoplasma para o núcleo, sendo que esta translocação geralmente está associada com ativação das MAPKs (Keyse, 2000; Chang & Karin, 2001). A ativação de fatores de transcrição pode resultar em transcrição gênica de proteínas celulares importantes como citocinas, receptores e fatores de crescimento (Keyse, 2000; Farooq & Zhou, 2004).

1.3.1 - p38^{MAPK}

A proteína p38^{MAPK} foi identificada inicialmente em 1994 como uma MAPK alvo da ação de endotoxinas e hiperosmolaridade em células de mamíferos (Tibbles & Woodgell, 1999; Martín-Blanco, 2000). A p38^{MAPK} é amplamente distribuída nos tecidos de mamíferos, incluindo o cérebro (Mielke & Herdegen, 2000). A ativação desta proteína dá-se através da fosforilação de resíduos de treonina 180 e tirosina 182 (Martín-Blanco, 2000).

Atualmente muitos experimentos sugerem um envolvimento da p38^{MAPK} na resposta inflamatória (Johnson e Lapadat, 2002), na sinalização celular induzida por estresse, na proliferação e apoptose (Nebreda & Porras, 2000). Adachi-Yamada *et al.* (1999) e Suzanne *et al.* (1999), demonstraram uma relação de proteínas homólogas à p38^{MAPK} com o desenvolvimento das asas e ovos de *Drosophilas*. Além disso, foi sugerida uma importância da p38^{MAPK} no processo de diferenciação celular em linhagem tumoral de fibroblastos (Engelman *et al.*, 1998), em adipócitos (Engelman *et al.*, 1999) e em neurônios (Morooka & Nishida, 1998; Iwasaki *et al.*, 1999), bem como na proliferação e sobrevivência celular (Nebreda & Porras, 2000) em neurônios (Kolodziejczyk *et al.*, 1999) e cardiomiócitos (Zechner *et al.*, 1998).

É bem caracterizado o envolvimento da p38^{MAPK} em condições de isquemia (Irving *et al.*, 2000), estresse oxidativo (Clerk *et al.*, 1998; Lee e Corry, 1998a; Bhat e Zhang, 1999; Lee *et al.*, 2000), excitotoxicidade (Kawasaki *et al.*, 1997) e exposição a metais pesados (Hung *et al.*, 1998a; Samet *et al.*, 1998; Galán *et al.*, 2000; Wang & Bonner, 2000). A principal via que ativa a p38^{MAPK} em mamíferos é através da MKK6 (Derijard *et al.*, 1995) e MKK3 (Tibbles & Woodget, 1999). A p38^{MAPK} na forma ativa pode fosforilar fatores de transcrição e outras quinases (Derijard *et al.*, 1995).

O envolvimento da p38^{MAPK} nos processos de iniciação e progressão de processos imunopatológicos e inflamatórios impulsionou a síntese de novas drogas que

atuam como inibidoras de p38^{MAPK}. Compostos como o 2,4,5 triaril imidazol (SB203580) inibem a atividade catalítica da p38^{MAPK} competindo com ATP pela ligação no sítio da proteína (Pelaia *et al.*, 2005). Estes constituem poderosas ferramentas para o estudo dos eventos de sinalização celular mediados pela p38^{MAPK}.

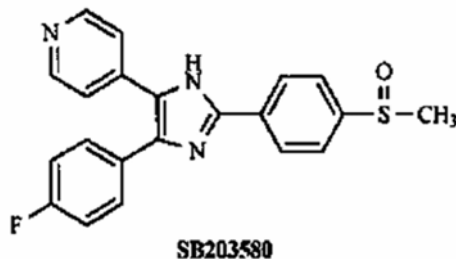


Fig. 05 - Estrutura molecular do inibidor de p38^{MAPK}, SB203580 (obtido de Pelaia *et al.*, 2005).

1.3.2 - Quinase c-Jun Amino Terminal (JNK)

As proteínas JNK quinases são ativadas por citocinas e por exposição de células a muitas formas de estresse físico (estresse osmótico, estresse redox e radiação). Estas proteínas são codificadas por 3 genes. Os genes Jnk1 e 2 são amplamente expressos. Ao contrário, o gene JNK3 tem expressão limitada ao coração, cérebro e testículos. Formas transcritas destes genes codificam isoformas de 46 e 55KDa (Derijard *et al.*, 1995).

As proteínas quinases JNK são ativadas por fosforilação sobre aminoácidos treonina e tirosina pelas proteínas MKK4 e MKK7. A MKK7 é ativada primariamente por citocinas (Derijard *et al.*, 1995) e MKK4 por estresse ambiental. Estas, por sua vez são ativadas por dupla fosforilação pelas MAPKKK (MEKK1 – 4) e proteínas quinases do grupo das linhagens mistas (MLK1, MLK2, MLK3, DLK e LZK), bem como o grupo ASK (ASK1 e 2), TAK1 e TPL2 (Davis, 2000). Porém ainda é incerta a ativação de JNK por estas proteínas a nível fisiológico. Evidências apontam para uma mediação

da proteína Rho da família de GTPases mediando a ativação de JNK, a partir de receptores tirosina quinases (Davis, 2000; Schlessinger, 2000).

Foram identificadas também proteínas de ancoramento interagindo com JNK. Estas incluem a proteína de interação com JNK1 (JIP1), a qual potencializa a transmissão do sinal através da organização de módulos de sinalização, interagindo individualmente com as proteínas que compõem este módulo (Yasuda *et al.*, 1999). JNKs podem fosforilar uma variedade de proteínas nucleares, como o fator de transcrição c-Jun (Gupta, *et al.*, 1996; Mindem & Karin, 1997), ATF2 (Gupta *et al.*, 1995) e proteínas citoplasmáticas, como proteínas do citoesqueleto (Reynolds *et al.*, 1997), p53 (Fuchs *et al.*, 1998) e Bcl-2 (Park *et al.*, 1997). Possíveis papéis das proteínas JNKs consistem no seu envolvimento na regeneração neuronal e neuroplasticidade (Mielke & Herdegen, 2000). Além disso, também são sugeridos como potenciais papéis fisiológicos das JNKs seus efeitos anti-apoptóticos (Kuan *et al.*, 1999; Wisdom *et al.*, 1999).

Apesar de vários estudos sugerirem papéis fisiológicos para as JNKs (Bevilaqua *et al.*, 2003) é bem caracterizada a participação dessas quinases como mediadores de morte celular neuronal e degeneração na excitotoxicidade, isquemia, lesões de fibras nervosas, retirada de fatores tróficos e na toxicidade por metais pesados (Iryo *et al.*, 2000; Mielke & Herdegen, 2000).

1.3.3 - Quinase Regulada por Sinal Extracelular (ERK):

As proteínas ERKs constituem a cascata de sinalização mais bem estudada em células de mamíferos, nas quais expressam-se amplamente (Robinson & Cobb, 1997; Johnson & Lapadat, 2002).

Muitos estímulos diferentes são capazes de ativar a via das ERK1 e ERK2. Estes incluem fatores de crescimento, citocinas, infecções virais, carcinógenos e influxo de Cálcio (Johnson & Lapadat, 2002; Thomas & Huganir, 2004). O receptor tirosina quinase (RTK) exerce um papel importante na ativação das ERKs. A fosforilação de resíduos específicos de tirosina no RTK pode recrutar moléculas de sinalização com domínio SH2 para o sítio do receptor. Entre estas se incluem a fosfolipase C- γ 1 (PLC- γ 1), fosfatidilinositol-3-Kinase (PI-3K) e a proteína ligadora de receptor de fator de crescimento 2 (Grb2). O recrutamento de Grb2 para a membrana é uma passo importante que pode regular a via das MAPKs. Grb2 é uma molécula adaptadora que possui um domínio SH2 e dois domínios SH3. O domínio SH2 reconhece a tirosina fosforilada no RTK e ancora Grb2 no receptor. O domínio SH3 interage com a proteína “son of sevenless” (SOS), uma proteína estimuladora da troca de nucleotídeos de guanina. A SOS estimula a liberação de GDP e ligação de GTP em uma proteína G de baixo peso molecular chamada Ras. A Ras interage e transloca a proteína quinase Raf para a membrana plasmática, onde Raf torna-se ativa e catalisa a fosforilação de MEK. Esta por sua vez fosforila ERK nos resíduos treonina e tirosina, ativando a enzima (Fig. 04), (Nestler & Greengard, 1999; Schlessinger, 2000; Hunter, 2000).

As ERKs possuem como alvo principal fatores de transcrição como o fator CREB e ELK1, proteínas de citoesqueleto e enzimas regulatórias de outras quinases. As ERKs estão envolvidas em respostas celulares a fatores de crescimento e outros

mitógenos e exercem ações regulatórias sobre mecanismos de proliferação e diferenciação (Thomas & Huganir, 2004).

Inibidores da via das ERKs são úteis para o estudo de quinases em muitos tecidos e tipos celulares inclusive o sistema nervoso. Foram descritos compostos sintéticos que inibem a ativação da ERK. Entre estes, o PD098059 (Fig. 6) pode competir com a ligação de ATP no alvo “upstream” da proteína ERK, a MEK (Thomas & Huganir, 2004).

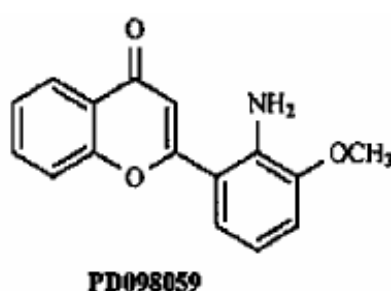


Fig. 06 - Estrutura molecular do inibidor de ERK1/2, PD098059, (obtido de Pelaia et al, 2005).

Os metais podem modular significativamente a via das MAPKs; no caso do Chumbo, várias ações sobre estas enzimas tem sido documentadas, tais como: estimulação da fosforilação de ERK1/2 e MEK1/2 dependente de PKC em cultura de astrocitoma (Lu *et al.*, 2002) e ativação de NF-KB, AP-1 e estimulação da fosforilação de MEK e JNK em células cromafins (Ramesh *et al.*, 1999); estimulação da fosforilação de p38^{MAPK} e Hsp27 em células cromafins bovinas e neuroblastoma humano (Leal *et al.*, 2002); estimulação da fosforilação de ERK1/2 e AKT em anedocarcinoma (Lin *et al.*, 2003a); aumento da fosforilação de ERK1/2 e fator de transcrição CREB dependentemente de PKC e CaMKII em linhagem neuronal (Zhang *et al.*, 2003); ativação da EKR1/2 e p38^{MAPK} em fatias hipocampais de ratos (Cordova *et al.*, 2004).

1.4 - Resistência das Células aos efeitos do Chumbo – Proteínas Hsps e Akt.

A origem dos estudos de Akt, (também conhecida como proteínas quinase B, devido a similaridades com as proteínas PKA e PKC - Nicholson & Anderson, 2002), parte de 1977 com a descoberta do vírus Akt8 oriundo de camundongos com alta incidência de linfomas espontâneos. Após infecção de células epiteliais e posterior isolamento deste vírus, descobriu-se que ele continha uma seqüência oncogênica, denominada Akt. Posteriormente, também foram encontrados fragmentos de DNA contendo homólogos de Akt em células de adenocarcinoma humano, sugerindo um papel de Akt na patogênese de tumores (Brazil & Hemmings, 2001). Atualmente conhecemos três membros da família Akt: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) e Akt3 (PKB γ), os quais possuem 80% de homologia entre si (Brazil & Hemmings, 2001; Nicholson & Anderson, 2002), sendo que algumas isoformas podem ser superexpressas em cânceres de ovário, pâncreas e de mama (Cheng *et al.*, 1992, Cheng *et al.*, 1996; Nakatani *et al.*, 1999). A análise da seqüência de aminoácidos de Akt mostra um domínio de 100 resíduos de aminoácidos na porção N-terminal da molécula, chamado domínio PH, que pode mediar a interação de Akt com fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (Brazil & Hemmings, 2001).

Foi proposto um modelo de regulação de Akt por intermédio do receptor tirosina quinase. Dessa forma, a ativação do receptor tirosina quinase por ligantes como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), ocasionam a autofosforilação do receptor na porção intracelular. Assim, levam ao recrutamento de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) para a membrana plasmática, através da ligação do domínio SH2 da subunidade regulatória (p85) da proteína, ao resíduo de fosfotirosina do receptor. Isto ocasiona uma mudança conformacional na quinase e sua ativação, o que favorece a síntese de 3'-fosfoinositídeos. A Akt citosólica se desloca para a membrana plasmática ligando-se aos 3'-fosfoinositídeos produzidos. A

Akt associada à membrana é fosforilada sobre um resíduo de treonina 308 pela PDK1 (quinase 1 dependente de fosfoinosítido, cuja atividade depende de lipídeos de inositol fosforilados na posição 3') e na serina 473 por uma quinase ainda indeterminada (Brazil & Hemmings, 2001; Lawlor & Alessi, 2001; Neri *et al.*, 2002).

Entre as proteínas alvo de AKT estão a proteína apoptótica BAD, os fatores de transcrição CREB, membros da família “forkhead” de fatores de transcrição, I κ -B quinase, procaspase-9 e GSK3, p27 e p21 (Lawlor & Alessi, 2001; Nicholson & Anderson, 2002; Downward, 2004) (fig.07). A Akt está envolvida na proliferação, diferenciação e proteção de apoptose, síntese protéica e angiogênese (Brazil & Hemmings, 2001; Kim *et al.*, 2004). Em tumores, a AKT demonstrou um papel importante na tumorigenicidade e resistência a drogas quimioterápicas (O’Gorman & Cotter, 2001). Em culturas neuronais, houve aumento da fosforilação de Akt e GSK3 após tratamento com Lítio, protegendo as células da excitotoxicidade glutamatérgica (Chalecka-Franaszek & Chuang, 1999). No esquema apresentado na fig. 07 podemos visualizar os mecanismos de ação da AKT promovendo a sobrevivência celular.

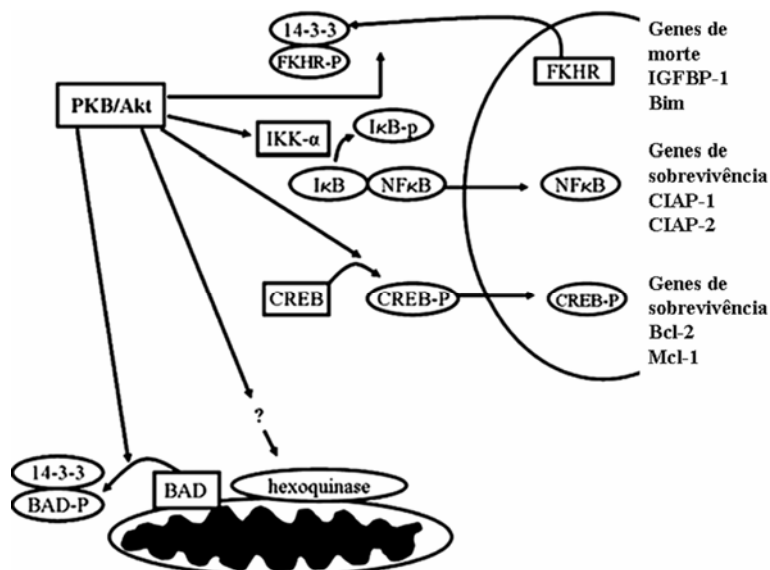


Fig. 07 - Regulação das vias de sobrevivência celular por AKT. A Akt pode promover sobrevivência celular por muitos mecanismos: (1) diminuição da transcrição de genes de morte por fosforilação de fatores de transcrição da família “forkhead”, como FKHR, promovendo seu sequestro no citoplasma por proteínas 14-3-3, (2) aumento da transcrição de genes de sobrevivência pela ativação de fatores de transcrição NFκ-B e CREB, (3) fosforilação e inativação da proteína BAD, (4) manutenção da integridade mitocondrial pela ativação de hexoquinases (Modificado de Nicholson & Anderson, 2002).

Embora esteja claro que a Akt está fortemente envolvida na regulação da sobrevivência e crescimento celular, são ainda incertos quais os alvos que medeiam estes processos fisiologicamente. Um grande número de alvos foi descoberto nos últimos anos, como a GSK3 e membros da família “forkhead” de fatores de transcrição, porém o grau de importância diante de outros alvos, ainda é duvidoso. Os metais demonstraram capacidade de modular a via de Akt em diferentes culturas celulares, sendo observado estímulo da fosforilação de Akt em resposta ao Cádmio (Matsuoka et al, 2001), Arsenito (Souza et al, 2001), Vanadato (Zhang et al, 2004) e Chumbo (Lin et al, 2003a). O significado fisiopatológico desta modulação ainda não está bem esclarecido, porém sugere-se que esteja correlacionado com mecanismos de sobrevivência e proliferação celular.

As Hsps (heat shock protein) ou proteínas de choque térmico pertencem a uma classe conservada de proteínas, expressas constitutivamente pelas células e/ou induzidas sob condições estressantes (Beck *et al.*, 2000; Sreedhar & Csermely, 2004), estando presentes em todas as células vivas. A expressão de Hsp foi primeiramente detectada em glândulas salivares de *Drosophila melanogaster* após insulto com choque térmico, sendo este fato correlacionado com citoproteção e tolerância à temperatura (Ritossa, 1962). Hoje tem-se relevado a importância das Hsps na regulação, proliferação e manutenção do ciclo celular (Pechan, 1991; Helmbrecht *et al.*, 2000; Sreedhar & Csermely, 2004). Muitos estudos correlacionaram os níveis de Hsps com mecanismos de tolerância celular ao estresse. Quando células foram adaptadas a elevadas concentrações de cloreto de sódio, aumentaram os níveis intracelulares de Hsp70 e apresentaram resistência à morte quando expostas a altas concentrações de uréia. O mesmo não foi observado quando o acúmulo de Hsp70 foi inibido por SB203580 (Sheikh-Hamad *et al.*, 1998) ou transfecção destas células com construído antisense-Hsp70 (Neuhofer *et al.*, 1999). Foi observado aumento da fosforilação e da expressão de Hsp27, Hsp90 e Hsp70 em modelos de pré-condicionamento e tolerância celular à isquemia *in vivo* (Valentim *et al.*, 2001; Dhodda *et al.*, 2004) e *in vitro* (Valentim *et al.*, 2003).

O estado redox da célula também pode influenciar a expressão de proteínas de resposta ao estresse (Schoeniger *et al.*, 1994; Gorman *et al.*, 1999; Calabrese *et al.*, 2004). Além disso, agentes depletors de glutathiona (GSH) potencializaram a indução de Hsp70 por Cádmio em culturas de células de hepatoma (Freeman *et al.*, 1993), células amnióticas (Abe *et al.*, 1994) e glioma C6 de rato (Ito *et al.*, 1998). Compostos antioxidantes diminuíram a expressão de Hsp70 e Hsp27 induzida por alta temperatura em células mielocíticas (Gorman *et al.*, 1999).

A maioria das Hsps são chaperonas moleculares: interagem momentaneamente com proteínas parcialmente enoveladas ou não enoveladas, desse modo assegurando o correto enovelamento dessas proteínas. Além disso, elas podem participar do transporte de proteínas intracelulares e interagir com elementos do citoesqueleto (Beck *et al.*, 2000). Segundo Helmbrecht *et al.*, (2000), os processos que promovem o enovelamento e montagem de novas proteínas, desempenham um importante papel na transdução de sinal. Dessa forma, as Hsps podem participar do processo de ativação de proteínas quinase. Algumas Hsps formam complexos com proteínas da via de ativação de ERK1/2 como Rak e MEK (Helmbrecht *et al.*, 2000).

Entre as mais conhecidas características dos metais pesados, está sua capacidade de propiciar síntese e acúmulo de proteínas de resposta ao estresse (Linguist & Craig, 1988). Em cultura de células, foi visto que o Cádmio aumentou a expressão de Hsp70 (Galán *et al.*, 2001) e Hsp25 (Ito *et al.*, 1998) e o Chumbo aumentou a fosforilação de Hsp27 dependentemente de p38^{MAPK} (Leal *et al.*, 2002).

1.5 - Importância das culturas celulares para o estudo da neurotoxicidade do Chumbo.

Diversos modelos de culturas celulares têm sido utilizados para o estudo da neurotoxicidade do Chumbo, tais como modelos de culturas mistas de astrócitos e neurônios (Zurich *et al.*, 1998), agregados celulares (Zurich *et al.*, 2002), oligodendrócitos (Deng *et al.*, 2001), neurônios (Mazzolini *et al.*, 2001), astrócitos (Struzyńska *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 1996). Todos estes podem ser afetados por Chumbo, com maior sensibilidade dos oligodendrócitos seguida por neurônios e então astrócitos ao metal (Holtzman *et al.*, 1987; Tiffani-Castiglioni, 1993).

Os astrócitos constituem-se em componentes importantes na neurotoxicidade do Chumbo graças ao desenvolvimento de mecanismos capazes de capturar e armazenar este metal. Estes mecanismos são numerosos, entre eles está a deposição em organelas (Holtzman *et al.*, 1987; Selvin-Testa *et al.*, 1994), interação de Chumbo com proteínas e enzimas, e interação com ATPases do tipo P (Tiffany-Castigliani & Qian, 2001)

Culturas de linhagens tumorais são uma ferramenta muito útil para o estudo da toxicidade do Chumbo sobre as células do sistema nervoso, e ao contrário destas, podem ser facilmente cultivadas, permitindo análises bioquímicas. Tiffani-Castiglioni *et al.*, (1988), demonstraram que cultura de células de glioma C6 de rato constitui-se um modelo adequado para o estudo do Chumbo. Estas células possuem características semelhantes a astrócitos no que diz respeito à captação de Chumbo e indução de síntese protéica.

Outros estudos em linhagem C6 demonstraram um possível envolvimento do Chumbo na modulação de PKC (Lattera *et al.*, 1992; Tonner *et al.*, 1997) e na expressão da proteína GRP78 (Qian *et al.*, 2000). No entanto, o efeito do Chumbo sobre a viabilidade destas células permanece controverso, podendo tanto diminuir (Tiffani-Castiglioni *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 1996) como não alterar este parâmetro (Tonner *et al.*, 1997), dependendo das condições experimentais utilizadas em cada estudo.

Vários estudos têm mostrado que cada tipo celular pode responder diferentemente à presença de Chumbo no meio. Estas respostas podem envolver alterações morfológicas (Struzińska *et al.*, 2001; Zurich *et al.*, 2002) e metabólicas (Tiffany-Castiglioni *et al.*, 1988; Tonner *et al.*, 1997; Garber & Heiman, 2002; Baranowska-Bosiacka & Hlynczak, 2003) muitas vezes relacionadas à modulação de diversas vias de sinalização pelo Chumbo. Apesar disso, há poucos dados mostrando a modulação de MAPKs, viabilidade celular e mecanismos de tolerância das células C6

frente à exposição ao Chumbo. Desta forma, no presente trabalho procurou-se aprofundar o estudo de alguns destes aspectos, utilizando como modelo as linhagens celulares de glioma e astrócitos em cultura.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do Chumbo sobre a modulação de MAPKs em cultura de células de glioma C6 de rato, bem como proteínas potencialmente envolvidas nos mecanismos de tolerância celular ao estresse, como Hsps e Akt. Além disso, verificar o efeito do Chumbo sobre a viabilidade celular em astrócitos e glioma U373 humano.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a viabilidade das culturas de células de glioma U373 e astrócitos corticais de rato após tratamento por 24 horas com Chumbo.
2. Determinar a ação do Chumbo sobre a viabilidade celular de culturas de células de glioma C6 após tratamento por diferentes tempos e concentrações de Chumbo.
3. Caracterizar a modulação da fosforilação das quinases p38^{MAPK}, JNK1/2 e ERK1/2 pelo Chumbo nas culturas de células de glioma C6.
4. Caracterizar o papel de p38^{MAPK} e ERK1/2 na viabilidade celular em cultura de células de glioma C6;
5. Avaliar a expressão de Hsp27 e Hsp70, além de avaliar a expressão e a fosforilação de Akt em células de glioma C6 após tratamento com Chumbo.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais:

Para o preparo das culturas primárias de astrócitos corticais foram utilizados ratos da linhagem Wistar provenientes do Biotério do Departamento de Anatomia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Rio de Janeiro, RJ). Foram utilizados ratos neo-natos com idade entre 0 e 2 dias pós-natal. Os animais receberam leite materno *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura entre 22 e 25°C, sendo manipulados e sacrificados de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa seguindo as normas do NIH (National Institute of Health).

3.2 - Reagentes:

β -mercaptoetanol, Ácido Bórico, Coomassie Blue R-250, kit ECL, Glicina, Nitrocelulose, Persulfato de Amônia, SDS, Padrão de Peso Molecular, TEMED, Acrilamida, Bis-acrilamida, Tris e anticorpos secundários (anti-mouse e anti-rabbit) conjugados à peroxidase foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech[®]. EDTA, Álcool Metílico, Ácido Acético, DMSO, e Metanol foram obtidos da Nuclear[®]. Ácido Clorídrico, Paraformaldeído, DMSO foram obtidos da Vetec[®]. Anticorpo anti-fosfo Akt (anti-rabbit) e anti-Akt (anti-rabbit) foram obtidos da Cell Signaling[®]. Hidróxido de Sódio foi obtido da Merck[®], Acetato de Chumbo, Anticorpo anti-fosfo ERK (anti-mouse), PD098059, anticorpo anti-Vimentina (anti-mouse), anticorpo secundário anti-mouse conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), Bromofenol Blue, FOLIN, MTT e Albumina de Soro Bovino foram obtidos da Sigma[®]. O kit de coloração de células Panótico Rápido foi obtido da Laborclin[®]. SB203580, os anticorpos anti-ERK

(anti-rabbit), anti-fosfo-p38^{MAPK} (anti-rabbit), anti-Hsp27 (anti-rabbit), anti-Hsp70 (anti-rabbit), anti-p38^{MAPK} (anti-rabbit) e os anticorpos secundários anti-mouse ou anti-rabbit conjugados à peroxidase foram obtidos da Calbiochem[®]. Ponceau e Tween 20 foram obtidos da USB[®]. As soluções Fixadora e Reveladora e filme sensível à quimiluminescência Biomax foram obtidos da KODAK[®]. Papel Filtro 3MM foi obtido da Whatman[®]. O meio de cultura DMEM, o suplemento F-12, o Soro Fetal Bovino e a tripsina foram obtidos da Gibco BRL[®].

3.3 - Equipamentos

Agitador Orbital BIOMIXER[®] modelo MOS-1, sistema de gel gradiente Amersham Pharmacia Biotech[®], balança analítica SCIEN TECH[®] modelo SA 12, cuba de eletrotransferência HOEFER[®] modelo TE 22, espectrofotômetro MICRONAL[®] modelo B 382, fonte para eletroforese Amersham Pharmacia Biotech[®] modelo EPS 301, leitor de Elisa WHITTAKER[®] modelo 2001, pHmetro DIGIMED[®] modelo DM 20, câmara de Neubauer, Hirschmann Techcolor[®], garrafas para cultura de células e placas de 24 e 96 poços Nunc[®], filtro 0,22UM Millex[®]. Centrífuga Uniscience modelo Mikro 20, vortex FANEM[®], microscópio de fluorescência Nikon[®] modelo Elipse TE300, microscópio de fluorescência Zeiss[®], microscópio invertido de contraste de fase Olympus[®] CK 40, fluxo laminar Veeco[®], estufa de CO₂, Nuaire[®], scanner Genius[®] modelo ColorPage-Vivid III V2.

3.4 - Preparação de cultura de astrócitos corticais:

Culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir de córtices cerebrais de ratos neo-natos (P0-P2). Os procedimentos foram realizados conforme descrito previamente por Moura Neto *et al.* (1983), com algumas modificações introduzidas em

Trentin *et al.* (1995). Os animais foram decapitados, os cérebros removidos e colocados rapidamente em solução de tampão fosfato de sódio enriquecida com 0,6% de glicose pH 7,6. Em seguida, sob condições estéreis, as meninges foram delicadamente removidas, os córtices cerebrais foram cortados e transferidos para um tubo de centrífuga cônico contendo meio “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” com mistura de nutriente F-12 (DMEM-F12) sem soro. As células foram mecanicamente dissociadas com auxílio de pipeta Pasteur. A seguir, as células dissociadas foram centrifugadas a 3000 rpm por quatro minutos e o precipitado foi ressuspensão em meio de cultura, DMEM-F12, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram plaqueadas a uma densidade de 2×10^5 células por poço em placas de cultura contendo 24 poços de 16 mm cada e cobertas ou não com lamínulas de vidro previamente tratadas com poliornitina. Após 24h o meio de cultura foi retirado, a cultura foi lavada com PBS-glicose e novo meio foi adicionado. Este procedimento foi repetido a cada dois dias até o décimo dia quando após a lavagem as células foram incubadas em meio DMEM-F12 contendo soro fetal bovino 1%, para realização dos tratamentos.

3.5 - Preparação de cultura de células de glioma U373

Utilizamos a linhagem de glioma U373, proveniente do laboratório do Professor Vivaldo Moura-Neto (Departamento de Anatomia, UFRJ). As culturas de células da linhagem U373 foram crescidas em garrafas de 25cm² na presença de meio DMEM-F12, suplementado com 10% de SFB. As células foram manipuladas esterilmente em fluxo laminar e mantidas em atmosfera com 95% de umidade, 5% de CO₂ e 37°C. Depois de atingir a confluência, as células foram incubadas (1 minuto, 25°C) em solução tripsina (0,125% e EDTA 0,5mM) e tampão salina fosfato (PBS), pH 7,4 . A reação foi paralisada pela adição de meio de cultura contendo 5% de SFB. Após 3

lavagens com PBS, as células foram semeadas na densidade de 5×10^3 células por poço em placa de 24 poços e mantidas durante 3 dias sob condições de cultura na presença de SFB 10%. Para a realização dos experimentos de viabilidade celular, o meio foi trocado e a concentração do SFB foi ajustada para 1%.

3.6 - Preparação de cultura de células de glioma C6:

Utilizamos a linhagem de glioma C6, proveniente do laboratório do Professor Vivaldo Moura-Neto (Departamento de Anatomia, UFRJ) e mantidas no Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular (Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, UFSC). Esta linhagem foi obtida a partir de um tumor cerebral quimicamente induzido, identificada como célula astrocítica indiferenciada (Benda *et al.*, 1968). A linhagem foi mantida esterilmente em garrafas de cultura de 25cm², contendo DMEM tamponado com 2g/L de HEPES, suplementado com 10% de SFB (Trentin & Alvarez-Silva, 1998). As células foram manipuladas sob capela de fluxo laminar e mantidas em estufa com 95% de umidade, 5% CO₂ a 37°C. Após a confluência, as células foram retiradas com solução de tripsina, consistindo de tripsina 0,125% e EDTA 0,5mM, em PBS, pH 7,4 à temperatura ambiente, durante 1 minuto. A reação foi neutralizada pela adição de meio de cultura contendo 5% de SFB. Após três lavagens com PBS, as células foram semeadas em uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 24 poços para preparação de amostras para eletroforese ou 5×10^4 células por poço em placas de 96 poços, para os experimentos de viabilidade celular.

3.7 - Tratamento das Células

Para o tratamento das culturas celulares, o Acetato de Chumbo foi diluído em água Milli-q fresca autoclavada para a preparação de uma solução estoque 100mM, que

foi posteriormente filtrada, aliquotada e estocada a $-20^{\circ}\text{C}^{\circ}$. No momento de uso, a solução estoque foi diluída para soluções de uso $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ e 1mM , ou seja, 100x a concentração final desejada nos tratamentos.

As culturas de astrócitos mantidas 10 dias *in vitro* foram expostas a diferentes concentrações de Chumbo ($0,1\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$) em meio DMEM-F12 com SFB 1% por 24 horas. O controle dos experimentos foi feito com culturas mantidas no mesmo meio sem adição de Acetato de Chumbo.

Para o tratamento das culturas de células U373, as mesmas foram mantidas 3 dias em cultura e depois, tratadas com diferentes concentrações de Chumbo ($0,1\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$) em meio DMEM-F12 com SFB 1% por 24 horas. O controle dos experimentos foi feito com culturas mantidas no mesmo meio sem adição de Acetato de Chumbo.

Para tratamento das culturas de células da linhagem C6, as células foram mantidas 24 horas em cultura e após foram expostas a diferentes concentrações de Chumbo ($0,1\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$) em meio DMEM-F12 com SFB 1% por diferentes períodos de tempo (24h, 48h e 72h). O controle dos experimentos foi feito com culturas mantidas no mesmo meio sem adição de Acetato de Chumbo.

Para determinar um possível papel da $p38^{\text{MAPK}}$ sobre a viabilidade celular, as culturas de glioma C6 foram pré-incubadas por 30 minutos com o inibidor específico de $p38^{\text{MAPK}}$, SB203580 na concentração $10\mu\text{M}$ a partir de uma solução estoque de 10mM diluída em DMSO. A seguir as células foram expostas por 24, 48 e 72 horas ao Chumbo ($10\mu\text{M}$) na presença de SB203580.

Além disso, visando determinar o efeito da inibição de ERK1/2 sobre a viabilidade celular, as culturas de células de glioma C6 foram pré-incubadas por 30 minutos com o inibidor de MEK, PD095089 nas concentrações de 10, 50 e $100\mu\text{M}$ a

partir de uma solução estoque de 10mM diluída em DMSO. A seguir as fatias foram expostas por 24, 48 ou 72 horas ao Chumbo (10 μ M) na presença de PD095089.

3.8 - Imunocitoquímica

- *Fixação das células*: as monocamadas de astrócitos foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 20 minutos em temperatura ambiente e as membranas celulares permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% durante 5 minutos. Sítios inespecíficos de ligação dos anticorpos foram bloqueados pela incubação das células com 5% de BSA diluída em PBS por 30 minutos.

- *Imunomarcação para Vimentina*: Após o bloqueio, as células foram incubadas por 12 horas, a 4°C, em câmara úmida, com anticorpo primário anti-Vimentina anti-mouse, (diluição 1:200) e com anticorpo secundário anti-mouse conjugado com FITC (diluição 1:400) por 1 hora, em temperatura ambiente. Depois disso, as lâminas foram montadas com n-propilgalactosídeo, analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência.

3.9 - Determinação da Viabilidade Celular Através da Medida da Redução do MTT:

Após a realização dos tratamentos, as culturas primárias de astrócitos e de células da linhagem tumoral U373 foram incubadas com MTT (5 mg/ml) por 3 horas a 37°C. O MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium = “Thiazolyl blue”) é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em um formazam púrpura após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Liu *et al.*, 1997b). O formazam foi solubilizado com a adição de 200 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO), formando um composto colorido cuja densidade óptica é medida em Leitor de ELISA ($\lambda=540$ nm). A atividade mitocondrial (viabilidade celular) é

diretamente proporcional à capacidade redutora sobre o MTT e, portanto, produção de cromógeno.

As células C6 foram semeadas a uma densidade de 5×10^4 células por poço em placa de 96 poços e incubadas sob condições de cultivo com diferentes tratamentos. A seguir, foi adicionado MTT (5mg/mL), permanecendo por um período de 4 horas de incubação nas condições de cultivo. As células viáveis reduziram o MTT, produzindo um precipitado colorido que foi eluído com a adição de 100µl por poço de SDS a 10%, acrescido de 0,04N de ácido clorídrico, durante 12 horas, a 37°C. O ensaio foi quantificado por absorvância em 540nm em leitor de ELISA

3.10 - Avaliação da Viabilidade Celular Através da Contagem do Número de Células:

A contagem de células foi realizada através de microscopia invertida de contraste de fase, onde contou-se o número de células equivalentes a 5 campos aleatórios para cada poço de placa de cultura. Após o período de tratamento com Chumbo, as culturas primárias de astrócitos e de glioblastoma U373 foram contadas depois de serem fixadas e coradas com kit de fixação e coloração Panótico Rápido® (conforme recomendação do fabricante).

No caso das células de glioma C6, não foi realizada coloração e a contagem foi feita diretamente através da captura de imagens das células no microscópio de contraste de fase.

3.11 - Separação de proteína:

As células de glioma C6 correspondentes a dois poços na placa de 24 poços foram solubilizadas (70µl/poço) com tampão de amostra (4% de SDS, 50mM de Tris, 100mM de EDTA , pH 6,8), transferidas para ependorfes, e a seguir incubadas por 5

minutos à 90°C para completa solubilização do material. Após a retirada de 3µl de amostra para dosagem de proteína, foi adicionado β-mercaptoetanol (8% v/v). A seguir, foi adicionada a solução de diluição de amostra (40% de glicerol, 25mM de Tris e Azul de Bromofenol; pH 6,8) na relação de 25:100 (solução de diluição:solução de solubilização). Normalmente era obtida em média uma concentração protéica de 2µg/µl. As proteínas (50µg por poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), usando gel de separação 10% e gel de entrada com 4% de acrilamida/bis-acrilamida (Cordova *et al.*, 2004).

Para preparo dos géis foi utilizado um sistema de eletroforese em mini-gel Amershan Pharmacia Biotech[®] utilizando espaçadores de 1mm de espessura. Em cada placa adicionava-se a mistura de gel composta por 10% de acrilamida/bis-acrilamida na relação 37,5:1(w/w), 375mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,06% de TEMED e 0,036% de persulfato de amônia; pH8,8). Após o preenchimento das placas, o gel permanecia em repouso durante 30 minutos para plena polimerização. Logo a seguir era adicionado o gel de entrada composto por 4% de acrilamida/bis-acrilamida 37,5:1(w/w), 125mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,05% de TEMED e 0,1% de persulfato de amônia; pH 6,8. Sobre este gel foi colocado um pente de 10 dentes. Após 1 hora e 30 minutos eram aplicadas as amostras para separação. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 20mA por placa e voltagem máxima de 140V durante aproximadamente 2 horas, em temperatura ambiente, utilizando-se os tampões superior (190mM de glicina, 25mM de Tris e 0,1% de SDS) e inferior (50mM de Tris; pH 8.3). Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

3.12 - Eletrotransferência

Após a eletroforese o gel foi fixado durante 1 hora em solução fixadora (50% de metanol e 8% de ácido acético) e a seguir foi lavado com tampão superior de eletroforese (25mM de Tris, 190mM de glicina e 0,1% de SDS) por 30 minutos. Após esse período, o gel foi equilibrado em tampão de transferência (50mM de Ácido Bórico e 4mM de EDTA; pH 8.9) durante 30 minutos. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose no sentido do pólo negativo para o positivo, utilizando um “sanduíche” compreendido de espuma de suporte, papel filtro Whatman[®] 3MM, gel, nitrocelulose, novamente papel filtro e espuma de suporte. A transferência foi realizada a 4°C usando corrente de 400mA por 3 horas em uma cuba contendo tampão de transferência. Após a eletrotransferência, as membranas foram coradas com solução de Ponceau (0,5% de Ponceau e 1% de ácido acético) para controle da transferência.

3.13 - Imunodeteccção

Após a eletrotransferência, as membranas foram lavadas com TBS (10mM de Tris, 150mM de NaCl, pH 7,5) por 5 minutos para retirar a marcação com Ponceau, e a seguir foram bloqueadas por 1 hora com 5% de leite desnatado (Molico[®]) em TBS à temperatura ambiente. Após esse primeiro bloqueio, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos com TBS-T (Tween-20 0,05%, 10mM de Tris, 150mM de NaCl, pH7,5) e submetidas a um segundo bloqueio de 1 hora usando uma solução de 2,5% de gelatina (Royal[®] sem sabor) em TBS (Bobrovskaya *et al.*, 2001; Cordova *et al.*, 2004). As membranas foram novamente lavadas 3 vezes (5 minutos cada) com TBS-T, para finalmente serem incubadas com os anticorpos primários: anti-ERK1/2 total (1:40.000), anti-p38^{MAPK} total (1:10.000), anti-JNK1/2 total (1:10.000), anti-Hsp27 (1:2000), anti-Hsp70 (1:10.000), por um período de 2 horas a temperatura ambiente e com anti-fosfo-

p38^{MAPK}(1:1000), anti-fosfo-ERK1/2 (1:5.000), anti-fosfo-AKT (1:1000), anti-AKT-total (1:1000) e anti-fosfo-JNK1/2 (1:5000) durante 12 horas a 4°C. Após as incubações com os anticorpos primários, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T (3 vezes de 5 minutos) e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpos secundários específicos (ligados à peroxidase) com diluição 1:4000. Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram lavadas 3 vezes (5 minutos) com TBS-T e 2 vezes com TBS, sendo que as bandas correspondentes às respectivas proteínas foram reveladas através de kit ECL (quimiluminescência) conforme as recomendações do fabricante (Fig. 08). As medidas de fosforilação e/ou imunoconteúdo das proteínas foram realizadas através de densitometria com o auxílio do software Scion Image (versão Beta 3).

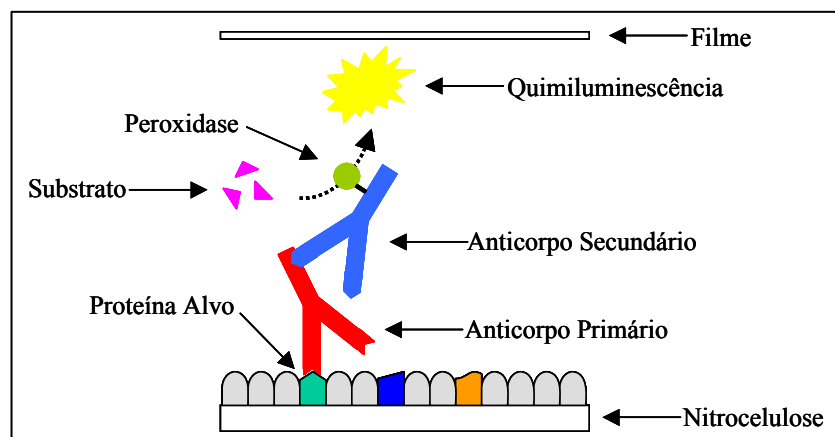


Figura 08 - Imunodeteção de um polipeptídeo através de quimiluminescência usando anticorpo específico.

3.14 - Dosagem de proteínas

As proteínas foram dosadas através do método de Peterson (1977). Sobre alíquotas de 3µl das amostras foram adicionados 397µl de água e 400µl do reagente de Lowry (0,2N de NaOH, 2,5% de SDS, 5% de Na₂CO₃, 0,2% de CuSO₄ e 0,1% de tartarato duplo de sódio e potássio). Após 10 minutos foram adicionados 200µl do

reagente de Folin 0,4N e as proteínas incubadas por 30 minutos. A leitura foi realizada em 750nm e as concentrações foram obtidas através de uma curva padrão utilizando BSA.

3.15 - Análise Estatística:

Os resultados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido, quando apropriado, pelo teste de Duncan. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

PARTE 1

Tratamento de culturas primárias de astrócitos, bem como de culturas de glioma U373 com Chumbo. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Morfologia Celular, Departamento de Anatomia, UFRJ e buscaram a análise dos seguintes parâmetros:

1 - Viabilidade das culturas primárias de astrócitos e de linhagem tumoral U373 através de contagem de células após exposição ao Chumbo sob diferentes concentrações durante o período de 24 horas.

2 – Viabilidade celular pela medida da redução do MTT em cultura primária de astrócitos e linhagem tumoral U373 após exposição ao Chumbo sob diferentes concentrações durante o período de 24 horas.

3 - Imunocitoquímica para a proteína do citoesqueleto Vimentina em cultura primária de astrócitos após exposição ao Chumbo sob diferentes concentrações durante o período de 24 horas.

4.1 - Análise da Viabilidade Celular Através da Medida de Redução do MTT em Cultura de Células de Glioma Humano U373 e Astrócitos Corticais Após Tratamento com Chumbo.

Muitos estudos *in vivo* e *in vitro*, inclusive em cultura de células mostram que o Chumbo pode afetar a atividade mitocondrial alterando o consumo de oxigênio e ATP, (Wielgus-Serafinska *et al.*, 1980; Dumas *et al.*, 1985) e inibindo desidrogenases mitocondriais (Holtzman *et al.*, 1978).

Neste estudo foi determinado o efeito do Chumbo sobre a viabilidade de cultura de células de glioma humano U373 (Fig. 09), bem como de astrócitos corticais de rato (Fig. 10) a partir da medida da atividade mitocondrial destas células após tratamento por 24 horas com Acetato de Chumbo nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M. Como controle, utilizamos células incubadas sob as mesmas condições de cultura, mas sem adição de Acetato de Chumbo. A viabilidade celular, baseada na capacidade redutora de desidrogenases mitocondriais sobre o MTT, foi expressa em porcentagem do controle (considerado 100%). Em ambas as culturas celulares, Chumbo demonstrou aumentar significativamente a viabilidade celular nas concentrações de 0,1 e 1 μ M, enquanto que a concentração de 10 μ M não alterou o perfil de viabilidade da células.

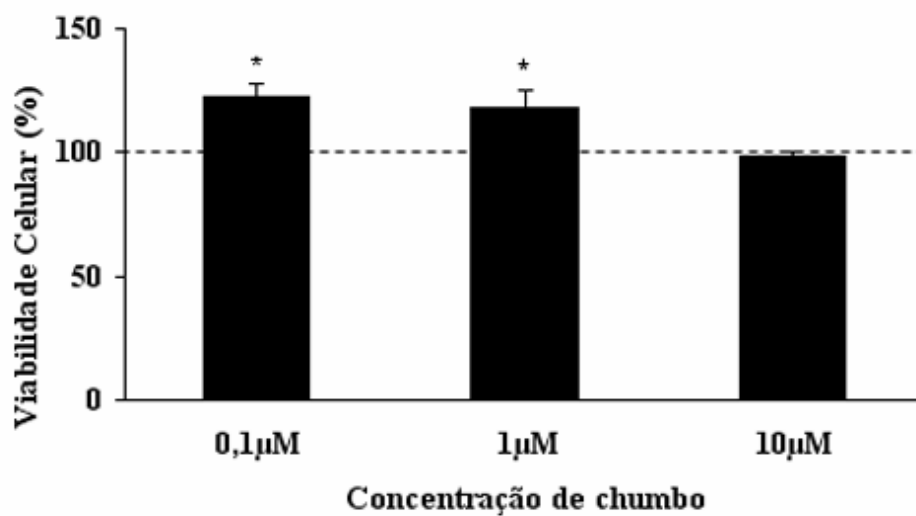


Fig. 09 – Efeito do Chumbo sobre a viabilidade celular pela medida da redução do MTT em culturas de células de glioma U373 tratadas por 24 horas.

As culturas de células de glioma U373 foram incubadas com diferentes concentrações de Acetato de Chumbo por 24 horas. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os resultados representam uma média de 4 experimentos realizados separadamente + erro padrão, e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%) . * $p < 0,05$ em relação ao controle.

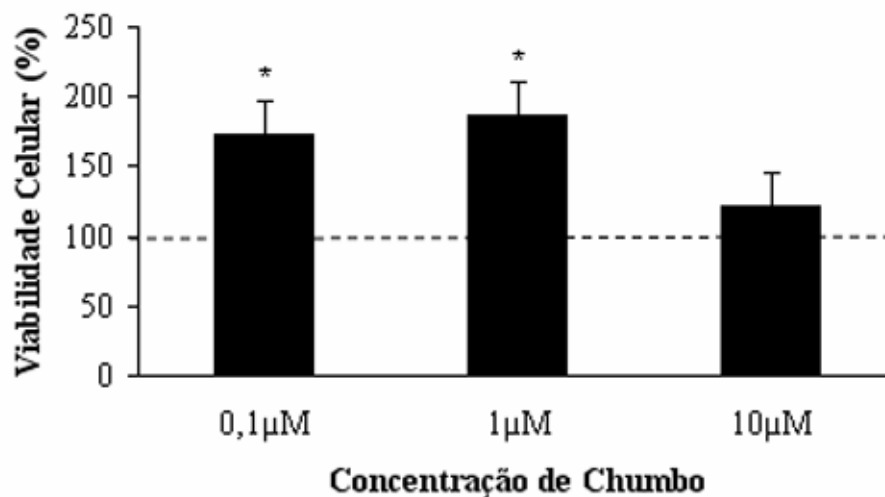


Fig. 10 – Efeito do Chumbo sobre a viabilidade celular pela medida da redução do MTT em culturas primárias de astrócitos corticais tratadas por 24 horas.

As culturas primárias de astrócitos corticais de rato foram incubadas com diferentes concentrações de Acetato de Chumbo por 24 horas. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os resultados representam uma média de 4 experimentos realizados separadamente + erro padrão e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%) . * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.2 - Análise da Viabilidade Celular em Cultura de Linhagem de Glioma U373 e Astrócitos Corticais Através da Contagem do Número de Células Após Tratamento com Chumbo.

Foi determinado o efeito do Chumbo (0,1, 1 e 10 μ M) sobre o número de células após tratamento de linhagem de glioma humano U373 (Fig. 11) e astrócitos corticais de rato (Fig. 12) durante 24 horas. Como controle, as células foram incubadas sob as mesmas condições de cultura sem adição de Acetato de Chumbo.

Após o tratamento, as células foram fixadas e coradas. Contou-se o equivalente a 5 campos aleatórios por poço de cultura. Em média foram contados aproximadamente 200 células para cada campo aleatório com aumento de 50x através de microscopia invertida de contraste de fase. O Chumbo causou um aumento significativo no número de células após tratamento com concentrações de 0,1 e 1 μ M, porém nenhuma alteração no número de células foi verificada na concentração de 10 μ M. Estes dados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram um efeito proliferativo de concentrações muito baixas de Chumbo em linhagem de neuroblastoma humano e de ratos após contagem de células (Stark *et al*, 1992). Além disso, culturas de astrócitos apresentam maior resistência à morte celular induzida por metais do que outros tipos celulares do SNC (Tiffani-Castigliani & Qian, 2001) como neurônios, que exibem uma clara diminuição de viabilidade após tratamento com metais (Kim, 1999; Schneider *et al*, 2003; Chen & Liao, 2003).

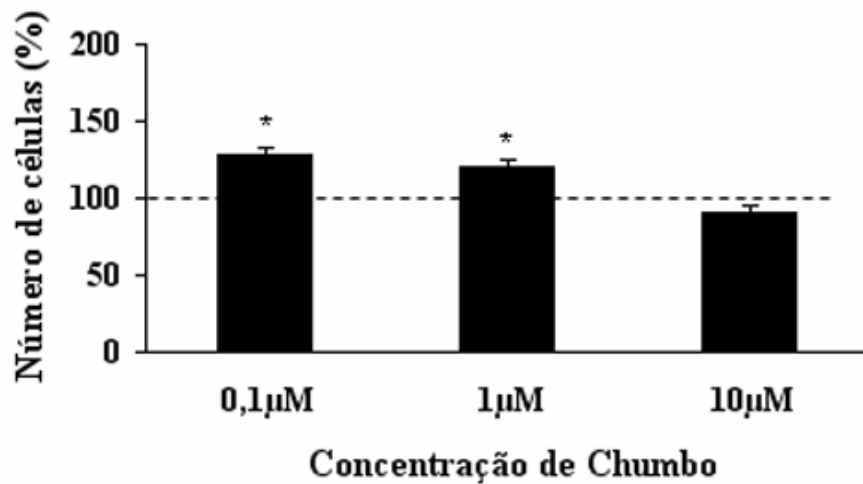


Fig. 11 – Efeito do Chumbo sobre o número de células em culturas de glioma U373 tratadas por 24 horas.

As culturas de células de glioma U373 foram incubadas com diferentes concentrações de Acetato de Chumbo por 24 horas. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os resultados representam uma média de 4 experimentos realizados separadamente + erro padrão, e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%) . * $p < 0,05$ em relação ao controle.

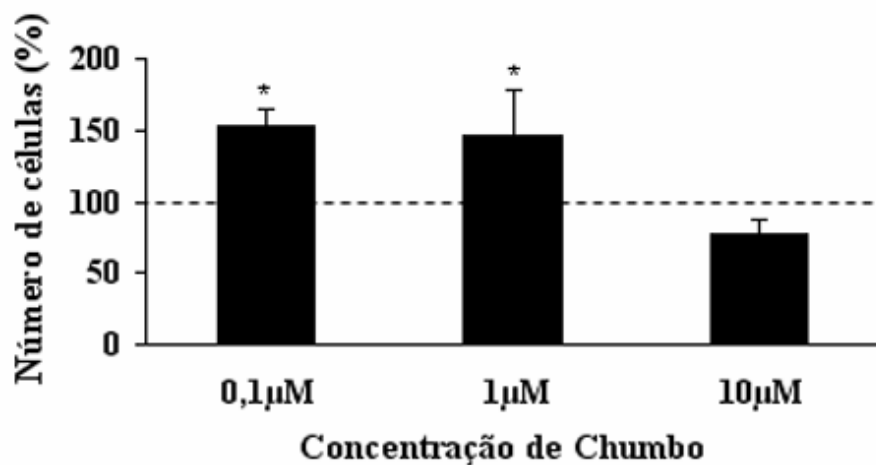


Fig. 12 – Efeito do Chumbo sobre o número de células em culturas primárias de astrócitos corticais tratadas por 24 horas.

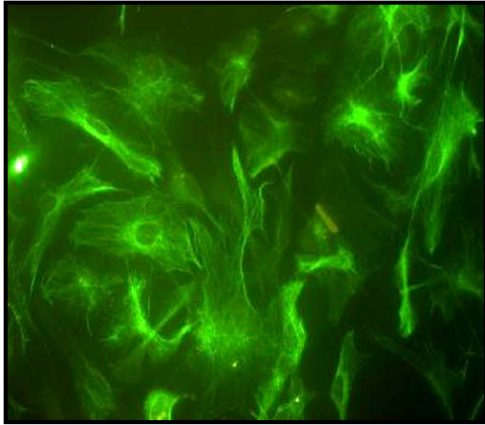
As culturas de astrócitos foram incubadas com diferentes concentrações de Acetato de Chumbo por 24 horas. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os resultados representam uma média de 4 experimentos realizados separadamente + erro padrão, e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%) . * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.3 - Morfologia de Culturas Primárias de Astrócitos Corticais Incubadas com Chumbo Através de Imunocitoquímica para Vimentina.

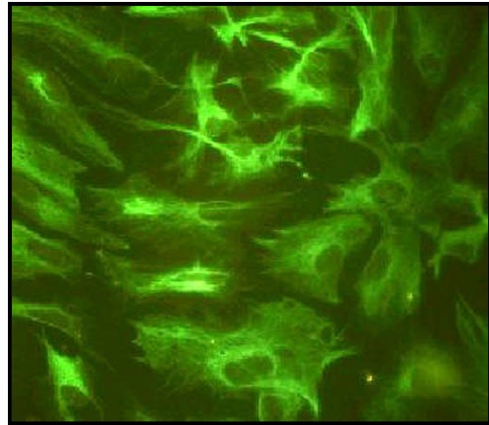
Dados prévios da literatura demonstraram que o tratamento com Chumbo pode levar à morfologia hipertrófica (Selvín-Testa *et al.*, 1994) e reativa (Zurich *et al.*, 2002) em astrócitos imunomarcados com GFAP e Vimentina. Além disso, o Chumbo pode induzir o surgimento de numerosas extensões citoplasmáticas em astrócitos cerebelares (Cookman *et al.*, 1988). Neste estudo, foi determinado o efeito do Chumbo sobre a morfologia celular em cultura de astrócitos primários corticais de rato expostos ao metal nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M durante 24 horas. Para controle, as células foram incubadas sob as mesmas condições de cultura, porém sem a adição de Acetato de Chumbo.

As células foram visualizadas (aumento de 40x) através de microscopia de fluorescência usando anti-corpo primário contra o filamento intermediário Vimentina e anti-corpo secundário conjugado a FITC. A análise visual das imagens obtidas, não mostrou alteração na morfologia celular baseada na organização citoplasmática dos filamentos de Vimentina nos astrócitos tratados com diferentes concentrações de Chumbo por 24 horas, quando comparado ao controle (Fig. 13).

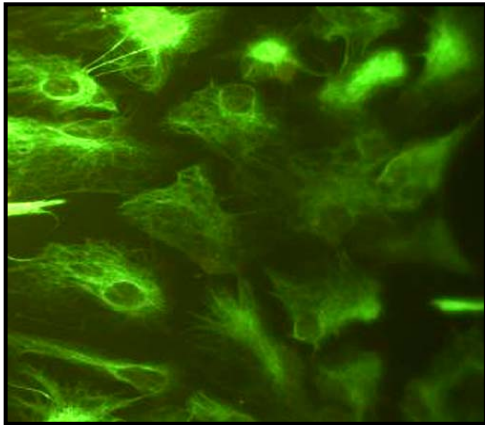
Controle



Chumbo 0,1 μ M



Chumbo 1 μ M



Chumbo 10 μ M

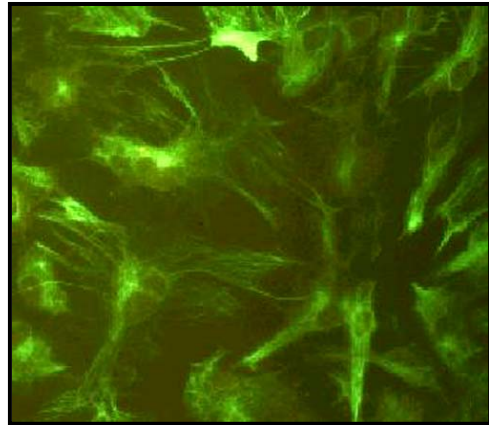


Fig. 13 – Imunocitoquímica para Vimentina em culturas primárias de astrócitos corticais tratadas por 24 horas com Chumbo.

As culturas primárias de astrócitos corticais foram incubadas durante 24 horas com diferentes concentrações de Acetato de Chumbo. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Cada imagem é representativa de 3 experimentos realizados separadamente (aumento de 40 vezes).

PARTE 2

Estudo dos efeitos do Chumbo sobre culturas de células de glioma C6, mantidas nas devidas condições de cultivo, no Laboratório de Imunopatologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, UFSC. Estes experimentos visaram a análise dos seguintes parâmetros:

1 - efeitos do Chumbo sobre a viabilidade celular pela medida da redução do MTT em cultura de células de glioma C6 após tratamento com diferentes concentrações do metal no período de 24, 48 e 72 horas.

2 - efeitos do Chumbo sobre a viabilidade celular em cultura de células de glioma C6 após tratamento com diferentes concentrações do metal no período de 24 e 48 horas através da técnica de contagem de células por microscopia invertida de contraste de fase.

3 - efeitos dos inibidores de p38^{MAPK} e ERK 1/2 sobre viabilidade celular pela medida da redução do MTT em cultura de células de glioma C6 após tratamento com Chumbo no período de 24, 48 e 72 horas.

4 - Determinação da fosforilação e imunoconteúdo das proteínas da família das MAPK, p38^{MAPK}, JNK1/2 e ERK1/2 em cultura de células de glioma C6 após tratamento com Chumbo no período de 24 horas.

5 - Determinação da fosforilação e imunoconteúdo da proteína AKT em cultura de células de glioma C6 após tratamento com Chumbo no período de 24 horas.

6 - Avaliação do imunoconteúdo de Hsp27 e Hsp70 em cultura de células de glioma C6 após tratamento com Chumbo no período de 24 horas.

4.4 - Análise da Viabilidade Celular pela Medida da Redução do MTT em Cultura de Células de Glioma C6 de Rato Após Tratamento com Chumbo.

Neste estudo, foi verificado o efeito do Chumbo sobre a viabilidade celular em culturas de células de glioma C6 de rato através da medida da capacidade das células em reduzir o MTT. As células foram incubadas com Chumbo em concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M durante 24, 48 ou 72 horas. Para controle as células foram incubadas sob as mesmas condições de cultura sem Chumbo. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem do controle (considerado 100%).

Após 24 horas de incubação foi observado um aumento na viabilidade das células expostas a 1 μ M de Chumbo, embora nenhum efeito tenha sido observado nas concentrações de 0,1 μ M e 10 μ M. Após 48 horas de incubação, o Chumbo passou a diminuir a viabilidade das células nas concentrações de 1 e 10 μ M. Este efeito foi mantido após 72 horas de incubação. A concentração de 0,1 μ M de Chumbo não afetou a viabilidade celular em nenhum período de incubação (Fig. 14).

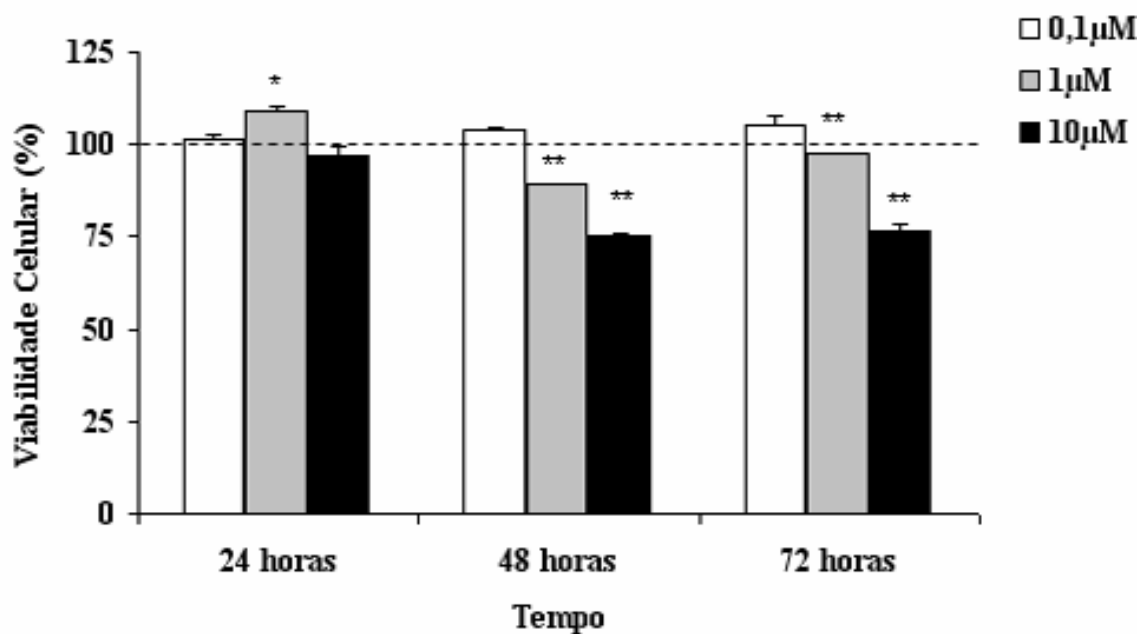


Fig. 14 – Efeito do Chumbo sobre a viabilidade celular pela medida da redução do MTT em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24, 48 e 72 horas.

As culturas de células de glioma C6 foram incubadas com diferentes concentrações de Chumbo por 24 horas, 48 horas ou 72 horas. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os resultados representam uma média de 4 experimentos realizados separadamente + erro padrão, e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%) .
 * $p < 0,01$ em relação ao controle; * * $p < 0,001$ em relação ao controle.

4.5 - Análise da Viabilidade Celular em Cultura de Células de Glioma C6 de Rato Através da Contagem do Número de Células Após Tratamento com Chumbo.

Foi determinado o efeito do Chumbo sobre o número de células após o tratamento das culturas de células de glioma C6 de rato com concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M após 24, 48 e 72 horas de incubação. Como controle, as células foram incubadas sob as mesmas condições de cultura sem Acetato de Chumbo.

Após o tratamento, foram capturadas imagens das células sob condições de cultura com aumento de 50x através de microscopia invertida de contraste de fase. Capturou-se o equivalente a 5 imagens aleatórias por poço de cultura. Os experimentos foram realizados em triplicata. A figura 15 demonstra os efeitos do tratamento com Chumbo sobre o número de células e é expressa como porcentagem em relação ao controle (considerado 100%). O Chumbo demonstrou um aumento significativo no número de células após tratamento com concentrações de 0,1 μ M, porém nenhuma alteração no número de células foi verificada na concentração de 1 μ M. Enquanto que uma diminuição significativa no número de células foi observada após o tratamento com 10 μ M de Chumbo. Esses dados se repetiram após o tratamento por 24 e 48 horas.

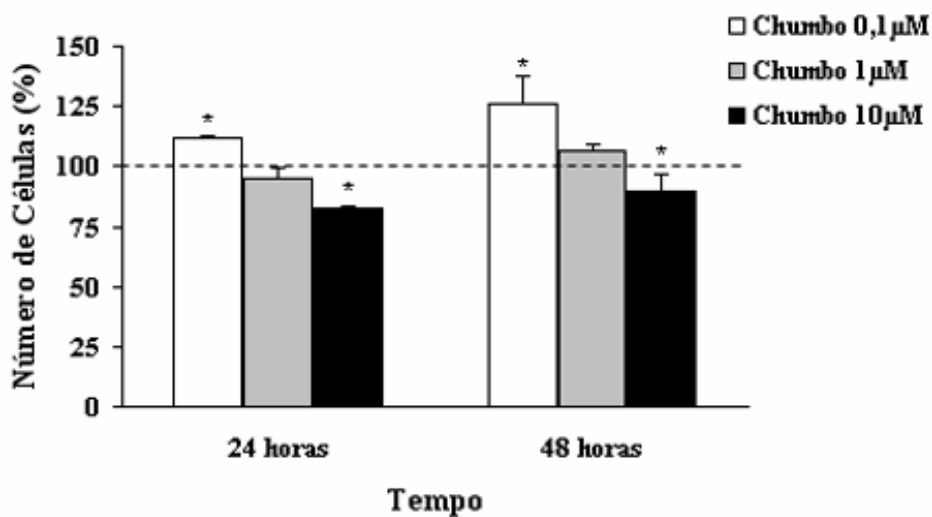


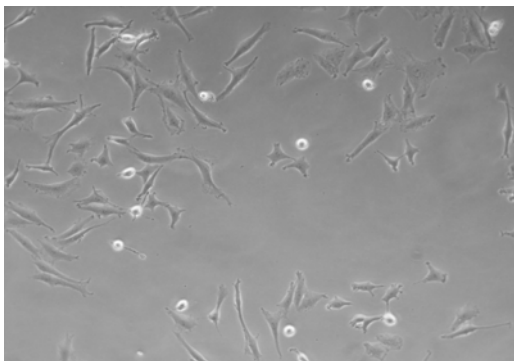
Fig. 15 – Efeito do Chumbo sobre ao número de células em culturas de glioma C6 tratadas por 24 e 48 horas.

As culturas de células de glioma C6 foram incubadas com diferentes concentrações de Chumbo por 24 horas e 48 horas. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições de cultura sem tratamento com Chumbo. Os resultados representam uma média de 2 experimentos realizados separadamente + erro padrão, e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%). * $p < 0,01$ em relação ao controle.

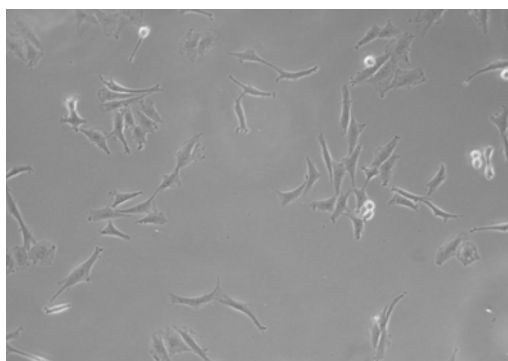
4.6 - Efeito do Chumbo sobre a morfologia de células de glioma C6 de rato.

Estudos em culturas de células mostraram que o Chumbo pode causar astrogliose ou microgliose (Zurich *et al.*, 2002), afetar o crescimento neurítico (Schneider *et al.*, 2003) ou até mesmo acelerar a diferenciação de astrócitos e células de glioma C6 (Cookman *et al.*, 1988). Neste estudo, culturas de células de glioma C6 foram incubadas por 24 ou 48 horas com Chumbo. Após, foram verificadas as condições morfológicas das células através da análise das imagens obtidas por microscopia de contraste de fase. O tratamento das células com Chumbo não alterou o tamanho das células, nem indicou alterações morfológicas (Fig. 16 e 17). A única alteração observada se refere ao número de células, como já foi apresentado anteriormente (Fig. 14 e 15).

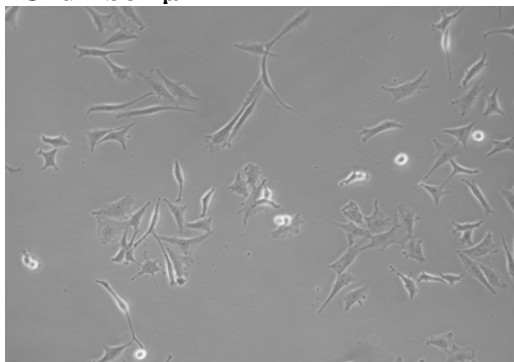
Controle



Chumbo 0,1μM



Chumbo 1μM



Chumbo 10μM

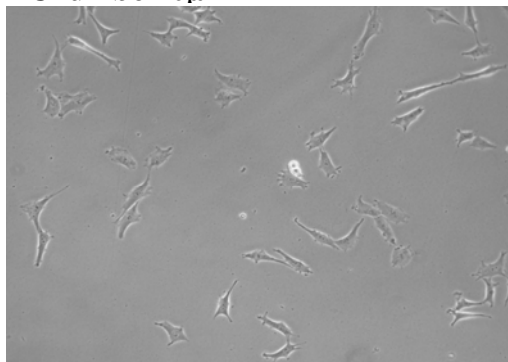
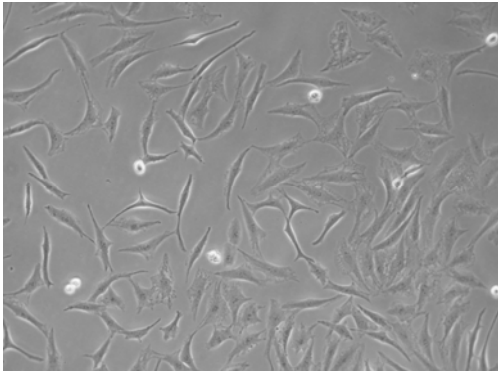


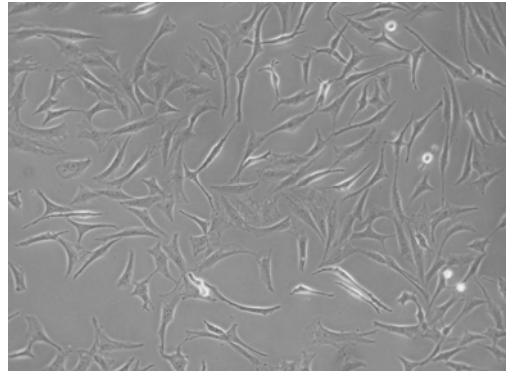
Fig. 16 – Efeito do Chumbo sobre a morfologia de culturas de células de glioma C6 após 24 horas de incubação através de microscopia invertida de contraste de fase.

As culturas de células de glioma C6 foram incubadas com diferentes concentrações de Chumbo por 24 horas. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Cada imagem é representativa de 2 experimentos realizados separadamente (aumento de 50x).

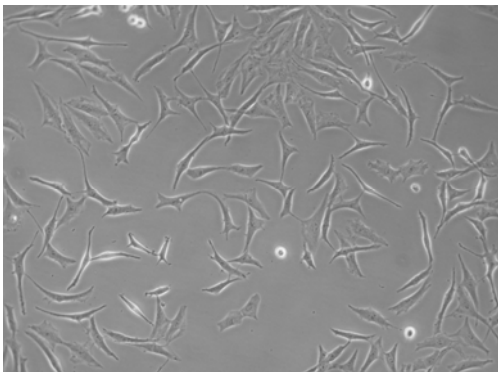
Controle



Chumbo 0,1μM



Chumbo 1μM



Chumbo 10μM

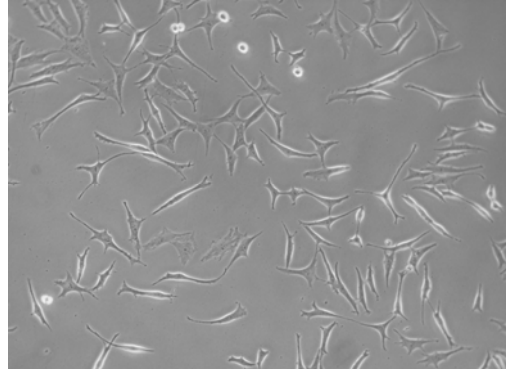


Fig. 17 – Efeito do Chumbo sobre a morfologia de culturas de células de glioma C6 após 48 horas de incubação através de microscopia invertida de contraste de fase. As culturas de células de glioma C6 foram incubadas com diferentes concentrações de Chumbo por 24 horas. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Cada imagem é representativa de 2 experimentos realizados separadamente (aumento de 50x).

4.7 - Análise da Fosforilação de p38^{MAPK} em Cultura de Células de Glioma C6 de Rato Incubadas com Chumbo.

A p38^{MAPK} pode ser ativada por vários tipos de estresse ambiental, inclusive metais pesados (Galán *et al.*, 2000; Kondoh *et al.*, 2002). Em outros estudos, o tratamento com Chumbo alterou a fosforilação de p38^{MAPK}, tanto em modelos de culturas celulares (Leal *et al.*, 2002) como em modelos de fatias hipocampais (Cordova *et al.*, 2004).

Neste trabalho, foi analisada a modulação de p38^{MAPK} em cultura de células de glioma C6 de rato incubadas com Chumbo em concentrações de 0,1, 1 e 10µM por 24 horas. Para controle as células foram incubadas sob as mesmas condições de cultura sem Acetato de Chumbo. As Figuras 18 A e B mostram os “imunoblottings” da fosforilação de p38^{MAPK} e do conteúdo total de p38^{MAPK}, respectivamente. A quantificação das bandas é mostrada na figura C, a fosforilação de p38^{MAPK} foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%). O tratamento de 24 horas com Chumbo aumentou significativamente a fosforilação de p38^{MAPK} na concentração de 10µM (Fig. 18 C). O Chumbo não alterou o imunoc conteúdo de p38^{MAPK} (Figura 18 B).

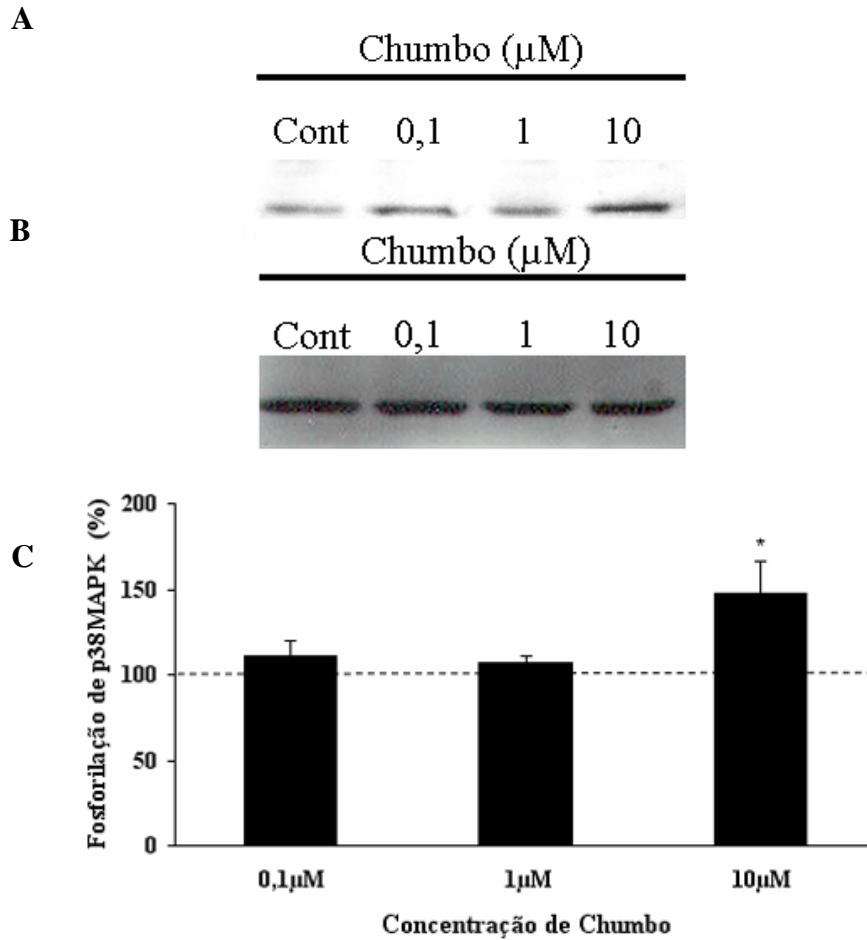


Fig. 18 - Efeito do Chumbo sobre a fosforilação da proteína p38^{MAPK} em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 horas com o metal. (A) “Imunoblotting” mostrando as bandas de fosfo p38^{MAPK}. (B) “Imunoblotting” mostrando o conteúdo total de p38^{MAPK}. (C) Quantificação da fosforilação das bandas.

As culturas de células de glioma C6 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de Chumbo. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os resultados representam uma média de 6 experimentos realizados separadamente + erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%); * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.8 - Análise da Fosforilação de JNK1/2 em Cultura de Células de Glioma C6 Incubadas com Chumbo.

A via de sinalização de JNK está envolvida na regulação de muitos eventos celulares, incluindo controle do crescimento, diferenciação e apoptose (Lin, 2003b) e pode ser induzida por uma série de fatores, incluindo metais pesados (Chuang *et al.*, 2000).

Em nosso modelo de estudo, foi analisada a modulação de JNK1/2 em cultura de células de glioma de rato C6 incubadas com Chumbo em concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M por 24 horas. Para controle as células foram incubadas sob as mesmas condições de cultura sem Acetato de Chumbo. As Figuras 19 A e B mostram os “imunoblottings” da fosforilação de JNK1/2 e do conteúdo total de JNK1/2, respectivamente. A quantificação das bandas é mostrada na figura 19 C. A fosforilação de JNK1/2 foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%). O tratamento de 24 horas com Chumbo não alterou a fosforilação de JNK1/2 (Figuras A e C). Também não houve alteração no imunoc conteúdo de JNK1/2 (Figura B).

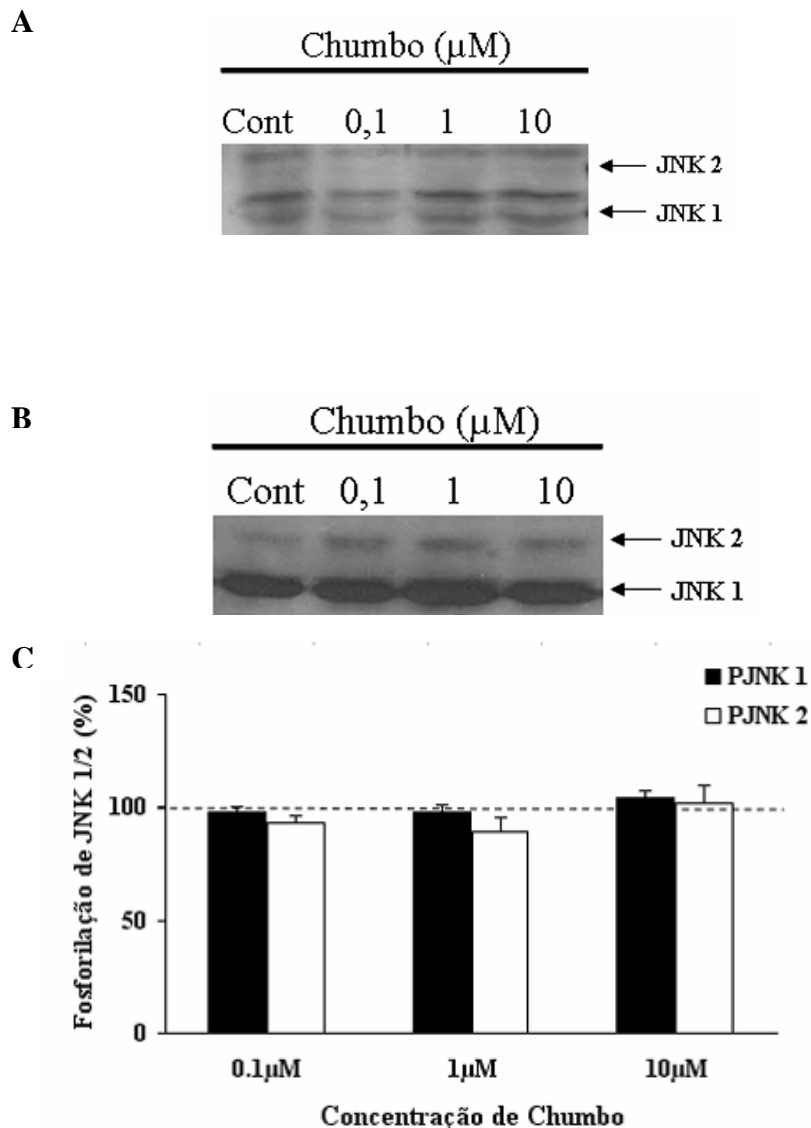


Fig. 19 - Efeito do Chumbo sobre a fosforilação da proteína JNK1/2 em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 horas. (A) “imunoblotting” mostrando as bandas de fosfo JNK1/2. (B) “imunoblotting” mostrando o conteúdo total de JNK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas.

As culturas de células de glioma C6 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de Acetato de Chumbo. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os resultados representam uma média de 6 experimentos realizados separadamente + erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%); $p > 0,05$, sem diferenças significativas em relação ao controle.

4.9 - Análise da Fosforilação de ERK1/2 em Cultura de Células de Glioma C6 Incubadas com Chumbo.

As proteínas ERK1/2 são amplamente expressas e estão envolvidas na regulação da meiose, mitose e diferenciação celular. Diferentes estímulos podem ativar ERK1/2, entre eles, fatores de crescimento, citocinas e carcinógenos (Johnson & Lapadat, 2002). O Chumbo também é capaz de ativar a via de sinalização de ERK em linhagens tumorais (Ramesh *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2003;) e em hipocampo (Cordova *et al.*, 2004).

Neste trabalho foi analisada a modulação de ERK1/2 em cultura de células de glioma C6 de rato incubadas com Chumbo em concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M por 24 horas. Para controle as células foram incubadas sob as mesmas condições de cultura sem Acetato de Chumbo. As Figuras 20 A e B mostram os “imunoblottings” da fosforilação de ERK1/2 e do conteúdo total de ERK1/2, respectivamente. A quantificação das bandas é mostrada na figura 20 C. A fosforilação de ERK1/2 foi expressa em porcentagem do controle (considerado 100%). O tratamento de 24 horas aumentou significativamente a fosforilação de ERK1 nas concentrações de 1 e 10 μ M (Figura C). Além disso, não foi observada alteração no imunoc conteúdo de ERK1/2 (Figura B).

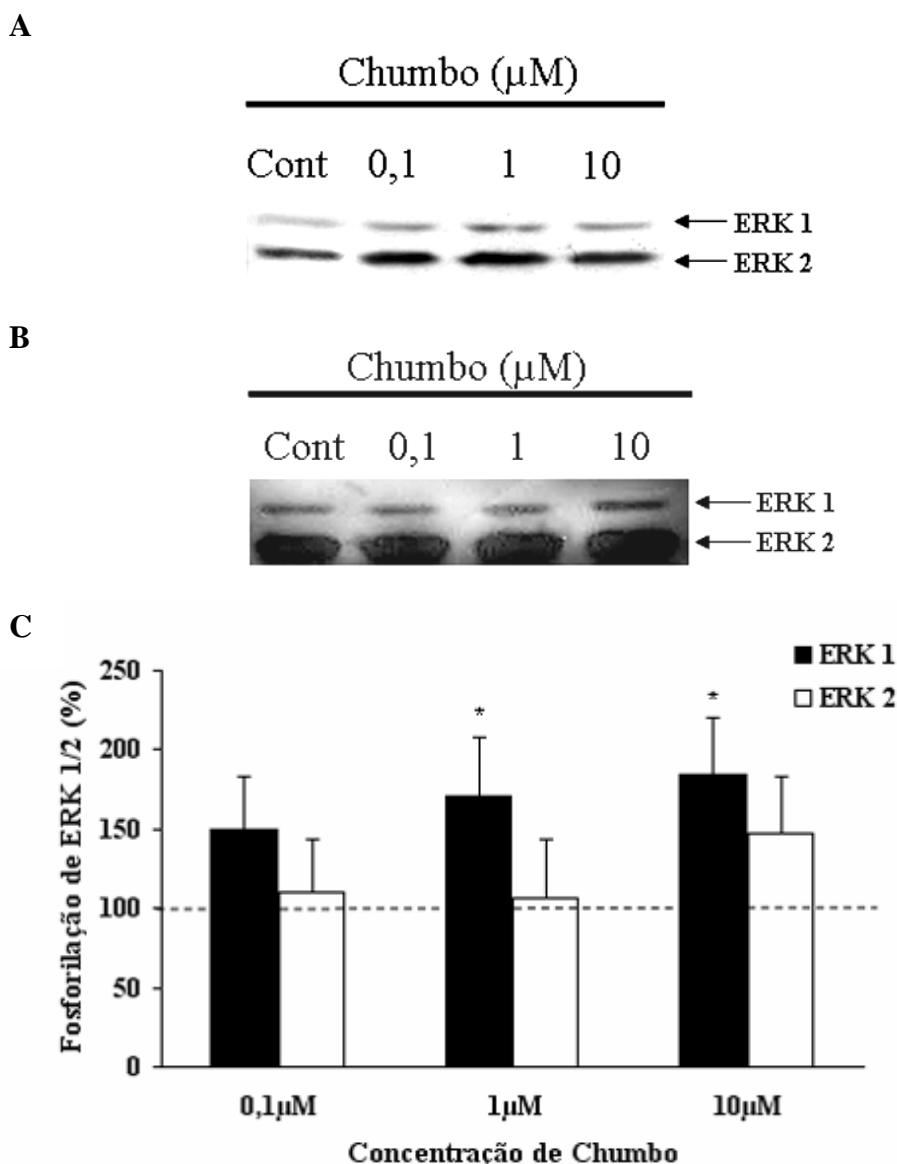


Fig. 20 - Efeito do Chumbo sobre a fosforilação da proteína ERK1/2 em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 horas.

(A) “imunoblotting” mostrando as bandas de fosfo ERK1/2. (B) “imunoblotting” mostrando o conteúdo total de ERK1/2. (C) Quantificação da fosforilação das bandas.

As culturas de células de glioma C6 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de Acetato de Chumbo. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os resultados representam uma média de 6 experimentos realizados separadamente + erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%); * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.10 - Análise da Fosforilação e Conteúdo Total de Akt em Cultura de Células de Glioma C6 Incubadas com Chumbo.

A Akt está envolvida em processos que regulam eventos celulares como metabolismo, apoptose e proliferação celular, agindo como um sinal anti-apoptótico.

Esta proteína responde a fatores de crescimento (Brazil & Hemmings, 2001), matriz extracelular e outros fatores (Nicholson & Anderson, 2002). Em cultura de células, os metais podem aumentar a fosforilação de Akt (Chalecka-Franaszek & Chuang, 1999; Lin *et al.*, 2003a).

Em nosso estudo, foi analisada a modulação de Akt em cultura de células de glioma C6 de rato incubadas com Chumbo em concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M por 24 horas (Fig. 21 A e B). Para controle as células foram incubadas sob as mesmas condições de cultura sem Acetato de Chumbo. Na parte A da figura 21 é mostrado o “imunoblotting” e a quantificação da fosforilação de Akt. Observou-se um aumento significativo na fosforilação de Akt em todas as concentrações testadas de Chumbo (0,1, 1 e 10 μ M) em relação ao controle (considerado 100%). Na parte B, é mostrado o “imunoblotting” e quantificação do conteúdo total de Akt. Neste caso também observou-se um aumento significativo no conteúdo de Akt em todas as concentrações de Chumbo utilizadas em relação ao controle.

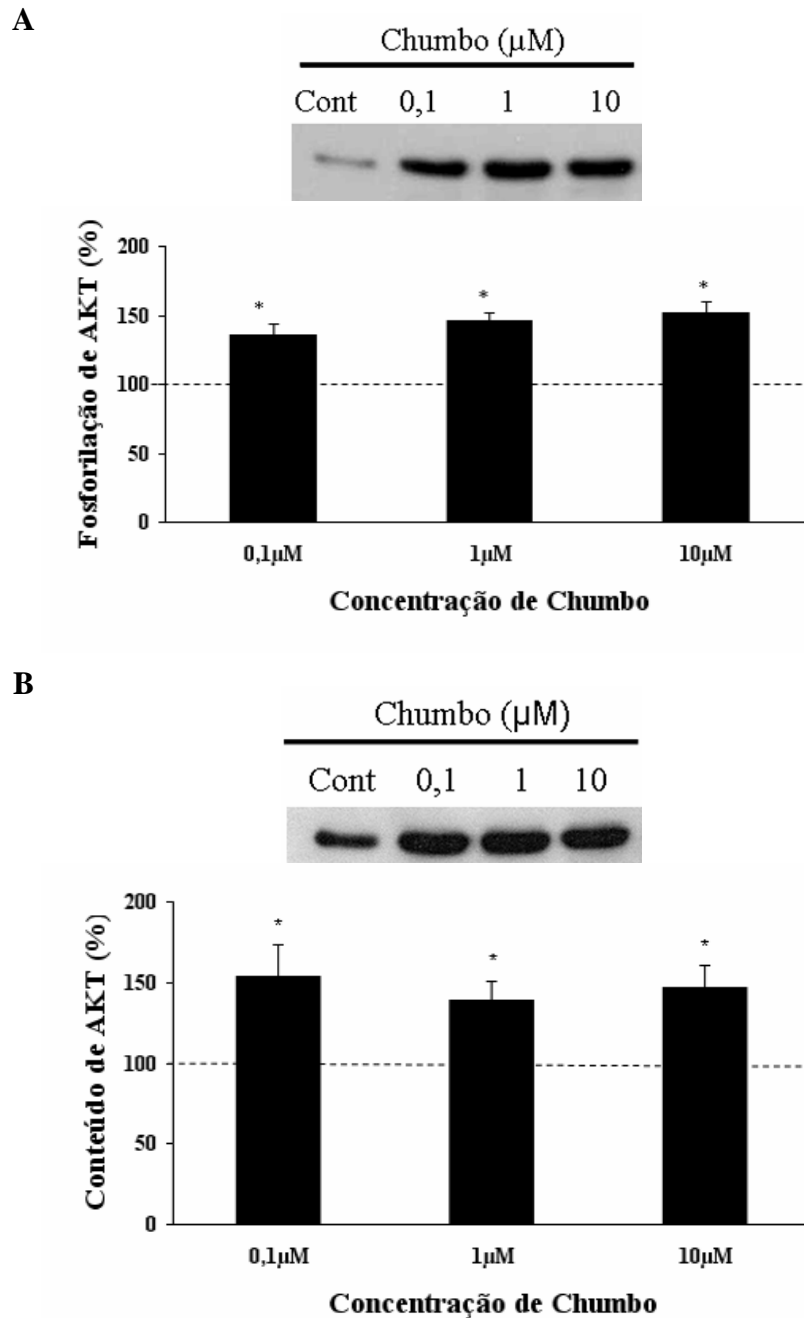


Fig. 21 - Efeito do Chumbo sobre a fosforilação e conteúdo total da proteína AKT em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 horas.

(A) “imunoblotting” e quantificação de fosfo AKT. (B) “imunoblotting” e quantificação de Akt total.

As culturas de células de glioma C6 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de Acetato de Chumbo. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. O resultados representam uma média de 4 experimentos realizados separadamente + erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%); * $p < 0,001$ em relação ao controle em A. * $p < 0,01$ em relação ao controle em B.

4.11 - Análise do Imunoconteúdo de Hsp27 e Hsp70 em Cultura de Células de Glioma C6 Incubadas com Chumbo.

As Hsps formam um sistema ancestral de defesa celular. As células podem responder a estímulos estressantes pelo aumento da expressão de algumas proteínas Hsps (Sreedhar & Czermely, 2004). Entre estes estímulos, alguns metais pesados se destacam pela capacidade de causar aumento da expressão de Hsps (Hung *et al.*, 1998b; Qian *et al.*, 2000).

Dessa forma, foi analisada a modulação da expressão de Hsp27 e Hsp70 em cultura de células de glioma de rato C6 incubadas com Chumbo em concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M por 24 horas. Para controle as células foram incubadas sob as mesmas condições de cultura sem Acetato de Chumbo. A figura 22 A e B mostram o “imunoblotting” do conteúdo total de Hsp27 e a quantificação das bandas, respectivamente. Não foi observada variação no conteúdo total de Hsp27 após tratamento como Chumbo em nenhuma concentração analisada quando comparado ao controle (considerado 100%). A figura 23 A e B mostram o “imunoblotting” do conteúdo total de Hsp70 e a quantificação das bandas, respectivamente. Não foi observada variação no conteúdo total de Hsp70 após tratamento com Chumbo em nenhuma concentração analisada, quando comparado ao controle (considerado 100%).

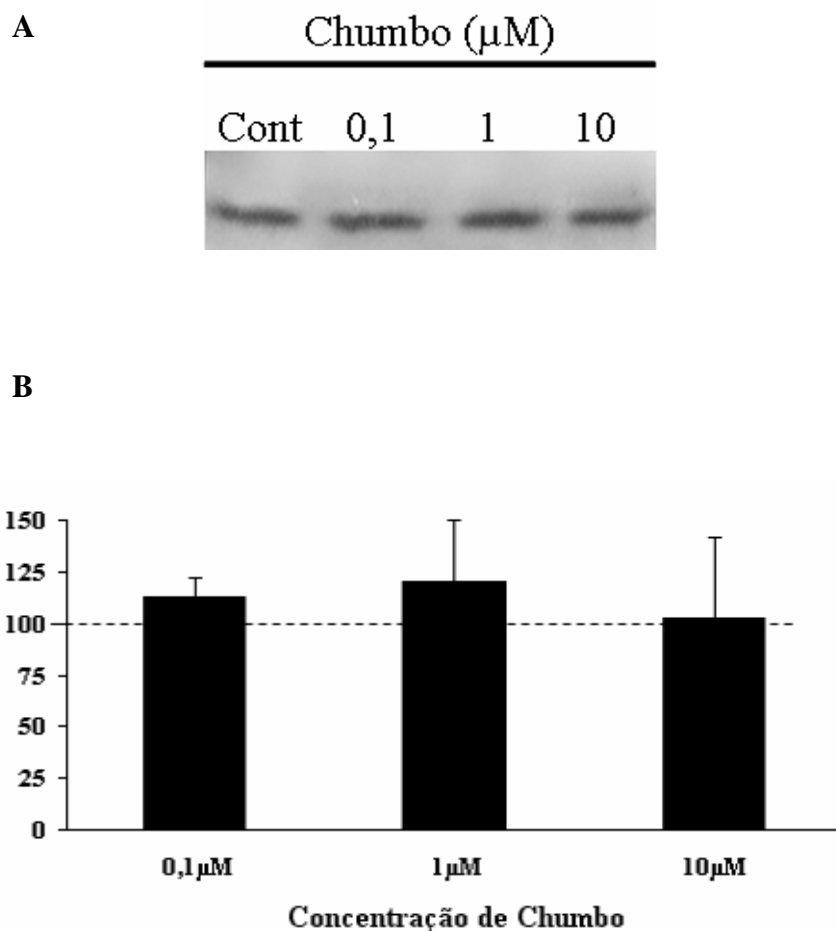
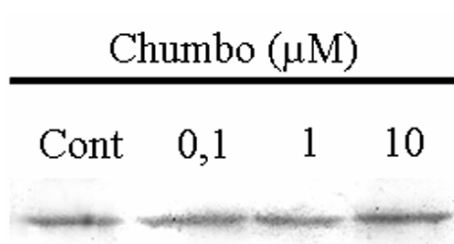


Fig. 22 - Efeito do Chumbo sobre a o conteúdo total da proteína Hsp27 em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 horas.

(A) “imunoblotting” mostrando as bandas de HSP27 total. (B) Quantificação do conteúdo total de Hsp27.

As culturas de células de glioma C6 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de Acetato de Chumbo. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os resultados representam uma média de 5 experimentos realizados separadamente + erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%); $p > 0,05$, sem diferenças significativas em relação ao controle.

A



B

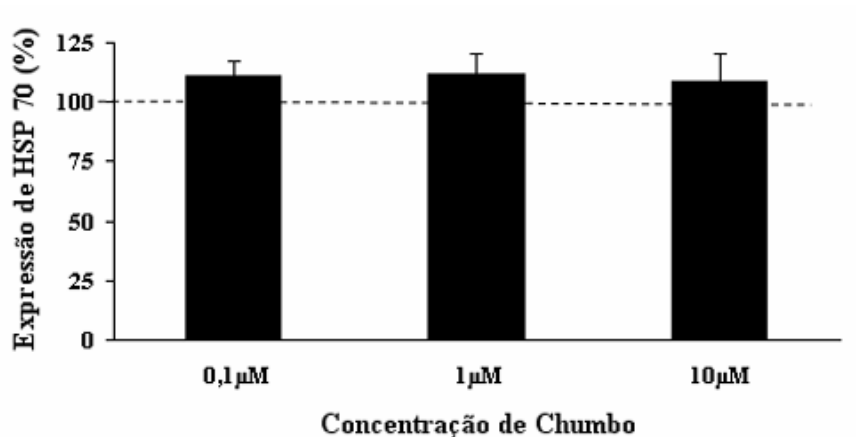


Fig. 23 - Efeito do Chumbo sobre a o conteúdo total da proteína Hsp70 em culturas de células de glioma C6 tratadas por 24 horas.

(A) “imunoblotting” mostrando as bandas de Hsp70 total. (B) Quantificação do conteúdo total de Hsp70.

As culturas de células de glioma C6 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de Acetato de Chumbo. O controle do experimento representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os resultados representam uma média de 5 experimentos realizados separadamente + erro padrão das densidades ópticas de cada banda e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%); $p > 0,05$, sem diferenças significativas em relação ao controle.

4.12 – Análise da Viabilidade Celular pela Medida da Redução do MTT em Culturas de Células de Glioma C6 de Rato Após Tratamento com Chumbo e PD098059.

A via de sinalização de ERK1/2 é de fundamental importância para o crescimento e diferenciação celular. Estudos com inibidores clássicos de ERK reforçam esta afirmação demonstrando que a ERK1/2 é importante para o crescimento e viabilidade celular mediada por metais ou agentes pró-oxidantes (Misra *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, verificamos que o PD098059 paralelamente com a inibição de ERK1/2, também inibiu a viabilidade celular em nosso modelo de cultura. Baseado nisso, verificamos qual seria o efeito do tratamento de Chumbo (10 μ M) juntamente com PD098059 sobre a viabilidade celular, uma vez que o Chumbo nessa concentração aumentou a fosforilação de ERK1 e diminuiu a viabilidade celular.

Para isto, a cultura de células de glioma C6 de rato foi incubada por 24, 48 e 72 horas com Chumbo (10 μ M), PD098059 (50 μ M) ou Chumbo (10 μ M) juntamente com PD098059 (50 μ M). Para controle as células foram incubadas sob as mesmas condições de cultura, porém sem os tratamentos citados.

Na figura 24 A observa-se a curva de inibição do PD098059 sobre a fosforilação de ERK 1/2 medida em 24 horas de incubação com o inibidor. A concentração de 50 μ M foi a que teve o maior efeito inibitório na fosforilação de ERK1/2. O conteúdo total de proteína não foi alterado (dados não mostrados). Na figura 24 B, observamos que o PD098059 paralelamente com a inibição de ERK1/2, também diminuiu a viabilidade celular a partir de 5 μ M, após tratamento de 24 horas.

Na figura 25, verifica-se que o tratamento de Chumbo juntamente com PD098059 não alterou o efeito do inibidor de ERK1/2 sobre a proliferação. Deste

modo, o tratamento com Chumbo não foi capaz de modificar o efeito inibitório de PD098059 sobre a viabilidade de células de glioma C6 de rato.

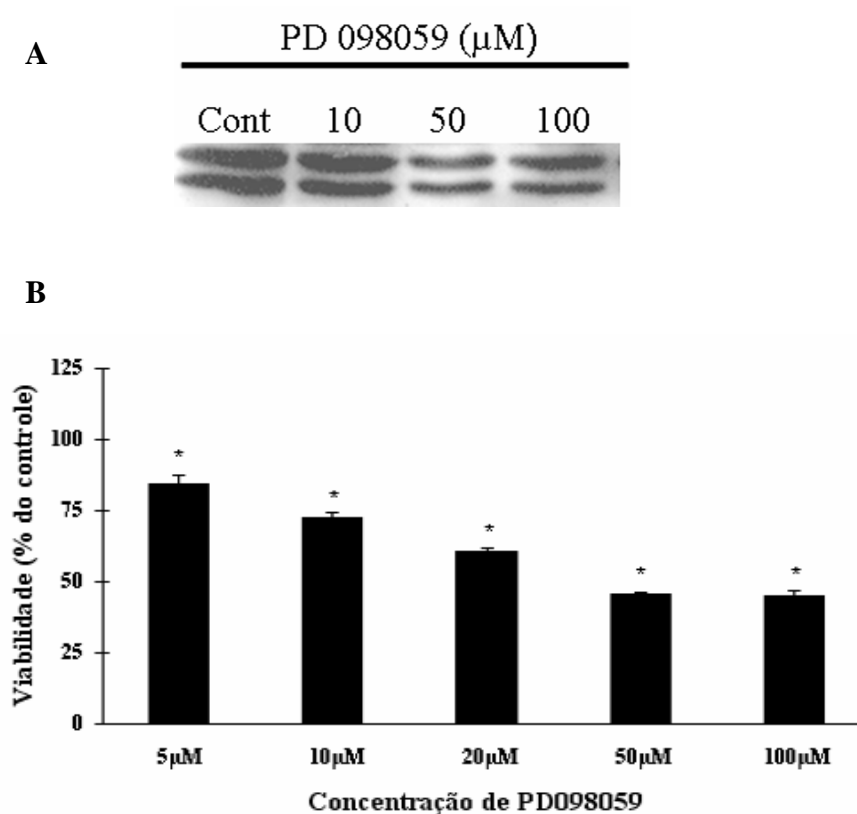


Fig. 24 – Efeito do PD098059 sobre a fosforilação de ERK 1/2 e viabilidade celular em células de glioma C6 após exposição ao Chumbo. (A) “imunoblotting” mostrando o efeito do PD098059 sobre a fosforilação de ERK1/2 após 24 horas de incubação. (B) Medida da redução do MTT após 24 horas de incubação com PD098059.

(A) As culturas de células da linhagem C6 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de PD098059. (B) As culturas de células da linhagem C6 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de PD098059. O controle representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os gráficos acima representam uma média de 3 experimentos realizados separadamente + erro padrão, e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%). * $p < 0,001$ em relação ao controle.

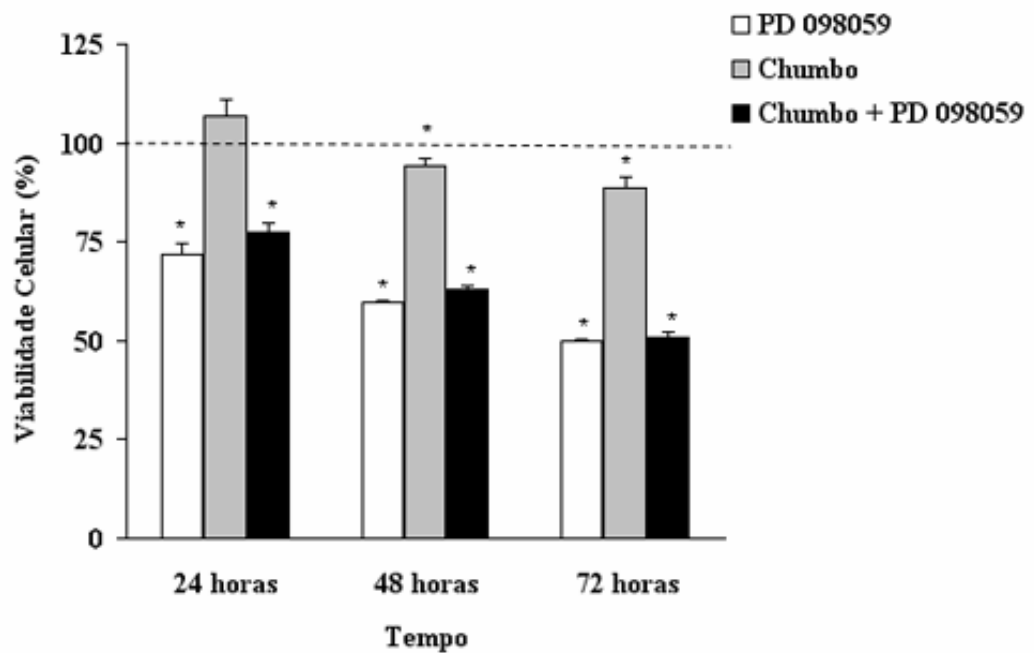


Fig. 25 – Efeito de Chumbo e PD098059 sobre a viabilidade celular pela redução do MTT em células de glioma C6 após 24, 48 e 72 horas com os respectivos tratamentos.

As células foram incubadas durante 24, 48 ou 72 horas com Chumbo 10 μ M, PD098059 50 μ M ou Chumbo + PD098059. O controle representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os gráficos acima representam uma média de 3 experimentos realizados separadamente + erro padrão e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%). * $p < 0,001$ em relação ao controle.

4.13 - Análise da Viabilidade Celular Através da Medida de Redução do MTT em Cultura de Células de Glioma C6 de Rato Após Tratamento com Chumbo e SB203580.

Em culturas celulares a p38^{MAPK} demonstrou mediar a apoptose induzida por Cádmio (Galán *et al.*, 2000). Porém, a inibição de p38^{MAPK} não afetou a queda de viabilidade celular em fatias hipocampais expostas ao Cádmio (Cordova, 2002).

Culturas de células de glioma C6 de rato foram incubadas por 24, 48 e 72 horas com Chumbo (10 μ M), SB203580 (10 μ M) ou Chumbo (10 μ M) juntamente com SB203580 (10 μ M). Para controle as células foram incubadas sob as mesmas condições de cultura, porém sem os tratamentos citados.

Na figura 26 A observa-se a curva de inibição do SB203580 sobre a fosforilação de p38^{MAPK}. A concentração de 10 μ M foi a que teve o maior efeito inibitório na fosforilação desta proteína. O conteúdo total de proteína não foi alterado (dados não mostrados).

Foi analisado o efeito do Chumbo mais SB203580 sobre a viabilidade celular em períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas (Fig. 26 B). Os resultados mostram que tanto o Chumbo (10 μ M) como o SB203580 (10 μ M), isoladamente, causam uma diminuição na viabilidade celular especialmente nos períodos de 48 e 72 horas. Entretanto, quando adicionados conjuntamente observa-se uma diminuição de viabilidade mais pronunciada do que cada um deles isoladamente, mostrando um efeito aditivo entre os tratamentos.

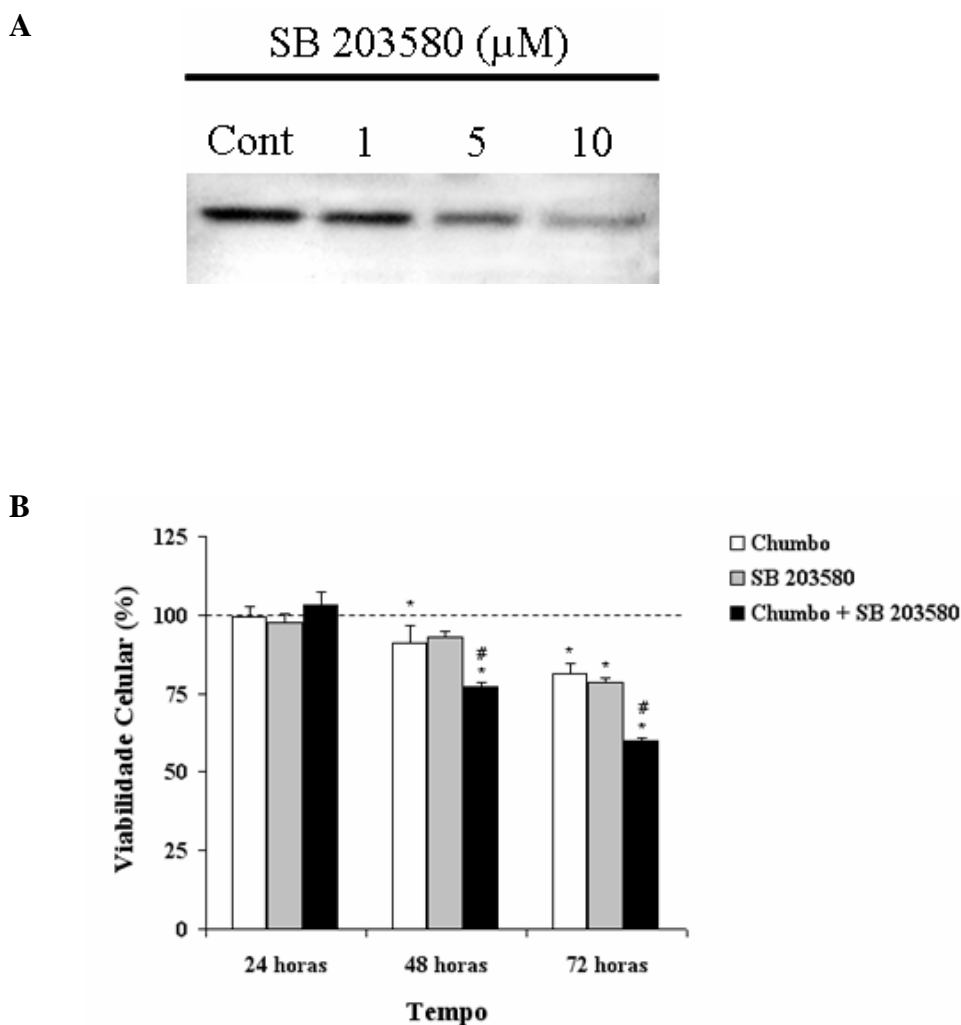


Fig. 26 – Efeito do Chumbo e SB203580 sobre a viabilidade celular medida pela redução do MTT em células de glioma C6 de rato. (A) “imunoblotting” mostrando o efeito do SB203580 sobre a fosforilação de P38^{MAPK} após 24 horas de incubação. (B) Redução do MTT após 24, 48 e 72 horas de incubação com Chumbo e SB203580.

(A) As culturas de células da linhagem C6 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de SB203580. (B) As células foram incubadas durante 24, 48 ou 72 horas com Chumbo 10 μM , SB203580 10 μM ou Chumbo + SB203580. O controle representa as células incubadas sob as mesmas condições sem tratamento com Chumbo. Os gráficos acima representam uma média de 3 experimentos realizados separadamente + erro padrão e são expressos como percentuais em relação ao controle (considerado 100%). * $p < 0,001$ em relação ao controle. # $p < 0,01$ em relação à SB203580 e Chumbo + SB203580.

5-DISCUSSÃO

Os dados aqui apresentados demonstraram que o tratamento por 24 horas com Chumbo aumentou a viabilidade celular em culturas de glioma U373 humano e cultura primária de astrócitos, determinado através da medida da redução do MTT e da contagem celular. Nestas mesmas condições, um efeito similar foi observado sobre cultura de células de glioma C6 de rato, mas apenas através da medida da contagem de células. Estes efeitos foram observados somente com as menores concentrações de Chumbo utilizadas neste estudo (0,1 e 1 μ M). Isto está de acordo com estudos *in vitro*, onde o tratamento com Chumbo causou um aumento no número de células de gliomas humanos (86HG, 87HG, 88HG e A172) e de ratos (F98 e RG2) mantidos em cultura (Stark *et al.*, 1992) e aumentou a proliferação de hepatócitos de ratos após administração do metal *in vivo* (Choie & Richter, 1978). Em culturas de linhagem de astrocitoma, após 24 horas de tratamento com Chumbo, houve indução da síntese de DNA e estimulação na transição do ciclo celular da fase G0/G1 para a fase S/G2 (Lu *et al.*, 2001). Em células da musculatura lisa vascular (Fujiwara *et al.*, 1995) e em linfócitos do pâncreas de ratos (Razani-Boroujerdi *et al.*, 1999), a exposição ao Chumbo também estimulou a síntese de DNA de modo dose-dependente. Além disso, estudos *in vivo* demonstraram aumento da síntese de DNA no fígado após administração de nitrato de Chumbo em ratos (Liu *et al.*, 1997a).

A capacidade do Chumbo em aumentar a viabilidade celular em baixas concentrações, como verificado neste estudo, juntamente com a capacidade do Chumbo estimular a síntese de DNA, pode sugerir um potencial carcinogênico para este metal. Neste sentido o Chumbo foi avaliado como um possível carcinógeno humano (Grupo II-B) pela Agência Internacional de Estudo sobre o Câncer (IARC, 1987). Altos níveis sanguíneos de Chumbo podem estar correlacionados com um aumento da incidência de

câncer pulmonar e gliomas cerebrais em trabalhadores expostos ao Chumbo (Anttila *et al.*, 1995, Antilla *et al.*, 1996). Em animais, também há evidências de que este metal induza gliomas e outros tipos de cânceres (WHO, 1995). A genotoxicidade do Chumbo pode não ser resultado de um dano direto sobre o DNA, mas pode ocorrer por mecanismos indiretos. Metais divalentes podem inibir mecanismos de reparo do DNA (Calsou *et al.*, 1996). Posteriormente foi demonstrado que células que não apresentam o mecanismo de reparo de nucleotídeos (NER) são mais sensíveis à citotoxicidade e mutagenicidade do Chumbo, sugerindo que o Chumbo possa induzir lesões do DNA que podem ser reparadas por NER (Lin *et al.*, 2003a).

A exposição das células ao Chumbo (10 μ M) por 24 horas, não alterou a viabilidade celular de culturas de glioma U373 e de cultura primária de astrócitos, medida pela redução de MTT e contagem celular. Entretanto, em cultura de células de glioma C6, este mesmo tratamento reduziu significativamente o número de células medido através da contagem celular. Adicionalmente, nas células de glioma C6 exposição ao Chumbo (10 μ M) por 48 e 72 horas, causou uma diminuição na viabilidade, medida pela contagem do número de células e através da medida de redução do MTT. As concentrações de Chumbo capazes de causar citotoxicidade podem variar dependendo do tipo celular utilizado e condições experimentais de exposição. Desta forma tem sido demonstrado que em cultura de neurônios, as concentrações de 1 e 10 μ M de Chumbo causaram uma queda no número de células (Schneider *et al.*, 2003). Em células de glioma C6, Chumbo na concentração de 10 μ M diminuiu o número de células, embora causando estímulo da síntese protéica (Tiffany-Castiglioni, 1988). Em outros estudos, com linhagem U373, estas mesmas concentrações não alteraram a viabilidade celular, mas afetaram a expressão de TNF- α e interleucinas (Liu *et al.*, 2000). Em culturas de células tronco neurais, a exposição ao Chumbo (0.01-10 μ M)

causou inibição da proliferação celular (Huang & Schneider, 2004). Desse modo, pode-se concluir que não há um consenso sobre a concentração mínima de Chumbo que possa causar citotoxicidade. Porém, sabe-se que podem ser de uma baixa ordem de magnitude.

Em nosso estudo não observamos alterações morfológicas de astrócitos expostos ao Chumbo (0,1-10 μ M) por 24 horas através da análise das células imunomarcadas com anticorpo anti-Vimentina. Alguns estudos que analisaram as respostas dos astrócitos frente à exposição prolongada ao Chumbo *in vivo* mostraram hipertrofia astrocitária no hipocampo e cerebelo usando Vimentina e GFAP como marcadores astrocitários (Selvín-Testa *et al.*, 1994). Desta forma a ausência de uma modificação morfológica em nosso estudo pode sugerir que o aparecimento de alterações morfológicas dependa de períodos de exposição mais prolongados. Entretanto, em neurônios em cultura, 24h de exposição ao Chumbo alterou a expressão de proteínas do citoesqueleto neuronal (Scortegagna *et al.*, 1998), indicando que dependendo do tipo celular respostas rápidas do citoesqueleto também podem ser verificadas.

Muitos estímulos são capazes de estimular os módulos de fosforilação de proteínas MAPKs, entre eles observam-se os metais pesados. Desde que estas proteínas são componentes fundamentais de vias que controlam processos de embriogênese, diferenciação, proliferação e morte celular (Pearson *et al.*, 2001), as implicações fisiológicas e patológicas da ação dos metais sobre estas proteínas torna-se importante. Neste sentido tem sido bem demonstrado que o Cádmiu pode aumentar a fosforilação de ERK1/2 e p38^{MAPK} em linhagem de neuroblastoma resultando em mitogênese e apoptose, respectivamente (Hung *et al.*, 1998a);_Cádmiu também tem mostrado causar aumento da fosforilação de p38^{MAPK} e apoptose em promonócitos (Galán *et al.*, 2000). Em macrófagos, foi observado que o Cádmiu pode induzir a fosforilação de ERK1 e p38^{MAPK} bem como a síntese de DNA (Misra *et al.*, 2002), além disso, também tem

sido relatado indução de apoptose e estímulo da fosforilação de JNK (Kim & Sharma, 2004). Em astrocitoma o Chumbo estimulou a fosforilação de ERK1/2 com estimulação da síntese de DNA (Lu *et al.*, 2002), em fatias hipocampais, houve aumento da fosforilação de ERK1/2 e p38^{MAPK}, sem alterar a viabilidade celular (Cordova *et al.*, 2004). O tratamento de tumores neuronais com Chumbo aumentou a fosforilação de ERK1/2, contribuindo para a fosforilação do fator de transcrição CREB (Zhang *et al.*, 2003). Em células cromafins bovinas e neuroblastoma humano, o Chumbo aumentou a fosforilação de p38^{MAPK}, resultando em fosforilação de Hsp27 (Leal *et al.*, 2002).

Neste estudo, averiguou-se a fosforilação das proteínas MAPKs em cultura de células de linhagem C6 após exposição por 24 horas ao Chumbo, sendo observado que o Chumbo (10µM) causou um aumento na fosforilação de p38^{MAPK}. A proteína p38^{MAPK} tem demonstrado responder à citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α), ao choque térmico e osmótico, aos inibidores de síntese protéica e a radiação UV (Robinson & Cobb, 1997; Nebreda & Porras, 2000). Muitas das ações de p38^{MAPK} têm sido associadas ao aparecimento de morte celular (Ko *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2004). Porém, dependendo do tipo de célula e do estímulo utilizado, a família de p38^{MAPK} pode exercer tanto um papel favorável como desfavorável à proliferação (Nebreda & Porras, 2000).

A incubação das células de glioma C6 de rato por 48 e 72 horas com o inibidor de p38^{MAPK}, SB203580, demonstrou que esta proteína é importante para a proliferação destas células, pois verificamos uma diminuição significativa na viabilidade celular, de 10% e 19%, respectivamente. Este efeito não foi significativo após 24 horas de incubação das células com o inibidor. Diversos trabalhos na literatura discutem a importância de p38^{MAPK} na proliferação celular. Em cultura de fibroblastos, a inibição de p38^{MAPK} bloqueou o aumento da proliferação celular induzida por FGF-2 (Maher *et*

al., 1999), em culturas de células pancreáticas, também foi observada diminuição da viabilidade após 48 horas com SB203580, medida pela redução de MTT (Aikin *et al.*, 2005). Neste trabalho, a adição concomitante de Chumbo e SB203580 por 48 e 72 horas mostrou um efeito aditivo na diminuição da viabilidade celular. Desta forma, pode-se sugerir que o Chumbo esteja exercendo efeitos sobre a viabilidade celular independentes de p38^{MAPK} sobre a viabilidade, pelo menos nos períodos de 48 e 72 horas de incubação. Deve ser salientado que com 24 horas de tratamento das culturas de glioma C6 de rato com Chumbo (10µM), observou-se uma nítida estimulação da fosforilação de p38^{MAPK} e diminuição da viabilidade apenas através da contagem de células, mas não através da medida do MTT. Além disso, neste período de 24h não foi observada alteração da viabilidade celular analisada pela redução de MTT, com adição simultânea de Chumbo e SB203580.

O inibidor de p38^{MAPK}, SB203580, utilizado nestes experimentos, age sobre as isoformas p38α e p38β, as quais medeiam a maior parte das funções de p38^{MAPK} (Nebreda & Porras, 2000). O fato de que o inibidor de p38^{MAPK} utilizado neste estudo também possa estar agindo na modulação de outras vias também não pode ser descartado, uma vez que alguns estudos verificaram que o SB203580 pode afetar, em doses mais altas, a ativação de enzimas incluindo Raf, ou então algumas isoformas de JNK (Clerk *et al.*, 1998; Nebreda & Porras, 2000).

O envolvimento de ERK1/2 em processos celulares que incluem proliferação, sobrevivência ou morte celular é bem caracterizado (Robinson & Cobb, 1997; Chang & Karin, 2001; Haddad, 2004). Em nosso estudo, a exposição das células de glioma C6 ao Chumbo (1 e 10µM) por 24 horas, estimulou a fosforilação de ERK1. A incubação das células de glioma C6 de rato por 24, 48 e 72 horas com o inibidor de MEK1/2, PD098059 (50µM), demonstrou que a fosforilação de ERK1/2 pode ser um passo

importante para a proliferação das células de glioma C6 de rato. Em diversos estudos pode ser verificada a ação de ERK sobre a viabilidade e proliferação celular. Em cultura de células do pâncreas, o PD098059 inibiu a síntese de DNA e a viabilidade celular induzidas por leptina (Tanabe *et al.*, 1997); inibiu também a captação de timidina estimulada pelo Cádmio em macrófagos (Misra *et al.*, 2002). Em cultura celular de astrocitoma, a indução da síntese de DNA promovida pelo Chumbo pode ser bloqueada pela inibição de ERK1/2 (Lu *et al.*, 2002).

Neste estudo, podemos verificar uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular de células de glioma C6 de rato após a incubação com PD098059 em todos os períodos analisados. Porém, a adição concomitante de Chumbo (10 μ M) por 24, 48 e 72 horas não alterou o efeito inibitório de PD098059 (50 μ M) sobre a viabilidade celular. Em dados não demonstrados, verificamos que a ação conjunta de Chumbo e PD098059 durante 24 horas, impediu a estimulação da fosforilação de ERK1/2 causada pelo Chumbo. Desta forma pode-se indicar que a via de sinalização que envolve a MEK1/2-ERK1/2 seja de grande importância para a proliferação das células de glioma C6. Além disso, a falta de um efeito adicional do Chumbo sobre a viabilidade na presença de PD098059 pode sugerir um papel desta via na intermediação da ação do Chumbo (10 μ M) sobre a viabilidade. Entretanto, os dados apresentados não podem ser conclusivos neste sentido, pois a concentração de PD098059 utilizada neste estudo (50 μ M) pode ser relativamente alta, não permitindo uma observação dos efeitos adicionais do Chumbo (em termos de diminuição de viabilidade). Além disso, devemos considerar que na concentração de 1 μ M de Chumbo é observado um estímulo de ERK1 sem, no entanto, ser observado diminuição da viabilidade. Desta forma, mais experimentos devem ser conduzidas para que possamos compreender melhor o papel de

ERK1/2 na intermediação dos danos de viabilidade observados na concentração, mais alta do metal (10 μ M).

No presente estudo, nós não caracterizamos os mecanismos pelos quais o Chumbo poderia estar causando modulação de ERK1/2 e p38^{MAPK}. Entretanto, diversas possibilidades podem ser consideradas, entre elas: a) a atividade de tirosina fosfatases pode ser inibida pelo Chumbo e isso poderia causar um estímulo das vias MAPKs (Samet *et al.*, 1999); b) o Chumbo, assim como outros metais, pode produzir espécies reativas de oxigênio (Aikawa *et al.*, 1997; Lee & Corry; 1998; Almazan *et al.*, 2000; Stohs *et al.*, 2001) e estas poderiam causar ativação de MAPKs; c) o Chumbo também poderia estar ativando PKC (Bressler *et al.*, 1999) e isso indiretamente ativar a via Raf/ERK (Sweatt, 2004), entretanto, embora muitos estudos *in vitro* apontem para ativação de PKC pelo Chumbo, *in vivo* isso não parece ocorrer (Cremir & Smith, 2002); d) o Chumbo poderia estar ativando calmodulina, como tem sido relatado em diversos estudos *in vitro* (Kern & Audesirk, 1995; Kern *et al.*, 2000) e isso também poderia ativar a via Raf/ERK (Dolmetsch *et al.*, 2001; Agell *et al.*, 2002); e) por fim, não pode-se excluir a possibilidade da participação de receptores NMDA, os quais podem ser inibidos pelo Chumbo (Nihei & Guilarte, 2001) e isso ocasionar alterações que induzam uma estimulação da via de ERK (Cordova *et al.*, 2004).

O tratamento por 24 horas com Chumbo (0,1, 1 e 10 μ M) aumentou a expressão da proteína Akt, isto foi acompanhado de uma aumento na fosforilação da proteína na mesma magnitude. Em muitos estudos os metais têm demonstrado modular a fosforilação de Akt. O Arsenito causou ativação de Akt em queratinócitos, via ativação de PI3K e p38^{MAPK} (Souza *et al.*, 2001). Cádmio induziu a fosforilação de p53 de forma dependente de PI3K em linhagem tumoral de câncer de mama (Matsuoka *et al.*, 2001). Em linhagem de células epidérmicas, Vanadato estimulou o ciclo celular promovendo

sua entrada na fase S, pela ativação de PI3K e Akt (Zhang *et al.*, 2004). O tratamento de cultura de células de carcinoma pulmonar com Chumbo estimulou a fosforilação de Akt (Lin *et al.*, 2003a). A via de sinalização em que participa PI3K/Akt, interage com muitos receptores e genes envolvidos na carcinogênese induzida por metais, incluindo VEGF, HIF-1, p53 e src, influenciando a sobrevivência celular, proliferação e migração (Leonard *et al.*, 2004).

A proteína Akt tem demonstrado exercer um papel importante na sobrevivência e proliferação celular. Seu envolvimento na regulação do apoptose envolve a fosforilação da proteína BAD (antagonista de Bcl-2/Bcl-X). Quando BAD é fosforilado na serina 136 por Akt, este é liberado do complexo Bcl-2/Bcl-X localizado na membrana mitocondrial, formando um complexo com proteínas 14-3-3 no citosol (Lawlor & Alessi, 2001; Hanada *et al.*, 2004). Desta forma ele não mais exerce atividade pró-apoptótica. Além do mais, a Akt pode fosforilar quinases acima da via das MAPK, como ASK1 (quinase regulada por sinal apoptótico-1) e SEK1/MKKK4, desta forma inibindo a fosforilação de p38^{MAPK} e JNK1/2, respectivamente. Estas observações sugerem que um dos importantes alvos de Akt é a família de proteínas SAPKs, podendo desta forma promover a sobrevivência celular (Hanada *et al.*, 2004). Em nossos resultados, a estimulação não só da fosforilação, mas também da expressão de Akt, pode estar envolvida em parte na estimulação da viabilidade celular observada em baixas concentrações de Chumbo. Porém mais investigações são necessárias para se compreender o efeito do Chumbo sobre a expressão desta proteína.

O Chumbo pode estimular a expressão de proteínas em culturas de astrócitos (Opanashuk & Finkelstein, 1995a), entre estas, alguns subtipos de Hsps, como HO-1 (Opanashuk & Finkelstein, 1995b; Cabell *et al.*, 2004). Adicionalmente o Cádmiu pode estimular a expressão de Hsp70 em cultura de neuroblastoma (Hung *et al.*, 1998b). Em

nosso modelo de cultura de células de glioma C6, não obtivemos alteração no conteúdo de Hsp27 e Hsp70. Estes dados concordam com Opanashuk & Finkelstein, (1995b) e Cabell *et al.*, (2004) e com dados prévios de nosso laboratório (Cordova, 2002; Cordova *et al.*, 2004), em que não observamos alteração do conteúdo destas proteínas em fatias hipocámpais de animais jovens (14 dias) expostas ao chumbo *in vitro* (1-3h) ou obtidas de animais expostos *in vivo* (do 8^o ao 12^o dia pós natal).

6-CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

Baixas concentrações de Chumbo (0,1 e 1 μ M) por 24 horas, aumentaram a viabilidade celular, tanto avaliada pela medida de redução do MTT como pela contagem de células, nos modelos de cultura de célula de glioma U373 humano e de cultura primária de astrócitos. Neste mesmo período a concentração de 10 μ M de Chumbo não alterou a viabilidade destas células.

Em linhagem de células de glioma C6 de rato, a exposição por 24 horas ao Chumbo nas concentrações mais baixas (0,1 e 1 μ M) causou aumento discreto na viabilidade celular, avaliado através da contagem celular e medida de redução do MTT, respectivamente. Neste mesmo período, o Chumbo (10 μ M) causou citotoxicidade nessas células, quando avaliado o parâmetro de contagem celular. Em períodos mais prolongados (48 e 72 horas) de exposição ao metal, observou-se um nítido efeito citotóxico do chumbo na concentração de 10 μ M. No período de 48 horas de incubação, o Chumbo em concentração muito baixa (0,1 μ M) causou aumento da contagem celular.

O tratamento com SB203580 (10 μ M) diminuiu a viabilidade de células de glioma C6 de rato, medidas através da redução do MTT, a partir de 48 horas de incubação. Neste período de incubação das células, observou-se uma ação aditiva na diminuição da viabilidade celular com o tratamento de Chumbo (10 μ M) juntamente com SB203580 (10 μ M).

O tratamento com PD098059 (50 μ M) diminuiu drasticamente a viabilidade de células de glioma C6 de rato a partir de 24 horas de incubação. O tratamento concomitante com Chumbo (10 μ M) e PD098059 (50 μ M) não alterou o efeito sobre a viabilidade observado pelo PD098059 isoladamente.

A exposição de células de glioma C6 de rato ao Chumbo ($10\mu\text{M}$) durante 24 horas causou aumento da fosforilação de p38^{MAPK} e ERK1. Neste mesmo período, as baixas concentrações de Chumbo ($0,1$ e $1\mu\text{M}$) não alteraram a fosforilação de p38^{MAPK} , mas Chumbo $1\mu\text{M}$ foi capaz de estimular ERK1. Nenhuma concentração de Chumbo utilizada alterou a fosforilação de JNK1/2.

Foi verificado um aumento na expressão de Akt, acompanhado de um aumento de mesma magnitude na fosforilação da proteína em todas as concentrações de Chumbo utilizadas ($0,1$, 1 e $10\mu\text{M}$) durante o período de 24 horas. O conteúdo de Hsp27 e Hsp70 não foi modificado em nenhuma concentração de Chumbo utilizada.

Concluindo, apesar de muitos estudos delinearem efeitos do Chumbo sobre a fosforilação de MAPKs em culturas de células, ainda não é bem documentado o efeito da exposição de cultura de células de glioma C6 de rato ao Chumbo, visto que este é um modelo bem aceito de estudo das funções dos metais pesados sobre a glia. Nosso estudo aponta claramente para uma capacidade do Chumbo em modular as vias de ERK e p38^{MAPK} , neste modelo. Adicionalmente, sugere que a diminuição de viabilidade observada na concentração mais alta do metal parece não ser dependente da estimulação de p38^{MAPK} . Por fim, este estudo mostra, de uma forma importante, um efeito do Chumbo sobre a expressão da proteína Akt em culturas celulares.

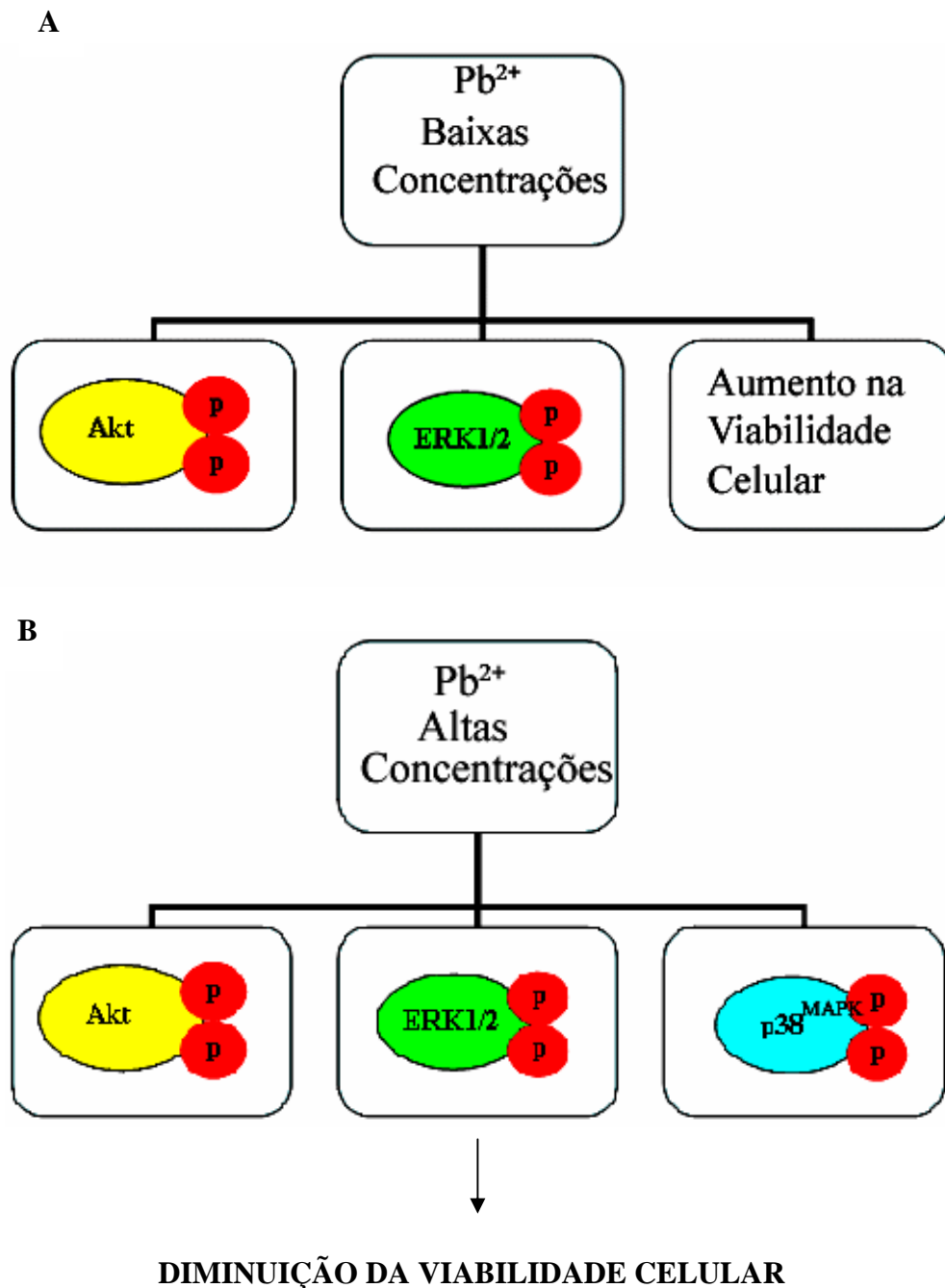


Fig. 27. Resumo ilustrativo dos resultados obtidos neste trabalho. (A) Baixas concentrações de Chumbo estão correlacionadas com ativação da proteína Akt e ERK1/2, acompanhado de um aumento da viabilidade celular. (B) Altas concentrações de Chumbo estão correlacionadas com ativação da proteína Akt, ERK1/2 e p38^{MAPK}, acompanhado de uma diminuição da viabilidade celular.

7 - PERSPECTIVAS

Os dados expostos neste trabalho conduzem-nos a preencher algumas lacunas que contribuirão para um melhor entendimento dos efeitos do Chumbo sobre o metabolismo dos astrócitos e de linhagens tumorais, entre elas:

1 - A ação do Chumbo sobre a fosforilação das proteínas MAPKs no período de 48 horas de incubação, visto que neste período foi observada uma diminuição expressiva na viabilidade celular, tanto nos experimentos de viabilidade medida pela redução do MTT, quanto na contagem do número de células.

2 - Aprofundar o entendimento do papel da Akt na resposta celular frente ao Chumbo, uma vez que esta pode estar intermediando o efeito do metal sobre o aumento da viabilidade celular em pequenas concentrações.

3 - Aprofundar a compreensão do papel de p38^{MAPK} e ERK1/2 na proliferação das células de glioma C6 de rato, uma vez que foi observado que Chumbo e SB203580 exercem um efeito aditivo sobre a viabilidade celular e Chumbo e PD098059 não mostraram efeitos adicionais. Além disso, a ERK1/2 e a p38^{MAPK} demonstraram ser fundamentais para a viabilidade das culturas celulares de glioma C6.

8 - REFERÊNCIAS

- ABE, T., KONISHI, T., KATOH, T., HIRANO, H., MATSUKUMA, K., KASHIMURA, M. & HIGASHI, K. (1994). Induction of heat shock 70 mRNA by cadmium is mediated by glutathione suppressive and non-suppressive triggers. *Biochim Biophys Acta* 1201, 29-36.
- ADACHI-YAMADA, T., NAKAMURA, M., IRIE, K., TOMOYASU, Y., SANO, Y., MORI, E., GOTO, S., UENO, N., NISHIDA, Y. & MATSUMOTO, K. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in Drosophila wing morphogenesis. *Mol Cell Biol* 19, 2322-2329.
- AGELL, N., BACHS, O., ROCAMORA, N., & VILLALONGA, P. (2002). Modulation of Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca²⁺, and calmodulin. *Cell. Signal.* 14, 649-654.
- AIKAWA, R., KOMURO, I., YAMAZAKI, T., ZOU, Y., KUDOH, S., TANAKA, M., SHIOJIMA, I., HIROI, Y. & YAZAKI, Y. (1997). Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* 100, 1813-1821.
- AIKIN, R., MAYSINGER, D. & ROSENBERG, L. (2004). Cross-talk between phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and c-jun NH2-terminal kinase mediates survival of isolated human islets. *Endocrinology* 145, 4522-4531.
- ALMAZAN, G., LIU, H. N., KHORCHID, A., SUNDARARAJAN, S., MARTINEZ-BERMUDEZ, A. K. & CHEMTOB, S. (2000). Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. *Free Radic Biol Med* 29, 858-869.
- ANNEST, J. L., PIRKLE, J. L., MAKUC, D., NEESE, J. W., BAYSE, D. D. & KOVAR, M. G. (1983). Chronological trend in blood lead levels between 1976 and 1980. *N Engl J Med* 308, 1373-1377.
- ANTTILA, A., HEIKKILA, P., NYKYRI, E., KAUPPINEN, T., PUKKALA, E., HERNBERG, S. & HEMMINKI, K. (1996). Risk of nervous system cancer among workers exposed to lead. *J Occup Environ Med* 38, 131-136.
- ANTTILA, A., HEIKKILA, P., PUKKALA, E., NYKYRI, E., KAUPPINEN, T., HERNBERG, S. & HEMMINKI, K. (1995). Excess lung cancer among workers exposed to lead. *Scand J Work Environ Health* 21, 460-469.
- BARANOWSKA-BOSIACKA, I. & HLYNCZAK, A. J. (2003). The effect of lead ions on the energy metabolism of human erythrocytes in vitro. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 134, 403-416.

- BECK, F. X., GRUNBEIN, R., LUGMAYR, K. & NEUHOFER, W. (2000). Heat shock proteins and the cellular response to osmotic stress. *Cell Physiol Biochem* 10, 303-306.
- BENDA, P., LIGHTBODY, J., SATO, G., LEVINE, L. & SWEET, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161, 370-371.
- BEVILAQUA, L. R., KERR, D. S., MEDINA, J. H., IZQUIERDO, I. & CAMMAROTA, M. (2003). Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci* 17, 897-902.
- BHAT, N. R. & ZHANG, P. (1999). Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurochem* 72, 112-119.
- BOBROVSKAYA, L., ODELL, A., LEAL, R. B. & DUNKLEY, P. R. (2001). Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of MAPKs after angiotensin II stimulation. *J Neurochem* 78, 490-498.
- BRADBURY, M. W. & DEANE, R. (1993). Permeability of the blood-brain barrier to lead. *Neurotoxicology* 14, 131-136.
- BRAZIL, D. P. & HEMMINGS, B. A. (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26, 657-664.
- BRESSLER, J., KIM, K. A., CHAKRABORTI, T. & GOLDSTEIN, G. (1999). Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochem Res* 24, 595-600.
- BRESSLER, J. P., BELLONI-OLIVI, L., FORMAN, S. & GOLDSTEIN, G. W. (1996). Distinct mechanisms of neurotransmitter release from PC 12 cells exposed to lead. *J Neurosci Res* 46, 678-685.
- BUCHHEIM, K., NOACK, S., STOLTENBURG, G., LILIENTHAL, H. & WINNEKE, G. (1994). Developmental delay of astrocytes in hippocampus of rhesus monkeys reflects the effect of pre- and postnatal chronic low level lead exposure. *Neurotoxicology* 15, 665-669.
- CABELL, L., FERGUSON, C., LUGINBILL, D., KERN, M., WEINGART, A. & ALDESIRK, G. (2004). Differential induction of heme oxygenase and other stress proteins in cultured hippocampal astrocytes and neurons by inorganic lead. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 49-60.
- CALABRESE, V., SCAPAGNINI, G., RAVAGNA, A., COLOMBRITA, C., SPADARO, F., BUTTERFIELD, D. A. & GIUFFRIDA STELLA, A. M. (2004). Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state. *Mech Ageing Dev* 125, 325-335.

- CALSOU, P., FRIT, P., BOZZATO, C. & SALLES, B. (1996). Negative interference of metal (II) ions with nucleotide excision repair in human cell-free extracts. *Carcinogenesis* 17, 2779-2782.
- CANFIELD, R. L., HENDERSON, C. R., JR., CORY-SLECHTA, D. A., COX, C., JUSKO, T. A. & LANPHEAR, B. P. (2003). Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N Engl J Med* 348, 1517-1526.
- CHALECKA-FRANASZEK, E. & CHUANG, D. M. (1999). Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8745-8750.
- CHANG, L. & KARIN, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- CHEN, C. J. & LIAO, S. L. (2003). Zinc toxicity on neonatal cortical neurons: involvement of glutathione chelation. *J Neurochem* 85, 443-453.
- CHEN, H. H., MA, T., PAUL, I. A., SPENCER, J. L. & HO, I. K. (1997). Developmental lead exposure and two-way active avoidance training alter the distribution of protein kinase C activity in the rat hippocampus. *Neurochem Res* 22, 1119-1125.
- CHENG, J. Q., GODWIN, A. K., BELLACOSA, A., TAGUCHI, T., FRANKE, T. F., HAMILTON, T. C., TSICHLIS, P. N. & TESTA, J. R. (1992). AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9267-9271.
- CHENG, J. Q., RUGGERI, B., KLEIN, W. M., SONODA, G., ALTOMARE, D. A., WATSON, D. K. & TESTA, J. R. (1996). Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3636-3641.
- CHOIE, D. D. & RICHTER, G. W. (1978). G2 sub-population in mouse liver induced into mitosis by lead acetate. *Cell Tissue Kinet* 11, 235-239.
- CHUANG, S. M., LIOU, G. Y. & YANG, J. L. (2000). Activation of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases by chromium(VI) is mediated through oxidative stress but does not affect cytotoxicity. *Carcinogenesis* 21, 1491-1500.
- CLARK, C. S., BORNSCHEIN, R., SUCCOP, P., HEE, S. Q., HAMMOND, P. B. & PEACE, B. (1985). Pathways to elevated blood lead and their importance in control strategy development. In *Int. Conf. Heavy Metals Environ.*, vol. 1. ed. LINDBERG, S. E. & HUTCHINSON, T. C., pp. 159-161, Edinburgh.
- CLARK, C. S., BORNSCHEIN, R. L., SUCCOP, P., QUE HEE, S. S., HAMMOND, P. B. & PEACE, B. (1985). Condition and type of housing as an indicator of

- potential environmental lead exposure and pediatric blood lead levels. *Environ Res* 38, 46-53.
- CLERK, A., FULLER, S. J., MICHAEL, A. & SUGDEN, P. H. (1998). Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *J Biol Chem* 273, 7228-7234.
- COOKMAN, G. R., HEMMENS, S. E., KEANE, G. J., KING, W. B. & REGAN, C. M. (1988). Chronic low level lead exposure precociously induces rat glial development in vitro and in vivo. *Neurosci Lett* 86, 33-37.
- CORDOVA, F. M. (2002). Vias de sinalização celular no hipocampo envolvidas na resposta ao estresse produzida por Chumbo e cádmio. In *Departamento de Bioquímica - CCB*, pp. 99. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- CORDOVA, F. M., RODRIGUES, A. L., GIACOMELLI, M. B., OLIVEIRA, C. S., POSSER, T., DUNKLEY, P. R. & LEAL, R. B. (2004). Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res* 998, 65-72.
- CORREA, M., ROIG-NAVARRO, A. F. & ARAGON, C. M. (2004). Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. *Life Sci* 74, 2009-2021.
- CORY-SLECHTA, D. A., GARCIA-OSUNA, M. & GREENAMYRE, J. T. (1997). Lead-induced changes in NMDA receptor complex binding: correlations with learning accuracy and with sensitivity to learning impairments caused by MK-801 and NMDA administration. *Behav Brain Res* 85, 161-174.
- CREMIN JR.J.D., SMITH D.R. (2002). In vitro vs in vivo Pb effects on brain protein kinase C activity. *Environmental. Res.* 90, 191-199.
- DAVIS, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
- DENG, W., MCKINNON, R. D. & PORETZ, R. D. (2001). Lead exposure delays the differentiation of oligodendroglial progenitors in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 174, 235-244.
- DERIJARD, B., RAINGEAUD, J., BARRETT, T., WU, I. H., HAN, J., ULEVITCH, R. J. & DAVIS, R. J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682-685.
- DHODDA, V. K., SAILOR, K. A., BOWEN, K. K. & VEMUGANTI, R. (2004). Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis. *J Neurochem* 89, 73-89.

- DOLMETSCH, R.E., PAJVANI, U., K. FIFE, K., J.M. SPOTTS, J.M. & GREENBERG, M.E. (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway, *Science* 294, 333-339.
- DONG, Z. & BODE, A. M. (2003). Dialogue between ERKs and JNKs: friendly or antagonistic? *Mol Interv* 3, 306-308.
- DOWNWARD, J. (2004). PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 15, 177-182.
- DUMAS, P., GUELDRY, D., LOIREAU, A., CHOMARD, P., BUTHIEAU, A. M. & AUTISSIER, N. (1985). [Effects of lead poisoning on properties of brain mitochondria in young rats]. *C R Seances Soc Biol Fil* 179, 175-183.
- ENGELMAN, J. A., BERG, A. H., LEWIS, R. Y., LIN, A., LISANTI, M. P. & SCHERER, P. E. (1999). Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem* 274, 35630-35638.
- ENGELMAN, J. A., LISANTI, M. P. & SCHERER, P. E. (1998). Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem* 273, 32111-32120.
- FAROOQ, A. & ZHOU, M. M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 16, 769-779.
- FREEMAN, M. L., SIERRA-RIVERA, E., VOORHEES, G. J., EISERT, D. R. & MEREDITH, M. J. (1993). Synthesis of hsp-70 is enhanced in glutathione-depleted Hep G2 cells. *Radiat Res* 135, 387-393.
- FUCHS, S. Y., ADLER, V., PINCUS, M. R. & RONAI, Z. (1998). MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10541-10546.
- FUJIWARA, Y., KAJI, T., YAMAMOTO, C., SAKAMOTO, M. & KOZUKA, H. (1995). Stimulatory effect of lead on the proliferation of cultured vascular smooth-muscle cells. *Toxicology* 98, 105-110.
- GALAN, A., GARCIA-BERMEJO, M. L., TROYANO, A., VILABOA, N. E., DE BLAS, E., KAZANIETZ, M. G. & ALLER, P. (2000). Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J Biol Chem* 275, 11418-11424.
- GALAN, A., TROYANO, A., VILABOA, N. E., FERNANDEZ, C., DE BLAS, E. & ALLER, P. (2001). Modulation of the stress response during apoptosis and necrosis induction in cadmium-treated U-937 human promonocytic cells. *Biochim Biophys Acta* 1538, 38-46.

- GARBER, M. M. & HEIMAN, A. S. (2002). The in vitro effects of Pb acetate on NO production by C6 glial cells. *Toxicol In Vitro* 16, 499-508.
- GIDLOW, D. A. (2004). Lead toxicity. *Occup Med (Lond)* 54, 76-81.
- GILBERT, M. E., MACK, C. M. & LASLEY, S. M. (1996). Chronic developmental lead exposure increases the threshold for long-term potentiation in rat dentate gyrus in vivo. *Brain Res* 736, 118-124.
- GORMAN, A. M., HEAVEY, B., CREAGH, E., COTTER, T. G. & SAMALI, A. (1999). Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *FEBS Lett* 445, 98-102.
- GOYER, R. A. (1971). Lead toxicity: a problem in environmental pathology. *Am J Pathol* 64, 167-182.
- GREENGARD, P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294, 1024-1030.
- GUILARTE, T. R. & MCGLOTHAN, J. L. (2003). Selective decrease in NR1 subunit splice variant mRNA in the hippocampus of Pb²⁺-exposed rats: implications for synaptic targeting and cell surface expression of NMDAR complexes. *Brain Res Mol Brain Res* 113, 37-43.
- GUPTA, S., BARRETT, T., WHITMARSH, A. J., CAVANAGH, J., SLUSS, H. K., DERIJARD, B. & DAVIS, R. J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* 15, 2760-2770.
- GUPTA, S., CAMPBELL, D., DERIJARD, B. & DAVIS, R. J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267, 389-393.
- HADDAD, J.J. (2004). Mitogen-activated protein kinases and the evolution of Alzheimer's: a revolutionary neurogenetic axis for therapeutic intervention? *Progress in Neurobiology* 73, 359-377
- HAMER, D. H. (1986). Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 55, 913-951.
- HANADA, M., FENG, J. & HEMMINGS, B. A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1697, 3-16.
- HELMBRECHT, K., ZEISE, E. & RENSING, L. (2000). Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 33, 341-365.
- HOLTZMAN, D., OLSON, J. E., DEVRIES, C. & BENSCH, K. (1987). Lead toxicity in primary cultured cerebral astrocytes and cerebellar granular neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 89, 211-225.

- HOLTZMAN, D., SHEN HSU, J. & MORTELL, P. (1978). In vitro effects of inorganic lead on isolated rat brain mitochondrial respiration. *Neurochem Res* 3, 195-206.
- HUANG, F. & SCHNEIDER, J. S. (2004). Effects of lead exposure on proliferation and differentiation of neural stem cells derived from different regions of embryonic rat brain. *Neurotoxicology* 25, 1001-1012.
- HUNG, J. J., CHENG, T. J., CHANG, M. D., CHEN, K. D., HUANG, H. L. & LAI, Y. K. (1998b). Involvement of heat shock elements and basal transcription elements in the differential induction of the 70-kDa heat shock protein and its cognate by cadmium chloride in 9L rat brain tumor cells. *J Cell Biochem* 71, 21-35.
- HUNG, J. J., CHENG, T. J., LAI, Y. K. & CHANG, M. D. (1998a). Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinases confers cadmium-induced HSP70 expression in 9L rat brain tumor cells. *J Biol Chem* 273, 31924-31931.
- HUNTER, T. (2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100, 113-127.
- IARC. (1987). Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. In *IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to Human*, vol. 1, pp. 230-232. International Agency For Research on Cancer, Lyon.
- IRVING, E. A., BARONE, F. C., REITH, A. D., HADINGHAM, S. J. & PARSONS, A. A. (2000). Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 77, 65-75.
- IRYO, Y., MATSUOKA, M., WISPRIYONO, B., SUGIURA, T. & IGISU, H. (2000). Involvement of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway in the induction of apoptosis by cadmium chloride in CCRF-CEM cells. *Biochem Pharmacol* 60, 1875-1882.
- ITO, H., OKAMOTO, K. & KATO, K. (1998). Enhancement of expression of stress proteins by agents that lower the levels of glutathione in cells. *Biochim Biophys Acta* 1397, 223-230.
- IWASAKI, S., IGUCHI, M., WATANABE, K., HOSHINO, R., TSUJIMOTO, M. & KOHNO, M. (1999). Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 274, 26503-26510.
- JARUP, L., BERGLUND, M., ELINDER, C. G., NORDBERG, G. & VAHTER, M. (1998). Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health* 24 Suppl 1, 1-51.
- JETT, D. A., KUHLMANN, A. C., FARMER, S. J. & GUILARTE, T. R. (1997). Age-dependent effects of developmental lead exposure on performance in the Morris water maze. *Pharmacol Biochem Behav* 57, 271-279.

- JOHNSON, G. L. & LAPADAT, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- KAWASAKI, H., MOROOKA, T., SHIMOHAMA, S., KIMURA, J., HIRANO, T., GOTOH, Y. & NISHIDA, E. (1997). Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 272, 18518-18521.
- KERN, M. & AUDESIRK, G. (1995). Inorganic lead may inhibit neurite development in cultured rat hippocampal neurons through hyperphosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol* 134, 111-123.
- KERN, M. & AUDESIRK, G. (2000). Estimulatory and inhibitory effects of inorganic lead on calcineurin. *Toxicol.*150, 171-178.
- KERN, M., WISNIEWSKI, M., CABELL, L. & AUDESIRK, G. (2000). Inorganic lead and calcium interact positively in activation of calmodulin. *Neurotoxicology* 21, 353-363.
- KEYSE, S. M. (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 12, 186-192.
- KIM, J. & SHARMA, R. P. (2004). Calcium-mediated activation of c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and apoptosis in response to cadmium in murine macrophages. *Toxicol Sci* 81, 518-527.
- KIM, Y., SEGER, R., SURESH BABU, C. V., HWANG, S. Y. & YOO, Y. S. (2004). A positive role of the PI3-K/Akt signaling pathway in PC12 cell differentiation. *Mol Cells* 18, 353-359.
- KIM, Y. H., KIM, E. Y., GWAG, B. J., SOHN, S. & KOH, J. Y. (1999). Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience* 89, 175-182.
- KISS, T. & OSIPENKO, O. N. (1994). Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacol Rev* 46, 245-267.
- KO, H. W., HAN, K. S., KIM, E. Y., RYU, B. R., YOON, W. J., JUNG, Y. K., KIM, S. U. & GWAG, B. J. (2000). Synergetic activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3-like proteases for execution of calyculin A-induced apoptosis but not N-methyl-d-aspartate-induced necrosis in mouse cortical neurons. *J Neurochem* 74, 2455-2461.
- KOLLER, K., BROWN, T., SPURGEON, A. & LEVY, L. (2004). Recent developments in low-level lead exposure and intellectual impairment in children. *Environ Health Perspect* 112, 987-994.
- KOŁODZIEJCZYK, S. M., WANG, L., BALAZSI, K., DEREPIENTIGNY, Y., KOTHARY, R. & MEGENEY, L. A. (1999). MEF2 is upregulated during

- cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr Biol* 9, 1203-1206.
- KONDOH, M., TASAKI, E., ARARAGI, S., TAKIGUCHI, M., HIGASHIMOTO, M., WATANABE, Y. & SATO, M. (2002). Requirement of caspase and p38MAPK activation in zinc-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Eur J Biochem* 269, 6204-6211.
- KUAN, C. Y., YANG, D. D., SAMANTA ROY, D. R., DAVIS, R. J., RAKIC, P. & FLAVELL, R. A. (1999). The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22, 667-676.
- LATERRA, J., BRESSLER, J. P., INDURTI, R. R., BELLONI-OLIVI, L. & GOLDSTEIN, G. W. (1992). Inhibition of astroglia-induced endothelial differentiation by inorganic lead: a role for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10748-10752.
- LAWLOR, M. A. & ALESSI, D. R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 114, 2903-2910.
- LEAL, R. B., CORDOVA, F. M., HERD, L., BOBROVSKAYA, L. & DUNKLEY, P. R. (2002). Lead-stimulated p38MAPK-dependent HSP27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol* 178, 44-51.
- LEE, S. A., PARK, J. K., KANG, E. K., BAE, H. R., BAE, K. W. & PARK, H. T. (2000). Calmodulin-dependent activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases contributes to c-fos expression by calcium in PC12 cells: modulation by nitric oxide. *Brain Res Mol Brain Res* 75, 16-24.
- LEE, Y. J. & CORRY, P. M. (1998). Metabolic oxidative stress-induced HSP70 gene expression is mediated through SAPK pathway. Role of Bcl-2 and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem* 273, 29857-29863.
- LEE, Y. J. & CORRY, P. M. (1998a). Metabolic oxidative stress-induced HSP70 gene expression is mediated through SAPK pathway. Role of Bcl-2 and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem* 273, 29857-29863.
- LEGARE, M. E., BARHOUMI, R., HEBERT, E., BRATTON, G. R., BURGHARDT, R. C. & TIFFANY-CASTIGLIONI, E. (1998). Analysis of Pb²⁺ entry into cultured astroglia. *Toxicol Sci* 46, 90-100.
- LEONARD, S. S., HARRIS, G. K. & SHI, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 37, 1921-1942.
- LIN, A. (2003b). Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays* 25, 17-24.
- LIN, Y. W., CHUANG, S. M. & YANG, J. L. (2003a). Persistent activation of ERK1/2 by lead acetate increases nucleotide excision repair synthesis and confers anti-cytotoxicity and anti-mutagenicity. *Carcinogenesis* 24, 53-61.

- LINDAHL, L. S., BIRD, L., LEGARE, M. E., MIKESKA, G., BRATTON, G. R. & TIFFANY-CASTIGLIONI, E. (1999). Differential ability of astroglia and neuronal cells to accumulate lead: dependence on cell type and on degree of differentiation. *Toxicol Sci* 50, 236-243.
- LINDQUIST, S. & CRAIG, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22, 631-677.
- LIU, J. Y., LIN, J. K., LIU, C. C., CHEN, W. K., LIU, C. P., WANG, C. J., YEN, C. C. & HSIEH, Y. S. (1997a). Augmentation of protein kinase C activity and liver cell proliferation in lead nitrate-treated rats. *Biochem Mol Biol Int* 43, 355-364.
- LIU, L., WONG, T. P., POZZA, M. F., LINGENHOEHL, K., WANG, Y., SHENG, M., AUBERSON, Y. P. & WANG, Y. T. (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304, 1021-1024.
- LIU, M. Y., HSIEH, W. C. & YANG, B. C. (2000). In vitro aberrant gene expression as the indicator of lead-induced neurotoxicity in U-373MG cells. *Toxicology* 147, 59-64.
- LIU, Y., PETERSON, D. A., KIMURA, H. & SCHUBERT, D. (1997b). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69, 581-593.
- LONG, G. J., ROSEN, J. F. & SCHANNE, F. A. (1994). Lead activation of protein kinase C from rat brain. Determination of free calcium, lead, and zinc by ¹⁹F NMR. *J Biol Chem* 269, 834-837.
- LU, H., GUIZZETTI, M. & COSTA, L. G. (2001). Inorganic lead stimulates DNA synthesis in human astrocytoma cells: role of protein kinase Calpha. *J Neurochem* 78, 590-599.
- LU, H., GUIZZETTI, M. & COSTA, L. G. (2002). Inorganic lead activates the mitogen-activated protein kinase kinase-mitogen-activated protein kinase-p90(RSK) signaling pathway in human astrocytoma cells via a protein kinase C-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 818-823.
- MAHER, P. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for fibroblast growth factor-2-stimulated cell proliferation but not differentiation. *J Biol Chem* 274, 17491-17498.
- MARKOVAC, J. & GOLDSTEIN, G. W. (1988). Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* 334, 71-73.
- MARTIN-BLANCO, E. (2000). p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *Bioessays* 22, 637-645.

- MATSUOKA, M. & IGISU, H. (2001). Cadmium induces phosphorylation of p53 at serine 15 in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 1120-1125.
- MAZZOLINI, M., TRAVERSO, S. & MARCHETTI, C. (2001). Multiple pathways of Pb(2+) permeation in rat cerebellar granule neurones. *J Neurochem* 79, 407-416.
- MIELKE, K. & HERDEGEN, T. (2000). JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol* 61, 45-60.
- MINDEN, A. & KARIN, M. (1997). Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta* 1333, F85-104.
- MISRA, U. K., GAWDI, G., AKABANI, G. & PIZZO, S. V. (2002). Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cell Signal* 14, 327-340.
- MOROOKA, T. & NISHIDA, E. (1998). Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem* 273, 24285-24288.
- MOROZUMI, M., CHOW, T. J. & PATTERSON, C. (1969). Chemical concentrations of pollutant lead aerosols, terrestrial dusts, and sea salts in Greenland and Antarctic snow strata. *Geochim Cosmochim Acta* 33, 1247- 1254.
- MOURA NETO, V., MALLAT, M., JEANTET, C. & PROCHIANTZ, A. (1983). Microheterogeneity of tubulin proteins in neuronal and glial cells from the mouse brain in culture. *Embo J* 2, 1243-1248.
- MURAKAMI, K., FENG, G. & CHEN, S. G. (1993). Inhibition of brain protein kinase C subtypes by lead. *J Pharmacol Exp Ther* 264, 757-761.
- NAKATANI, K., THOMPSON, D. A., BARTHEL, A., SAKAUE, H., LIU, W., WEIGEL, R. J. & ROTH, R. A. (1999). Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem* 274, 21528-21532.
- NEBREDA, A. R. & PORRAS, A. (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 25, 257-260.
- NEEDLEMAN, H. L. (2000). The removal of lead from gasoline: historical and personal reflections. *Environ Res* 84, 20-35.
- NERI, L. M., BORGATTI, P., CAPITANI, S. & MARTELLI, A. M. (2002). The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim Biophys Acta* 1584, 73-80.
- NESTLER, E. J. & GREENGARD, P. (1999). Serine and Threonine Phosphorylation. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, pp. 472-495. Raven, Philadelphia.

- NEUHOFER, W., MULLER, E., BURGER-KENTISCHER, A., FRAEK, M. L., THURAU, K. & BECK, F. X. (1999). Inhibition of NaCl-induced heat shock protein 72 expression renders MDCK cells susceptible to high urea concentrations. *Pflugers Arch* 437, 611-616.
- NICHOLSON, K. M. & ANDERSON, N. G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14, 381-395.
- NIHEI, M.K. & GUILARTE, T.R. (2001). Molecular changes in glutamatergic synapses induced by Pb²⁺: association with deficits of LTP and spatial learning, *Neurotoxicology* 22, 635-643.
- O'GORMAN, D. M. & COTTER, T. G. (2001). Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways. *Leukemia* 15, 21-34.
- OPANASHUK, L. A. & FINKELSTEIN, J. N. (1995a). Induction of newly synthesized proteins in astroglial cells exposed to lead. *Toxicol Appl Pharmacol* 131, 21-30.
- OPANASHUK, L. A. & FINKELSTEIN, J. N. (1995b). Relationship of lead-induced proteins to stress response proteins in astroglial cells. *J Neurosci Res* 42, 623-632.
- OWEN, B. D. & FLEGAL, A. R. (1998). Blood lead concentrations in marine mammals validate estimates of 10(2)- to 10(3)-fold increase in human blood lead concentrations. *Environ Res* 78, 134-139.
- PARK, J., KIM, I., OH, Y. J., LEE, K., HAN, P. L. & CHOI, E. J. (1997). Activation of c-Jun N-terminal kinase antagonizes an anti-apoptotic action of Bcl-2. *J Biol Chem* 272, 16725-16728.
- PATTERSON, C. C. (1953). The Isotopic Composition of Meteoritic, Basaltic and Oceanic Leads, and the Age of the Earth. In *Subcommittee on Nuclear Processes in Geological Settings.*, pp. 36-40. National Academy of Sciences/National Research Council, Washington, DC.
- PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS GIBSON, T., XU, B. E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K. & COBB, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- PECHAN, P. M. (1991). Heat shock proteins and cell proliferation. *FEBS Lett* 280, 1-4.
- PELAIA, G., CUDA, G., VATRELLA, A., GALLELLI, L., CARAGLIA, M., MARRA, M., ABBRUZZESE, A., CAPUTI, M., MASELLI, R., COSTANZO, F. S. & MARSICO, S. A. (2005). Mitogen-activated protein kinases and asthma. *J Cell Physiol* 202, 642-653.
- PETERSON, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 346-356.

- PETIT, T. L. & LEBOUTILLIER, J. C. (1979). Effects of lead exposure during development on neocortical dendritic and synaptic structure. *Exp Neurol* 64, 482-492.
- POBLANO, A., ROTHENBERG, S. J., SCHNAAS, L., ELIAS, Y. & CRUZ, M. L. (2001). Spatial distribution of EEG theta activity as a function of lifetime lead exposure in 9-year-old children. *Neurotoxicology* 22, 439-446.
- PORTO, M. L. (1989). . Environmental evaluation of Tubarão River, SC, through analysis of heavy metals in water, sediment and plants. UFRGS.
- QIAN, Y., FALAHATPISHEH, M. H., ZHENG, Y., RAMOS, K. S. & TIFFANY-CASTIGLIONI, E. (2001). Induction of 78 kD glucose-regulated protein (GRP78) expression and redox-regulated transcription factor activity by lead and mercury in C6 rat glioma cells. *Neurotox Res* 3, 581-589.
- QIAN, Y., HARRIS, E. D., ZHENG, Y. & TIFFANY-CASTIGLIONI, E. (2000). Lead targets GRP78, a molecular chaperone, in C6 rat glioma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 163, 260-266.
- RAJANNA, B., CHETTY, C. S., RAJANNA, S., HALL, E., FAIL, S. & YALLAPRAGADA, P. R. (1995). Modulation of protein kinase C by heavy metals. *Toxicol Lett* 81, 197-203.
- RAMESH, G. T., MANNA, S. K., AGGARWAL, B. B. & JADHAV, A. L. (1999). Lead activates nuclear transcription factor-kappaB, activator protein-1, and amino-terminal c-Jun kinase in pheochromocytoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 155, 280-286.
- RAZANI-BOROUJERDI, S., EDWARDS, B. & SOPORI, M. L. (1999). Lead stimulates lymphocyte proliferation through enhanced T cell-B cell interaction. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 714-719.
- REYNOLDS, C. H., UTTON, M. A., GIBB, G. M., YATES, A. & ANDERTON, B. H. (1997). Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem* 68, 1736-1744.
- RITOSSA, F. M. (1962). A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571-573.
- ROBINSON, M. J. & COBB, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9, 180-186.
- ROCHA, J. B., ROCHA, L. K., EMANUELLI, T. & PEREIRA, M. E. (2001). Effect of mercuric chloride and lead acetate treatment during the second stage of rapid post-natal brain growth on the behavioral response to chlorpromazine and on delta-ALA-D activity in weaning rats. *Toxicol Lett* 125, 143-150.

- RODRIGUES, A. L., REGNER, A., RUBIN, M. A. & SOUZA, D. O. (1999). Effects of lead on adenylate cyclase activity in rat cerebral cortex. *Neurochem Res* 24, 1037-1042.
- RODRIGUES, A. L., ROCHA, J. B., MELLO, C. F. & SOUZA, D. O. (1996). Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol Toxicol* 79, 150-156.
- SAMET, J. M., GRAVES, L. M., QUAY, J., DAILEY, L. A., DEVLIN, R. B., GHIO, A. J., WU, W., BROMBERG, P. A. & REED, W. (1998). Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *Am J Physiol* 275, L551-558.
- SAMET, J.M., SILBAJORIS R., WU W., GRAVES L.M. (1999). Tyrosine phosphatases as targets in metal-induced signaling in human airway epithelial cells *Am J Respi Cell Mol. Biol.* 21, 357-364.
- SANDHIR, R., JULKA, D. & GILL, K. D. (1994). Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol Toxicol* 74, 66-71.
- SCHLESSINGER, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- SCHNEIDER, J. S., HUANG, F. N. & VEMURI, M. C. (2003). Effects of low-level lead exposure on cell survival and neurite length in primary mesencephalic cultures. *Neurotoxicol Teratol* 25, 555-559.
- SCHOENIGER, L. O., ANDREONI, K. A., OTT, G. R., RISBY, T. H., BULKLEY, G. B., UDELSMAN, R., BURDICK, J. F. & BUCHMAN, T. G. (1994). Induction of heat-shock gene expression in postischemic pig liver depends on superoxide generation. *Gastroenterology* 106, 177-184.
- SELVIN-TESTA, A., LOIDL, C. F., LOPEZ-COSTA, J. J., LOPEZ, E. M. & PECCI-SAAVEDRA, J. (1994). Chronic lead exposure induces astrogliosis in hippocampus and cerebellum. *Neurotoxicology* 15, 389-401.
- SHARIFI, A. M., BANIASADI, S., JORJANI, M., RAHIMI, F. & BAKHSHAYESH, M. (2002). Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo. *Neurosci Lett* 329, 45-48.
- SHEIKH-HAMAD, D., DI MARI, J., SUKI, W. N., SAFIRSTEIN, R., WATTS, B. A., 3RD & ROUSE, D. (1998). p38 kinase activity is essential for osmotic induction of mRNAs for HSP70 and transporter for organic solute betaine in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 273, 1832-1837.
- SHIN, M. H., JANG, J. H. & SURH, Y. J. (2004). Potential roles of NF-kappaB and ERK1/2 in cytoprotection against oxidative cell death induced by tetrahydropapaveroline. *Free Radic Biol Med* 36, 1185-1194.

- SILBERGELD, E. K. (1997). Preventing lead poisoning in children. *Annu Rev Public Health* 18, 187-210.
- SOUZA, K., MADDOCK, D. A., ZHANG, Q., CHEN, J., CHIU, C., MEHTA, S. & WAN, Y. (2001). Arsenite activation of P13K/AKT cell survival pathway is mediated by p38 in cultured human keratinocytes. *Mol Med* 7, 767-772.
- SREEDHAR, A. S. & CSERMELY, P. (2004). Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 101, 227-257.
- STARK, M., WOLFF, J. E. & KORBMACHER, A. (1992). Modulation of glial cell differentiation by exposure to lead and cadmium. *Neurotoxicol Teratol* 14, 247-252.
- STOHS, S. J., BAGCHI, D., HASSOUN, E. & BAGCHI, M. (2001). Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20, 77-88.
- STRUZYNSKA, L., BUBKO, I., WALSKI, M. & RAFALOWSKA, U. (2001). Astroglial reaction during the early phase of acute lead toxicity in the adult rat brain. *Toxicology* 165, 121-131.
- SUN, X., TIAN, X., TOMSIG, J. L. & SUSZKIW, J. B. (1999). Analysis of differential effects of Pb²⁺ on protein kinase C isozymes. *Toxicol Appl Pharmacol* 156, 40-45.
- SUZANNE, M., IRIE, K., GLISE, B., AGNES, F., MORI, E., MATSUMOTO, K. & NOSELLI, S. (1999). The Drosophila p38 MAPK pathway is required during oogenesis for egg asymmetric development. *Genes Dev* 13, 1464-1474.
- SWEATT, JD (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14, 1-7.
- TANABE, K., OKUYA, S., TANIZAWA, Y., MATSUTANI, A. & OKA, Y. (1997). Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 241, 765-768.
- TANG, H. W., YAN, H. L., HU, X. H., LIANG, Y. X. & SHEN, X. Y. (1996). Lead cytotoxicity in primary cultured rat astrocytes and Schwann cells. *J Appl Toxicol* 16, 187-196.
- THOMAS, G. M. & HUGANIR, R. L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5, 173-183.
- TIBBLES, L. A. & WOODGETT, J. R. (1999). The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* 55, 1230-1254.

- TIFFANY-CASTIGLION, E. & QIAN, Y. (2001). Astroglia as metal depots: molecular mechanisms for metal accumulation, storage and release. *Neurotoxicology* 22, 577-592.
- TIFFANY-CASTIGLIONI, E. (1993). Cell culture models for lead toxicity in neuronal and glial cells. *Neurotoxicology* 14, 513-536.
- TIFFANY-CASTIGLIONI, E., GARCIA, D. M., WU, J. N., ZMUDZKI, J. & BRATTON, G. R. (1988). Effects of lead on viability and intracellular metal content of C6 rat glioma cells. *J Toxicol Environ Health* 23, 267-279.
- TIFFANY-CASTIGLIONI, E., SIERRA, E. M., WU, J. N. & ROWLES, T. K. (1989). Lead toxicity in neuroglia. *Neurotoxicology* 10, 417-443.
- TIFFANY-CASTIGLIONI, E., ZMUDZKI, J. & BRATTON, G. R. (1986). Cellular targets of lead neurotoxicity: in vitro models. *Toxicology* 42, 303-315.
- TONNER, L. E., KATZ, D. I. & HEIMAN, A. S. (1997). The acute effect of lead acetate on glucocorticoid receptor binding in C6 glioma cells. *Toxicology* 116, 109-122.
- TOSCANO, C. D., HASHEMZADEH-GARGARI, H., MCGLOTHAN, J. L. & GUILARTE, T. R. (2002). Developmental Pb²⁺ exposure alters NMDAR subtypes and reduces CREB phosphorylation in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 139, 217-226.
- TRENTIN, A. G. & ALVAREZ-SILVA, M. (1998). Thyroid hormone regulates protein expression in C6 glioma cells. *Braz J Med Biol Res* 31, 1281-1284.
- TRENTIN, A. G., ROSENTHAL, D. & MAURA NETO, V. (1995). Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: factor secretion, cell differentiation, and proliferation. *J Neurosci Res* 41, 409-417.
- TROTTER, R. T., 2ND. (1990). The cultural parameters of lead poisoning: a medical anthropologist's view of intervention in environmental lead exposure. *Environ Health Perspect* 89, 79-84.
- VALENTIM, L. M., GEYER, A. B., TAVARES, A., CIMAROSTI, H., WORM, P. V., RODNIGHT, R., NETTO, C. A. & SALBEGO, C. G. (2001). Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunoccontent and phosphorylation in rat hippocampus. *Neuroscience* 107, 43-49.
- VALENTIM, L. M., RODNIGHT, R., GEYER, A. B., HORN, A. P., TAVARES, A., CIMAROSTI, H., NETTO, C. A. & SALBEGO, C. G. (2003). Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118, 379-386.

- VIG, P. J. & NATH, R. (1991). In vivo effects of cadmium on calmodulin and calmodulin regulated enzymes in rat brain. *Biochem Int* 23, 927-934.
- WANG, Y. Z. & BONNER, J. C. (2000). Mechanism of extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1 and ERK-2 activation by vanadium pentoxide in rat pulmonary myofibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22, 590-596.
- WHO. (1989). Environmental health criteria 85: Lead - Environmental Aspects. World Health Organization, Geneva.
- WHO. (1995). Environmental health criteria 165: Inorganic Lead. World Health Organization, Geneva.
- WIELGUS-SERAFINSKA, E., ZAWADZKA, A. & FALKUS, B. (1980). The effect of lead acetate on rat liver mitochondria. *Acta Physiol Pol* 31, 659-668.
- WILSON, M. A., JOHNSTON, M. V., GOLDSTEIN, G. W. & BLUE, M. E. (2000). Neonatal lead exposure impairs development of rodent barrel field cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5540-5545.
- WISDOM, R., JOHNSON, R. S. & MOORE, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *Embo J* 18, 188-197.
- XIE, Z., SMITH, C. J. & VAN ELDIK, L. J. (2004). Activated glia induce neuron death via MAP kinase signaling pathways involving JNK and p38. *Glia* 45, 170-179.
- YANG, S. H., SHARROCKS, A. D. & WHITMARSH, A. J. (2003). Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320, 3-21.
- YASUDA, J., WHITMARSH, A. J., CAVANAGH, J., SHARMA, M. & DAVIS, R. J. (1999). The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 19, 7245-7254.
- ZAWIA, N. H. & HARRY, G. J. (1996). Developmental exposure to lead interferes with glial and neuronal differential gene expression in the rat cerebellum. *Toxicol Appl Pharmacol* 138, 43-47.
- ZECHNER, D., CRAIG, R., HANFORD, D. S., MCDONOUGH, P. M., SABBADINI, R. A. & GLEMBOTSKI, C. C. (1998). MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 273, 8232-8239.
- ZHANG, Q., BRATTON, G. R., AGARWAL, R. K., CALISE, D., KUGEL, G., WAN, Y. & KUMAR, A. M. (2003). Lead-induced cell signaling cascades in GT1-7 cells. *Brain Res Bull* 61, 207-217.
- ZHANG, Z., GAO, N., HE, H., HUANG, C., LUO, J. & SHI, X. (2004). Vanadate activated Akt and promoted S phase entry. *Mol Cell Biochem* 255, 227-237.

ZURICH, M. G., ESKEES, C., HONEGGER, P., BERODE, M. & MONNET-TSCHUDI, F. (2002). Maturation-dependent neurotoxicity of lead acetate in vitro: implication of glial reactions. *J Neurosci Res* 70, 108-116.

ZURICH, M. G., MONNET-TSCHUDI, F., BERODE, M. & HONEGGER, P. (1998). Lead acetate toxicity in vitro: Dependence on the cell composition of the cultures. *Toxicology in vitro* 12, 191-196.