



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**AÇÕES CELULARES E MOLECULARES DO  
CÁDMIO SOBRE O HIPOCAMPO**

**ANA PAULA RIGON**

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2008

**ANA PAULA RIGON**

**AÇÕES CELULARES E MOLECULARES DO CÁDMIO  
SOBRE O HIPOCAMPO**

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 2008**

**“AÇÕES CELULARES E MOLECULARES DO CÁDMIO SOBRE O HIPOCAMPO”.**

**ANA PAULA RIGON**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS**

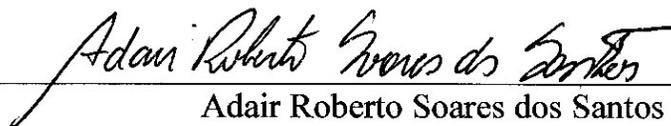
na área de Neurobiologia Celular e Molecular Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientador



Rodrigo Bainy Leal

Coordenador do Curso



Adair Roberto Soares dos Santos

Banca Examinadora



Rodrigo Bainy Leal (Presidente)



Carlos Alberto Saraiva Gonçalves



Carla Inês Tasca

## **AGRADECIMENTOS**

- ✓ Agradeço a Deus pela força e oportunidade de concluir mais esta etapa de minha vida;
- ✓ Aos meus Pais, pelo apoio e amor incondicional que sempre tive por parte deles;
- ✓ Ao meu Orientador Rodrigo, por toda paciência, compreensão e principalmente orientação;
- ✓ Aos Professores Carla Inês Tasca, Nelson H. Gabilan e Marcelo Farina pelos empréstimos de equipamentos e alguns materiais e pelas dicas oferecidas;
- ✓ Às meninas do Laboratório de Neuroquímica III (Cami, Thaís, Ana, Daí e Ilza) pela convivência e amizade;
- ✓ Ao Nivaldo, secretário da Pós-graduação em Neurociência, pela sua dedicação aos alunos;
- ✓ Às meninas do Laboratório do Hospital Marieta Konder Bornhausen, por me receberem de braços abertos e principalmente a Bioquímica Glauce pelas “trocas” de plantões necessárias para o encerramento de mais esta etapa;
- ✓ Aos meus amigos especiais, Bê, Carol e Vitor, pelo companheirismo, convivência e por estarem sempre dispostos a me ajudar em todos os momentos;
- ✓ E a todos que de certo modo contribuíram para a realização deste trabalho;

*“O livro é um mestre que fala  
mas não responde!”*

**Platão**

## RESUMO

O metal divalente cádmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) é um poluente ambiental que causa intensa toxicidade em vários sistemas incluindo o sistema nervoso central (SNC). Diversos estudos mostram que o SNC em desenvolvimento é mais vulnerável a ação de agentes tóxicos e que a exposição a metais em fase precoce do desenvolvimento do SNC pode predispor ao aparecimento de processos neurodegenerativos. Em modelos de culturas celulares o  $\text{Cd}^{2+}$  pode causar citotoxicidade e modular diversas proteínas cinases. O presente trabalho teve por objetivo principal investigar a ação neurotóxica aguda do  $\text{Cd}^{2+}$  e sua capacidade de modular as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e AKT, que são enzimas envolvidas na regulação de processos de proliferação, diferenciação, morte celular e neuroplasticidade. Além disso, foi avaliado um possível efeito neuroprotetor da glutathiona (GSH) e sua análoga permeável, a glutathiona monoetilester (GSH-me). Fatias hipocampais foram incubadas (1-3 h) com  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ). A atividade de MAPKs (ERK1/2; JNK e  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ ) e da AKT foi determinada através de western blotting. A viabilidade celular foi determinada pela análise da redução do MTT, liberação da lactato desidrogenase (LDH) e incorporação de iodeto de propídio (IP). Os resultados mostraram que o  $\text{Cd}^{2+}$  (3 h) promoveu um aumento na fosforilação de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  em todas as doses avaliadas (5-200  $\mu\text{M}$ ) sem alterar a fosforilação de JNK e de AKT. Nas concentrações mais altas (100-200  $\mu\text{M}$ ) o metal também estimulou a fosforilação de ERK1/2. A inibição da  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  pelo SB203580 agravou a neurotoxicidade mediada pelo  $\text{Cd}^{2+}$ . Por outro lado, a inibição da via de ERK1/2 pelo PD98059 não alterou a neurotoxicidade do  $\text{Cd}^{2+}$ . O  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ; 3 h) reduziu a

viabilidade celular medida pelo MTT sem produzir lesões sobre a membrana celular, tendo em vista que a liberação de LDH e a incorporação de IP não foi modificada. A GSH foi capaz de reverter parcialmente o efeito citotóxico do  $\text{Cd}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$ ), entretanto a GSH-me, mesmo sendo capaz de aumentar o conteúdo de GSH intracelular cerca de 3 vezes, não minimizou a citotoxicidade do  $\text{Cd}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$ ). Os resultados demonstraram uma ação neurotóxica aguda do  $\text{Cd}^{2+}$  sobre o hipocampo imaturo com queda de viabilidade e uma alteração na atividade de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  e ERK1/2, vias de fundamental importância no desenvolvimento e neuroplasticidade hipocampal. Além disso, os resultados sugerem que neste modelo  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  participa de uma sinalização que protege as células da neurotoxicidade induzida pelo  $\text{Cd}^{2+}$ . Por fim o estudo sugere uma ação neuroprotetora (possivelmente extracelular) de GSH frente ao  $\text{Cd}^{2+}$ .

## ABSTRACT

The developing of the brain is very sensitive to damage by toxic agents, in which consequences may manifest only in the adulthood. Cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) is an environmental pollutant widely used in industry and is a constituent of tobacco smoke. Exposure to  $\text{Cd}^{2+}$  is associated with detrimental effects on mammalian cells including neural cells. We investigate the action of  $\text{Cd}^{2+}$  on immature hippocampus by assessing cell viability and modulation of AKT/PKB and MAPK family members (extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/2,  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  and JNK), as well a possible neuroprotective effect of glutathione and its permeable analogue, glutathione monoethyl ester (GSH-me). Hippocampal slices from immature rats (postnatal day 14; PN14) were incubated with  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ) for 3 h and the effects on protein phosphorylation were analyzed by western blotting. Phosphorylation of  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  was enhanced by  $\text{Cd}^{2+}$  at all doses tested.  $\text{Cd}^{2+}$  also stimulated the phosphorylation of ERK1/2 in a concentration-dependent manner. Conversely,  $\text{Cd}^{2+}$  did not alter the phosphorylation of JNK and AKT. Moreover,  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ; 3 h) reduced cell viability, measured by MTT reduction assay without changes on LDH leakage assay and propidium iodide (IP) staining. GSH but not GSH-me was able to reduce the impairment on cell viability induced by the metal. This finding suggests that the neuroprotective effect of GSH is extracellular action dependent. The inhibition of  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  by SB203580 aggravated the acute  $\text{Cd}^{2+}$ -induced impairment on cell viability. Differently, the inhibition of MEK by PD98059 did not alter the effects of  $\text{Cd}^{2+}$  on cell viability. The

current data suggest that in immature hippocampal cells p38<sup>MAPK</sup> may play a role in a signaling pathway in order to counteract against acute Cd<sup>2+</sup> neurotoxicity. In conclusion, our results show that Cd<sup>2+</sup> impairs cell viability and disturbs MAPKs pathways in a developmental stage that is significant for synaptic organization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cascata de sinalização de MAPKs.....	20
Figura 2. Cascata de sinalização da AKT/PKB.....	24
Figura 3. Ilustração representativa dos sistemas de eletroforese e eletrotransferência .....	37
Figura 4. Ilustração representativa do sistema de imunodeteccção, através de quimioluminescência, de um polipeptídeo utilizando anticorpo específico. ....	38
Figura 5. Efeito do Cd <sup>2+</sup> sobre a redução do MTT em fatias de hipocampo de ratos imaturos.....	41
Figura 6. Efeito do Cd <sup>2+</sup> sobre a liberação de LDH em fatias de hipocampo de ratos imaturos.....	42
Figura 7. Efeito do Cd <sup>2+</sup> na incorporação de IP por fatias hipocampais de ratos imaturos.....	43
Figura 8. Ação da GSH sobre o efeito do Cd <sup>2+</sup> na redução do MTT em fatias de hipocampo de ratos imaturos. ....	44
Figura 9. Ação da GSH-me sobre o efeito do Cd <sup>2+</sup> na redução do MTT em fatias de ratos imaturos. ....	46
Figura 10. Efeito do Cd <sup>2+</sup> sobre os níveis totais de glutaciona (GSH <sub>Total</sub> ) em fatias de ratos imaturos. ....	47
Figura 11. Efeito do Cd <sup>2+</sup> sobre a fosforilação protéica em resíduos de tirosina em fatias de hipocampo de ratos imaturos incubadas por 3 h.....	49
Figura 12. Efeito do Cd <sup>2+</sup> sobre a fosforilação de p38 <sup>MAPK</sup> em fatias de hipocampo de ratos imaturos incubadas por 3 h. ....	51
Figura 13. Efeito do Cd <sup>2+</sup> sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos imaturos incubadas por 3 h. ....	52

Figura 14. Efeito do Cd <sup>2+</sup> sobre a fosforilação de JNK1/2 em fatias de hipocampo de ratos imaturos incubadas por 3 h. ....	53
Figura 15. Efeito do Cd <sup>2+</sup> sobre a fosforilação de AKT/PKB em fatias de hipocampo de ratos imaturos incubadas por 3 h. ....	55
Figura 16. Efeito do PD98059 sobre a viabilidade celular e a fosforilação de ERK1/2 de fatias hipocampais de ratos imaturos tratadas com Cd <sup>2+</sup> por 3 h. ....	57
Figura 17. Efeito do SB203580 sobre a viabilidade celular e a fosforilação da p38 <sup>MAPK</sup> em fatias hipocampais de ratos imaturos tratadas com Cd <sup>2+</sup> por 3 h. ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Albumina sérica bovina

$\text{Cd}^{2+}$  – Íon cádmio

$\text{CuSO}_4$  – Sulfato de cobre

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DTNB – 5, 5'-ditiolbis-(2-ácido nitrobenzóico)

EAL – Esclerose amiotrófica lateral

EDTA – Ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EPM – Erro padrão da média

ERK – Cinase regulada por sinal extracelular

ERO – Espécie reativa de oxigênio

GMPc – Guanosina monofosfato cíclico

GR – Glutathione redutase

GSH – Glutathione ou  $\gamma$ -glutamyl-cisteinyl-glicina

GSH-me – Glutathione monoetil-éster

GSSH – Dissulfeto de glutathione

HCl – Ácido clorídrico

HEPES – Ácido N-2-Hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfônico

HSP – Proteína de choque térmico

IgG – Imunoglobulina G

IP – Iodeto de propídio

IP3 – Inositol trifosfato

JNK – Proteína cinase c-Jun NH2-terminal

LDH – Lactato desidrogenase

LTD – Depressão de longa duração

LTP – Potenciação de longa duração

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno  
MTT – Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de sódio  
NaCl – Cloreto de sódio  
NaOH – Hidróxido de sódio  
p38<sup>MAPK</sup> – Proteína cinase ativada por mitógeno de 38 kDa  
PBS – Tampão fosfato-salina  
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas  
PI3K – Cinase 3-fosfatidilinositol  
PN14 – 14 dias de pós-natal  
PKB/AKT – Proteína cinase B  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida contendo SDS  
SN – Sistema nervoso  
SNC – Sistema nervoso central  
TBS – Tampão tris-salina  
TBS-T – Tampão tris-salina com Tween-20  
TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina  
TFK – Tampão fosfato de potássio

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1 SINALIZAÇÃO CELULAR</b> .....	19
<i>1.1.1 Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)</i> .....	19
<i>1.1.2 Via da Proteína Cinase B (PKB/AKT)</i> .....	23
<b>1.2 RESPOSTAS A ESTRESSE CELULAR</b> .....	25
<b>1.3 JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	29
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	29
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	29
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
<b>3.1 ANIMAIS</b> .....	31
<b>3.2 MATERIAIS</b> .....	31
<b>3.3 PREPARO DE FATIAS HIPOCAMPAIS</b> .....	32
<b>3.4 TRATAMENTO DAS FATIAS HIPOCAMPAIS</b> .....	32
<b>3.5 VIABILIDADE CELULAR</b> .....	33
<i>3.5.1 Avaliação da Redução do MTT</i> .....	33
<i>3.5.2 Avaliação de Lactato Desidrogenase liberado (LDH)</i> .....	34
<i>3.5.3 Incorporação de Iodeto de Propídio (IP)</i> .....	34
<b>3.6 MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA TOTAL (GSH<sub>TOTAL</sub>)</b> .....	35
<b>3.7 SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS</b> .....	36

<b>3.8 ELETROTRANSFERÊNCIA</b> .....	37
<b>3.9 IMUNODETECÇÃO</b> .....	38
<b>3.10 DOSAGEM DE PROTEÍNAS</b> .....	39
<b>3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	39
<b>4 RESULTADOS</b> .....	40
<b>4.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE FATIAS HIPOCAMPAIS DE RATOS IMATUROS SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO E CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO</b> ....	40
<i>4.1.1 Avaliação da redução do MTT</i> .....	40
<i>4.1.2 Avaliação da liberação de LDH</i> .....	42
<i>4.1.3 Avaliação da incorporação de Iodeto de Propídio (IP)</i> .....	43
<b>4.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA GLUTATIONA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS HIPOCAMPAIS EXPOSTAS AO CÁDMIO</b> .....	44
<b>4.3 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA GLUTATIONA-MONOETILESTER (GSH-ME) SOBRE A VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS HIPOCAMPAIS EXPOSTAS AO CÁDMIO</b> .....	45
<b>4.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS TOTAIS DE GLUTATIONA (GSH<sub>TOTAL</sub>) DAS FATIAS HIPOCAMPAIS EXPOSTAS AO CÁDMIO</b> .....	47
<b>4.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FOSFORILAÇÃO DE RESÍDUOS DE TIROSINA DAS FATIAS HIPOCAMPAIS EXPOSTAS AO CÁDMIO</b> .....	48
<b>4.6 DETERMINAÇÃO DA MODULAÇÃO DAS MAPKS PELO CÁDMIO</b> .....	50
<b>4.7 INVESTIGAÇÃO DA MODULAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA AKT/PKB PELO CÁDMIO</b> ....	54
<b>4.8 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE PD98059 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS HIPOCAMPAIS EXPOSTAS AO CÁDMIO</b> .....	56

<b>4.9 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO SB203580 E DO SB202474 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS HIPOCAMPAIS EXPOSTAS AO CÁDMIO.....</b>	<b>58</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>68</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O cádmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) é um metal pesado que antigamente era encontrado em baixas concentrações na natureza. Entretanto, quantidades significantes e progressivas deste metal vêm sendo introduzidas ao meio ambiente a partir de fontes naturais, como atividades vulcânicas e incêndios florestais, e fontes antropogênicas, como a mineração e a metalúrgica (WAALKES, 2003; WAISBERG et al., 2003). Além disso, este metal possui grande aplicação nas indústrias de eletrônica, comunicação, geração de energia e aeroespacial (YATES, 1992; RPA, 2000; WAALKES, 2003; WAISBERG et al., 2003; SANTOS et al., 2005; MONROE e HALVORSEN, 2006).

A exposição ao  $\text{Cd}^{2+}$  pode ser ocupacional ou não. Trabalhadores de indústrias estão sujeitos a inalar o  $\text{Cd}^{2+}$  ou retê-lo em contato com a pele. Exposições não ocupacionais podem ocorrer por meio da ingestão de alimentos e de água. Também o hábito de fumar é uma importante fonte de contaminação para o homem (IARC, 1993; RPA, 2000; ROMAN et al., 2002; WAISBERG et al., 2003). O contato com poluentes ambientais contendo  $\text{Cd}^{2+}$  pode ocorrer mesmo que não se resida ou trabalhe em áreas geográficas altamente poluídas. Níveis de contaminação de  $\text{Cd}^{2+}$  podem ser comumente detectados em diferentes hortaliças comercializadas, provenientes, por exemplo, de várias regiões do estado de São Paulo (ROMAN et al., 2002). Diferentes artigos domésticos de uso infantil frequentemente levados à boca podem ocasionar intoxicação por  $\text{Cd}^{2+}$ , como a mamadeira do bebê e seus acessórios, a chupeta e os mordedores de borracha (GARRIDO et al., 1983).

As concentrações de  $\text{Cd}^{2+}$  nos alimentos são maiores nos vegetais, depois em carnes e pescados e, finalmente, nos ovos e produtos lácteos (LENZI et al., 1990; MATA et al., 1995; RPA, 2000). O leite, mesmo não apresentando níveis elevados de concentração do metal, pode representar uma fonte importante de  $\text{Cd}^{2+}$  para o homem (LENZI et al., 1990) e em especial aos lactentes (ROMAN, 2002).

O  $\text{Cd}^{2+}$  absorvido via alimentos ou água ou inalado sob forma gasosa pode concentrar-se em vários órgãos como fígado, rins, sistema nervoso (SN), intestino, ossos, pele e sistema reprodutor (IARC, 1993; RPA, 2000; ROMAN et al., 2002; WAALKES, 2003; WAISBERG et al., 2003).

Em se tratando do sistema nervoso central (SNC) e periférico, o  $\text{Cd}^{2+}$  causa prejuízos que incluem sintomas como dor de cabeça e vertigem, sintomas semelhantes ao da doença de Parkinson, retardo da função visual-motora, neuropatia periférica, diminuição na habilidade de concentração e no equilíbrio (OKUDA et al., 1997; VIAENE et al., 2000). Alguns estudos também demonstraram prejuízo nas funções neuropsicológicas de crianças expostas ao  $\text{Cd}^{2+}$  (HART et al., 1989).

A neurotoxicidade causada pela exposição crônica ao  $\text{Cd}^{2+}$  tem sido bem demonstrada em modelos animais (VIAENE et al., 2000), entretanto estes estudos são mais limitados em seres humanos. Estudos utilizando roedores expostos ao  $\text{Cd}^{2+}$  demonstraram mudanças comportamentais e danos sobre diversas regiões do SNC (CHANDRA et al., 1985). Estudos de citotoxicidade *in vitro* utilizando linhagens celulares humanas de neuroblastoma indicaram que o  $\text{Cd}^{2+}$  pode ser mais neurotóxico que o chumbo e alumínio (GOTTI et al., 1987). Entretanto o mecanismo da ação citotóxica do  $\text{Cd}^{2+}$ , permanece pouco compreendido, apesar dos vários estudos *in vitro* e *in vivo*.

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi determinar as ações do  $\text{Cd}^{2+}$  no hipocampo, em um estágio específico de desenvolvimento (PN14) que é bastante vulnerável ao efeito de substâncias neurotóxicas (COSTA et al., 2004; NEVES et al., 2008). Neste sentido foi avaliado a fosforilação das MAPKs e AKT, bem como viabilidade celular como parâmetros de neurotoxicidade.

## **1.1 SINALIZAÇÃO CELULAR**

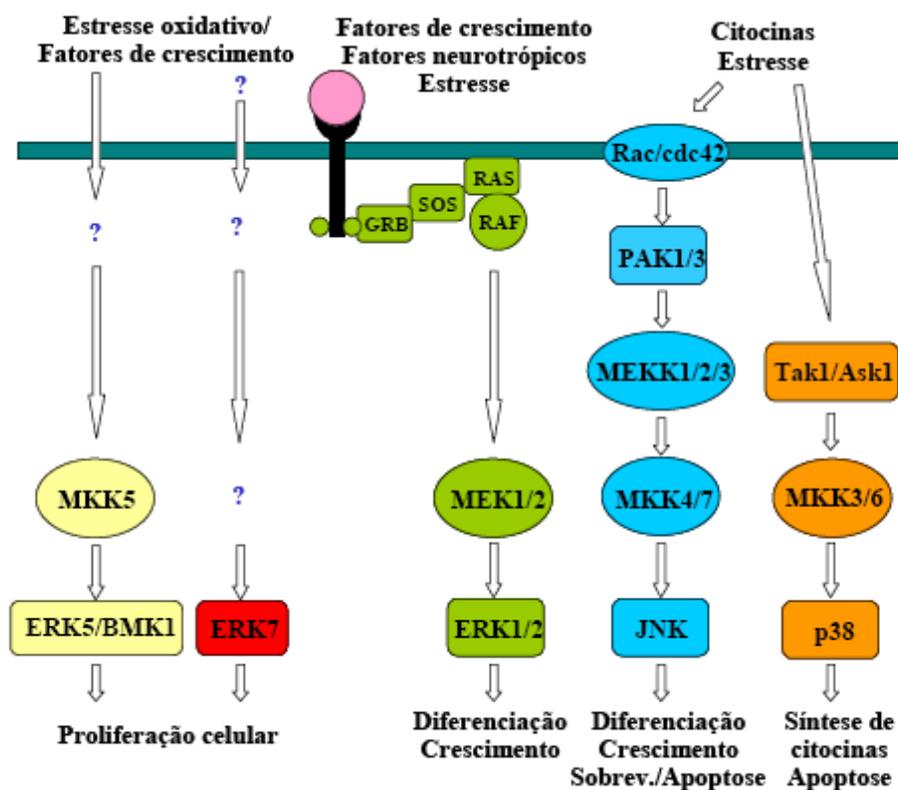
Os sinais extracelulares produzem muitos de seus efeitos fisiológicos através da regulação do estado de fosforilação de proteínas específicas em células alvo (HUNTER, 2000). Os sistemas de fosforilação são constituídos de uma proteína cinase, uma proteína fosfatase e uma proteína aceptora de fosfato (proteínas substrato). A proteína substrato é convertida da forma defosforilada para a forma fosforilada pela proteína cinase, e o retorno à forma defosforilada é realizada pela proteína fosfatase (GREENGARD, 2001). Dentre as proteínas cinases que regulam a sobrevivência e morte celular observa-se as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e a proteína cinase B (PKB/AKT).

### **1.1.1 Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)**

As MAPKs representam uma família de serina-treonina cinases que medeiam a transdução de sinal intracelular em resposta a diversos estímulos. As MAPKs conduzem, amplificam e integram diversas atividades, incluindo embriogênese, diferenciação, proliferação e transformação celular, respostas de estresse, alterações morfológicas e

apoptose (Figura 1) (PARK et al., 2000; CHANG e KARIN, 2001; COWAN e STOREY, 2003).

A ativação das MAPKs é dependente de outras cinases posicionadas anteriormente a elas na via de sinalização, chamadas cinases de MAPKs (MAPKK) (CHEN et al., 2001). Desta forma, a fosforilação reversível das MAPKs sobre um resíduo de treonina e em tirosina, conduz a sua ativação. Três MAPKs tem sido bem caracterizadas: as proteínas cinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2); as proteínas cinases c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal (JNK) e a proteína cinase p38 (p38<sup>MAPK</sup>) (CHEN et al., 2001; CHANG e KARIN, 2001).



**Figura 1. Cascata de sinalização de MAPKs.**

A cascata das ERK1/2 está presente em todos os eucariontes e é amplamente utilizada na regulação celular (ROBINSON e COBB, 1997; CHANG e KARIN, 2001). As ERK1/2 são primariamente ativadas por fatores de crescimento (SEGER e KREBS, 1995), mas podem ser ativadas por diversos estímulos como citocinas, choque térmico, luz ultravioleta, isquemia e estresse oxidativo (HUNG et al., 1998; IRVING et al., 2000; GU et al., 2001).

O mecanismo mais conhecido de ativação de ERK é através da auto fosforilação dos receptores tirosina cinase (em resíduos de tirosina) em resposta a neurotrofinas. Isto por sua vez (via interação proteína-proteína) promove a ativação e o ancoramento na membrana plasmática de RAS (uma proteína G monomérica de 21 kDa), com posterior interação desta com RAF (uma proteína cinase serina-treonina de 74 kDa). Este processo promove a ativação de RAF que fosforila MEK (MAPKKs), que irá fosforilar e ativar as ERK1/2. A ativação de ERK depende da fosforilação nos resíduos treonina 183 e tirosina 185, sendo que a defosforilação de qualquer um dos sítios por fosfatases causa inativação da enzima (COBB e GOLDSMITH, 1995; CHEN, 2001).

A atividade de ERK1/2 tem sido primariamente relacionada com sobrevivência celular e neuroplasticidade sináptica, incluindo aprendizado e formação de memória dependentes do hipocampo (NORMAN et al., 2000; SWEATT, 2001; SWEATT, 2004; THOMAS e HUGANIR, 2004).

A ativação da p38<sup>MAPK</sup> e da JNK tem sido amplamente relacionada com a morte celular programada (MIELKE e HERDEGEN, 2000). Entretanto, diversas evidências indicam que as MAPKs de uma forma geral podem tanto exercer papéis cruciais, durante o desenvolvimento do SNC e na neuroplasticidade como também mediar eventos

neurotóxicos, na dependência do período de ativação e da localização subcelular (CHU et al., 2004; MURPHY e BLENIS, 2006).

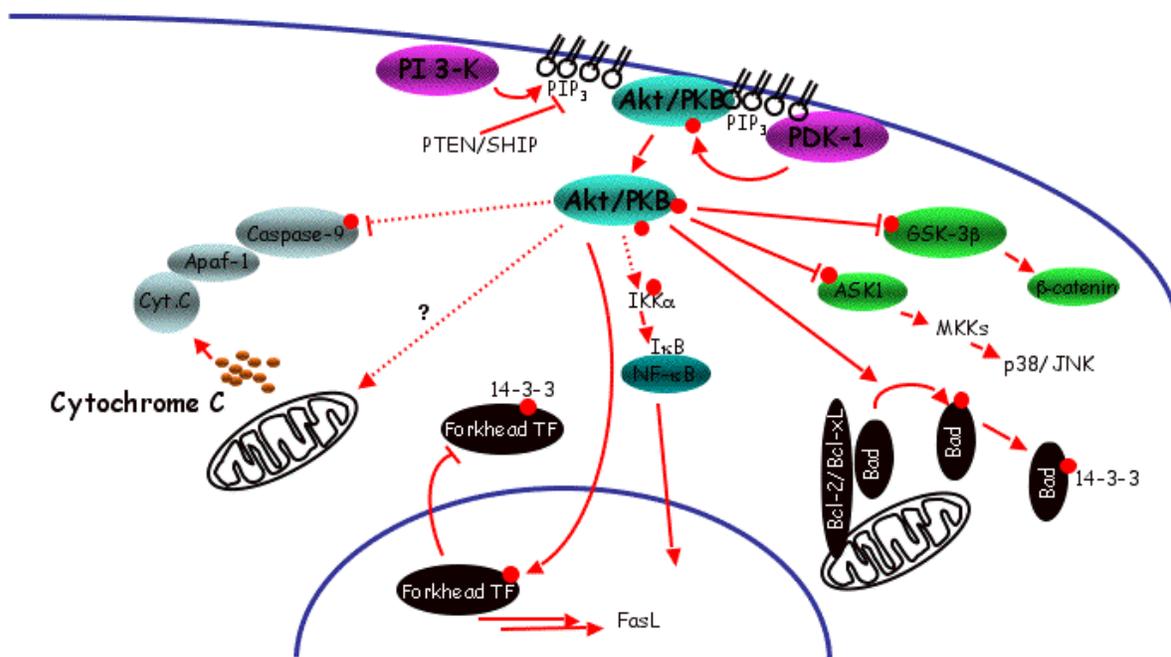
As JNKs são ativadas por fosforilação nos seus resíduos de treonina e tirosina nas posições 183 e 185 na JNK1 e na JNK2, e nas posições 221 e 223 na JNK3. As p38<sup>MAPK</sup>, por sua vez, representam uma família de quatro cinases homólogas: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  e p38 $\delta$ , que derivam de diferentes genes, e são ativadas por fosforilação nos resíduos de treonina 180 e tirosina 182 (MIELKE e HERDEGEN, 2000; CHEN, 2001). Tanto as JNKs quanto as p38<sup>MAPK</sup> são largamente expressas em muitos tecidos, além do SNC. A alta atividade basal no SNC está em contradição à hipótese de que a p38<sup>MAPK</sup> atue apenas como uma cinase ativada por estresse e envolvida na apoptose, portanto as p38<sup>MAPKs</sup> devem também desempenhar funções fisiológicas (MIELKE e HERDEGEN, 2000). Alguns estudos sugerem que essa enzima possui importante papel na regulação da resposta imune, proliferação e diferenciação celular (TAKENAKA et al., 1998; MIELKE et al., 1999; MARTÍN-BLANCO, 2000). Adicionalmente, trabalhos recentes sugerem funções neuroprotetoras exercidas pela p38<sup>MAPK</sup> no hipocampo em pré-condicionamento isquêmico (SUN et al., 2006) e estresse hiperosmótico (NISWANDER e DOKAS, 2006).

Em relação ao Cd<sup>2+</sup>, tem-se descrito que este metal pode induzir apoptose pela via de ERK1/2 em linhagem de células T humana (IRYO et al., 2000). Pode ativar JNK e p38<sup>MAPK</sup> em células de linhagem hipocampal (HT4) (ROCKWELL et al., 2004), ERK1/2, JNK e p38<sup>MAPK</sup> em células renais (HIRANO et al., 2005), em macrófagos (MISRA et al., 2002) e em diversas linhagens celulares tumorais (CHUANG et al., 2000; GÁLAN et al., 2000; CHAO e YANG, 2001; CHUANG et al., 2003; KIM et al., 2005;). Assim, vários

membros da família das MAPKs, dependendo do tipo celular, parecem estar diferentemente envolvidos nas ações citotóxicas induzidas pelo  $\text{Cd}^{2+}$  (LAG et al., 2005).

### **1.1.2 Via da Proteína Cinase B (PKB/AKT)**

Em diversos tipos celulares, a ativação de receptores tirosina cinase por ligantes como o fator de crescimento epidérmico (EGF), ou o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), ocasionam a autofosforilação do receptor na porção intracelular. Assim, levam ao recrutamento de fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) para a membrana plasmática. Isso ocasiona uma mudança conformacional na cinase e com conseqüente ativação, o que favorece a síntese de 3'-fosfoinosítídeos. A AKT citosólica se desloca para a membrana plasmática ligando-se aos 3'-fosfoinosítídeos produzidos. A AKT associada à membrana é fosforilada sobre um resíduo de treonina 308 pela PDK1 (cinase 1 dependente de fosfoinosítídeo, cuja atividade depende de lipídeos de inositol fosforilados na posição 3') e na serina 473 por uma cinase ainda indeterminada (Figura 2) (BRAZIL e HEMMING, 2001; NERI et al., 2002).



**Figura 2. Cascata de sinalização da AKT/PKB.**

A Akt está envolvida na proliferação, diferenciação e proteção de apoptose, síntese protéica e angiogênese (BRAZIL e HEMMINGS, 2001; KIM et al., 2004). No SNC, AKT contribui para a sobrevivência celular, sendo um elemento protetor frente a diversos insultos (MURATA et al., 2003; JOHNSON-FARLEY et al., 2005), além disso, recentemente esta via tem sido implicada na modulação da neuroplasticidade (VAN DER HEIDE et al., 2005).

Em cultura de células de linhagem hipocampal (HT4) foi sugerido que o  $\text{Cd}^{2+}$  pode ativar a via de PI3-K e causar estresse celular (ROCKWELL et al., 2004), apontando uma possível implicação de AKT na intermediação desse processo.

## 1.2 RESPOSTAS A ESTRESSE CELULAR

Em tecidos e células neuronais ou não neuronais, a chamada resposta de estresse compreende alterações enzimáticas e genéticas mais ou menos bem definidas após o estímulo de estresse. Esses fatores de estresse podem ser determinados por uma privação de fatores tróficos, radiação ionizante, choque térmico, radicais livres, luz ultravioleta, choque osmótico, lipopolissacarídeo bacteriano, hipóxia, isquemia e metais pesados. Esses estímulos potencialmente deletérios provocam reações intracelulares que levam à morte celular ou à adaptações defensivas (MIELKE e HERDEGEN, 2000; KLAUNIG e KAMENDULIS, 2004;). Sob condições fisiológicas normais, as células são capazes de contrabalancear a produção de espécies reativas de oxigênio com antioxidantes. As defesas antioxidantes celulares endógenas são principalmente as enzimáticas, incluindo superóxido dismutase, glutathione peroxidase, e catalase. Existem também as defesas não enzimáticas, entre elas a mais abundante é a glutathione (GSH), o tiol de baixo peso molecular mais abundante em células de mamíferos, que está presente na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (KLAUNIG e KAMENDULIS, 2004).

Os neurônios podem ser especialmente suscetíveis a condições pró-oxidantes por possuírem muitas mitocôndrias e um metabolismo basicamente aeróbico o que facilita a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MONROE e HALVORSEN, 2006). O estresse oxidativo afeta numerosos componentes celulares, à medida que oxida o DNA, lipídios, e proteínas, (STOHS e BAGCHI, 1995; KLAUNIG e KAMENDULIS, 2004; ROCKWELL et al., 2004;), bem como altera a expressão de genes através da ativação de

vias de sinalização sensíveis as ERO. Todos estes mecanismos podem alterar a estrutura e função celular causando citotoxicidade (KLAUNIG e KAMENDULIS, 2004; ROCKWELL et al., 2004).

Cabe salientar que o aumento do estresse oxidativo é um achado proeminente em muitas desordens neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose amiotrófica lateral (EAL) (FALNOGA et al., 2000; KLAUNIG e KAMENDULIS, 2004; ROCKWELL et al., 2004; MONROE e HALVORSEN, 2006; LOPEZ et al., 2006).

Um efeito importante do  $\text{Cd}^{2+}$ , tanto *in vivo* quanto *in vitro*, é a geração de estresse oxidativo nas células (STOHS e BAGCHI, 1995; WANG et al., 2004). O  $\text{Cd}^{2+}$  é um metal de transição que, preferencialmente, mantêm-se em um estado oxidado  $2+$  e não é capaz de participar de reações redox clássicas como a reação de Fenton (STOHS e BAGCHI, 1995; WAALKES, 2003). Entretanto, o  $\text{Cd}^{2+}$  do mesmo modo que outros metais pesados, como o mercúrio, é capaz de gerar ERO através da inibição da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias (STOHS e BAGCHI, 1995; WAALKES, 2003).

Outro aspecto que também tem sido mostrado é a capacidade de ligação do  $\text{Cd}^{2+}$  ao DNA, porém de uma maneira fraca, não sendo este, aparentemente, o mecanismo primário de sua ação citotóxica e carcinogênica (WAALKES, 2003). Apesar disso, ele é capaz de induzir diversos genes, incluindo: genes de expressão imediata, como c-fos e c-jun, bem como genes de metalotioneínas e de proteínas de choque térmico (HSPs) (WAISBERG et al., 2003). Além disso, o  $\text{Cd}^{2+}$  interfere na transdução de sinal intracelular em múltiplos níveis, alterando o metabolismo de segundos mensageiros, como da guanosina monofosfato

cíclico (GMPc) por inibição da fosfodiesterase, ou aumentar os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular via inositol trifosfato (IP3) (WATJEN et al., 2002).

### **1.3 JUSTIFICATIVA**

O  $\text{Cd}^{2+}$  é um importante poluente ambiental e a exposição a este metal pesado pode causar importantes efeitos sobre o SNC. Sabe-se que as ações de metais podem ocorrer de forma sutil, alterando processos moleculares fundamentais que regulam a neuroplasticidade e o próprio desenvolvimento normal do SNC (COSTA et al., 2004). Apesar disso, poucos estudos têm sido direcionados para determinar as ações celulares e moleculares deste metal sobre este tecido (MONROE e HALVORSEN, 2006; LOPEZ et al., 2006). Os poucos estudos existentes utilizam principalmente cultura primária ou linhagens celulares (WATJEN et al., 2002; LOPEZ et al., 2006;). Nosso grupo tem utilizado o modelo de fatias hipocâmpais no estudo da ação molecular de metais pesados como o chumbo (CORDOVA et al., 2004). A importância deste modelo está na preservação da matrix extracelular, conectividade neural e inter-relação celular (neuroglial) do SNC, mostrando ser um modelo bastante apropriado para o estudo dos eventos agudos relacionados à citotoxicidade, respostas de estresse e a modulação dos diversos componentes das vias de transdução de sinal, especialmente proteínas cinases e fosfatases (RODNIGHT et al., 1988; LEAL et al., 1997; GONG et al., 2001; CORDOVA et al., 2004). O hipocampo tem sido o sistema experimental mais utilizado para estudos de plasticidade sináptica e permite que agentes, como os metais pesados, sejam rapidamente adicionados e/ou removidos do meio (NEVES et al., 2008). Estudos anteriores em nosso grupo indicam que o  $\text{Cd}^{2+}$  pode diminuir a

viabilidade de fatias hipocâmpais e ativar  $p38^{\text{MAPK}}$  e ERK1/2 (CORDOVA, 2002). Apesar disso, não foi determinado o tipo de morte celular ocasionado pelo metal e sua relação com a ativação destas vias. Da mesma forma não foi determinado a modulação pelo  $\text{Cd}^{2+}$  de outras vias de sinalização importantes na regulação de viabilidade e de neuroplasticidade como JNK e PI3K/AKT.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral investigar as ações *in vitro* do  $\text{Cd}^{2+}$  na modulação de vias de sinalização celular envolvidas em neuroplasticidade e morte/sobrevivência celular bem como caracterizar as ações do metal sobre a viabilidade celular e parâmetros anti e pró-oxidantes em fatias hipocâmpais de ratos jovens (13 - 14 dias de idade).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a ação do  $\text{Cd}^{2+}$  sobre a viabilidade e integridade celular em fatias hipocâmpais de ratos de 13-14 dias de idade, utilizando diferentes métodos de análise de viabilidade celular (MTT, LDH, iodeto de propídio);
- ✓ Determinar os níveis totais de glutathiona nas fatias hipocâmpais expostas *in vitro* ao  $\text{Cd}^{2+}$ .
- ✓ Determinar o efeito de compostos anti-oxidantes, como a glutathiona e a glutathiona monoetil ester, sobre a viabilidade celular de fatias hipocâmpais tratadas com  $\text{Cd}^{2+}$ ;
- ✓ Caracterizar as ações do  $\text{Cd}^{2+}$ , em fatias hipocâmpais de ratos jovens, sobre os níveis de fosforilação de MAPKs (ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup> e JNK) bem como de fosforilação proteica

em resíduos de tirosina (parâmetro geral de fosfotirosina) e sobre a fosforilação de AKT;

- ✓ Determinar o envolvimento das vias de sinalização dependentes de ERK1/2 e p38<sup>MAPK</sup>, na modulação da viabilidade pelo emprego de inibidores seletivos de proteínas cinases;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos imaturos (13-14 dias de idade) da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos, com ciclo claro-escuro de 12 h e temperatura de  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ , no Biotério Central junto com as mães, recebendo água e comida *ad libitum*. Os animais foram encaminhados do biotério diretamente para o Laboratório, onde foram imediatamente manipulados e sacrificados de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado na CEUA (054/CEUA; Processo No. 23080.015493/2006-39).

#### 3.2 MATERIAIS

Os anticorpos anti-fosfo-p38<sup>MAPK</sup> (diluição 1:1.000), anti-fosfo-JNK1/2 (diluição 1:1.000) foram comprados da Calbiochem<sup>®</sup>. SB203580, SB202474, PD98059, anticorpo anti-p38<sup>MAPK</sup>-total (diluição 1:10.000), anti-fosfo-ERK1/2 (diluição 1:10.000) e anti-ERK1/2-total (diluição 1:40.000), Reagente de Folin, Glicose e MTT foram obtidos da Sigma<sup>®</sup>. O anticorpo anti-fosfo<sup>SERINA-473</sup>-AKT e anti-AKT-total foram comprados da Cell Signaling Technology<sup>®</sup>. O cloreto de cádmio, iodeto de propídio, cloreto de cálcio, hidróxido de sódio, sulfato de magnésio foram obtidos da MERK<sup>®</sup>. HEPES, albumina

sérica bovina (BSA), Tris, Triton X-100, MTT,  $\beta$ -mercaptoetanol, SDS, acrilamida, bis-acrilamida, nitrocelulose Hybond<sup>®</sup> (ECL), anticorpos secundários (diluição 1:4.000) (anti-IgG de coelho e camundongo) conjugados à peroxidase, kit ECL, TEMED e glicina foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech<sup>®</sup>. O ácido acético, metanol, EDTA e cloreto de sódio foram obtidos da Nuclear<sup>®</sup>.

### **3.3 PREPARO DE FATIAS HIPOCAMPAIS**

Os animais foram mortos por decapitação utilizando uma tesoura e os cérebros retirados a 4 °C sobre uma placa de Petri invertida, recoberta com papel filtro umedecido com tampão Hepes-Salina (124 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1,2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 25 mM de Hepes, 12 mM de glicose e 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) previamente oxigenado por 30 min. Os hipocampus foram dissecados e a seguir fatiados, na espessura de 400  $\mu$ m, utilizando um fatiador de tecidos de McIlwain. Então, as fatias foram transferidas para um recipiente com fundo escuro contendo tampão Hepes-salina refrigerado, onde foram separadas e selecionadas com o auxílio de pincéis. As fatias selecionadas foram então submetidas individualmente aos diferentes tratamentos em poços de placas de elisa.

### **3.4 TRATAMENTO DAS FATIAS HIPOCAMPAIS**

As fatias foram pré-incubadas por um período de 30 min com tampão Hepes-Salina. A seguir o tampão foi removido e substituído com tampão controle ou contendo Cd<sup>2+</sup> (5–

200  $\mu\text{M}$ ) por período de incubação de 1-3 h. A modulação das vias de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  e ERK1/2 e seus papéis nos efeitos do  $\text{Cd}^{2+}$  foram estudados adicionando SB203580 (um inibidor seletivo de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ ) ou SB202474 (análogo inativo) e PD98059 (inibidor seletivo de MEK) durante o período de pré-incubação e incubação. O efeito da GSH na modulação da viabilidade celular foi analisado pela adição da forma permeável (GSH-monoetilester) durante apenas os 30 min de pré-incubação e da GSH não permeável (GSH) apenas durante o período de tratamento (3 h).

### **3.5 VIABILIDADE CELULAR**

A viabilidade celular foi avaliada por três parâmetros diferentes: avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais (medida de redução do MTT), dosagem da atividade da enzima citosólica lactato desidrogenase liberada pela fatia, e através da medida de incorporação celular do iodeto de propídio.

#### **3.5.1 Avaliação da Redução do MTT**

Após os respectivos tratamentos com cádmio, as fatias hipocâmpais foram incubadas com MTT (0,5 mg/mL em tampão HEPES-salina) por 30 min a 37 °C. O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) 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., 1997). O formazam é solubilizado com a

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

### **3.5.2 Avaliação de Lactato Desidrogenase liberado (LDH)**

A avaliação de LDH é uma medida baseada na liberação da enzima lactato desidrogenase no meio extracelular, pela perda de integridade da membrana celular e foi realizada com o uso de kit colorimétrico DOLES<sup>®</sup>. Após o tratamento das fatias, o sobrenadante foi coletado e sobre a fatia foi adicionado o mesmo volume de Triton 10% para completa dissolução da mesma. A LDH foi determinada no sobrenadante, que representou a quantidade de LDH liberado, e no lisado celular, que representou a quantidade de LDH restante nas fatias. A dosagem é baseada na conversão do lactato em piruvato, pela presença da enzima LDH, com redução de NAD. A formação de NADH foi verificada através de um método colorimétrico, onde a absorbância foi lida em espectrofotômetro ( $\lambda = 510$  nm), sendo que a cor era estável por 30 min. A liberação de LDH para o sobrenadante foi expressa como percentual do total.

### **3.5.3 Incorporação de Iodeto de Propídio (IP)**

A avaliação da morte celular pela incorporação de IP é baseada no fato deste corante ser um corante vital, ou seja, impermeável em células cuja membrana celular encontra-se

intacta. Entretanto, quando a integridade da membrana está comprometida, o IP consegue acessar o núcleo e se complexar ao DNA que se torna fluorescente (BRANA et al., 2002). O IP, na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , foi adicionado às fatias hipocâmpais nos últimos 15 min de tratamento com o  $\text{Cd}^{2+}$ . As fotos foram obtidas em microscópio de fluorescência utilizando filtro de rodamina (488 nm/515 nm) logo após o término dos tratamentos.

### **3.6 MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA TOTAL ( $\text{GSH}_{\text{TOTAL}}$ )**

Após a incubação de 3 h, cinco fatias de um mesmo tratamento foram homogeneizadas em 500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio (TFK) 20 mM (pH 7,0). Do homogenato foram retirados 10  $\mu\text{L}$  para a dosagem de proteína. A seguir, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 50% sobre o homogenato e a amostra foi centrifugada por 2 min a 13.000 rpm. Então, 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi misturado com 500  $\mu\text{L}$  de TFK 1 M, para assim promover a neutralização da amostra.

O método utilizado é enzimático e foi originalmente descrito por Tietze (1969), e posteriormente modificado por Akerboom e Sies (1981). Este método é cíclico e detecta tanto GSSG como GSH, definido como glutationa total ( $\text{GSH}_{\text{TOTAL}}$ ). As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 412 nm, contendo fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 0,2 U/mL de GR, 0,1 mM DTNB, 1 mM EDTA e 0,2 mM NADPH. A concentração de glutationa foi obtida através da realização de uma curva padrão com concentrações conhecidas de GSSG. Os valores são expressos em  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína.

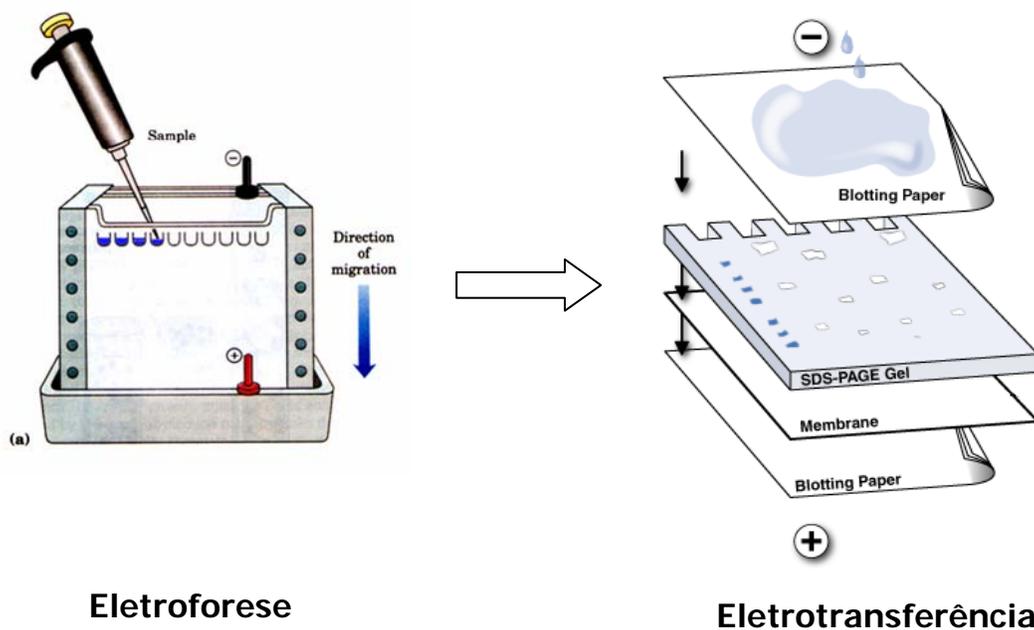
### 3.7 SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS

As fatias hipocampais foram colocadas individualmente em tampão de amostra (4% SDS, 50 mM de Tris, 2 mM de EDTA e 8% de  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 6,8) e aquecidas por 5 min para permitir a solubilização do tecido. Foi utilizado 100  $\mu$ L de tampão de amostra por fatia. Em seguida foi adicionada a solução de diluição de amostra (40% de glicerol, 50 mM de Tris e Bromofenol Blue; pH 6,8) numa proporção de diluição/solução de amostra de 25:100 (v/v).

As proteínas (70  $\mu$ g/poço) foram separadas pelo sistema de eletroforese em mini-gel Amersham Pharmacia Biotech®, utilizando gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) sendo o gel de separação 10% [10% de Acrilamida/Bis-acrilamida (37,5:1 p/p), 375 mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,06% de TEMED e 0,036% de persulfato de amônia; pH 8,8] e o gel de entrada 4% [4% de Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1 p/p), 125 mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,05% de TEMED e 0,1% de persulfato de amônia; pH 6,8] (Cordova et al., 2004; Leal et al., 2002). A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 20 mA por placa e voltagem máxima de 140 V durante aproximadamente três horas de corrida, em temperatura ambiente, utilizando tampão superior (190 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1% de SDS) e inferior (50 mM de Tris; pH 8,3). Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência (Figura 3).

### 3.8 ELETROTRANSFERÊNCIA

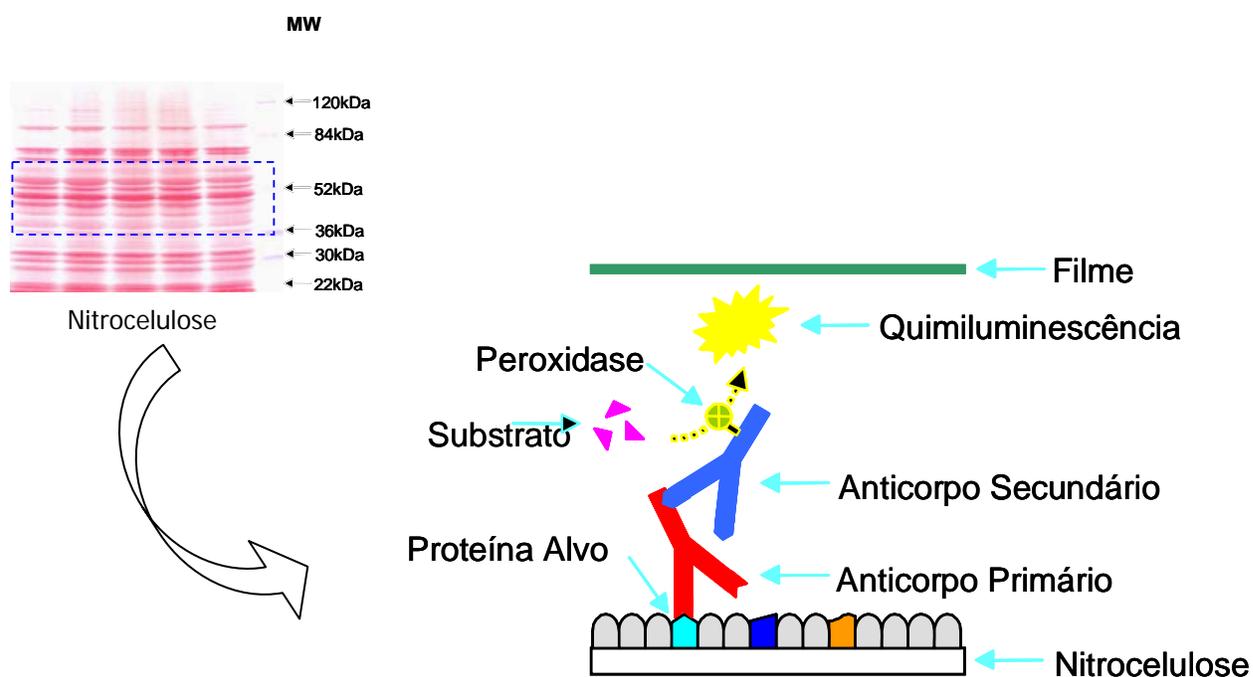
Após a eletroforese o gel foi equilibrado com tampão de equilíbrio (25 mM de Tris, 190 mM de glicina, 5% de metanol e 0,1% de SDS) por 30 min. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose AMERSHAM® utilizando o sistema semi-dry modelo TE70 com tampão de transferência (25 mM de Tris, 190 mM de glicina, 5% de metanol) com uma corrente de 1,2 mA/cm<sup>2</sup> durante 1,5 h (Figura 3). Após a eletrotransferência, para controle da eficiência do processo de transferência os géis foram corados com solução de Comassie Blue [Comassie blue R-250 0,1% (p/v), metanol 50% (v/v), ácido acético 7% (v/v)]. As membranas foram coradas com solução de Ponceau [Ponceau 0,5% (p/v) em ácido acético 1% (v/v)].



**Figura 3. Ilustração representativa dos sistemas de eletroforese e eletrotransferência.**

### 3.9 IMUNODETECCÃO

As proteínas de interesse foram identificadas e quantificadas através de *immunoblotting* (LEAL et al., 2002; CORDOVA et al., 2004). Foram utilizados anticorpos específicos contra a proteína total (para avaliar conteúdo) e também contra as formas fosforiladas de AKT, p38<sup>MAPK</sup>, ERK1/2 e JNK. A detecção foi realizada utilizando anticorpos secundários ligados a peroxidase (Anti-coelho ou anti-camundongo IgG-HRP-conjugada). A revelação dos imunoblottings foi realizada através de ECL.



**Figura 4.** Ilustração representativa do sistema de imunodeteccção, através de quimiluminescência, de um polipeptídeo utilizando anticorpo específico.

### **3.10 DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

As proteínas foram dosadas através do método de Peterson (1977). A leitura foi realizada em 750 nm e as concentrações foram obtidas através de uma curva-padrão utilizando albumina de soro bovino (BSA).

### **3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

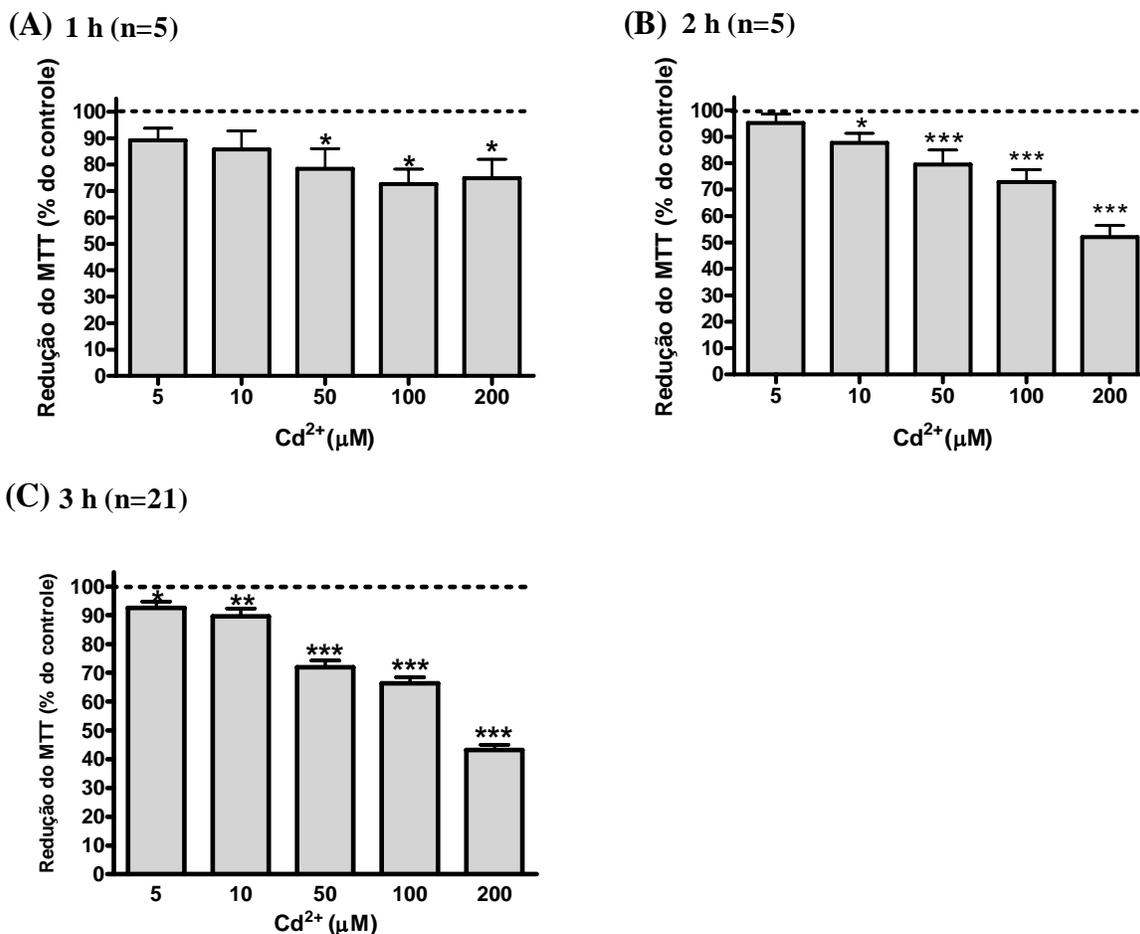
Os resultados estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os níveis de fosforilação de proteína foram acessados pela quantificação das bandas através do software Scion Image<sup>®</sup>. As diferenças significativas foram obtidas através de ANOVA de uma ou duas vias, seguida do teste de Duncan, quando pertinente. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE FATIAS HIPOCAMPAIS DE RATOS IMATUROS SUBMETIDAS A DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO E CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO**

#### **4.1.1 Avaliação da redução do MTT**

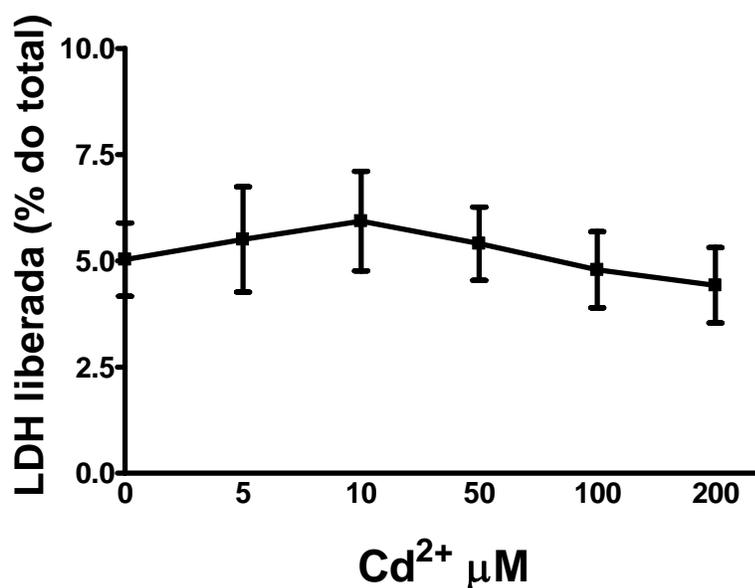
As fatias de ratos imaturos (13-14 dias) foram incubadas com  $\text{Cd}^{2+}$  em concentrações de 5, 10, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  por períodos de 1, 2 e 3 h. Para controle as fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. A viabilidade celular, capacidade redutora sobre o MTT, foi expressa em percentagem do controle (considerado 100%). Os resultados demonstraram que o tratamento com  $\text{Cd}^{2+}$  diminuiu a viabilidade celular em fatias hipocampais. Após 1 h de incubação (Figura 5A), a viabilidade foi diminuída em aproximadamente 20% na concentração de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  e em 25% nas concentrações de 100  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ . Após 2 h de incubação com o  $\text{Cd}^{2+}$ , as concentrações de 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  provocaram uma redução na viabilidade celular de aproximadamente 10%, 20%, 25% e 50%, respectivamente (Figura 5B). Após 3 h de incubação, a redução na viabilidade celular medida pelo MTT passou a ser evidenciada na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , com uma redução de 10%, semelhante à concentração de 10  $\mu\text{M}$ , neste período. Entretanto, nas concentrações 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  este declínio foi acentuado, de aproximadamente 30%, 35% e 55% respectivamente (Figura 5C).



**Figura 5. Efeito do Cd<sup>2+</sup> sobre a redução do MTT em fatias de hipocampo de ratos imaturos.** Fatias de hipocampo foram pré-incubada por 30 min com tampão HEPES-salina, seguido de incubação com tampão HEPES (controle) ou tampão contendo Cd<sup>2+</sup> (5-200 μM) por períodos de 1 h (A), 2 h (B) e 3 h (C). Os valores estão expressos como porcentagem do controle (considerado 100%; linha tracejada). Os resultados representam as médias ± E.P.M. dos experimentos. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan. \**P*<0,05; \*\**P*<0,01 e \*\*\**P*<0,001 quando comparado com o grupo controle.

#### 4.1.2 Avaliação da liberação de LDH

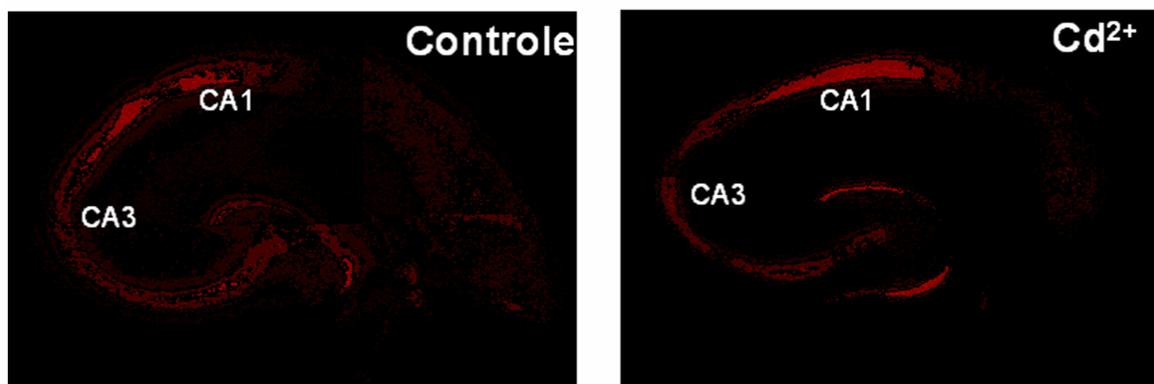
A liberação de LDH é um parâmetro que demonstra uma permeabilização na membrana celular, com perda de conteúdo citosólico. Para avaliar esta liberação, fatias de ratos imaturos foram incubadas com  $\text{Cd}^{2+}$  em concentrações de 5, 10, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  por um período de 3 h. Para controle as fatias foram incubadas apenas com tampão HEPES-salina. O tratamento com o metal não alterou a quantidade de LDH liberada pelas fatias hipocampais (figura 6).



**Figura 6. Efeito do  $\text{Cd}^{2+}$  sobre a liberação de LDH em fatias de hipocampo de ratos imaturos.** Fatias de hipocampo foram pré-incubada por 30 min com tampão HEPES-salina, seguido de incubação com tampão HEPES (controle) ou tampão contendo  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ) por 3 h. Os resultados representam percentagem do total de LDH. Os valores representam as médias das percentagens  $\pm$  E.P.M. de 5 experimentos.

#### 4.1.3 Avaliação da incorporação de Iodeto de Propídio (IP)

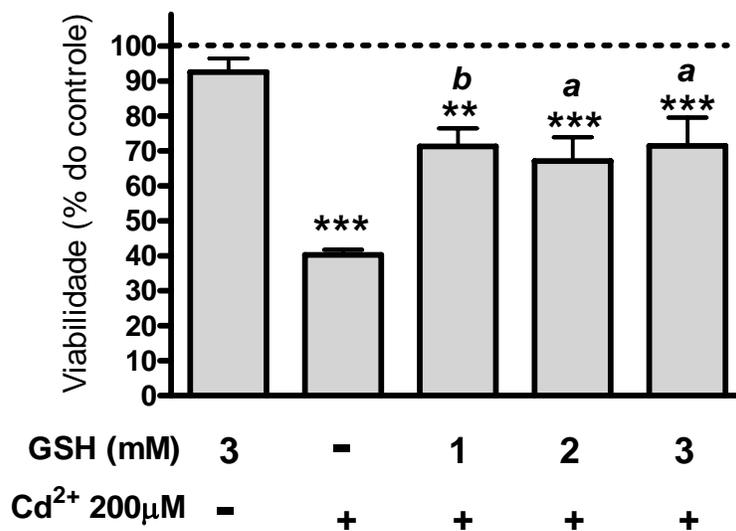
O IP é uma substância capaz de se complexar ao DNA, entretanto ele só consegue acessar o núcleo quando as células apresentam suas membranas plasmáticas permeabilizadas. Para demonstrar, por outra metodologia, a possível permeabilização da membrana celular pela exposição ao metal. AS fatias hipocampais de ratos jovens foram tratadas com  $\text{Cd}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$  ou tampão HEPES-salina (controle), por 3 h. As fatias tratadas apresentaram um mesmo padrão de incorporação de IP que as fatias controles, corroborando assim com os resultados encontrados para a liberação da LDH neste mesmo protocolo de 3 h de incubação, indicando que a integridade da membrana celular foi preservada.



**Figura 7. Efeito do  $\text{Cd}^{2+}$  na incorporação de IP por fatias hipocampais de ratos imaturos.** O IP, na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , foi adicionado as fatias nos 15 min finais do tratamento de 3 h com tampão HEPES-salina (controle) ou com  $\text{Cd}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$ ). Fotos foram obtidas com microscópio de fluorescência utilizando filtro de rodamina (488 nm/515 nm) logo após o termino do tratamento. Imagem representativa de 3 experimentos.

## 4.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA GLUTATIONA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS HIPOCAMPAIS EXPOSTAS AO CÁDMIO

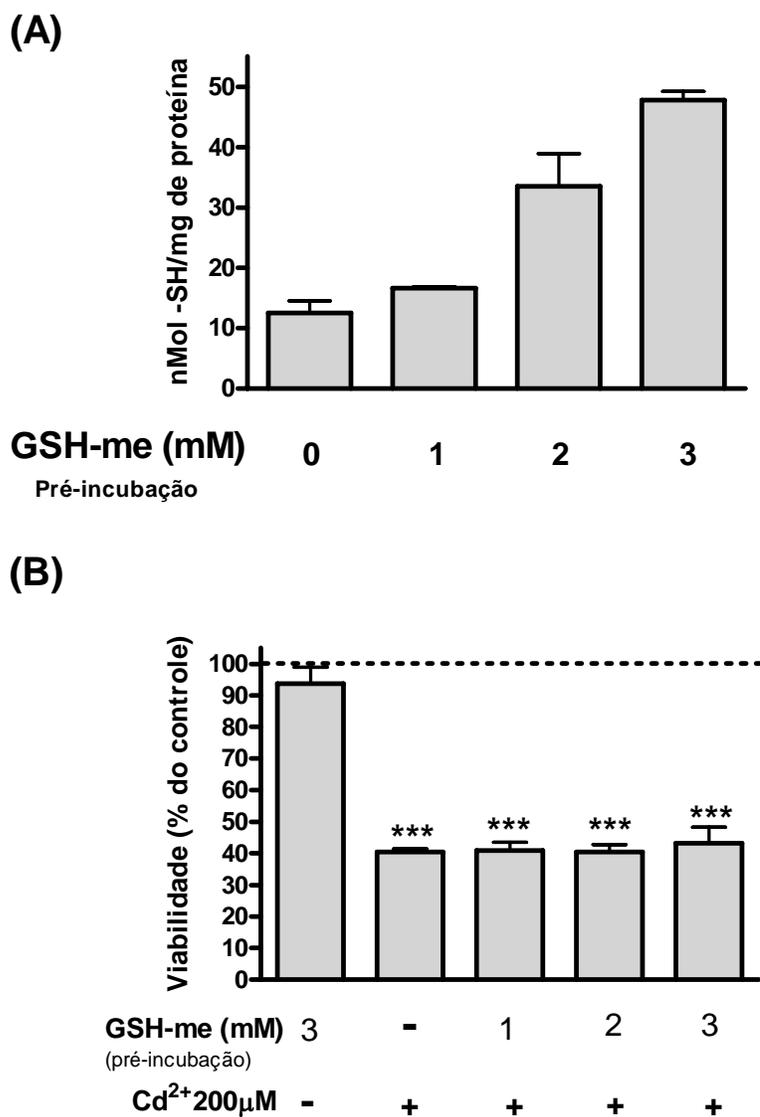
As fatias hipocâmpais de ratos imaturos foram mantidas em tampão HEPES-salina (controle) ou tampão contendo  $\text{Cd}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$  na presença ou ausência de concentrações crescentes de GSH (1-3 mM), por 3 h. A presença de GSH (1-3 mM) reverteu parcialmente (aproximadamente 20%) a queda de viabilidade celular induzida pelo metal (Figura 8). A GSH isoladamente não alterou a viabilidade das fatias hipocâmpais.



**Figura 8.** Ação da GSH sobre o efeito do  $\text{Cd}^{2+}$  na redução do MTT em fatias de hipocampo de ratos imaturos. As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 30 min com tampão HEPES seguida de 3 h de incubação com Tampão HEPES-salina (controle) na presença ou ausência das diferentes concentrações de GSH (1-3 mM) e na presença ou ausência de  $\text{Cd}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$ . Os valores estão expressos como percentagens relativas ao controle (considerado 100%; linha tracejada). Os resultados representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 4 experimentos. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan. \*\*\* $P < 0,001$  quando comparado com o grupo controle; **a**  $P < 0,01$  e **b**  $P < 0,001$  quando comparado com o grupo  $\text{Cd}^{2+}$ .

### **4.3 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA GLUTATIONA-MONOETILESTER (GSH-ME) SOBRE A VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS HIPOCAMPAIS EXPOSTAS AO CÁDMIO**

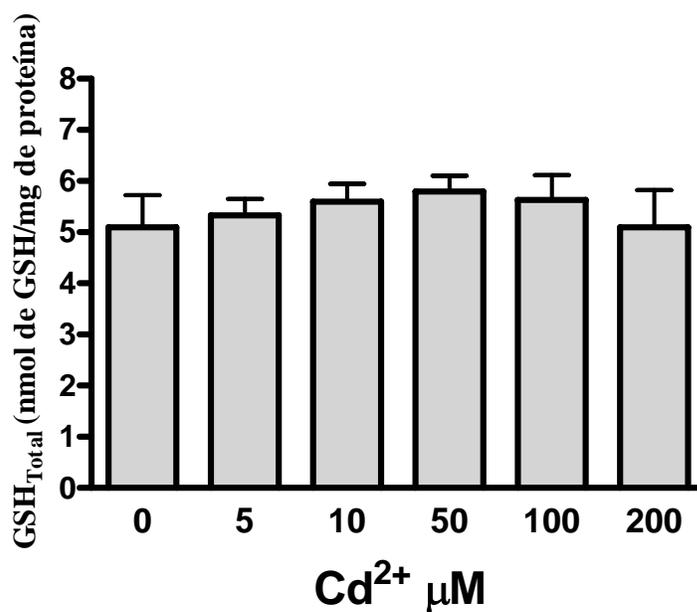
As fatias hipocampais de ratos imaturos foram pré-incubadas por 30 min com concentrações crescentes de GSH-me (1-3 mM), forma permeável da glutathiona, ou apenas tampão HEPES-salina (controle). Após esta pré-incubação, as fatias foram submetidas ao tratamento com  $\text{Cd}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$  ou tampão HEPES-salina (controle), por 3 h. Apesar da pré-incubação com GSH-me (2-3 mM) ser suficiente para triplicar o conteúdo total de GSH intracelular (Figura 9A), este pré-tratamento não foi capaz de prevenir o efeito citotóxico induzido pelo  $\text{Cd}^{2+}$  (Figura9B).



**Figura 9. Ação da GSH-me sobre o efeito do Cd<sup>2+</sup> na redução do MTT em fatias de ratos imaturos.** (A) Dosagem do conteúdo total de GSH após pré-incubação de 30 min com GSH-me. (B) As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 30 min com GSH-me (1-3 mM) ou Tampão HEPES-salina, seguida por incubação de 3 h com tampão HEPES (controle) e/ou Cd<sup>2+</sup> 200 μM. Os valores estão expressos como percentagens relativas ao controle (considerado 100%; linha tracejada). Os valores representam as médias ± E.P.M. de 3 experimentos A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan. \*\*\*P<0,001 quando comparado com o grupo controle.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS TOTAIS DE GLUTATIONA ( $GSH_{TOTAL}$ ) DAS FATIAS HIPOCAMPAIS EXPOSTAS AO CÁDMIO

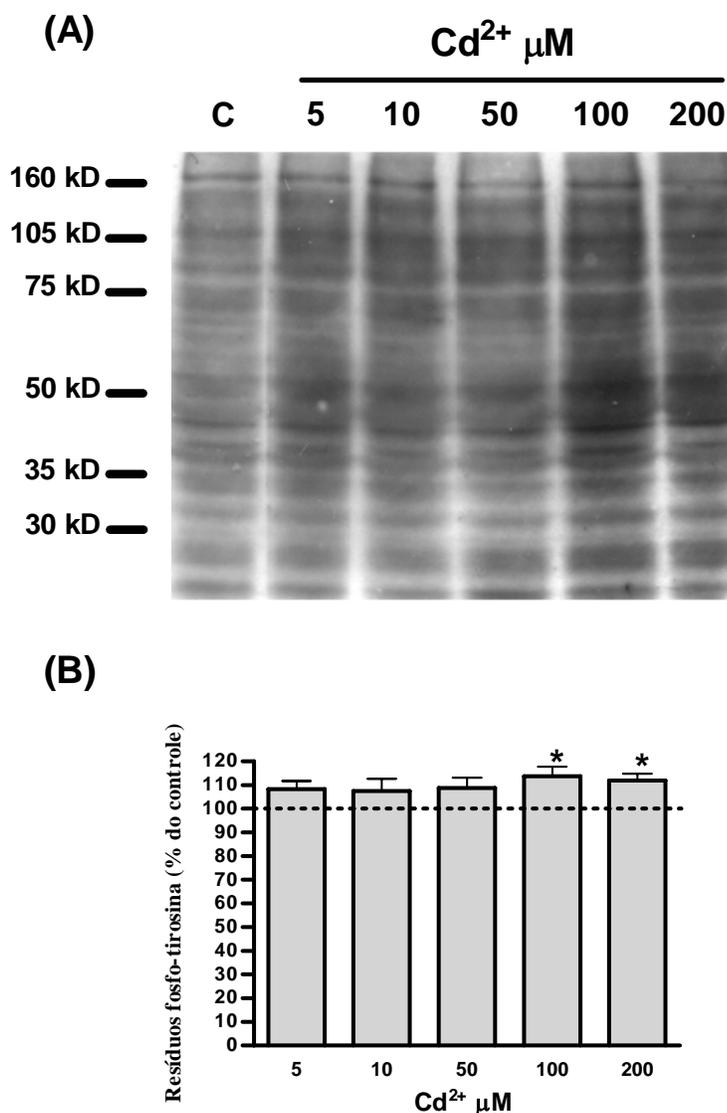
Como o pré-tratamento com a GSH-me não foi capaz de reverter os efeitos citotóxicos do  $Cd^{2+}$ , optou-se por determinar os níveis de glutatona total ( $GSH_{total}$ ) após o tratamento com metal. As fatias hipocampais foram tratadas por 3 h com concentrações crescentes de  $Cd^{2+}$  (5, 10, 50, 100 e 200  $\mu M$ ). Os resultados mostraram que o tratamento com metal não causa alterações significativas nos níveis de  $GSH_{total}$  das fatias hipocampais de ratos imaturos (Figura 10).



**Figura 10. Efeito do  $Cd^{2+}$  sobre os níveis totais de glutatona ( $GSH_{Total}$ ) em fatias de ratos imaturos.** As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 30 min com Tampão HEPES-salina, seguida por incubação de 3 h com tampão HEPES (controle) e/ou  $Cd^{2+}$  (5-200  $\mu M$ ). O conteúdo de GSH é expresso em nmol de GSH/mg de proteína. Os valores representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos.

#### **4.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FOSFORILAÇÃO DE RESÍDUOS DE TIROSINA DAS FATIAS HIPOCAMPAIS EXPOSTAS AO CÁDMIO**

Nós examinamos o conteúdo total de fosforilação protéica em resíduos de tirosina, como um parâmetro geral da modulação da sinalização celular dependente da fosforilação de tirosina. As fatias hipocampais de ratos de 14 dias de idade (PN14) foram tratadas por 3 h com  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ). O tratamento aumentou significativamente os níveis de fosforilação geral dos resíduos de tirosina das proteínas em cerca de 10% nas concentrações de 100  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  (Figura 11 A e B), quando comparadas com o controle HEPES-salina.

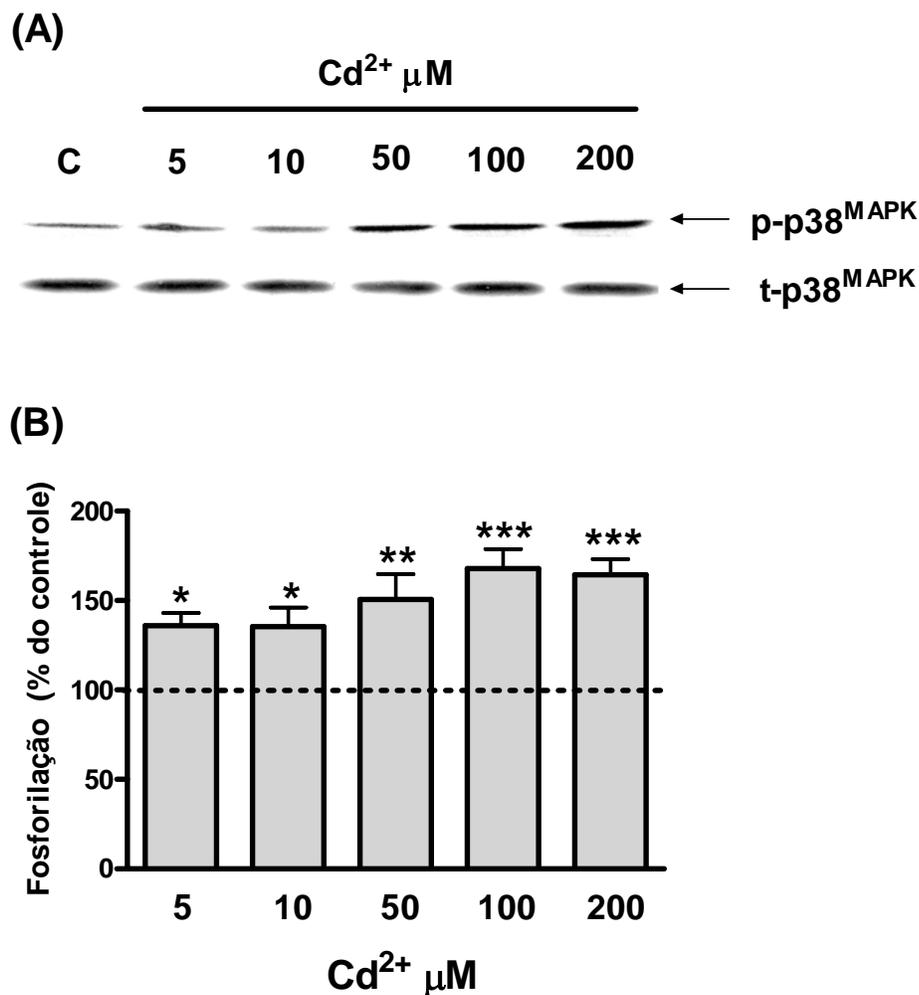


**Figura 11. Efeito do  $\text{Cd}^{2+}$  sobre a fosforilação protéica em resíduos de tirosina em fatias de hipocampo de ratos imaturos incubadas por 3 h.** Fatias hipocampais foram pré-incubadas com tampão HEPES-salina por 30 min. Em seguida foram incubadas em tampão HEPES-salina por 3 h na ausência (controle) ou presença de  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ). A fosforilação dos resíduos de tirosina foram detectados e as reações foram desenvolvidas por ECL. (A) Western blot representativo dos níveis gerais de fosforilação em resíduos de tirosina após 3 h de exposição ao  $\text{Cd}^{2+}$ . (B) Quantificação da fosforilação protéica geral sobre resíduos de tirosina. A fosforilação foi quantificada por análise densitométrica do conjunto de bandas imunoreativas. Os dados estão expressos como porcentagem do controle (considerado 100%; linha tracejada). Os valores representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 5 experimentos. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan. \* $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle.

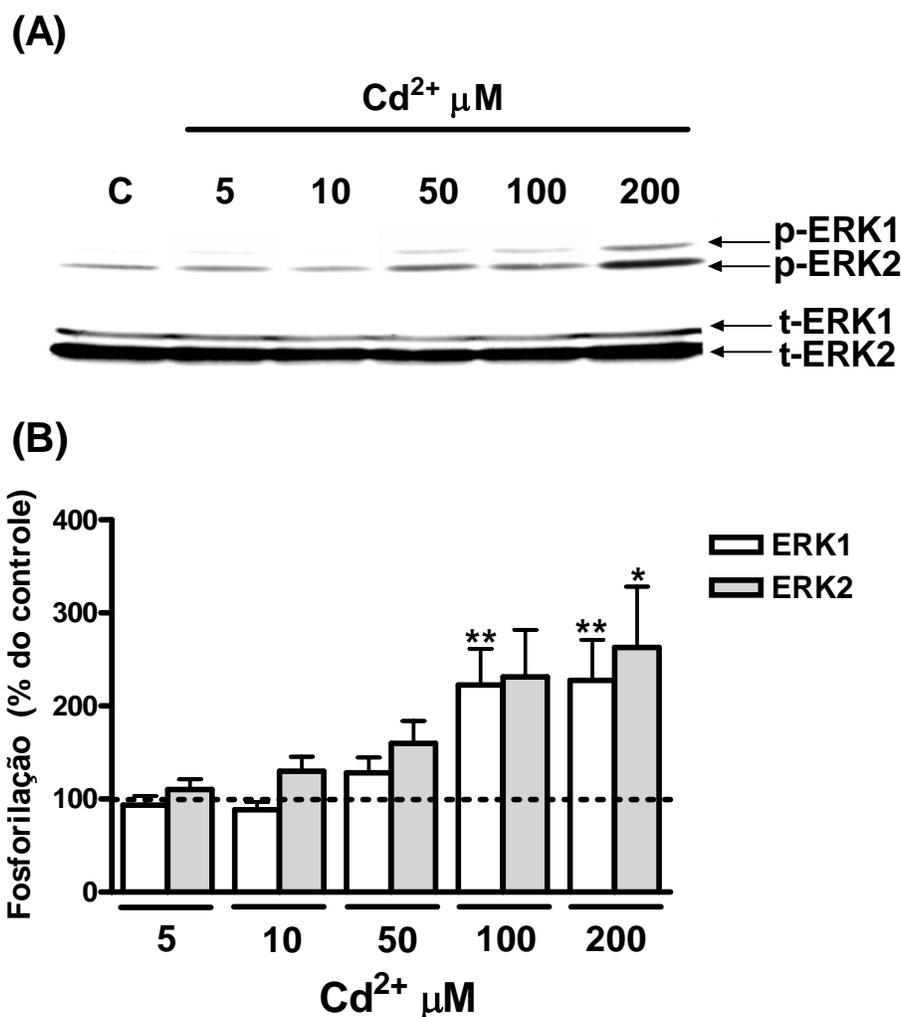
#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA MODULAÇÃO DAS MAPKS PELO CÁDMIO

Fatias hipocâmpais de ratos imaturos PN14 foram pré-incubadas por 30 min com tampão HEPES-salina, seguida por incubação de 3 h no mesmo tampão em ausência (controle) ou presença de  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ).

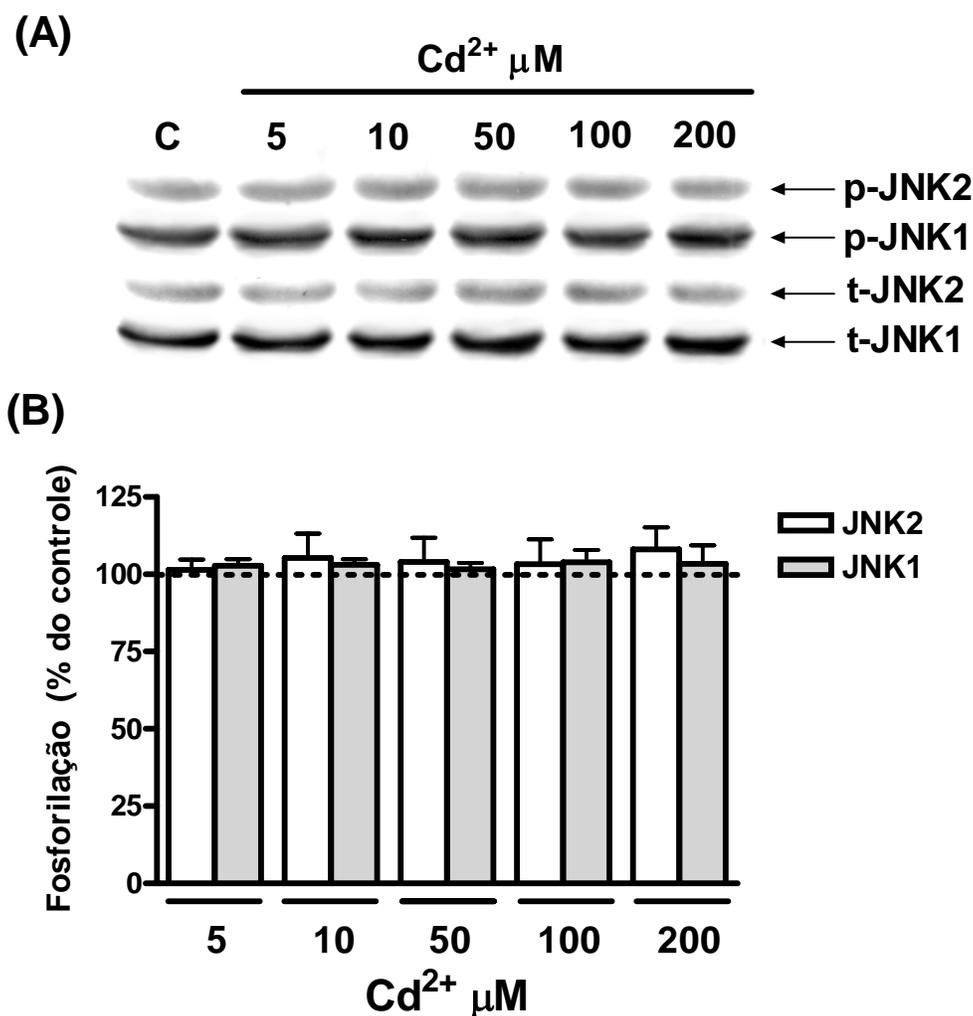
O tratamento com  $\text{Cd}^{2+}$  aumentou significativamente o nível de fosforilação de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  em todas as concentrações utilizadas (Figura 12 A e B). O mesmo tratamento aumentou significativamente a fosforilação da ERK1 em torno de 120% e 130% nas concentrações 100  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ , respectivamente e de ERK2 em aproximadamente 160% pelo tratamento com  $\text{Cd}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$  (Figura 13 A e B). Apesar destes efeitos sobre  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  e ERK1/2 não foi observado alteração nos níveis de fosforilação de JNK1/2 (Figura 14 A e B).



**Figura 12. Efeito do  $\text{Cd}^{2+}$  sobre a fosforilação de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  em fatias de hipocampo de ratos imaturos incubadas por 3 h.** Fatias hipocampais foram pré-incubadas com tampão HEPES-salina por 30 min. Em seguida foram incubadas em tampão HEPES-salina por 3 h na ausência (controle) ou presença de  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ). A fosforilação e o conteúdo total de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  foram detectados por Western blotting. (A) Western blot representativo da estimulação da fosforilação da  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  após 3 h de exposição ao  $\text{Cd}^{2+}$ . (B) Quantificação da fosforilação da  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  após 3 h de incubação com  $\text{Cd}^{2+}$ . A fosforilação foi quantificada por análise densitométrica das bandas imunoreativas. Os dados estão expressos como porcentagem do controle (considerado 100%; linha tracejada). Os valores representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 7 experimentos. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan. \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  quando comparado com o grupo controle.



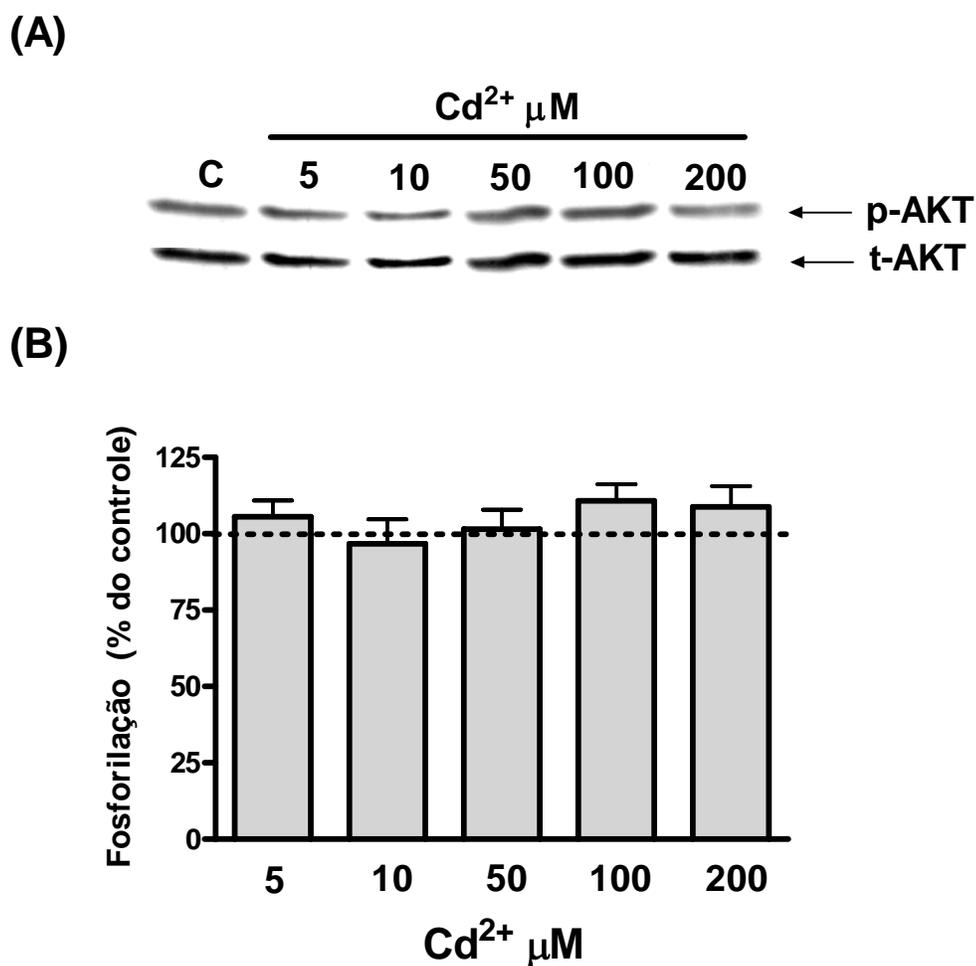
**Figura 13. Efeito do  $\text{Cd}^{2+}$  sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias de hipocampo de ratos imaturos incubadas por 3 h.** Fatias hipocampais foram pré-incubadas com tampão HEPES-salina por 30 min. Em seguida foram incubadas em tampão HEPES-salina por 3 h na ausência (controle) ou presença de  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ). A fosforilação e o conteúdo total de ERK1/2 foram detectados por Western blotting. (A) Western blot representativo da estimulação da fosforilação de ERK1/2 após 3 h de exposição ao  $\text{Cd}^{2+}$ . (B) Quantificação da fosforilação da ERK1/2 após 3 h de incubação com  $\text{Cd}^{2+}$ . A fosforilação foi quantificada por análise densitométrica das bandas imunoreativas. Os dados estão expressos como porcentagem do controle (considerado 100%; linha tracejada). Os valores representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 6-10 experimentos. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan. \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  quando comparado com o grupo controle.



**Figura 14. Efeito do  $\text{Cd}^{2+}$  sobre a fosforilação de JNK1/2 em fatias de hipocampo de ratos imaturos incubadas por 3 h.** Fatias hipocampais foram pré-incubadas com tampão HEPES-salina por 30 min. Em seguida foram incubadas em tampão HEPES-salina por 3 h na ausência (controle) ou presença de  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ). A fosforilação e o conteúdo total de JNK1/2 foram detectados por Western blotting. (A) Western blot representativo da estimulação da fosforilação da JNK1/2 após 3 h de exposição ao  $\text{Cd}^{2+}$ . (B) Quantificação da fosforilação da JNK1/2 após 3 h de incubação com  $\text{Cd}^{2+}$ . A fosforilação foi quantificada por análise densitométrica das bandas imunoreativas. Os dados estão expressos como porcentagem do controle (considerado 100%; linha tracejada). Os valores representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 6-10 experimentos.

#### **4.7 INVESTIGAÇÃO DA MODULAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA AKT/PKB PELO CÁDMIO**

Fatias hipocâmpais de ratos imaturos foram pré-incubadas por 30 min com tampão HEPES-salina, seguida por incubação de 3 h com o mesmo meio em ausência (controle) ou presença de  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ) ou tampão HEPES-salina (controle). Os resultados demonstraram que o  $\text{Cd}^{2+}$  não foi capaz de modular a fosforilação da AKT/PKB na faixa de concentração testada (Figura 15).



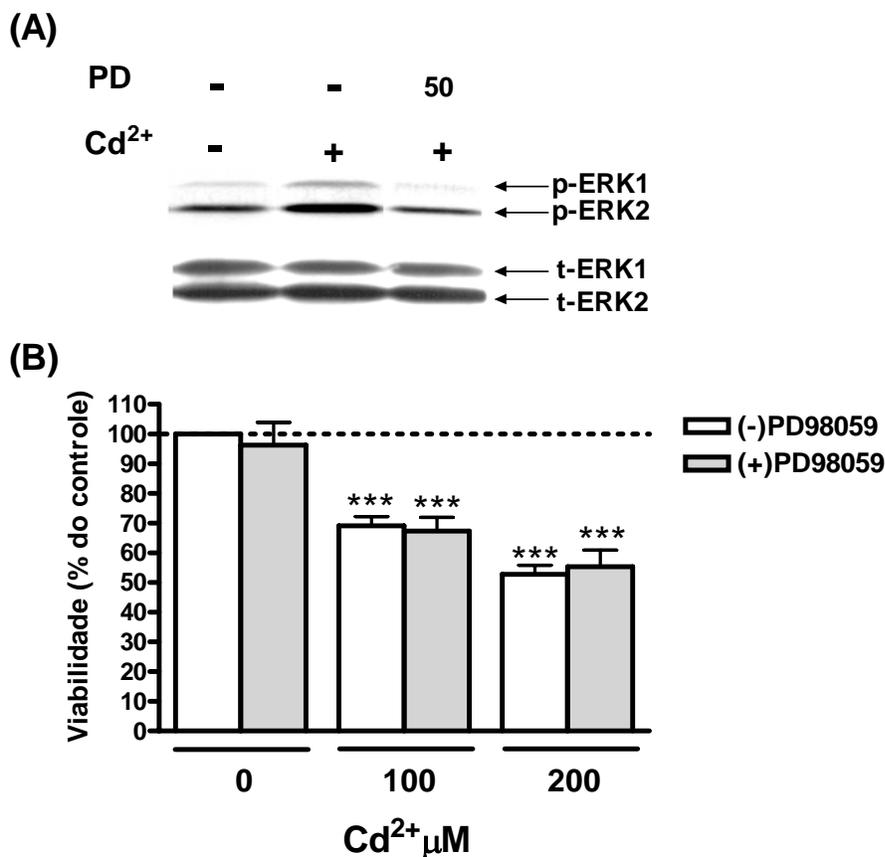
**Figura 15. Efeito do  $\text{Cd}^{2+}$  sobre a fosforilação de AKT/PKB em fatias de hipocampo de ratos imaturos incubadas por 3 h.** Fatias hipocampais foram pré-incubadas com tampão HEPES-salina por 30 min. Em seguida foram incubadas em tampão HEPES-salina por 3 h na ausência (controle) ou presença de  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ). A fosforilação (sobre Serina-473) e o conteúdo total de AKT/PKB foram detectados por Western blotting. (A) Western blotting representativo da estimulação da fosforilação da AKT/PKB após 3 h de exposição ao  $\text{Cd}^{2+}$ . (B) Quantificação da fosforilação da AKT/PKB após 3 h de incubação com  $\text{Cd}^{2+}$ . A fosforilação foi quantificada por análise densitométrica das bandas imunoreativas. Os dados estão expressos como porcentagem do controle (considerado 100%; linha tracejada). Os valores representam as médias  $\pm$  E.P.M. de 4 experimentos.

#### **4.8 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE PD98059 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS HIPOCAMPAIS EXPOSTAS AO CÁDMIO**

Para investigar o envolvimento da ativação de ERK1/2 pelo  $\text{Cd}^{2+}$  e a redução da viabilidade celular (medida pelo MTT) das fatias hipocampais, foi utilizado o PD98059, inibidor seletivo de MEK, a proteína cinase que fosforila especificamente ERK1/2.

Fatias hipocampais de ratos imaturos foram pré-incubadas por 30 min com PD98059 (50  $\mu\text{M}$ ), seguida por incubação durante 3 h na ausência ou presença de  $\text{Cd}^{2+}$  (100  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ ) e presença ou ausência de PD98059 (50  $\mu\text{M}$ ). Para controle, as fatias foram mantidas em tampão HEPES-salina por 3 h.

Estes resultados evidenciam que o PD98059 (50  $\mu\text{M}$ ) é capaz de inibir a fosforilação da ERK1/2  $\text{Cd}^{2+}$ -estimulada (Figura 16A). Entretanto, não foi capaz de modificar o efeito neurotóxico agudo (medida pelo teste do MTT) provocado pelo  $\text{Cd}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  (3h), sugerindo um não envolvimento de ERK1/2 neste efeito em particular (Figura 16B).

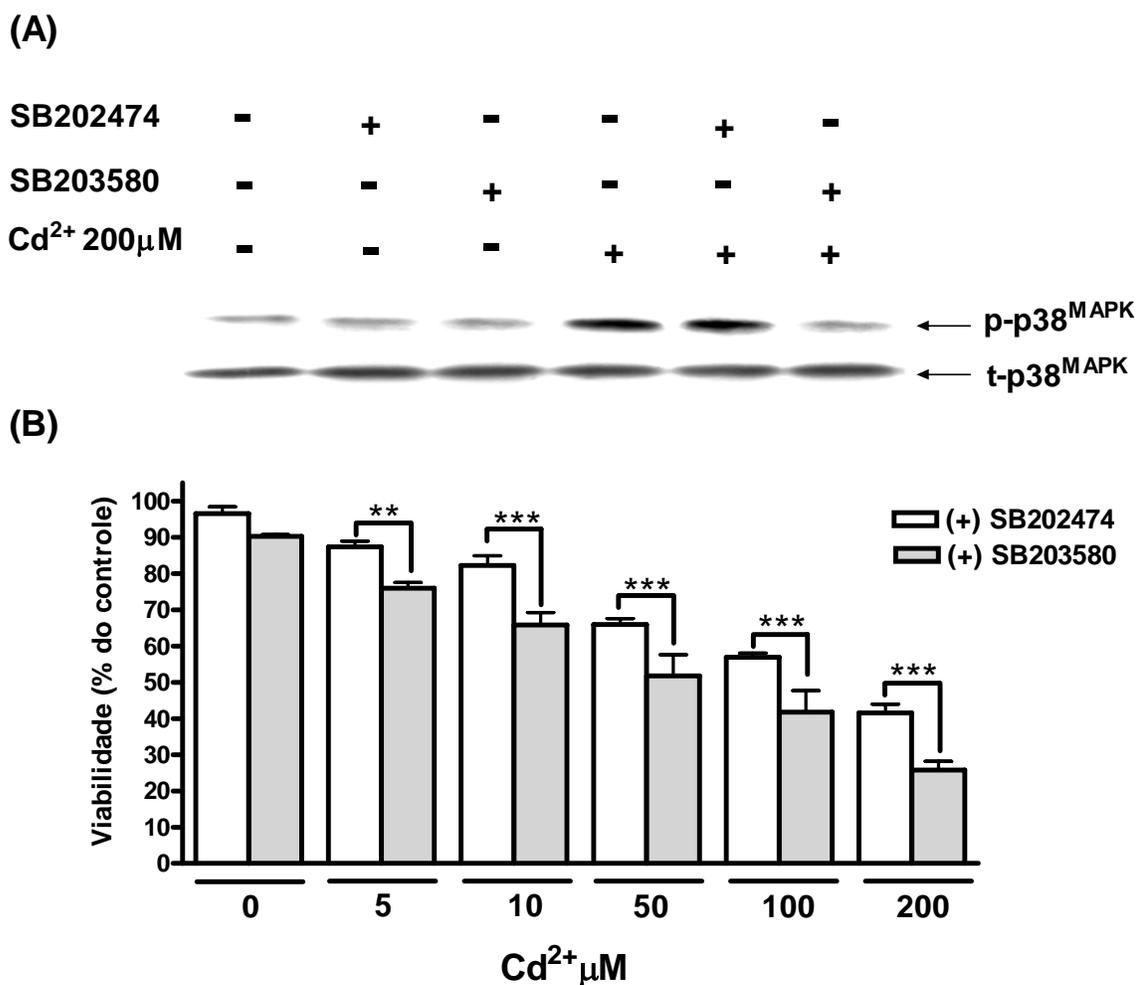


**Figura 16. Efeito do PD98059 sobre a viabilidade celular e a fosforilação de ERK1/2 de fatias hipocâmpais de ratos imaturos tratadas com Cd<sup>2+</sup> por 3 h.** (A) Western Blotting representativo mostrando a inibição, pelo inibidor de MEK (PD98059), da fosforilação de ERK1/2 induzida pelo Cd<sup>2+</sup>. As fatias hipocâmpais foram pré-incubadas por 30 min com tampão HEPES ou PD98059 (50 μM), com posterior incubação por 3 h na presença ou ausência de PD98059 (50 μM) e na presença ou ausência de Cd<sup>2+</sup> (200 μM) (n=3). (B) Ação do PD98059 sobre os efeitos do Cd<sup>2+</sup> na redução do MTT. As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 30 min com tampão HEPES-salina na ausência (controle) ou presença do PD98059 (50 μM). A seguir foram incubadas por 3 horas na presença ou ausência de Cd<sup>2+</sup> 100 μM e 200 μM e na presença ou ausência de PD98059 (50 μM). Os valores estão expressos como percentagens relativas ao controle (considerado 100%; linha tracejada). Os valores representam as médias ± E.P.M. de 3 experimentos. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan \*\*\*P<0,001 quando comparado com o grupo controle.

#### **4.9 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO SB203580 E DO SB202474 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS HIPOCAMPAIS EXPOSTAS AO CÁDMIO**

A fim de investigar uma possível correlação entre os efeitos do  $\text{Cd}^{2+}$  na viabilidade celular (medida pelo MTT) e a ativação de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ , as fatias hipocampais de ratos imaturos foram pré-incubadas por 30 min com SB203580 (10  $\mu\text{M}$ ; inibidor seletivo de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ ) ou SB202474 (10  $\mu\text{M}$ ; análogo inativo do SB203580), seguido pelo tratamento de 3 h com o  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ). Para controle, as fatias foram mantidas em tampão HEPES-salina e somente o inibidor, sem o tratamento com o metal.

Os resultados indicaram que o SB203580, mas não o SB202474, foi efetivo em inibir a fosforilação de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  em fatias hipocampais de ratos imaturos (Figura 17A). Adicionalmente, foi demonstrado que o SB203580 tornou as fatias hipocampais mais suscetíveis a citotoxicidade induzida pelo  $\text{Cd}^{2+}$ , enquanto que o seu análogo inativo (SB202474) não foi capaz de promover este mesmo efeito sobre as fatias (Figura 17B). Estes resultados sugerem que neste modelo de injúria, a  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  estaria exercendo um possível papel citoprotetor frente à ação do  $\text{Cd}^{2+}$  sobre a viabilidade das fatias hipocampais.



**Figura 17. Efeito do SB203580 sobre a viabilidade celular e a fosforilação da p38<sup>MAPK</sup> em fatias hipocâmpais de ratos imaturos tratadas com Cd<sup>2+</sup> por 3 h.** (A) Western Blot representativo da inibição da fosforilação induzida pelo Cd<sup>2+</sup> da p38<sup>MAPK</sup> pelo seu inibidor específico, SB203580. As fatias hipocâmpais foram pré-incubadas por 30 min com tampão ou tampão contendo SB202474 ou SB203580 (10 μM), com posterior incubação por 3 h na presença ou ausência de SB202474 ou SB203580 (10 μM) e na presença ou ausência de Cd<sup>2+</sup> (200 μM) (n=3). (B) Ação do SB203580 sobre os efeitos do Cd<sup>2+</sup> na redução do MTT. As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 30 min com tampão HEPES-salina na ausência (controle) ou presença de SB202474 ou SB203580 (10 μM). A seguir foram co-incubadas por 3 h na presença ou ausência de Cd<sup>2+</sup> (5-200 μM). Os valores estão expressos como percentagens relativas ao controle (considerado 100%). Os valores representam as médias ± E.P.M. de 6-10 experimentos. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan. \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001 quando comparados entre si.

## 5 DISCUSSÃO

O sistema nervoso central em desenvolvimento é mais vulnerável a substâncias tóxicas, devido à ausência de uma barreira hemato-encefálica funcional e a intensa proliferação celular, diferenciação e sinaptogênese que ocorre durante a gestação e no período pós-natal em mamíferos (CHANDRA et al., 1985; GOYER, 1990; MOREIRA et al., 2001; GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2006). Além disso, muito dos efeitos destes insultos tóxicos, durante estes períodos críticos do desenvolvimento, podem se manifestar apenas na vida adulta (BASHA et al., 2005; GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2006).

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi determinar as ações do  $Cd^{2+}$  no hipocampo, em um estágio específico de desenvolvimento (PN14) que é bastante vulnerável ao efeito de substâncias neurotóxicas (COSTA et al., 2004; NEVES et al., 2008). Neste sentido foi avaliado a fosforilação das MAPKs e AKT, bem como viabilidade celular como parâmetros de neurotoxicidade.

O modelo de fatias hipocampais tem sido muito utilizado em estudos de eletrofisiologia e neuroquímica, reproduzem bem diversos aspectos do tecido cerebral intacto, incluindo metabolismo, presença e composição da matrix extracelular, conectividade neural e inter-relação celular (neuro-glial). Além disso, a atividade dos sistemas de fosforilação de proteínas, incluindo os alvos protéicos e a atividade de enzimas cinases e fosfatases encontram-se bem preservados e respondendo ativamente a diversos agentes neuromoduladores (RODNIGHT et al., 1988; LEAL et al., 1997; GONG et al., 2001; XIAO et al., 2006; NEVES et al., 2008).

Os resultados demonstraram que o tratamento *in vitro* com o  $\text{Cd}^{2+}$  foi capaz de reduzir a viabilidade em fatias de hipocampo de ratos imaturos. Entretanto, esta redução na viabilidade não foi acompanhada por uma permeabilização da membrana celular, tendo em vista que o conteúdo total de LDH liberado pelas fatias não foi alterado. Corroborando com este achado, os níveis de incorporação de IP também não foram alterados pela exposição ao metal. Sendo assim, estes resultados indicam que em fatias hipocampais de ratos imaturos, o  $\text{Cd}^{2+}$  possui um rápido efeito intracelular mitocondrial (evidenciado pelo método do MTT), o qual não foi acompanhado de dano à membrana celular. Nossos resultados estão de acordo com dados prévios da literatura que demonstram que estes métodos possuem diferentes perfis de tempo (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006). Fotakis e Timbrell (2006) demonstraram que o método do MTT é mais sensível para detectar uma toxicidade precoce do  $\text{Cd}^{2+}$  quando comparado com o método de dosagem de LDH, que é apenas capaz de revelar toxicidade após longos períodos de incubação.

Durante o período de mielinização e sinaptogênese, que ocorre em torno do 10º ao 14º dia após o nascimento, há um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (KHAN e BLACK, 2003). Neurônios são especialmente susceptíveis a condições pró-oxidantes por possuírem muitas mitocôndrias e um metabolismo basicamente aeróbico o que facilita a geração de ERO (MONROE e HALVORSEN, 2006). O  $\text{Cd}^{2+}$  possui uma capacidade proeminente *in vivo* e *in vitro* de gerar estresse oxidativo em diferentes tipos celulares, incluindo neurônios (STOHS e BAGCHI, 1995; WANG et al., 2004; LOPEZ et al., 2006; POLIANDRI et al., 2006). Mesmo não sendo capaz de participar de reações redox clássicas como a reação de Fenton (STOHS e BAGCHI, 1995; WAALKES, 2003;) o  $\text{Cd}^{2+}$  é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) através da inibição seletiva da

cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias (STOHS e BAGCHI, 1995; WAALKES, 2003; LOPEZ et al., 2006; POLIANDRI et al., 2006). Desta forma, nossos achados em conjunto sugerem a mitocôndria como um possível alvo da citotoxicidade aguda desse metal.

O tratamento com  $\text{Cd}^{2+}$  não foi capaz de alterar significativamente os níveis totais de GSH. Além disso, um aumento na capacidade anti-oxidante das fatias proporcionando por um aumento significativo na quantidade de GSH, promovido pela pré-incubação das fatias hipocâmpais com a forma permeável da glutathiona (GSH-monoetilester), não foi capaz de reverter os efeitos citotóxicos do  $\text{Cd}^{2+}$ . Enquanto que a co-incubação com o tripeptídeo  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina (glutathiona; GSH) foi capaz de reverter parcialmente os efeitos do metal sobre a viabilidade das fatias hipocâmpais de ratos imaturos. Estes dados corroboram com a possibilidade, já bem demonstrada em outros trabalhos, de que o  $\text{Cd}^{2+}$  esteja sendo quelado pela GSH, reduzindo a concentração de metal livre e diminuindo assim sua toxicidade (PERRIN e WATT, 1971; JUMARIE et al., 2001; LEVERRIER et al., 2007).

O tratamento com o  $\text{Cd}^{2+}$  por 3 horas, também foi capaz de aumentar, de uma forma geral, a fosforilação protéica sobre resíduos de tirosina. Sabe-se que a fosforilação em resíduos de tirosina representa um papel importante na transdução de sinal, regulação do ciclo celular, proliferação celular e diferenciação (SUN e TONKS, 1994; GOZIN et al., 1998; HUNTER, 1998). Sendo assim, uma desregulação nos níveis de fosforilação destes resíduos, principalmente um aumento, estão diretamente ligados a uma sinalização celular aberrante, crescimento descontrolado em cultura, e desenvolvimento de câncer in vivo

(SUN e TONKS, 1994; HUNTER, 1998, LEONARD et al., 2004). Neste sentido, deve ser lembrado que existe uma grande diversidade de tirosinas cinases incluindo receptores para fatores neurotróficos e citocinas, bem como tirosinas cinases solúveis que de uma forma geral podem se autofosforilar, além de participarem de cascatas que conduzem a fosforilação de diversos substratos (LAU e HUGANIR, 2006). Deve ser ainda salientado que alguns metais e/ou o próprio estresse oxidativo podem inativar tirosinas fosfatases, o que poderia corroborar com um aumento nos níveis de fosfotirosina sobre uma diversidade de proteínas (DENU e TANNER, 1998).

O  $\text{Cd}^{2+}$  (5-200  $\mu\text{M}$ ) foi também capaz de ativar especificamente  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  e ERK1/2, sem alterar os perfis de fosforilação de JNK e AKT (serina-473).

A inibição da via de ERK1/2 pelo inibidor de MEK, PD98059, não foi capaz de alterar o efeito do  $\text{Cd}^{2+}$  sobre a viabilidade. No entanto, a inibição da  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  por seu inibidor específico, SB203580, potencializou o efeito tóxico do tratamento por 3 h com  $\text{Cd}^{2+}$ , quando comparado com seu análogo inativo, SB202474. Os inibidores individualmente não alteraram a viabilidade das fatias.

As proteínas ERK1/2 estão relacionadas com eventos transcricionais e de plasticidade sináptica neuronal como a potenciação de longa duração (LTP), depressão de longa duração (LTD) e memória (NORMAN et al., 2000; SWEAT, 2004; THOMAS e HUGANIR, 2004). A ativação de ERK1/2 pelo  $\text{Cd}^{2+}$  foi bem documentada em diversos modelos celulares (HUNG et al., 1998; GÁLAN et al., 2000, HIRANO et al., 2005, LEAL et al., 2007). Além disso, o  $\text{Cd}^{2+}$  pode influenciar a neurotransmissão (MINAMI et al., 2001) e diversos parâmetros neurocomportamentais incluindo déficit de memória (ALI et

al., 1986; LUKAWSKI et al., 2005). Baseado no papel da via de ERK1/2 na regulação da neurotransmissão e neuroplasticidade supõe-se que uma perturbação desta via de sinalização pode ser importante no efeito deletério do  $\text{Cd}^{2+}$  na neurotransmissão e plasticidade neural.

O papel da  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  durante o desenvolvimento, diferenciação, proteção celular e morte celular tem sido demonstrado (MIELKE e HERDEGEN, 2000; TAKEDA e ICHIJO, 2002). Desta forma, a fosforilação de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  observada nas fatias de hipocampo de ratos imaturos expostas ao  $\text{Cd}^{2+}$  poderia ser vista inicialmente como uma reação ao estresse provocado pelo metal, com consequências deletérias ou protetoras.

A morte celular induzida pelo  $\text{Cd}^{2+}$  via ativação da via de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  foi documentada em diversos tipos celulares incluindo pró-monócitos (GÁLAN et al., 2000) e células do epitélio pulmonar (LAG et al., 2005). Entretanto, nossos resultados sugerem que a ativação de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  em fatias de hipocampus de ratos imaturos (PN14) pode fazer parte de um mecanismo de defesa contra a neurotoxicidade induzida pelo  $\text{Cd}^{2+}$ , já que a inibição desta proteína cinase pelo SB203580 potencializou o efeito neurotóxico do  $\text{Cd}^{2+}$ , medido pela redução do MTT.

Existem alguns exemplos em que a ativação de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  está associada com sobrevivência celular, bem como respostas anti-citotóxicas e anti-apoptóticas em modelos de culturas celulares (NISHINA et al., 1997; NEMOTO et al., 1998). Em hipocampo de rato, foi demonstrado que a ativação de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  exerceu um papel importante no mecanismo de neuroproteção induzida por pré-condicionamento isquêmico (SUN et al., 2006). Fatias hipocampais submetidas *in vitro* ao estresse hiperosmótico por 3 h apresentaram ativação de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  e fosforilação de um de seus alvos, a proteína de choque

térmico de 27 kDa (Hsp27), integrando assim um mecanismo de defesa em resposta ao estresse das fatias hipocâmpais (NISWANDER e DOKAS, 2006).

A JNK está associada com a indução de morte celular e regulação do desenvolvimento (MIELKE e HERDEGEN, 2000). Já a AKT é uma proteína quinase conhecida por promover a sobrevivência celular através da fosforilação de diversos alvos, conduzindo à inibição de vias apoptóticas (LIZCANO et al., 2000; BRAZIL et al., 2001; MASTERS et al., 2001). Além do aspecto relacionado à neuroproteção, deve também ser considerado que a via PI3K/AKT também pode estar envolvida na modulação de fenômenos de neuroplasticidade como LTD e LTP (HOU e KLANN, 2004; VAN DER HEIDE et al., 2005). O  $\text{Cd}^{2+}$  é capaz de ativar JNK e AKT em carcinoma de células de tireóide (LIU et al., 2007), em linhagem de células prostáticas 1LN (MISRA et al., 2003) e células COS-7 (KONISHI et al., 1997). Entretanto, estas vias de sinalização não foram modificadas nas fatias hipocâmpais após o tratamento com  $\text{Cd}^{2+}$  por 3 h.

De uma forma geral, nossos estudos mostraram que o  $\text{Cd}^{2+}$  interfere nas vias da  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  e ERK1/2, aparentemente sem alterar as vias de JNK e PI3K/AKT, em hipocampo de ratos imaturos, em um importante período de desenvolvimento (PN14). Esta modulação pelo  $\text{Cd}^{2+}$  de importantes vias de sinalização celular durante o período pós-natal de desenvolvimento cerebral rápido contribuem para a compreensão dos aspectos neuroquímicos envolvidos na toxicidade deste metal em um modelo de fatias hipocâmpais, que preservam, pelo menos parcialmente, a interação entre os tipos celulares (astrócito, neurônio, microglia) e matriz extracelular.

## 6 CONCLUSÃO

O presente trabalho nos permite concluir os seguintes aspectos:

- ✓ O  $\text{Cd}^{2+}$  reduziu a viabilidade celular de fatias hipocâmpais de ratos imaturos. Esta redução de viabilidade foi primeiramente evidenciada pela diminuição na capacidade celular de redução do MTT, sem alteração na liberação de LDH e na incorporação de IP.
- ✓ Níveis intracelulares aumentados de GSH não foram capazes de reverter ou mesmo atenuar o efeito citotóxico do cádmio. Entretanto, a co-incubação de GSH com  $\text{Cd}^{2+}$  foi capaz de reverter parcialmente o efeito do metal pesado sobre fatias de hipocampo de ratos imaturos. Isso sugere um possível efeito quelante de GSH.
- ✓ Concentrações elevadas de  $\text{Cd}^{2+}$  (100 – 200  $\mu\text{M}$ ) aumentaram a fosforilação protéica geral sobre resíduos de tirosina.
- ✓ O  $\text{Cd}^{2+}$  foi capaz de aumentar a fosforilação de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  e ERK1/2, sem alterar o perfil de fosforilação de JNK e AKT.
- ✓ A via de sinalização de ERK1/2 não parece estar diretamente envolvida na queda da viabilidade provocada pelo metal, tendo em vista que a utilização do inibidor PD98059 não foi capaz de alterar a citotoxicidade provocada pelo metal.
- ✓ A via de sinalização de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  parece estar exercendo um papel protetor frente ao insulto provocado pelo  $\text{Cd}^{2+}$  em fatias hipocâmpais de ratos imaturos, tendo em vista

que o inibidor desta cinase (SB203580) potencializou o efeito deletério do metal, quando comparado com o análogo inativo (SB202474) desta mesma enzima.

## 7 PERSPECTIVAS

O presente trabalho abriu novas portas e levantou novos questionamentos, que são apresentadas como perspectivas futuras:

- ✓ Determinar o tipo de morte celular ocorrida nas fatias hipocâmpais;
- ✓ Determinar o tipo celular envolvido nas alterações bioquímicas provocadas pelo tratamento com o  $\text{Cd}^{2+}$ ;
- ✓ Determinar o efeito do cádmio sobre a atividade de proteínas fosfatases;
- ✓ Determinar o efeito do cádmio sobre a atividade das enzimas mitocondriais;
- ✓ Avaliar possíveis alterações na fosforilação de Hsp27 nas fatias hipocâmpais tratadas com  $\text{Cd}^{2+}$ ;
- ✓ Avaliar a liberação de caspases nas fatias hipocâmpais tratadas com o  $\text{Cd}^{2+}$ ;

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERBOOM, T.P. and SIES, H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77, 373-382.
- ALI, M.M., MURTHY, R.C. and CHANDRA, S.V. 1986. Developmental and longterm neurobehavioral toxicity of low level in-utero cadmium exposure in rats. *Neurobehav Toxicol Teratol* 8, 463-468.
- BASHA, M.R., WEI, W., BAKHEET, S.A., BENITEZ, N., SIDDIQI, H.K., GE, Y.W., LAHIRI, D.K. and ZAWIA, N.H. 2005. The fetal basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and beta-amyloid in the aging brain. *J Neurosci* 25, 823-829.
- BRANA, C., BENHAM, C. and SUNDSTROM, L. 2002. A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. *Brain Res Brain Res Protoc* 10, 109-114.
- BRAZIL, D.P. and HEMMINGS, B.A. 2001. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26, 657-664.
- CHANDRA, S.V., MURTHY, R.C. and ALI, M.M. 1985. Cadmium-induced behavioral changes in growing rats. *Ind Health* 23, 159-162.
- CHANG, L. and KARIN, M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- CHAO, J.I. and YANG, J.L. 2001. Opposite roles of ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in cadmium-induced genotoxicity and mitotic arrest. *Chem Res Toxicol* 14, 1193-1202.
- CHEN, Z., GIBSON, T.B., ROBINSON, F., SILVESTRO, L., PEARSON, G., XU, B., WRIGHT, A., VANDERBILT, C. and COBB, M.H. 2001. MAP kinases. *Chem Rev* 101, 2449-2476.
- CHU, C.T., LEVINTHAL, D.J., KULICH, S.M., CHALOVICH, E.M. and DEFRANCO, D.B. 2004. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur J Biochem* 271, 2060-2066.
- CHUANG, S.M., WANG, I.C., HWUA, Y.S. and YANG, J.L. 2003. Short-term depletion of catalase suppresses cadmium-elicited c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis: role of protein phosphatases. *Carcinogenesis* 24, 7-15.
- CHUANG, S.M., WANG, I.C. and YANG, J.L. 2000. Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium. *Carcinogenesis* 21, 1423-1432.
- COBB, M.H. and GOLDSMITH, E.J. 1995. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270, 14843-14846.

- CORDOVA, F.M. 2002. Vias de sinalização celular no hipocampo envolvidas na resposta ao estresse produzida por chumbo e cádmio. Pós-Graduação em Neurociência. UFSC, Florianópolis, p. 116.
- CORDOVA, F.M., RODRIGUES, A.L., GIACOMELLI, M.B., OLIVEIRA, C.S., POSSER, T., DUNKLEY, P.R. and LEAL, R.B. 2004. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res* 998, 65-72.
- COSTA, L.G., ASCHNER, M., VITALONE, A., SYVERSEN, T. and SOLDIN, O.P. 2004. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 87-110.
- COWAN, K.J. and STOREY, K.B. 2003. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* 206, 1107-1115.
- DENU, J.M. and TANNER, K.G. 1998. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37, 5633-5642.
- FALNOGA, I., TUSEK-ZNIDARIC, M., HORVAT, M. and STEGNAR, P. 2000. Mercury, selenium, and cadmium in human autopsy samples from Idrija residents and mercury mine workers. *Environ Res* 84, 211-218.
- FOTAKIS, G. and TIMBRELL, J.A. 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160, 171-177.
- GALAN, A., GARCIA-BERMEJO, M.L., TROYANO, A., VILABOIA, N.E., DE BLAS, E., KAZANIETZ, M.G. and 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.
- GARRIDO, N., PREGOLATO, N., LUCHESE, E., GALLI, D. and TOLEDO, E. 1983. Análise de qualidade e sugestões de norma para análise de chupetas, mordedores e outros artigos de uso infantil. *Rev Inst Adolfo Lutz* 43, 41-46.
- GONG, C.X., LIDSKY, T., WEGIEL, J., GRUNDKE-IQBAL, I. and IQBAL, K. 2001. Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain. *Brain Res Brain Res Protoc* 6, 134-140.
- GOTTI, C., CABRINI, D., SHER, E. and CLEMENTI, F. 1987. Effects of long-term in vitro exposure to aluminum, cadmium or lead on differentiation and cholinergic receptor expression in a human neuroblastoma cell line. *Cell Biol Toxicol* 3, 431-440.
- GOYER, R.A. 1990. Lead toxicity: from overt to subclinical to subtle health effects. *Environ Health Perspect* 86, 177-181.
- GOZIN, A., FRANZINI, E., ANDRIEU, V., DA COSTA, L., ROLLET-LABELLE, E. and PASQUIER, C. 1998. Reactive oxygen species activate focal adhesion kinase, paxillin

- and p130cas tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 25, 1021-1032.
- GRANDJEAN, P. and LANDRIGAN, P.J. 2006. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 368, 2167-2178.
- GREENGARD, P. 2001. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294, 1024-1030.
- GU, Z., JIANG, Q. and ZHANG, G. 2001. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in hippocampus after cerebral ischemia may not interfere with postischemic cell death. *Brain Res* 901, 79-84.
- HART, R.P., ROSE, C.S. and HAMER, R.M. 1989. Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. *J Clin Exp Neuropsychol* 11, 933-943.
- HIRANO, S., SUN, X., DEGUZMAN, C.A., RANSOM, R.F., MCLEISH, K.R., SMOYER, W.E., SHELDEN, E.A., WELSH, M.J. and BENNDORF, R. 2005. p38 MAPK/HSP25 signaling mediates cadmium-induced contraction of mesangial cells and renal glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F1133-1143.
- HOU, L. and KLANN, E. 2004. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* 24, 6352-6361.
- HUNG, J.J., CHENG, T.J., LAI, Y.K. and CHANG, M.D. 1998. 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. 1998. The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *Harvey Lect* 94, 81-119.
- HUNTER, T. 2000. Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100, 113-127.
- IARC. 1993. International Agency for Research on Cancer Monographs, Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Industry. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 119-238.
- IRVING, E.A., BARONE, F.C., REITH, A.D., HADINGHAM, S.J. and 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. and 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.
- JOHNSON-FARLEY, N.N., TRAVKINA, T. and COWEN, D.S. 2006. Cumulative activation of akt and consequent inhibition of glycogen synthase kinase-3 by brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 316, 1062-1069.

- JUMARIE, C., FORTIN, C., HOUDE, M., CAMPBELL, P.G. and DENIZEAU, F. 2001. Cadmium uptake by Caco-2 cells: effects of Cd complexation by chloride, glutathione, and phytochelatins. *Toxicol Appl Pharmacol* 170, 29-38.
- KHAN, J.Y. and BLACK, S.M. 2003. Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes. *Pediatr Res* 54, 77-82.
- KIM, S.D., MOON, C.K., EUN, S.Y., RYU, P.D. and JO, S.A. 2005. Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 326-334.
- KIM, Y., SEGER, R., SURESH BABU, C.V., HWANG, S.Y. and YOO, Y.S. 2004. A positive role of the PI3-K/Akt signaling pathway in PC12 cell differentiation. *Mol Cells* 18, 353-359.
- KLAUNIG, J.E. and KAMENDULIS, L.M. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 239-267.
- KONISHI, H., MATSUZAKI, H., TANAKA, M., TAKEMURA, Y., KURODA, S., ONO, Y. and KIKKAWA, U. 1997. Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Lett* 410, 493-498.
- LAG, M., REFSNES, M., LILLEAAS, E.M., HOLME, J.A., BECHER, R. and SCHWARZE, P.E. 2005. Role of mitogen activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells. *Toxicology* 211, 253-264.
- LAU, L.-F. and HUGANIR, R. 2006. Tyrosine Phosphorylation. In: SIEGEL, G.J., Ed. *Basic Neurochemistry*. ELSEVIER, Maywood, Illinois.
- LEAL, R.B., CORDOVA, F.M., HERD, L., BOBROVSKAYA, L. and DUNKLEY, P.R. 2002. Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol* 178, 44-51.
- LEAL, R.B., GONCALVES, C.A. and RODNIGHT, R. 1997. Calcium-dependent phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the rat hippocampus: a comparison of the kinase/phosphatase balance in immature and mature slices using tryptic phosphopeptide mapping. *Brain Res Dev Brain Res* 104, 1-10.
- LEAL, R.B., POSSER, T., RIGON, A.P., OLIVEIRA, C.S., GONCALVES, C.A., GELAIN, D.P. and DUNKLEY, P.R. 2007. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology* 234, 34-43.
- LENZI, E., RAUBER, T., LUCHESE, E., GALLI, D. and TOLEDO, E. 1990. Determinação do cádmio em materiais consumidos pelo ser humano. *Arq Biol Tecnol* 33, 179-194.
- LEONARD, S.S., HARRIS, G.K. and SHI, X. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 37, 1921-1942.

- LEVERRIER, P., MONTIGNY, C., GARRIGOS, M. and CHAMPEIL, P. 2007. Metal binding to ligands: cadmium complexes with glutathione revisited. *Anal Biochem* 371, 215-228.
- LIU, Y., PETERSON, D.A., KIMURA, H. and SCHUBERT, D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69, 581-593.
- LIU, Z.M., CHEN, G.G., VLANTIS, A.C., TSE, G.M., SHUM, C.K. and VAN HASSELT, C.A. 2007. Calcium-mediated activation of PI3K and p53 leads to apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Cell Mol Life Sci* 64, 1428-1436.
- LIZCANO, J.M., MORRICE, N. and COHEN, P. 2000. Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem J* 349, 547-557.
- LOPEZ, E., ARCE, C., OSET-GASQUE, M.J., CANADAS, S. and GONZALEZ, M.P. 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic Biol Med* 40, 940-951.
- LUKAWSKI, K., NIERADKO, B. and SIEKLUCKA-DZIUBA, M. 2005. Effects of cadmium on memory processes in mice exposed to transient cerebral oligemia. *Neurotoxicol Teratol* 27, 575-584.
- MARTIN-BLANCO, E. 2000. p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *Bioessays* 22, 637-645.
- MASTERS, S.C., YANG, H., DATTA, S.R., GREENBERG, M.E. and FU, H. 2001. 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Mol Pharmacol* 60, 1325-1331.
- MATA, L., PEREZ, M., PUYOL, P. and CALVO, M. 1995. Distribution of added lead and cadmium in human and bovine milk. *J Food Protect* 58, 305-309.
- MIELKE, K., BRECHT, S., DORST, A. and HERDEGEN, T. 1999. Activity and expression of JNK1, p38 and ERK kinases, c-Jun N-terminal phosphorylation, and c-jun promoter binding in the adult rat brain following kainate-induced seizures. *Neuroscience* 91, 471-483.
- MIELKE, K. and HERDEGEN, T. 2000. JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol* 61, 45-60.
- MINAMI, A., TAKEDA, A., NISHIBABA, D., TAKEFUTA, S. and OKU, N. 2001. Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. *Brain Res* 894, 336-339.
- MISRA, U.K., GAWDI, G. and PIZZO, S.V. 2003. Induction of mitogenic signalling in the ILN prostate cell line on exposure to submicromolar concentrations of cadmium+. *Cell Signal* 15, 1059-1070.
- MONROE, R.K. and HALVORSEN, S.W. 2006. Cadmium blocks receptor-mediated Jak/STAT signaling in neurons by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 41, 493-502.

- MOREIRA, E.G., ROSA, G.J., BARROS, S.B., VASSILIEFF, V.S. and VASSILLIEFF, I. 2001. Antioxidant defense in rat brain regions after developmental lead exposure. *Toxicology* 169, 145-151.
- MURATA, H., IHARA, Y., NAKAMURA, H., YODOI, J., SUMIKAWA, K. and KONDO, T. 2003. Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *J Biol Chem* 278, 50226-50233.
- MURPHY, L.O. and BLENIS, J. 2006. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31, 268-275.
- NEMOTO, S., XIANG, J., HUANG, S. and LIN, A. 1998. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273, 16415-16420.
- NERI, L.M., BORGATTI, P., CAPITANI, S. and MARTELLI, A.M. 2002. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim Biophys Acta* 1584, 73-80.
- NEVES, G., COOKE, S.F. and BLISS, T.V. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9, 65-75.
- NISHINA, H., FISCHER, K.D., RADVANYI, L., SHAHINIAN, A., HAKEM, R., RUBIE, E.A., BERNSTEIN, A., MAK, T.W., WOODGETT, J.R. and PENNINGER, J.M. 1997. Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* 385, 350-353.
- NISWANDER, J.M. and DOKAS, L.A. 2006. Phosphorylation of HSP27 and synthesis of 14-3-3epsilon are parallel responses to hyperosmotic stress in the hippocampus. *Brain Res* 1116, 19-30.
- NORMAN, E.D., THIELS, E., BARRIONUEVO, G. and KLANN, E. 2000. Long-term depression in the hippocampus in vivo is associated with protein phosphatase-dependent alterations in extracellular signal-regulated kinase. *J Neurochem* 74, 192-198.
- OKUDA, B., IWAMOTO, Y., TACHIBANA, H. and SUGITA, M. 1997. Parkinsonism after acute cadmium poisoning. *Clin Neurol Neurosurg* 99, 263-265.
- PARK, R., KIM, M.S., SO, H.S., JUNG, B.H., MOON, S.R., CHUNG, S.Y., KO, C.B., KIM, B.R. and CHUNG, H.T. 2000. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Biochem Pharmacol* 60, 1685-1691.
- PERRIN, D.D. and WATT, A.E. 1971. Complex formation of zinc and cadmium with glutathione. *Biochim Biophys Acta* 230, 96-104.
- 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.
- POLIANDRI, A.H., MACHIAVELLI, L.I., QUINTEROS, A.F., CABILLA, J.P. and DUVILANSKI, B.H. 2006. Nitric oxide protects the mitochondria of anterior pituitary

- cells and prevents cadmium-induced cell death by reducing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 40, 679-688.
- ROBINSON, M.J. and COBB, M.H. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9, 180-186.
- ROCKWELL, P., MARTINEZ, J., PAPA, L. and GOMES, E. 2004. Redox regulates COX-2 upregulation and cell death in the neuronal response to cadmium. *Cell Signal* 16, 343-353.
- RODNIGHT, R., ZAMANI, R. and TWEEDALE, A. 1988. An investigation of experimental conditions for studying protein phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. *J Neurosci Methods* 24, 27-38.
- ROMAN, T.R.N., LIMA, É.G.D., AZOUBEL, R. and BATIGÁLIA, F. 2002. Toxicidade do Cádmiu no Homem. *HB Científica* 9, 43-48.
- RPA. 2000. The Risks to Health and Environment by Cadmium used as a Colouring Agent or a Stabiliser in Polymers and for Metal Plating. In: LIMITED, R.P.A., Ed. European Commission, DG Enterprise.
- SANTOS, F.W., ZENI, G., ROCHA, J.B., WEIS, S.N., FACHINETTO, J.M., FAVERO, A.M. and NOGUEIRA, C.W. 2005. Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem Biol Interact* 151, 159-165.
- SEGER, R. and KREBS, E.G. 1995. The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9, 726-735.
- STOHS, S.J. and BAGCHI, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18, 321-336.
- SUN, H. and TONKS, N.K. 1994. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* 19, 480-485.
- SUN, X.C., LI, W.B., LI, Q.J., ZHANG, M., XIAN, X.H., QI, J., JIN, R.L. and LI, S.Q. 2006. Limb ischemic preconditioning induces brain ischemic tolerance via p38 MAPK. *Brain Res* 1084, 165-174.
- SWEATT, J.D. 2001. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76, 1-10.
- SWEATT, J.D. 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14, 311-317.
- TAKEDA, K. and ICHIJO, H. 2002. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7, 1099-1111.
- TAKENAKA, K., MORIGUCHI, T. and NISHIDA, E. 1998. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. *Science* 280, 599-602.
- THOMAS, G.M. and HUGANIR, R.L. 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5, 173-183.

- TIETZE, F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27, 502-522.
- VAN DER HEIDE, L.P., KAMAL, A., ARTOLA, A., GISPEN, W.H. and RAMAKERS, G.M. 2005. Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-d-aspartate receptor and phosphatidyl-inositol-3-kinase-dependent manner. *J Neurochem* 94, 1158-1166.
- VIAENE, M.K., MASSCHELEIN, R., LEENDERS, J., DE GROOF, M., SWERTS, L.J. and ROELS, H.A. 2000. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. *Occup Environ Med* 57, 19-27.
- WAALKES, M.P. 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res* 533, 107-120.
- WAISBERG, M., JOSEPH, P., HALE, B. and BEYERSMANN, D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95-117.
- WANG, Y., FANG, J., LEONARD, S.S. and RAO, K.M. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36, 1434-1443.
- WATJEN, W., HAASE, H., BIAGIOLI, M. and BEYERSMANN, D. 2002. Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 5, 865-867.
- XIAO, C., GU, Y., ZHOU, C.Y., WANG, L., ZHANG, M.M. and RUAN, D.Y. 2006. Pb<sup>2+</sup> impairs GABAergic synaptic transmission in rat hippocampal slices: a possible involvement of presynaptic calcium channels. *Brain Res* 1088, 93-100.
- YATES, E. 1992. The world needs cadmium - a miner's viewpoint. In: COOK, M., Ed., *Cadmium 92*. Cadmium Association, London, pp. 1-7.