

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

**EFEITOS DO DITELURETO DE DIFENILA SOBRE O  
CITOESQUELETO DE ASTRÓCITOS CORTICAIS DE RATOS**

**Fernanda Silva Ferreira**

Porto Alegre, novembro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

**EFEITOS DO DITELURETO DE DIFENILA SOBRE O  
CITOESQUELETO DE ASTRÓCITOS CORTICAIS DE RATOS**

**Fernanda Silva Ferreira**

**Orientadora: Profa. Dra. Regina Pessoa Pureur**

**Co-orientadora: Dra. Luana Heimfarth**

Porto Alegre, novembro de 2014

## RESUMO

O telúrio é um elemento raro utilizado principalmente em escala industrial. Pode ser encontrado na sua forma nativa e em formas orgânicas e inorgânicas. Estudos demonstraram que compostos orgânicos do telúrio têm efeitos neurotóxicos, entre eles o ditelureto de difenila [(PhTe)<sub>2</sub>]. Este composto causa importantes alterações no SNC, podendo romper o equilíbrio do nível de fosforilação dos filamentos intermediários (FIs) de células neurais *in vivo* e *in vitro*. Inicialmente, culturas primárias de astrócitos foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de (PhTe)<sub>2</sub> por 24 ou 48 horas e os ensaios de viabilidade (MTT) e morte (Anexina-PI) celular foram realizados, e indicaram que ocorre alteração da viabilidade celular de maneira dose e tempo dependente. Os resultados de fosforilação *in vitro* dos FIs mostraram que astrócitos primários expostos a 0,1 μM de (PhTe)<sub>2</sub> durante 24 horas apresentavam hiperfosforilação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e vimentina, FIs expressos em astrócitos primários. A utilização de inibidores específicos das principais cinases que fosforilam sítios no domínio N-terminal da GFAP (H89 inibidor da PKA e estaurosporina inibidor da PKC) mostrou que tanto a PKA como a PKC são responsáveis pela hiperfosforilação mediada por (PhTe)<sub>2</sub>. Além disso, o uso de antagonistas específicos para os receptores glutamatérgicos ionotrópicos tipo NMDA (DL-AP5) e não NMDA (CNQX), bem como metabotrópicos (MCPG), mostraram que esse efeito é mediado pelo sistema glutamatérgico. Sabe-se que o rompimento da homeostase do sistema fosforilante associado aos FIs causa desregulação de seu equilíbrio de associação/desassociação, comprometendo a dinâmica de outros componentes do citoesqueleto. Estudos citoquímicos com faloidina-actina mostraram um aumento das fibras de estresse nos astrócitos tratados com (PhTe)<sub>2</sub>. Como a desorganização do citoesqueleto pode levar a uma disfunção celular, os presentes resultados contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na intoxicação com (PhTe)<sub>2</sub>, demonstrando que possivelmente, há um envolvimento do citoesqueleto nos mecanismos de neurotoxicidade desse composto.

## ABSTRACT

Tellurium is a rare element mainly used on an industrial scale. In nature, this element can be found in native form or in organic and inorganic forms. Studies have shown that organic compounds of tellurium, including the diphenyl ditelluride [(PhTe)<sub>2</sub>], have neurotoxic effects. This compound causes important changes in the CNS, which can upset the balance in the level of phosphorylation of intermediate filaments (IFs) of neural cells *in vivo* and *in vitro*. In the present study, initially, primary astrocytes were treated with (PhTe)<sub>2</sub> at different concentrations for 24 or 48 hr and testing for viability (MTT) and cell death (Annexin-PI). The tests indicated that cell viability was altered in a dose- and time-dependent manner. The results of *in vitro* phosphorylation of IFs showed that primary astrocytes exposed to 0,1 μM (PhTe)<sub>2</sub> for 24 hours showed hyperphosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin, IFs expressed in primary astrocytes. The use of specific inhibitors of kinases that phosphorylate main sites at the N-terminus of GFAP (H89 inhibitor of PKA and staurosporine inhibitor of PKC) showed that both PKA and PKC are responsible for hyperphosphorylation mediated by (PhTe)<sub>2</sub>. Furthermore, the use of specific antagonists of NMDA type glutamate ionotropic receptors (DL-AP5) and non-NMDA (CNQX) and metabotropic (MCPG) glutamate receptors showed that this effect is mediated by the glutamatergic system. It is known that disruption of homeostasis associated with the FI phosphorylating system cause disruption of association/disassociation, affecting the dynamics of other components of the cytoskeleton. Cytochemistry and immunocytochemistry studies with phalloidin-actin showed an increase in stress fibers in astrocytes treated with (PhTe)<sub>2</sub>, otherwise, immunocytochemical studies with Anti-GFAP antibody showed unaltered GFAP organization in cytoplasm. As the disruption of the cytoskeleton network can lead to cellular dysfunction, the present results contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the intoxication with (PhTe)<sub>2</sub>, demonstrating that possibly there is an involvement of the cytoskeleton in the mechanisms of neurotoxicity of this compound.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPA (R,S) $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate
- FI Filamentos intermediários
- FITC Isotiocianato de fluoresceína
- GFAP Proteína glial fibrilar ácida
- mGluR Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
- NMDA N-metil-D-aspartato
- (PhTe)<sub>2</sub> Ditelureto de difenila
- PKA Proteína cinase A
- PKC Proteína cinase C
- PI Iodeto de propídio
- SNC Sistema nervoso central
- Vim Vimentina

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Representação esquemática do citoesqueleto. **9**
- Figura 2 Análise da viabilidade celular pela técnica de MTT em astrócitos primários tratados por 24 e 48 horas com  $(\text{PhTe})_2$ . **20**
- Figura 3 Análise da viabilidade celular, pela técnica de anexina V-FITC/Pi, em cultura de astrócitos tratadas por 24 horas com  $(\text{PhTe})_2$ . **21**
- Figura 4 Efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre a fosforilação de GFAP e vimentina. **22**
- Figura 5 Efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre o imunoconteúdo de GFAP e vimentina. **23**
- Figura 6 Efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre a fosforilação de GFAP e vimentina na presença ou ausência de inibidores de cinases. **24**
- Figura 7 Efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre a fosforilação de GFAP e vimentina na presença ou ausência de inibidores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos. **25**
- Figura 8 Efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre a fosforilação de GFAP e vimentina na presença ou ausência de antagonistas de receptores glutamatérgicos metabotrópicos. **25**
- Figura 9 Efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre a morfologia celular de astrócitos corticais. **26**

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>7</b>
1.1	Telúrio	7
1.1.2	Ditelureto de difenila	8
1.2	Citoesqueleto	8
1.2.1	Filamentos intermediários	10
1.2.1.1	Proteína glial fibrilar ácida	10
1.3	Fosforilação de proteínas	11
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>13</b>
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>14</b>
3.1	Animais	14
3.2	Reagentes	14
3.3	Metodologia	14
3.3.1	Cultura primária de astrócitos	14
3.3.2	Tratamento das culturas com ditelureto de difenila	15
3.3.3	Viabilidade celular	15
3.3.3.1	Anexina V-FITC	15
3.3.3.2	MTT	16
3.3.4	Fosforilação dos filamentos intermediários do citoesqueleto	16
3.3.4.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-page)	17
3.3.5	Imunocitoquímica e citoquímica	17
3.3.6	Análise do imunoconteúdo das proteínas por <i>Western blot</i>	18
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>20</b>
4.1	Viabilidade celular	20
4.2	Fosforilação dos filamentos intermediários	21
4.3	Imunocitoquímica e citoquímica	26
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>31</b>
6.1	Conclusão geral	31
6.2	Conclusões específicas	31
<b>7</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>32</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Telúrio

O telúrio, assim como oxigênio, enxofre e selênio, pertence ao grupo 16 da tabela periódica, sendo um elemento raro, não essencial e em muitos casos, tóxico. Apesar do conhecimento prévio de sua toxicidade, os mecanismos responsáveis por essas ações são pouco conhecidos, pois o contato com essa substância é raro (Ba *et al.*, 2010). Os sinais clínicos de uma intoxicação aguda ao telúrio incluem gosto metálico, náuseas, vômito, mucosa oral e pele escura, odor de alho e lesões no trato gastrointestinal (Yarema e Curry, 2005)

Compostos com telúrio são utilizados ou produzidos em escala industrial na produção de aço, refino de metais pesados, síntese de fármacos e explosivos, na vulcanização da borracha, entre outros (Clayton e Clayton, 1981; Taylor, 1996). Atualmente, estão envolvidos na produção de diferentes tipos de materiais eletrônicos, como discos de DVD (Hardman, 2006; Klaine *et al.*, 2008; Ogra, 2009), o que demonstra a necessidade de maiores estudos a respeito de sua toxicidade, bem como a interação com outros metais e sua liberação no ambiente.

O telúrio pode ser encontrado na sua forma nativa, mas na maioria das vezes está na forma de telureto de ouro ou combinado a outros metais (Cooper, 1971). Também pode ser encontrado na forma elementar ( $\text{Te}^0$ ), inorgânica (telureto, telurato) e orgânica. Cada uma das formas possui toxicidade específica, sendo o telúrio inorgânico o mais tóxico enquanto o orgânico apresenta menor toxicidade, devido às diferentes propriedades farmacológicas e farmacocinéticas dos compostos e seus metabólitos no organismo (Ba *et al.*, 2010).

Tanto as formas orgânicas quanto as inorgânicas do telúrio apresentam alta toxicidade para o sistema nervoso central de roedores (Maciel *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2001; Widy-Tysiewicz *et al.*, 2002). Compostos de telúrio inibem a enzima escaleno monooxigenase, com conseqüente inibição da síntese de colesterol, provocando uma desmielinização transitória do sistema nervoso periférico. Isso provavelmente ocorre pela interação do telúrico com os resíduos cisteinil das proteínas (Laden e Porter, 2001).

### 1.1.2 Ditelureto de difenila

O ditelureto de difenila [(PhTe)<sub>2</sub>] é um composto orgânico derivado do telúrio, importante intermediário em reações de síntese orgânica. Dados sobre a possível toxicidade desse composto são controversos, mas estudos mostram que o ditelureto de difenila pode ser teratogênico em ratos, causando malformações, hidrocefalia e presença de cérebro exposto (Stangherlin *et al.*, 2006), além de ser capaz de alterar a funcionalidade de vários tecidos, como o sistema nervoso central (SNC) (Heimfarth *et al.*, 2008; Stangherlin *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2010).

Os efeitos neurotóxicos deste composto orgânico são bem descritos na literatura. O ditelureto de difenila causa efeitos tóxicos marcantes ao SNC de roedores tanto após uma exposição aguda ou prolongada (Maciel *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2001; Meotti *et al.*, 2003). Estudos têm demonstrado que ele pode modificar a funcionalidade do sistema glutamatérgico *in vivo* e *in vitro*, sendo capaz de alterar a homeostase do glutamato. Essa alteração do sistema glutamatérgico é dependente da idade do animal (Nogueira *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2010). Estudos *in vitro* com esse composto mostraram que ele é capaz de afetar a atividade de enzimas importantes para o funcionamento do SNC, como a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase cerebral, que é inibida por ele de maneira dependente da concentração (Borges *et al.*, 2005). Os danos neurotóxicos causados pelo composto orgânico do telúrio podem estar relacionados, pelo menos em parte, com alterações na função dos canais de cálcio da membrana plasmática (Moretto *et al.*, 2007).

## 1.2 Citoesqueleto

A capacidade das células em adotar uma variedade de formas e de executar determinados movimentos depende de uma rede complexa de filamentos de proteínas fibrosas que se estende por todo o citoplasma e é denominada citoesqueleto.

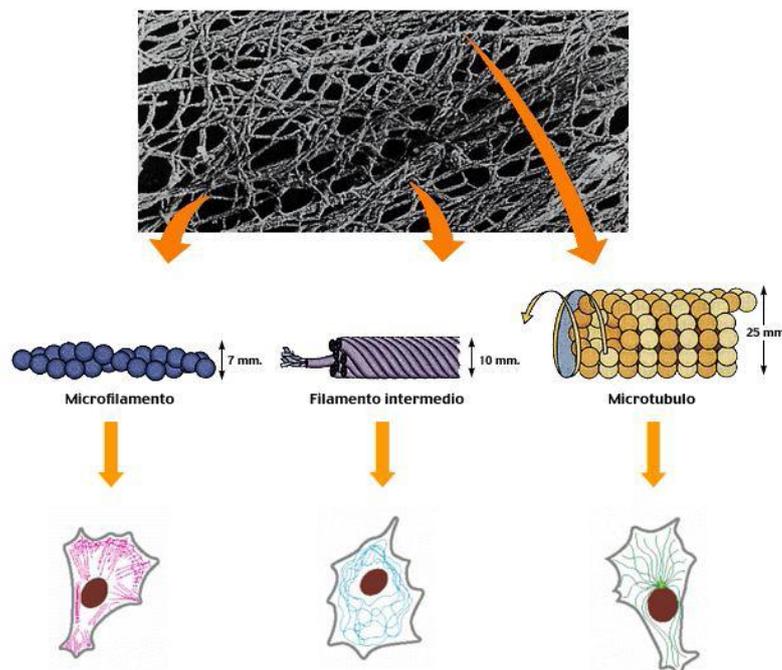
O citoesqueleto é uma estrutura altamente dinâmica que, em resposta a estímulos do ambiente, se reorganiza continuamente e leva a alteração da morfologia celular. É o responsável pelo deslocamento das células sobre um substrato, contração muscular, plasticidade, sobrevivência e morte celular, além de

fornecer a maquinaria necessária para movimentos intracelulares (Alberts *et al.*, 2002).

No SNC, as proteínas do citoesqueleto têm papel fundamental na criação e manutenção da morfologia de neurônios e astrócitos, participam da manutenção do calibre axonal, bem como de organelas e substâncias envolvidas na transmissão sináptica. (Kirkpatrick e Brady, 1999; Ackerley, 2000).

Por sua importância na manutenção da homeostase celular, o citoesqueleto está associado a diversas doenças neurodegenerativas e distúrbios psiquiátricos (Hirano, 1991; Lariviere e Julien, 2004).

As diferentes atividades do citoesqueleto dependem de três tipos de filamentos proteicos: filamentos de actina ou microfilamentos (MF), microtúbulos (MT), e filamentos intermediários (FI). Todos os filamentos são formados pela polimerização/associação de monômeros proteicos específicos. Os três tipos de filamentos proteicos do citoesqueleto têm a sua dinâmica regulada por uma grande variedade de mecanismos, incluindo famílias de proteínas associadas, fazendo com que o citoesqueleto forme uma estrutura altamente conectada e complexa, respondendo de forma coordenada a estímulos fisiológicos ou patológicos, sendo fundamental em todas as respostas celulares tanto no funcionamento normal da célula como nas respostas a agentes estressores (Alberts *et al.*, 2002).



**Figura 1:** representação esquemática do citoesqueleto. Adaptado de Alberts *et al.*, 2002

### **1.2.1 Filamentos intermediários**

Os filamentos intermediários (FI) são polímeros de proteínas fibrosas, com diâmetro aproximado de 10 nm. São filamentos longos que possuem subtipos específicos em diferentes tipos celulares, sendo utilizados como marcadores de diferenciação celular.

As principais funções dos FI são a manutenção da forma celular, integridade estrutural e organização do citoplasma, além de proteger a célula contra o estresse mecânico e não mecânico (Chou *et al.*, 1997; Omary e Ku, 1997). Além de funcionarem como integradores celulares, os FI são importantes alvos dos sistemas de sinalização celular, participando das respostas celulares à estímulos (Paramio e Jorcano, 2002; Chang e Goldman, 2004)

#### **1.2.1.1 Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)**

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é uma proteína estrutural de 50 kDa sintetizada nos astrócitos e em algumas células de Schwann (Kaneko *et al.*, 1995; Kosako *et al.*, 1997; Guo-Ross *et al.*, 1999). A GFAP é considerada marcador de astrócitos e é importante na modulação da motilidade e forma celular, fornecendo estabilidade estrutural a essas células. Além disso, a GFAP é importante para a interação astrócito-neurônio (McCall *et al.*, 1996; Eliasson *et al.*, 1999), participando do sistema de comunicação intercelular que pode regular a liberação de neurotransmissores, a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (Carmignoto, 2000).

No SNC, após uma injúria, os astrócitos tornam-se reativos e respondem de uma maneira típica denominada astrogliose, que é caracterizada por uma rápida síntese de GFAP (Eddleston *et al.*, 1993), sendo essa proteína, em muitos casos, utilizada como marcador de neurotoxicidade. Mudanças na expressão de GFAP podem alterar a morfologia dos astrócitos, o que pode afetar indiretamente outros tipos celulares e a estrutura cerebral como um todo (Middeldorp e Hol, 2011).

### 1.3 Fosforilação de proteínas

A fosforilação de proteínas é um processo reversível e dinâmico que desempenha um papel fundamental na regulação de diversas funções celulares, sendo o principal mecanismo utilizado no processo de transdução de sinal (Hunter, 1995). Através dessa modificação covalente, há uma regulação da função das proteínas em resposta a estímulos extracelulares (Nestler e Greengard, 1994), como por exemplo, neurotransmissores e hormônios. (Walaas e Greengard, 1991; Grant e Pant, 2000; Helfand *et al.*, 2005).

O grau de fosforilação de uma proteína alvo reflete um balanço entre as ações contrárias de proteínas cinases e fosfatases, integrando um conjunto de rotas de sinalização celular (Nestler e Greengard, 1994).

Os componentes do citoesqueleto estão entre as principais proteínas modificadas em resposta à maioria dos sinais extracelulares que determinam a morfologia celular (Sanchez *et al.*, 2000). Nos FI, a fosforilação é o principal mecanismo responsável pela sua modulação, contribuindo na organização e função dos mesmos (Grant e Pant, 2000; Omary *et al.*, 2006).

Os FI são fosforilados na região amino-terminal e carboxi-terminal. A fosforilação do domínio amino-terminal está relacionada com a capacidade de associação e desassociação dos FI, sendo controlada por cinases dependentes de segundos mensageiros (Sihag *et al.* 2007). Já no domínio carboxi-terminal, a fosforilação é realizada por cinases independentes de segundos mensageiros e tem implicações na interação dos filamentos com outras estruturas do citoesqueleto (Chou *et al.*, 1996, Grant e Pant, 2000).

Filamentos intermediários são substratos de inúmeras serina/treonina cinases, incluindo a proteína cinase C (PKC), a proteína cinase dependente de cálcio e calmodulina (PKCaMII), a proteína cinase dependente de AMPc (PKA), a família das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK), a proteína cinase dependente de ciclina 5 (CDK5), entre outras. Estas cinases possuem um papel significativo na regulação da estrutura e associação dos filamentos, bem na interação deles com outras proteínas (Eriksson *et al.*, 2004, Sihag *et al.*, 2007). Além disso, a ação dessas cinases nos FI é sítio-específica, sendo que o equilíbrio de

fosforilação/desfosforilação de cada sítio está relacionado com o equilíbrio de funções específicas dessas proteínas dentro da célula (Sihag *et al.*, 2007). Proteínas serina/treonina fosfatases como a proteína fosfatase 1 (PP1), e as proteínas fosfatases 2A (PP2A) e 2B (PP2B ou calcineurina) asseguram a reversibilidade da ação das proteínas cinases e também desempenham papel importante na regulação do citoesqueleto (Grant e Pant, 2000).

A fosforilação é o principal mecanismo regulatório dos FI e de outras proteínas do citoesqueleto, e alterações nos níveis fisiológicos de fosforilação destas proteínas são consideradas eventos críticos em patologias do SNC (Miller *et al.*, 2002), podendo levar a disfunções neurológicas e a perda da função, e conseqüentemente, a morte celular.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é investigar os efeitos causados pelo  $(\text{PhTe})_2$  sobre a fosforilação da GFAP e vimentina, os dois FI de astrócitos em cultura primária, identificando as proteínas cinases e os receptores glutamatérgicos envolvidos nesse efeito.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Determinar o efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre a viabilidade dos astrócitos corticais de ratos

2.2.2 Verificar o efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre a fosforilação dos FIs de astrócitos;

2.2.3 Verificar a influência do  $(\text{PhTe})_2$  no imunoconteúdo de FIs;

2.2.4 Verificar a participação de diferentes cinases sobre os efeitos do  $(\text{PhTe})_2$ ;

2.2.5 Verificar a participação de receptores glutamatérgicos na ação do  $(\text{PhTe})_2$  sobre os FIs de astrócitos em cultura;

2.2.6 Verificar o efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre a organização dos FIs e dos filamentos de actina nos astrócitos em cultura.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar recém nascidos (com idade de 0-1 dia), obtidos no Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O protocolo experimental seguiu o "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publicação 85-23, revisado 1985) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### 3.2 Reagentes

Ortofosfato de sódio radioativo ( $^{32}\text{P-Na}_2\text{PO}_4$ ) foi adquirido do CNEN, São Paulo, Brasil. Benzamidina, leupeptina, antipainá, pepstatina, quimostatina, acrilamida, bisacrilamida, anticorpos anti-GFAP e anti-vimentina foram obtidos a partir de Sigma (St. Louis, MO, EUA). Ditelureto de difenila foi sintetizado pelo Prof. João Batista Teixeira da Rocha da Universidade Federal de Santa Maria, utilizando o método descrito por Petraghani (1994), sendo dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) imediatamente antes da utilização. O soro fetal bovino (SFB) e o meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco: Mistura de nutrientes F-12 (DMEM/F12), fungizona e penicilina/estreptomicina foram adquiridos da Gibco BRL (Carlsbad, CA, EUA). Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) foi obtido da Invitrogen (Eugene, OR, EUA). Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

#### 3.3 Metodologia

##### 3.3.1 Cultura primária de astrócitos

Culturas primárias de astrócitos corticais foram preparadas a partir de ratos Wistar recém nascidos (0 a 1 dia de idade; P0), conforme descrito previamente (Loureiro *et al.*, 2010). Os ratos foram decapitados e as cabeças imediatamente

colocadas em placa de Petry estéril com Krebs-HEPES contendo NaCl 121 mM, KCl 4,83 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,22 mM  $\text{NaHCO}_3$  25,5 mM, Na-HEPES 10 mM (pH 7,4), glicose 13mM. Os cérebros foram cuidadosamente removidos com auxílio de tesouras e pinças cirúrgicas e colocados em uma segunda placa de Petry onde, ainda em presença de Krebs, o córtex cerebral foi retirado. As etapas de dissecação das estruturas cerebrais, remoção das meninges e dissociação mecânica das células aconteceram conforme protocolo. As células dissociadas foram suspensas em DMEM/F12, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de cultura.

As culturas foram colocadas na incubadora sendo mantidas em atmosfera úmida, à 37°C e com 5% de  $\text{CO}_2$  (condições mantidas durante todo o desenvolvimento da cultura). Sucessivas trocas de meio foram realizadas a cada 3 dias onde, com a simples agitação da placa, eram removidas células que normalmente ficam aderidas sobre os astrócitos (neurônios, microglia e oligodendrócitos), além de renovados os nutrientes para as células. O desenvolvimento das culturas foi acompanhado diariamente por observações no microscópio de contraste de fase.

### **3.3.2 Tratamento das culturas com ditelureto de difenila ( $\text{PhTe}$ )<sub>2</sub>**

Após as células atingirem a semi-confluência, o meio de cultura foi removido por sucção e as mesmas foram incubadas por até 24 horas, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$  em DMEM/F12 sem SFB, na presença ou ausência (controles) de ( $\text{PhTe}$ )<sub>2</sub> em diferentes concentrações (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10  $\mu\text{M}$ ).

### **3.3.3 Viabilidade celular**

#### **3.3.3.1 Anexina V-FITC**

Para análise da apoptose celular, foi realizada a medição da aderência de anexina V à membrana celular, através da conjugação da anexina V ao isotiocianato

de fluoresceína (FITC). O marcador fluorescente iodeto de propídio (PI) foi utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas.

As células foram incubadas com o (PhTe)<sub>2</sub> (0,5 e 10 µM) por 24 horas e após foram recuperadas com 0,25% de tripsina-EDTA, centrifugadas e lavadas com solução salina tamponada (PBS). Foi realizada a marcação por incubação com PI e FITC em um tampão de ligação (*kit* de detecção de apoptose I-556547; BD Pharmingen) durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro, de acordo com as instruções do fabricante. As células coradas foram analisadas em um citômetro de fluxo FACS Calibur. A análise foi realizada em Flow Jo Software.

### 3.3.3.2 MTT

A viabilidade celular foi determinada através do método de brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) que se baseia na capacidade das células viáveis de clivar o anel tetrazólico do MTT pela ação de desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazan de cor azul, que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose (Mosmann, 1983; Liu *et al.*, 1997). Foram utilizadas placas de 96 poços, nas quais 0,5 mg/mL de MTT foi adicionado a cada poço por 2 horas. O sobrenadante foi então separado, e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço, seguido de incubação e agitação durante 10 minutos. O produto de formazan gerado durante a incubação foi solubilizado em DMSO e a absorbância foi medida a 490 e 630 nm. Apenas as células viáveis são capazes de reduzir o MTT.

### 3.3.4 Fosforilação dos FI do citoesqueleto

Os astrócitos em cultura foram incubados durante 24 horas na presença ou ausência de (PhTe)<sub>2</sub>, e em seguida o meio foi modificado, sendo a incubação realizada durante 1 hora em meio Krebs-HEPES contendo NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, Na-HEPES 25 mM (pH 7,4), glicose 12 mM e CaCl<sub>2</sub> 1 mM, juntamente com os seguintes inibidores de proteases: benzamidina 1mM, leupeptina 0,1 µM, antipaína 0,7 µM, pepstatina 0,7 µM e quimostatina 0,7 µM e 10 µCi de ortofosfato radioativo.

Nos experimentos realizados para estudo dos mecanismos de sinalização, as células foram pré-incubadas durante 60 minutos na presença ou ausência de Estaurosporina 10 nM, H-89 10 µM, KN-93 1 µM, MCPG 50 µM, 43CHPG 10 µM, MPEP 100 µM, DL-AP5 50µM e CNQX 50µM. A incubação prosseguiu por 24 horas a 37 °C, sendo interrompida com tampão usado para cessar a atividade enzimática (NaF 150 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 6,5) com os inibidores de proteases descritos anteriormente. As células foram lavadas 2 vezes para retirada do excesso de radioatividade, e posteriormente, foi adicionado um tampão de alta força iônica (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM (pH 7,1), KCl 600 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EGTA 2 mM, 1% de Triton X-100, e os inibidores de protease descritos anteriormente), obtendo assim, a fração citoesquelética enriquecida em FI a partir dos astrócitos corticais. A quantidade de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

#### **3.3.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-page)**

Para a análise em eletroforese, as amostras foram dissolvidas em 25% (v/v) de uma solução contendo glicerol 40%, mercaptoetanol 5%, Tris-HCl 50 mM, pH 6,8 e fervidas por 3 minutos. As concentrações de proteína foram igualmente aplicadas em gel de poliacrilamida 10% e analisadas por SDS-PAGE de acordo com o sistema descontínuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Os géis contendo a fração citoesquelética enriquecida em FI foram expostos em filmes de raio-X (T-Mat G/RA, Kodak) a -70°C, com intensificadores de radioatividade (*screen*) e, finalmente, a autoradiografia foi obtida e quantificada por digitalização dos filmes com um scanner HP Scanjet 6100C Hewlett-Packard e a densidade óptica determinada com uma versão de software Optiquant 02.00 (Packard Instrument Company). Valores de densidade óptica foram obtidos para a faixa correspondente a cada proteína. A quantidade de amostra aplicada e a qualidade da migração na placa de eletroforese foram controladas por coloração com Brilliant Blue R.

#### **3.3.5 Imunocitoquímica e citoquímica**

A imunocitoquímica foi realizada como descrito por Gomes (Gomes *et al.*, 1999). As células cultivadas em lamínulas de vidro foram fixadas com 500 µL de

paraformaldeído 4% por 20 minutos e, após a fixação, foram lavadas com 500  $\mu$ L de PBS por 3 vezes, durante 5 minutos cada. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 50  $\mu$ L de PBS contendo Triton X-100 0,2 % por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizado o bloqueio com 300  $\mu$ L de albumina de soro bovino (BSA) 5% em PBS durante 30 minutos para bloquear a superfície de reação. O passo seguinte foi a incubação durante a noite com o anticorpo primário anti-GFAP policlonal (1:500), seguido por 5 lavagens com PBS (5 minutos cada) e incubação com o anticorpo secundário específico conjugado com Cy3 (1:1000) por 1 hora. Em todos os controles negativos as reações foram realizadas omitindo o anticorpo primário. Não foi observada reatividade na ausência do anticorpo primário. O citoesqueleto de actina foi observado utilizando faloidina-fluoresceína e o núcleo foi corado com DAPI. As células foram visualizadas com um microscópio invertido e as imagens transferidas para um computador com uma câmera digital acoplada (Sound Vision Inc., EUA).

### **3.3.6 Análise do imunoconteúdo das proteínas pela técnica de *Western blot***

O homogeneizado total de proteínas (50  $\mu$ g), foi analisado através da técnica de eletroforese em SDS-PAGE e transferido para uma membrana de nitrocelulose (Trans-blot SD semi-dry transfer cell, BioRad) por 1 hora a 15 V, utilizando para isso o tampão de transferência contendo Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% e 0,25% SDS. Posteriormente as membranas de nitrocelulose foram lavadas por 10 minutos com tampão TBS (NaCl 0,5 M, Tris 20 mM, pH 7,5), seguido de 2 horas de incubação com solução de bloqueio, contendo TBS adicionado de 5% de albumina bovina sérica e 0,1% de Tween 20. Após o bloqueio, as membranas de nitrocelulose foram lavadas 2 vezes por 5 minutos cada com TBS contendo 0,05% Tween-20 (T-TBS) e então incubadas durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos diluídos em tampão de bloqueio: anti-GFAP diluída 1:1000, anti-vimentina diluída 1:1000 e anti-actina diluída 1:1000. As membranas de nitrocelulose foram então lavadas 4 vezes por 5 minutos com T-TBS e incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase e diluídos em solução de bloqueio (anti-IgG de camundongo diluído 1:2000 e anti- IgG de coelho diluído 1:2000).

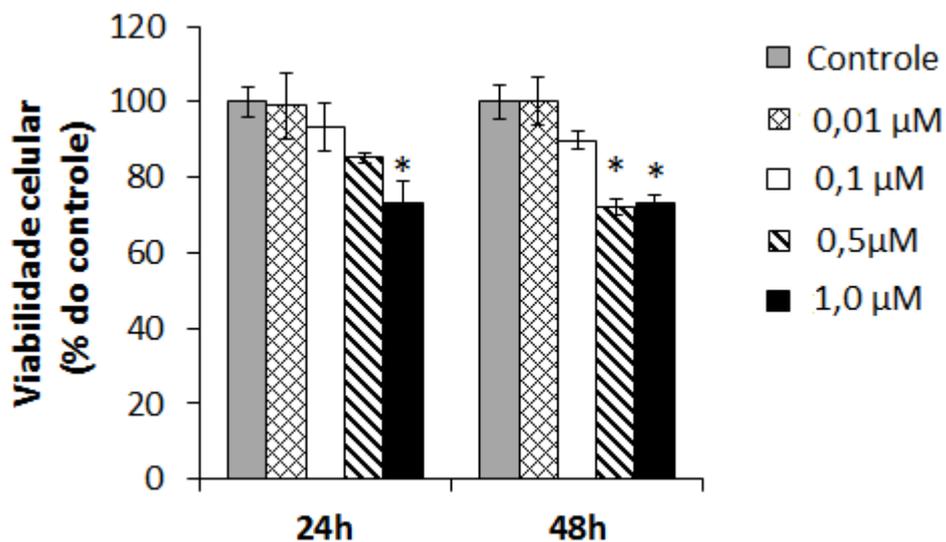
Posteriormente, as membranas de nitrocelulose foram lavadas 2 vezes com T-TBS e 2 vezes com TBS por 5 minutos. O *blot*, então, foi revelado usando o *kit* de quimioluminescência ECL (Amersham). O imunocconteúdo das proteínas foi quantificado através da técnica de densitometria óptica, usando para isso o programa OptiQuant, software versão 02.00 (Packard Instrument Company). Como controle da quantidade de proteínas foi utilizada a  $\beta$ -actina.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Viabilidade celular

Inicialmente determinamos a viabilidade celular de culturas primárias de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações de  $(\text{PhTe})_2$  através das técnicas de MTT e citometria de fluxo (anexina V-FITC/Pi), descritas nos Materiais e Métodos.

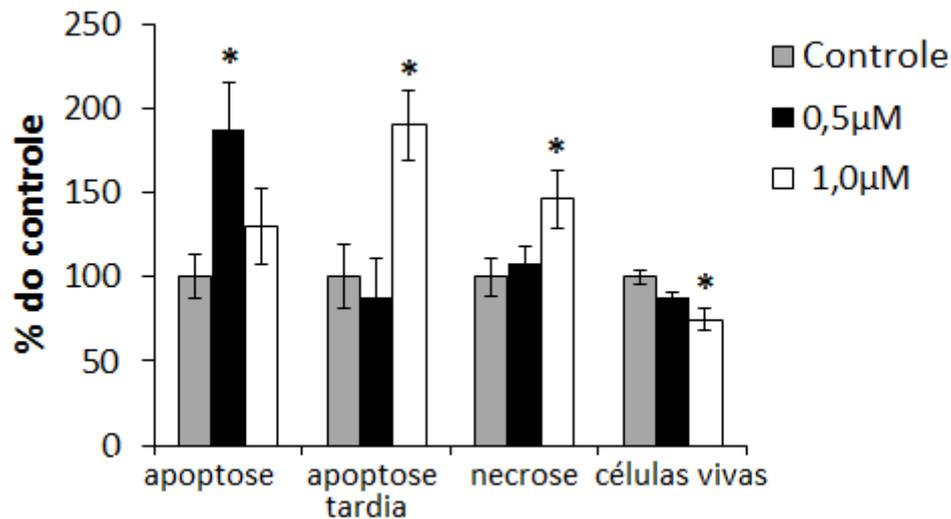
A técnica do MTT foi realizada 24 e 48 horas após o tratamento, utilizando concentrações entre 0,01 a 10  $\mu\text{M}$  de  $(\text{PhTe})_2$ . Os resultados mostraram que, 24 horas após o tratamento, houve uma redução dose dependente da viabilidade celular a partir da concentração de 1  $\mu\text{M}$  de  $(\text{PhTe})_2$ . O aumento do tempo de exposição ao composto de telúrio causou diminuição da viabilidade celular com concentrações menores, a partir de 0,5  $\mu\text{M}$  de  $(\text{PhTe})_2$  (Figura 2).



**Figura 2:** Análise da viabilidade celular pela técnica de MTT em astrócitos primários tratados por 24 ou 48 horas com  $(\text{PhTe})_2$ . Dados foram expressos como porcentagem do grupo controle e reportados como média  $\pm$  D.P de 4 experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey-Kramer:  $P < 0,05$ .

Tentando compreender melhor o efeito do tratamento com  $(\text{PhTe})_2$  sobre a viabilidade dos astrócitos corticais utilizamos a técnica de anexina V-FITC/Pi, que determina a quantidade de células apoptóticas e necróticas. Esses experimentos

foram realizados 24 horas após o tratamento com  $(\text{PhTe})_2$ , nas concentrações de 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$ , e mostraram que o  $(\text{PhTe})_2$  causa um aumento no número de células apoptóticas e/ou necróticas nessas concentrações. Houve o surgimento de apoptose na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$ , enquanto apoptose tardia e necrose foram observadas nas células tratadas com 1,0  $\mu\text{M}$  do metabólito (Figura 3).

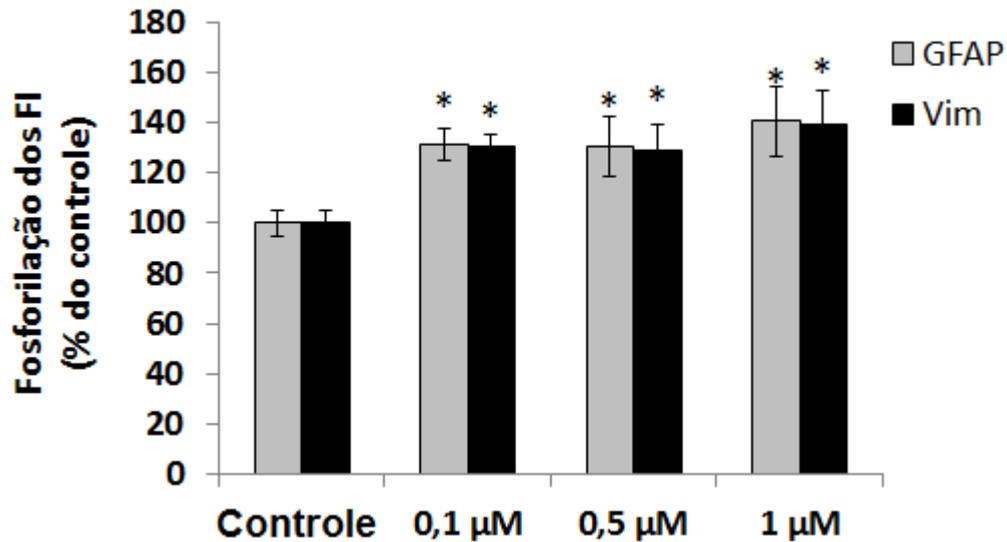


**Figura 3:** Análise da viabilidade celular, pela técnica de anexina V- FITC/Pi, em cultura de astrócitos tratadas por 24 horas com  $(\text{PhTe})_2$ . Dados foram expressos como porcentagem do grupo controle e reportados como média  $\pm$  D.P de 4 experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey-Kramer:  $P < 0,05$ .

#### 4.2 Fosforilação dos Filamentos Intermediários

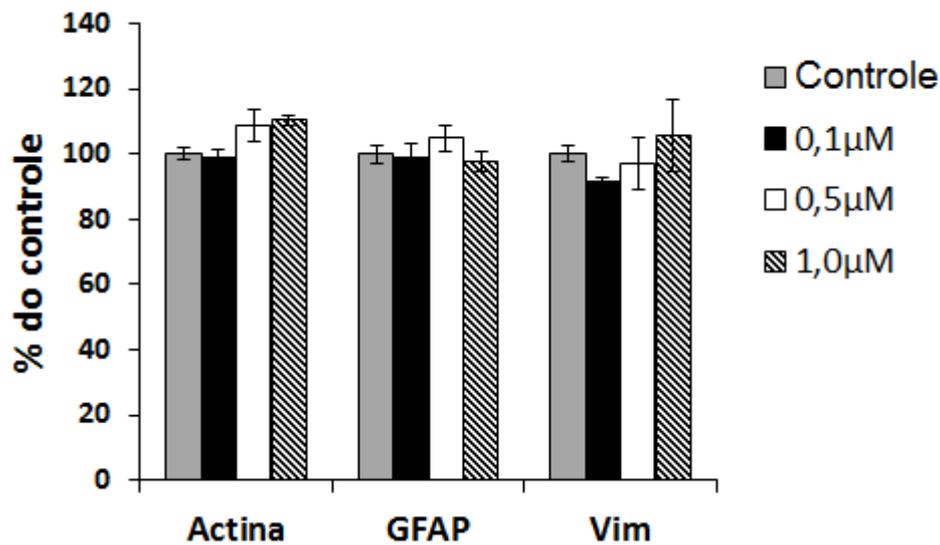
Com base nos resultados anteriores, escolhemos estudar os efeitos do  $(\text{PhTe})_2$  sobre o sistema fosforilante associado ao citoesqueleto de astrócitos corticais em cultura utilizando a concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  durante 24 horas. Considerando que o  $(\text{PhTe})_2$  é uma substância neurotóxica que afeta a fosforilação de proteínas do citoesqueleto de células neurais em modelos animais *in vivo* e *in vitro* (Heimfarth et al., 2012; 2013) e que a fosforilação de FIs está relacionada a disfunção das células do SNC, é importante analisarmos a suscetibilidade do sistema fosforilante associado ao citoesqueleto em cultura primária de astrócitos.

A análise da fosforilação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e da vimentina, IFs presentes em astrócitos foi realizada após o tratamento das células com  $(\text{PhTe})_2$  0,1, 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Os resultados mostraram que o composto orgânico do telúrio causa um aumento da fosforilação da GFAP e vimentina, nas três concentrações estudadas 24 horas após a exposição à neurotoxina (Figura 4).



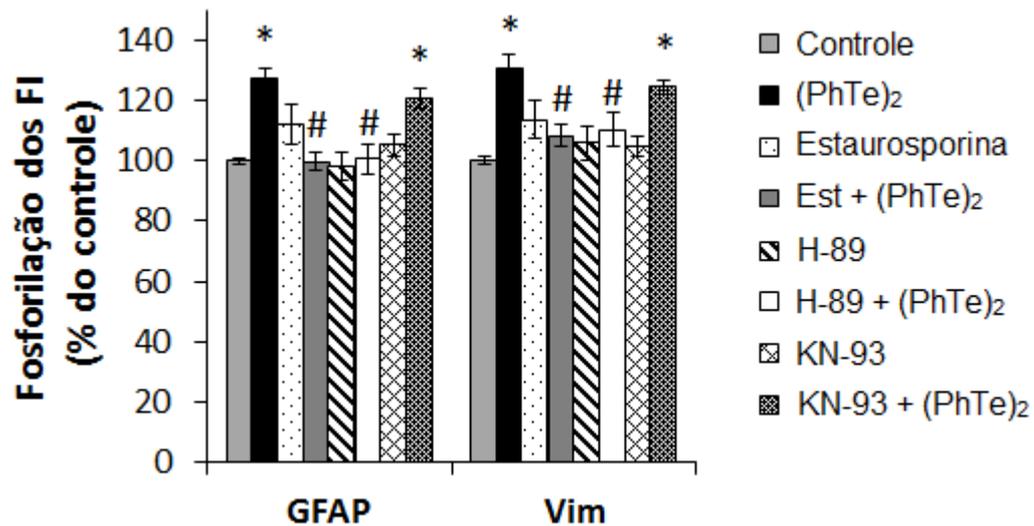
**Figura 4:** Efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre a fosforilação de GFAP e vimentina. Dados foram expressos como porcentagem do grupo controle e reportados como média  $\pm$  D.P de 4 experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey-Kramer:  $P < 0,05$ .

Para verificar se o aumento de fosforilação das proteínas GFAP e vimentina estava relacionada com os níveis dessas proteínas nos astrócitos primários, determinamos o imunoconteúdo da GFAP e da vimentina através da técnica de *Western Blot*, utilizando anticorpos monoclonais anti-GFAP e anti-vimentina. Os resultados mostraram que não há alteração no imunoconteúdo dessas proteínas 24 horas após a incubação com o  $(\text{PhTe})_2$  (Figura 5), indicando que a hiperfosforilação era decorrente de uma alteração da atividade de cinases e/ou fosfatases.



**Figura: 5:** Efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre o imunoconteúdo de GFAP e vimentina. Dados foram expressos como porcentagem do grupo controle e reportados como média  $\pm$  D.P de 4 experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey-Kramer:  $P < 0,05$ .

Para identificar as cinases direcionadas para a fosforilação dos FIs envolvidas nas ações do  $(\text{PhTe})_2$  sobre essas proteínas, verificamos a participação das principais cinases dependentes de segundos mensageiros que fosforilam sítios nessas proteínas: PKA, PKCaMII e PKC. Para tanto, os astrócitos em cultura foram co-incubados com  $(\text{PhTe})_2$  e cada um dos inibidores das cinases nas concentrações mencionadas anteriormente: H89, inibidor da PKA; KN-93, inibidor da PKCaMII; e estauroporina, inibidor da PKC. Após 24 horas de incubação, a fração citoesquelética foi extraída e o  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato incorporado na GFAP e vimentina foi avaliado. Os resultados mostraram uma prevenção da hiperfosforilação dos FIs gliais na presença dos inibidores estaurosporina e H-89 responsáveis pela inibição da PKC e PKA respectivamente, reforçando a participação dessas cinases no rompimento da homeostase do citoesqueleto em resposta ao  $(\text{PhTe})_2$ . Por outro lado, não houve prevenção da hiperfosforilação na presença de KN-93, indicando que não há participação da PKCaMII na ação desta neurotoxina (Figura 6).

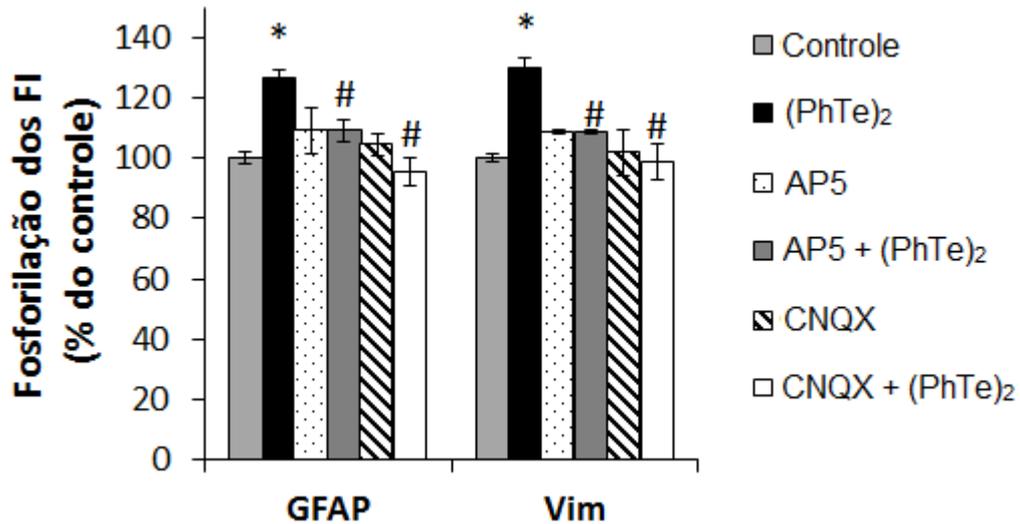


**Figura 6:** Efeito do (PhTe)<sub>2</sub> sobre a fosforilação de GFAP e vimentina na presença ou ausência de inibidores de cinases. Dados foram expressos como porcentagem do grupo controle e reportados como média ± D.P de 4 experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey-Kramer: P<0,05.

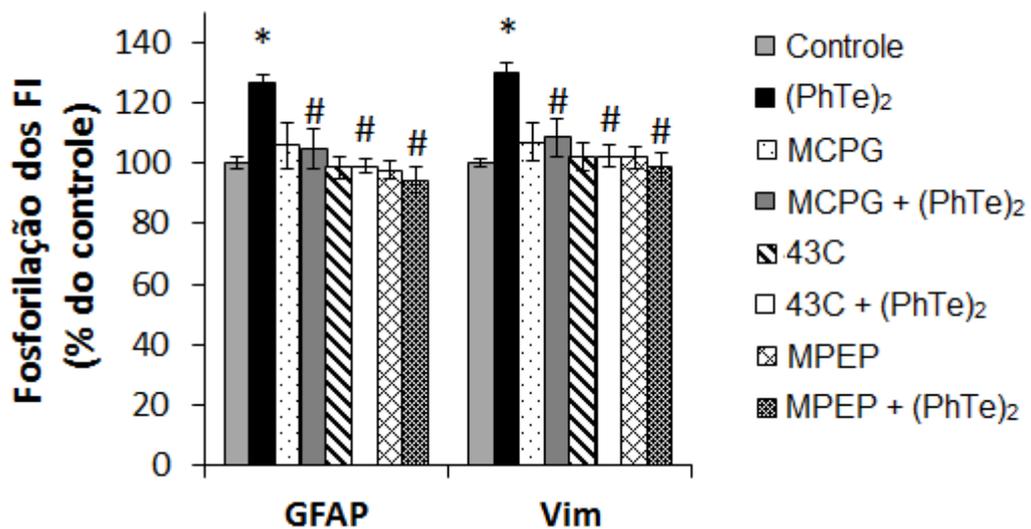
Em seguida, pretendemos verificar a participação de receptores glutamatérgicos nos efeitos do (PhTe)<sub>2</sub> sobre o rompimento da homeostase do citoesqueleto dos astrócitos, pois estudos anteriores mostraram a participação do sistema glutamatérgico nas ações do (PhTe)<sub>2</sub> no sistema nervoso central (Pessoa-Pureur *et al*, 2014). Para isso, os astrócitos primários foram co-incubados durante 24 horas com (PhTe)<sub>2</sub> na presença de um dos seguintes antagonistas glutamatérgicos: DL-AP5 (50 μM) e CNQX (50 μM), antagonistas glutamatérgicos ionotrópicos NMDA e não NMDA, respectivamente; e MCPG (50 μM), 4-3CHPG (10 μM) e MPEP (100 μM), antagonistas glutamatérgicos metabotrópicos.

Inicialmente, os resultados mostraram a prevenção da hiperfosforilação induzida pelo organotelureto na presença do DL-AP5 e CNQX, sugerindo a participação dos receptores NMDA, AMPA e cainato nas ações do composto sobre o citoesqueleto (Figura 7). Por outro lado, na presença do antagonista glutamatérgico metabotrópico MCPG, verificamos que o organotelureto não causa hiperfosforilação, sugerindo o envolvimento desses receptores nos efeitos desencadeados pelo (PhTe)<sub>2</sub> (Figura 9). Para tentar compreender melhor qual tipo de receptor metabotrópico glutamatérgico está envolvido nas ações do (PhTe)<sub>2</sub> sobre o sistema fosforilante associado ao citoesqueleto, foram utilizados antagonistas específicos dos receptores mGluR1 (MPEP) e mGluR5 (4-3CHPG). Os resultados

demonstraram que estes antagonistas preveniram a hiperfosforilação, sugerindo o envolvimento dos receptores mGluR1 e mGluR5 no mecanismo de ação do  $(\text{PhTe})_2$  (Figura 8).



**Figura 7:** Efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre a fosforilação de GFAP e vimentina na presença ou ausência de inibidores de receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Dados foram expressos como porcentagem do grupo controle e reportados como média  $\pm$  D.P de 4 experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey-Kramer:  $P < 0,05$ ; \*, diferente do controle; #, diferente do  $(\text{PhTe})_2$ .

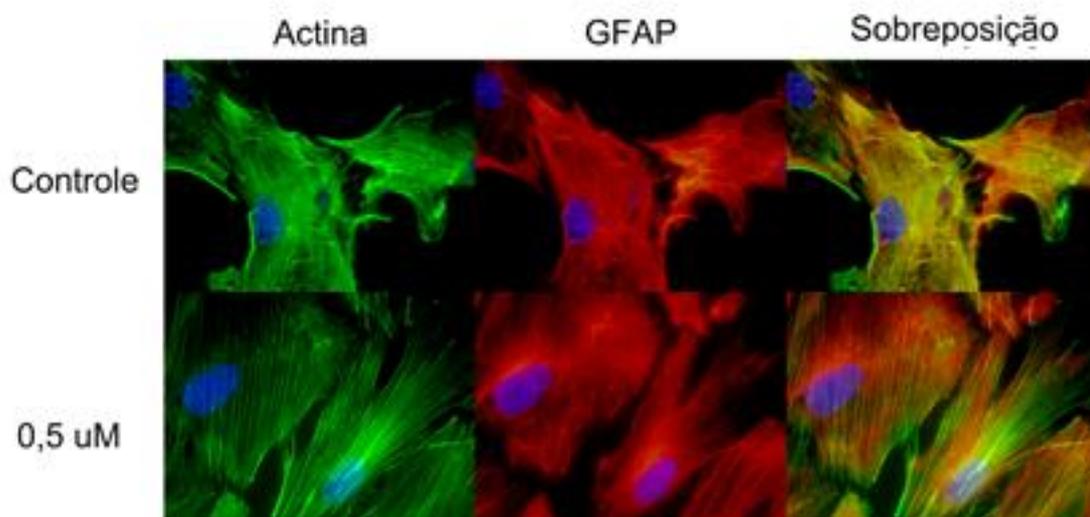


**Figura 8:** Efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre a fosforilação de GFAP e vimentina na presença ou ausência de antagonistas de receptores glutamatérgicos metabotrópicos. Dados foram expressos como porcentagem do grupo controle e reportados como média  $\pm$  D.P de 4 experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey-Kramer:  $P < 0,05$ ; \*, diferente do controle; #, diferente do  $(\text{PhTe})_2$ .

### 4.3 Imunocitoquímica e Citoquímica

Para avaliar o efeito de  $0,5 \mu\text{M}$   $(\text{PhTe})_2$  sobre a organização do citoesqueleto dos astrócitos em cultura, as células foram tratadas com a toxina e analisadas por citoquímica após 24 horas usando faloidina-fluoresceína para marcar o citoesqueleto de actina. Os resultados da figura 10 mostram que nas células não tratadas o citoesqueleto de actina está completamente distribuído no citoplasma, consistente com a forma circular e achatada da célula, uma característica predominante dos astrócitos protoplasmáticos nessas culturas. A alteração do citoesqueleto de actina foi observada após 24 horas de tratamento. Esta desregulação da distribuição da actina parece estar correlacionada com o espalhamento celular, pois nas células tratadas com  $0,5 \mu\text{M}$   $(\text{PhTe})_2$  observamos a reorganização da actina, formando fibras de estresse, acompanhadas do surgimento da forma estrelada da célula.

Paralelamente ao citoesqueleto de actina, nas células não tratadas com  $(\text{PhTe})_2$  (controles), os filamentos de GFAP marcados com anticorpo anti-GFAP mostraram uma organização típica, estendendo-se ao longo do citoplasma. Além disso, nas células expostas ao  $(\text{PhTe})_2$  por 24 horas, nós não observamos o rompimento da arquitetura normal dos filamentos de GFAP.



**Figura 9:** Efeito do  $(\text{PhTe})_2$  sobre a morfologia celular de astrócitos corticais. Culturas primárias de astrócitos foram tratadas com  $0,5 \mu\text{M}$   $(\text{PhTe})_2$  e a imunocitoquímica foi realizada 24 horas após o tratamento. Verde= actina; vermelho=GFAP; Azul=DAPI.

## 5. DISCUSSÃO

O telúrio é um elemento traço usado como componente industrial de muitas ligas e na indústria eletrônica. Na forma de telureto de hidrogênio ( $H_2Te$ ) pode ser absorvido pelas proteínas (por exemplo, proteínas da pele e do cabelo) e apresenta uma taxa de eliminação muito lenta (Russel, 1992). O telúrio é uma substância tóxica, a qual pode produzir sintomas neurotóxicos, como diminuição do aprendizado e da memória espacial (Walbran e Robins, 1978; Widy-Tyszkiewicz *et al.*, 2002) e desmielinização do sistema nervoso periférico (Wagner-Recio *et al.*, 1991; Laden e Porter, 2001). Além disso, ele apresenta toxicidade reprodutiva, caracterizada por teratogênese (Stangherlin *et al.*, 2006).

A importância da exposição ocupacional a compostos contendo telúrio tem crescido nos últimos anos, entretanto a clínica e a bioquímica dessa exposição são fracamente compreendidas. O contato com o telúrio nas suas diferentes formas pode afetar o desenvolvimento e a função cerebral causando hidrocefalia, hipomielinização ou desmielinização (Perez-D`Gregório e Miller, 1988; Taylor; 1996).

O composto orgânico de telúrio  $(PhTe)_2$  pode afetar o sistema glutamatérgico (Borges *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2010) e alterar a atividade de enzimas, como a delta-aminolevulinato desidratase (Maciel *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2003) e  $Na^+K^+$ -ATPase (Borges *et al.*, 2005). Estudos em cultura de astrócitos mostraram que o  $(PhTe)_2$  é citotóxico para esse tipo celular (Roy e Hardej, 2011). Os danos neurotóxicos causados pelo composto orgânico do telúrio podem estar relacionados, pelo menos em parte, a alterações na função dos canais de cálcio, levando à alteração na homeostase desse segundo mensageiro celular (Moretto *et al.*, 2007).

Os astrócitos são as células mais abundantes no SNC e estão envolvidas em diversas desordens que levam a alterações em sua morfologia e função. Culturas primárias de astrócitos são consideradas um modelo bastante útil para a avaliação de lesões neurotóxicas (Pekny e Pekna, 2014).

Estudos prévios de nosso laboratório já demonstraram que o citoesqueleto é alvo do  $(PhTe)_2$  e que a ação desse composto sobre essa rede complexa de filamentos proteicos é dependente da estrutura cerebral (Heimfarth *et al.*, 2008). O

rompimento da homeostase do citoesqueleto neural tem sido relacionado à neurodegeneração (O'Callaghan, 1994) e modificações no nível de fosforilação de proteínas do citoesqueleto são consideradas eventos críticos na patologia do SNC (Koliatsos *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 2002), podendo levar as células neuronais à morte, causando disfunção neurológica. Várias doenças neurodegenerativas humanas, como Doença de Alzheimer, Parkinson, Huntington, Pick e Demência com corpos de Lewy, são caracterizadas pelo acúmulo de agregados de FI relativamente insolúveis no corpo celular (Goedert, 1998; Julien e Mushynski, 1998; Julien, 1999; Diprospero *et al.*, 2004).

Considerando que o (PhTe)<sub>2</sub> rompe o equilíbrio do citoesqueleto neural de ratos jovens *in vivo* e que esse efeito pode causar neurodegeneração, procuramos entender um pouco melhor como esse organotelureto age no SNC, estudando para isso o efeito dessa droga em cultura primária de astrócitos, tentando compreender quais as principais vias de sinalização envolvidas na ação desse composto. Estudos em culturas de células isoladas permitem compreender a importância de cada tipo celular na ação de uma determinada toxina. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o (PhTe)<sub>2</sub> causa morte astrocitária de uma maneira dose dependente, reforçando os resultados obtidos *in vivo* (Heimfarth *et al.*, 2013), que relataram que esse composto é neurotóxico. Além disso, há uma importante alteração do sistema fosforilante associado ao citoesqueleto dos astrócitos, implicando numa hiperfosforilação dos FIs gliais. Relatos da literatura sugerem que a fosforilação da GFAP regula a plasticidade estrutural dos filamentos gliais e eventualmente as funções dos astrócitos (Takemura *et al.*, 2002; Korolainen *et al.*, 2005).

Os mecanismos de sinalização envolvidos na ação do (PhTe)<sub>2</sub> não estão bem elucidados, mas os resultados do presente estudo mostram o envolvimento da PKA e PKC nos efeitos gerados pelo (PhTe)<sub>2</sub> sobre os astrócitos em cultura. Vários estudos têm indicado a importância da PKC e da PKA em injúrias do SNC. Uma diminuição da atividade da PKC protege culturas de neurônios da morte induzida por aminoácidos excitatórios (Felipo *et al.*, 1993) e metais neurotóxicos (Pavlakovic *et al.*, 1995). Inibidores da PKC previnem a hiperfosforilação dos FIs induzida pela homocisteína (Loureiro *et al.*, 2010), pelo ácido quinolínico (Pierozan *et al.*, 2012) e pelos hormônios da tireóide (Zamoner *et al.*, 2008). Já a PKA é uma importante

enzima envolvida em várias vias de sinalização, sendo que um dos seus alvos é o citoesqueleto neural. Ela está envolvida com a fosforilação da GFAP, bem como com o resíduo nos FIs de neurônios na região amino-terminal (Sihag *et al.*, 1999). É importante notar que a fosforilação de subunidades dos FIs mediada por serina-treonina cinases dependentes de segundos mensageiros como a PKA, a PKC é relevante para a polimerização/associação do filamento propriamente dito (Alberts *et al.*, 2002) e possivelmente, o envolvimento dessas cinases pode levar a uma desregulação do citoesqueleto e da função celular.

Além disso, os nossos resultados também mostraram que a ação do organotelureto nos astrócitos corticais foi dependente dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos. Esses achados sustentam a hipótese de que o telúrio age sobre o sistema glutamatérgico, causando excitotoxicidade glutamatérgica. Estudos anteriores de nosso grupo mostraram o envolvimento dos receptores NMDA, AMPA, cainato, bem como dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos nas ações desencadeadas pelo telúrio em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos jovens (Heimfarth *et al.*, 2012; 2013).

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos estão envolvidos com a patofisiologia do SNC. É descrito que o mGluR5 é extremamente importante para a plasticidade sináptica, bem como para o desenvolvimento do aprendizado e memória (Ayala *et al.*, 2009. Balschun e Wetzel, 2002; Balschun *et al.*, 2006; Grassi *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2009). Além disso, estudos (Xu *et al.*, 2007; 2009) demonstraram o envolvimento dos mGluR na neurotoxicidade induzida por chumbo.

Os receptores NMDA estão envolvidos nos efeitos desencadeados pelo (PhTe)<sub>2</sub> tanto no córtex cerebral, quanto no hipocampo, mostrando a importância deste receptor glutamatérgico ionotrópico para a toxicidade desse composto. Vários trabalhos do nosso grupo e de outros têm demonstrado que a ativação dos receptores NMDA está envolvida com alteração do estado de fosforilação dos FIs gliais e neuronais em diferentes estruturas cerebrais (Pierozan *et al.*, 2012; Loureiro *et al.*, 2008, Doroudchi e Durham, 1997) . A ativação dos receptores NMDA leva a um aumento no influxo do íon cálcio, provocando uma alteração na homeostase desse importante segundo mensageiro, ativando cinases e fosfatases, entre elas a PKA e a PKC (Pierozan *et al.*, 2014).

Levando em consideração os resultados discutidos acima, podemos propor que o composto orgânico de telúrio,  $(\text{PhTe})_2$ , age sobre os receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos, levando a uma alteração de importantes segundos mensageiros como AMPc e cálcio, acarretando na ativação das cinases PKA e PKC, respectivamente. Essas enzimas ativadas hiperfosforilam os FIs gliais (GFAP e vimentina), ocasionando um rompimento da homeostase dessas proteínas. Uma modificação do estado de fosforilação da GFAP e vimentina pode levar a alterações na interação com outros tipos de filamentos protéicos ou proteínas associadas ao citoesqueleto, causando uma reorganização com conseqüente alteração na morfologia celular. Essa alteração do citoesqueleto cerebral pode estar envolvida, pelo menos em parte, com a neurotoxicidade do composto orgânico de telúrio.

Os estudos citoquímicos e imunocitoquímicos com os astrócitos tratados com  $(\text{PhTe})_2$  mostraram que houve um aumento das fibras de estresse, em comparação com as células controles, sem alteração da organização da rede citoplasmática de FIs. As fibras de estresse são formadas por uma organização contrátil de filamentos de actina e miosina, ancorados à membrana plasmática através de receptores de integrina (Alberts *et al.*, 2002). Estas organizações se formam em resposta a sinais fisiológicos ou estressores. No caso dos astrócitos tratados com  $(\text{PhTe})_2$ , podemos sugerir que os sinais intracelulares desencadeados pela toxina foram capazes não só de romper a homeostase de fosforilação dos FIs, mas também de alterar a homeostase de proteínas reguladoras da rede de filamentos de actina.

## 6. CONCLUSÃO

### 6.1 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o  $(\text{PhTe})_2$  atua sobre a dinâmica do citoesqueleto de astrócitos, alterando a homeostase dos FIs gliais através de mecanismos dependentes do sistema glutamatérgico, levando a alterações de segundos mensageiros e acarretando a ativação de cinases envolvidas na associação/desassociação dos FIs e na reorganização dos filamentos de actina, formando fibras de estresse. Essa alteração na homeostase do citoesqueleto dos astrócitos pode estar envolvida com os efeitos neurotóxicos causados pelo organotelureto.

### 6.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

6.2.1 O  $(\text{PhTe})_2$  leva a uma redução dose e tempo dependente dose dependente e tempo dependente, da viabilidade celular, levando à morte por apoptose;

6.2.2 O tratamento com  $(\text{PhTe})_2$  causa hiperfosforilação dos FIs de astrócitos corticais;

6.2.3 O  $(\text{PhTe})_2$  leva a uma ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos, levando a alterações na homeostase de segundos mensageiros e conseqüentemente, ativação da PKA e PKC, levando ao aumento de fosforilação observado;

6.2.4 O tratamento com  $(\text{PhTe})_2$  leva a reorganização do citoesqueleto de actina, porém os filamentos intermediários gliais mantêm sua morfologia característica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERLEY, S. et al. Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. *J Cell Biol*, v. 150, n. 1, p. 165-76, Jul 10 2000.

ALBERTS B. et al. The cytoskeleton. In: *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. New York: Garland Science, p. 907-982, 2002.

AYALA, J. E. et al. mGluR5 positive allosteric modulators facilitate both hippocampal LTP and LTD and enhance spatial learning. *Neuropsychopharmacology*, v. 34, n. 9, p. 2057-71, Aug 2009.

BA, L. A. et al. Tellurium: an element with great biological potency and potential. *Org Biomol Chem*, v. 8, n. 19, p. 4203-16, Oct 7 2010

BALSCHUN, D.; WETZEL, W. Inhibition of mGluR5 blocks hippocampal LTP in vivo and spatial learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 73, n. 2, p. 375-80, Sep 2002.

BALSCHUN, D.; ZUSCHRATTER, W.; WETZEL, W. Allosteric enhancement of metabotropic glutamate receptor 5 function promotes spatial memory. *Neuroscience*, v. 142, n. 3, p. 691-702, Oct 27 2006.

BORGES, V. C. et al. Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. *Neurochem Res*, v. 29, n. 8, p. 1505-9, Aug 2004.

BORGES, V. C.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. *Toxicology*, v. 215, n. 3, p. 191-7, Nov 15 2005.

CARMIGNOTO, G. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. *Prog Neurobiol*, v. 62, n. 6, p. 561-81, Dec 2000.

CHANG, L.; GOLDMAN, R. D. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 5, n. 8, p. 601-13, Aug 2004.

CHOU, Y. H. et al. The relative roles of specific N- and C-terminal phosphorylation sites in the disassembly of intermediate filament in mitotic BHK-21 cells. *J Cell Sci*, v. 109 ( Pt 4), p. 817-26, Apr 1996.

CHOU, Y. H.; SKALLI, O.; GOLDMAN, R. D. Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions. *Curr Opin Cell Biol*, v. 9, n. 1, p. 49-53, Feb 1997.

CLAYTON, G.D.; CLAYTON, F.E. *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*. Wiley, Chichester. 1981

COOPER, G.M.O. Citoesqueleto e o Movimento Celular. In: *A célula: uma abordagem molecular*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed. p. 445-489, 2001

DIPROSPERO, N. A. et al. Early changes in Huntington's disease patient brains involve alterations in cytoskeletal and synaptic elements. *J Neurocytol*, v. 33, n. 5, p. 517-33, Sep 2004.

DOROUDCHI, M. M.; DURHAM, H. D. Activation of NMDA receptors and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase participate in phosphorylation of neurofilaments induced by protein kinase C. *J Neurosci Res*, v. 50, n. 4, p. 514-21, Nov 15 1997.

EDDLESTON, M.; MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, v. 54, n. 1, p. 15-36, May 1993.

ELIASSON, C. et al. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem*, v. 274, n. 34, p. 23996-4006, Aug 20 1999.

ERIKSSON, J. E. et al. Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci*, v. 117, n. Pt 6, p. 919-32, Feb 29 2004.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M. G.; DAVIES, S. W. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurobiol*, v. 8, n. 5, p. 619-32, Oct 1998.

GOMES, F.C. et al. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, p. 619-631, 1999.

GRANT, P.; PANT, H. C. Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J Neurocytol*, v. 29, n. 11-12, p. 843-72, Nov-Dec 2000.

GRASSI, S.; FRONDAROLI, A.; PETTOROSSO, V. E. Different metabotropic glutamate receptors play opposite roles in synaptic plasticity of the rat medial vestibular nuclei. *J Physiol*, v. 543, n. Pt 3, p. 795-806, Sep 15 2002.

GUO-ROSS, S. X. et al. Decrease of glial fibrillary acidic protein in rat frontal cortex following aluminum treatment. *J Neurochem*, v. 73, n. 4, p. 1609-14, Oct 1999.

HARDMAN, R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect*, v. 114, n. 2, p. 165-72, Feb 2006.

HEIMFARTH, L. et al. Effects of in vivo treatment with diphenyl ditelluride on the phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex and hippocampus of rats. *Neurotoxicology*, v. 29, n. 1, p. 40-7, Jan 2008.

HEIMFARTH, L. et al. Exposure of young rats to diphenyl ditelluride during lactation affects the homeostasis of the cytoskeleton in neural cells from striatum and cerebellum. *Neurotoxicology*, v. 33, n. 5, p. 1106-16, Oct 2012

HEIMFARTH, L. et al. Disrupted cytoskeletal homeostasis, astrogliosis and apoptotic cell death in the cerebellum of preweaning rats injected with diphenyl ditelluride. *Neurotoxicology*, v. 34, p. 175-88, Jan 2013

HELFAND, B. T. et al. Intermediate filament proteins participate in signal transduction. *Trends Cell Biol*, v. 15, n. 11, p. 568-70, Nov 2005.

HIRANO, A. Cytopathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol*, v. 56, p. 91-101, 1991.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, v. 80, n. 2, p. 225-36, Jan 27 1995.

JULIEN, J. P. Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol*, v. 9, n. 5, p. 554-60, Oct 1999.

JULIEN, J. P.; MUSHYNSKI, W. E. Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, v. 61, p. 1-23, 1998.

KANEKO, S. et al. Alterations of expression of the cytoskeleton after immortalization of human fibroblasts. *Cell Struct Funct*, v. 20, n. 1, p. 107-15, Feb 1995.

KIRKPATRICK, L.L.; BRADY, S.T. Cytoskeleton of neurons and glia. In: *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. 6 ed. New York, Lippincott-Raven Publishers, p. 455-473, 1999.

KLAINÉ, S. J. et al. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem*, v. 27, n. 9, p. 1825-51, Sep 2008.

KOLIATSOS, V. E. et al. Aberrant phosphorylation of neurofilaments accompanies transmitter-related changes in rat septal neurons following transection of the fimbria-fornix. *Brain Res*, v. 482, n. 2, p. 205-18, Mar 20 1989.

KOROLAINEN, M. A. et al. Proteomic analysis of glial fibrillary acidic protein in Alzheimer's disease and aging brain. *Neurobiol Dis*, v. 20, n. 3, p. 858-70, Dec 2005.

KOSAKO, H. et al. Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein at the same sites by cleavage furrow kinase and Rho-associated kinase. *J Biol Chem*, v. 272, n. 16, p. 10333-6, Apr 18 1997.

LADEN, B. P.; PORTER, T. D. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J Lipid Res*, v. 42, n. 2, p. 235-40, Feb 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.

LARIVIERE, R. C.; JULIEN, J. P. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol*, v. 58, n. 1, p. 131-48, Jan 2004.

LIU, Y. et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*, v. 69, n. 2, p. 581-93, Aug 1997.

LOUREIRO, S. O. et al. Homocysteine activates calcium-mediated cell signaling mechanisms targeting the cytoskeleton in rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci*, v. 26, n. 5, p. 447-55, Aug 2008.

LOUREIRO, S. O. et al. Homocysteine induces hypophosphorylation of intermediate filaments and reorganization of actin cytoskeleton in C6 glioma cells. *Cell Mol Neurobiol*, v. 30, n. 4, p. 557-68, May 2010

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

MACIEL, E. N. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol*, v. 14, n. 6, p. 310-9, 2000.

MCCALL, M. A. et al. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, n. 13, p. 6361-6, Jun 25 1996.

MEOTTI, F. C. et al. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicol Lett*, v. 143, n. 1, p. 9-16, Jun 5 2003.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*, v. 93, n. 3, p. 421-43, Mar 2011.

MILLER, C. C. et al. Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. *Cell Mol Life Sci*, v. 59, n. 2, p. 323-30, Feb 2002.

MORETTO, M. B. et al. Ebselen and diorganylchalcogenides decrease in vitro glutamate uptake by rat brain slices: prevention by DTT and GSH. *Toxicol In Vitro*, v. 21, n. 4, p. 639-45, Jun 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

NESTLER, E.J.; GREENGARD, P. Protein phosphorylation and the regulation of neuronal function. In: *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. Boston: Little Brown, p. 449-474, 1994.

NOGUEIRA, C.W. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res*, v. 906, n. 1-2, p. 157-63, Jul 6 2001.

NOGUEIRA, C. W. et al. Organochalcogens effects on delta-aminolevulinate dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology*, v. 191, n. 2-3, p. 169-78, Sep 30 2003.

O'CALLAGHAN, J. P. A potential role for altered protein phosphorylation in the mediation of developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology*, v. 15, n. 1, p. 29-40, Spring 1994.

OGRA, Y. Toxicometallomics for research on the toxicology of exotic metalloids based on speciation studies. *Anal Sci*, v. 25, n. 10, p. 1189-95, Oct 2009.

OMARY, M. B.; KU, N. O. Intermediate filament proteins of the liver: emerging disease association and functions. *Hepatology*, v. 25, n. 5, p. 1043-8, May 1997.

OMARY, M. B. et al. "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci*, v. 31, n. 7, p. 383-94, Jul 2006.

PARAMIO, J. M.; JORCANO, J. L. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? *Bioessays*, v. 24, n. 9, p. 836-44, Sep 2002.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte Reactivity and Reactive Astrogliosis: Costs and Benefits. *Physiol Rev*, v. 94, n. 4, p. 1077-1098, Oct 2014

PEREZ-D'GREGORIO, R. E.; MILLER, R. K. Teratogenicity of tellurium dioxide: prenatal assessment. *Teratology*, v. 37, n. 4, p. 307-16, Apr 1988.

PESSOA-PUREUR, R.; HEIMFARTH, L.; ROCHA, J. B. Signaling mechanisms and disrupted cytoskeleton in the diphenyl ditelluride neurotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2014, ID 458601, 2014.

PETRAGNANI, N. Preparation of the principal classes of organic tellurium compounds. In: *Tellurium in Organic Synthesis*. Academic Press, London, p. 9-88, 1994.

PIEROZAN P. et al. Signaling mechanisms downstream of quinolinic acid targeting the cytoskeleton of rat striatal neurons and astrocytes. *Exp Neurol*, v. 233, n. 1, p. 391-9, Jan 2012.

PIEROZAN, P. et al. The phosphorylation status and cytoskeletal remodeling of striatal astrocytes treated with quinolinic acid. *Exp Cell Res*, v. 322, n. 2, p. 313-23, Apr 1 2014.

ROY, S.; HARDEJ, D. Tellurium tetrachloride and diphenyl ditelluride cause cytotoxicity in rat hippocampal astrocytes. *Food Chem Toxicol*, v. 49, n. 10, p. 2564-74, Oct 2011.

RUSSEL, J.B. *Química Geral*. 2 ed. São Paulo. Markron Books, v. 2, p. 1092. 1992.

SANCHEZ, C.; DIAZ-NIDO, J.; AVILA, J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol*, v. 61, n. 2, p. 133-68, Jun 2000.

SIHAG, R. K. et al. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res*, v. 313, n. 10, p. 2098-109, Jun 10 2007.

SOUZA, A. C. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride: neurotoxic effect in brain of young rats, in vitro. *Mol Cell Biochem*, v. 340, n. 1-2, p. 179-85, Jul 2010.

STANGHERLIN, E. C. et al. Exposure of mothers to diphenyl ditelluride during the suckling period changes behavioral tendencies in their offspring. *Brain Res Bull*, v. 69, n. 3, p. 311-7, Apr 14 2006.

STANGHERLIN, E. C. et al. Exposure to diphenyl ditelluride, via maternal milk, causes oxidative stress in cerebral cortex, hippocampus and striatum of young rats. *Arch Toxicol*, v. 83, n. 5, p. 485-91, May 2009.

TAKEMURA, M.; NISHIYAMA, H.; ITOHARA, S. Distribution of phosphorylated glial fibrillary acidic protein in the mouse central nervous system. *Genes Cells*, v. 7, n. 3, p. 295-307, Mar 2002.

TAYLOR, A. Biochemistry of tellurium. *Biol Trace Elem Res*, v. 55, n. 3, p. 231-9, Dec 1996.

WAGNER-RECIO, M.; TOEWS, A. D.; MORELL, P. Tellurium blocks cholesterol synthesis by inhibiting squalene metabolism: preferential vulnerability to this metabolic block leads to peripheral nervous system demyelination. *J Neurochem*, v. 57, n. 6, p. 1891-901, Dec 1991.

WALAAS, S. I.; GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacol Rev*, v. 43, n. 3, p. 299-349, Sep 1991.

WALBRAN, B. B.; ROBINS, E. Effects of central nervous system accumulation of tellurium on behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 9, n. 3, p. 297-300, Sep 1978.

WIDY-TYSZKIEWICZ, E. et al. Tellurium-induced cognitive deficits in rats are related to neuropathological changes in the central nervous system. *Toxicol Lett*, v. 131, n. 3, p. 203-14, May 28 2002.

XU, J. et al. The role of metabotropic glutamate receptor 5 in developmental lead neurotoxicity. *Toxicol Lett*, v. 191, n. 2-3, p. 223-30, Dec 15 2009.

YAREMA, M. C.; CURRY, S. C. Acute tellurium toxicity from ingestion of metal-oxidizing solutions. *Pediatrics*, v. 116, n. 2, p. e319-21, Aug 2005.

ZAMONER, A. et al. Nongenomic actions of thyroxine modulate intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of rats. *Neuroscience*, v. 156, n. 3, p. 640-52, Oct 15 2008.