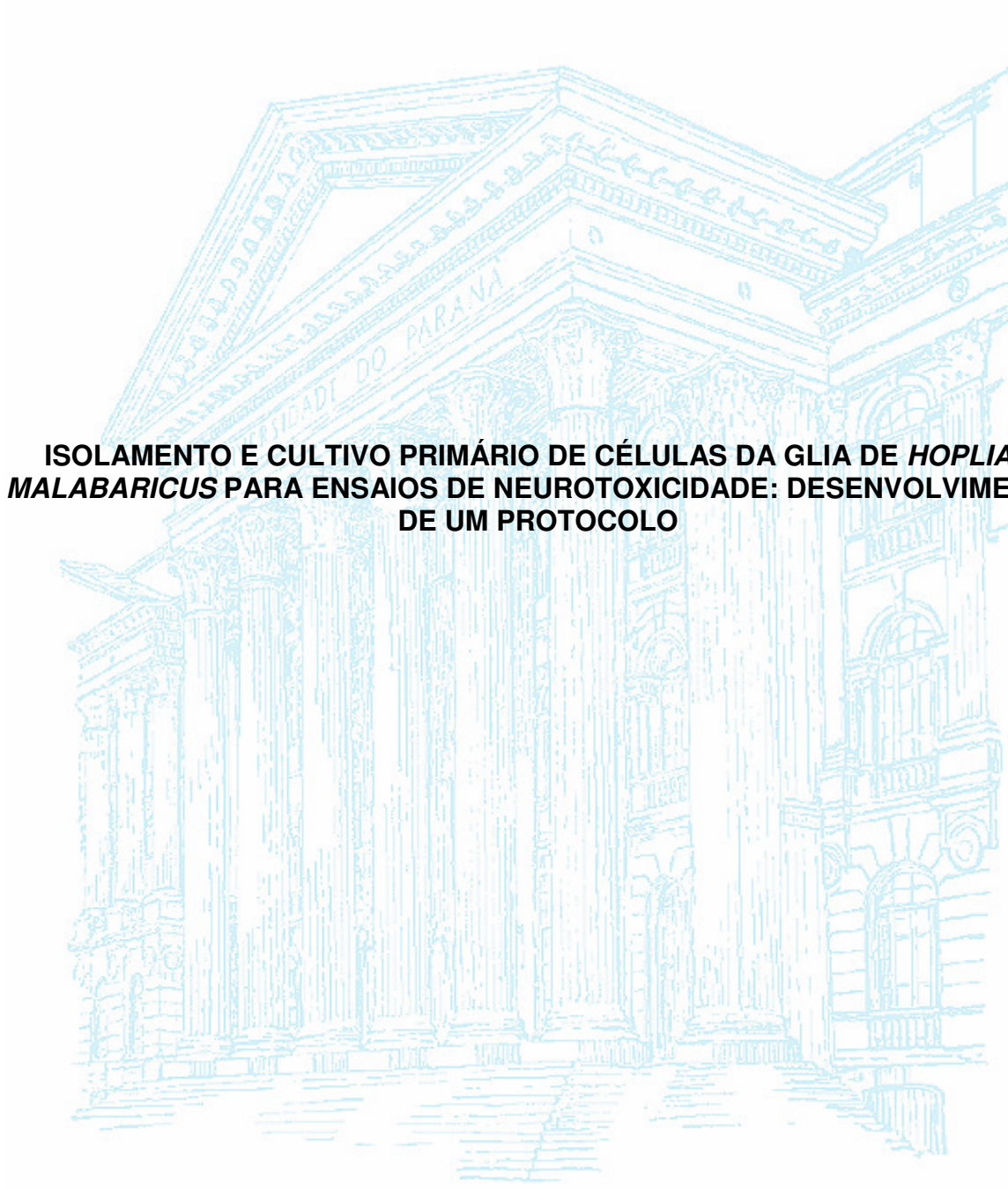


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAOLA CAROLINE NAGAMATSU



ISOLAMENTO E CULTIVO PRIMÁRIO DE CÉLULAS DA GLIA DE *HOPLIAS MALABARICUS* PARA ENSAIOS DE NEUROTOXICIDADE: DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO

**CURITIBA
2011**

PAOLA CAROLINE NAGAMATSU

ISOLAMENTO E CULTIVO PRIMÁRIO DE CÉLULAS DA GLIA DE *HOPLIAS MALABARICUS* PARA ENSAIOS DE NEUROTOXICIDADE: DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO

Monografia apresentada para a conclusão do curso de Bacharelado em Biologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: **Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro**

**CURITIBA
2011**

“... da bem-aventurança e da alegria na vida há pouco a ser dito enquanto duram; assim como as obras belas e maravilhosas, enquanto perduram para que os olhos as contemplem, são registros de si mesmas; e somente quando correm perigo ou são destruídas é que se transformam em poesia.”

J.R.R. Tolkien

AGRADECIMENTOS

Agradeço de forma muito especial ao meu orientador, Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, pela oportunidade de ser sua aluna e por ele nunca ter desistido de mim.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Federal do Paraná, pela amizade e pelo trabalho em conjunto.

Aos meus pais, Paulo e Luciana, por todo amor e pela certeza de que nunca estarei sozinha.

A minha irmã e companheira Beatriz pelo constante apoio.

Ao meu amado Alexei, por todo carinho, respeito e compreensão.

As minhas amigas, Adriana, Dayane e Renata pela força durante a graduação.

A minha amiga Halina, por toda ajuda no momento em que mais precisei.

Ao meu amigo Flávio, por me ensinar que “no final tudo dará certo”

Ao Dr. Francisco Filipak, pelas dicas durante os experimentos.

A Dr^a. Elizabeth de Moraes, por aparecer na minha vida de forma tão inesperada e acreditar no meu trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Helena Cristina da Silva de Assis, por disponibilizar todo o material utilizado durante o cultivo celular

Ao Dr. Cesar Aparecido da Silva, por me ensinar as técnicas de cultivo celular

A Dr^a. Michele Dietrich Moura Costa e a Dr^a. Célia Regina C. Franco, por terem aceitado fazer parte da banca avaliadora desta monografia. Obrigada pelas críticas e sugestões.

A Universidade Federal do Paraná, ao Setor de Ciências Biológicas e ao Departamento de Biologia Celular, que possibilitaram o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – PRINCIPAIS GRUPOS CELULARES DO SNC E SUAS INTER-RELAÇÕES: NEURÔNIOS: CÉLULAS CONDUTORAS DE ESTÍMULOS NERVOSOS; OLIGODENDRÓCITOS: RESPONSÁVEIS PELA MIELINIZAÇÃO DOS AXÔNIOS; ASTRÓCITOS, OS QUAIS APRESENTAM DIVERSAS FUNÇÕES, DENTRE ELAS A NUTRIÇÃO, A HOMEOSTASIA E A DEFESA IMUNITÁRIA DO SNC; CÉLULAS EPENDIMÁRIAS QUE REVÊSTEM AS CAVIDADES CEREBRAIS; MICROGLIA: CÉLULAS IMUNO-EFETORAS DO SCN	14
FIGURA 2 – EXEMPLAR ADULTO DE <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> (TRAÍRA)	15
FIGURA 3 – AQUÁRIOS DE 30L PARA ACLIMATAÇÃO DE TRAÍRAS ADULTAS (A). TRAÍRA ADULTA ANESTESIADA COM BENZOCAÍNA A 1% (B).....	18
FIGURA 4 – GRADIENTE DE SEPARAÇÃO OPTIPREP. FRAÇÃO 2: NEURÔNIOS E FRAÇÃO 3: POSSÍVEIS CÉLULAS DA GLIA QUE ESTÃO SENDO INVESTIGADAS.....	19
FIGURA 5 – EUTANÁSIA POR SECÇÃO ESPINHAL (C). INCISÃO FEITA NA REGIÃO BRANQUIAL PARA EXPOR CÉREBRO (D)	20
FIGURA 6 – ASSEPSIA COM ETANOL A 70% E CLOROEXIDINA ALCOÓLICA A 2% (E, F)	21
FIGURA 7 – ENCÉFALO EXPOSTO (G). CÉREBRO APÓS A RETIRADA DAS MENINGES (H)	22
FIGURA 8 – GRADIENTE DE SEPARAÇÃO OPTIPREP	23
FIGURA 9 – CÉLULAS SUPOSTAMENTE GLIAIS DE TRAÍRA, SOB MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE, APÓS 24H (1), 72H (2,3,4 E 5) E 7 DIAS (6). BARRA = 200 μ M.....	29
FIGURA 10 – CÉLULAS SUPOSTAMENTE GLIAIS DE TRAÍRA, SOB MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE, APÓS 10 DIAS (7, 8 E 9) E 15 DIAS (10, 11 E 12). BARRA = 200 μ M.....	30
FIGURA 11 – CÉLULAS SUPOSTAMENTE GLIAIS DE TRAÍRA, SOB MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE, APÓS 15 DIAS (13), 21 DIAS (14, 15,16,17) E 30 DIAS (18). BARRA = 200 μ M.....	31
FIGURA 12 – CÉLULAS SUPOSTAMENTE GLIAIS DE TRAÍRA, SOB MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE, APÓS 35 DIAS (19, 21) E 45 DIAS (20,22). BARRA = 200 μ M.....	32
FIGURA 13 – CÉLULAS SUPOSTAMENTE GLIAIS DE TRAÍRA, SOB MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE, APÓS 35 DIAS. BARRA = 200 μ M	32
FIGURA 14 – CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS. BARRA = 25 μ M	33
GRÁFICO 1 – TESTE DO METABOLISMO MITOCONDRIAL (MTT) PARA A ESCOLHA DA MATRIZ APÓS A DEFINIÇÃO DA PAPAÍNA 30 U. NÃO HOUE DIFERENÇA SIGNIFICATIVA NA VIABILIDADE CELULAR QUANDO UTILIZADO POLI-L-LISINA, MATRIGEL OU FIBRONECTINA....	36

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ANTICORPOS UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS E DAS CÉLULAS GLIAIS	25
QUADRO 2 – ABSORBÂNCIA: MTT PARA A ESCOLHA DA MATRIZ APÓS A DEFINIÇÃO DA PAPAÍNA 30 U	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 CULTIVO CELULAR NO ESTUDO DA TOXICIDADE	9
1.2 CÉLULAS DA GLIA	10
1.3 <i>HOPLIAS MALABARICUS</i> (TRAÍRA)	12
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. JUSTIFICATIVA	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 OBTENÇÃO E CUIDADOS COM OS PEIXES	18
4.2 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS	19
4.3 CONDIÇÕES PARA O CULTIVO CELULAR	23
4.4 PRÉ-TRATAMENTO PARA MELHORAR A ADESÃO CELULAR	24
4.5 DESENHO EXPERIMENTAL	24
4.6 MICROSCOPIA ÓPTICA	25
4.7 CARACTERIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DAS CÉLULAS	25
4.8 TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS DOS DADOS	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 CULTIVO PRIMÁRIO	27
5.2 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS	28
5.3 CARACTERIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DAS CÉLULAS	33
5.4 TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS DOS DADOS	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS	39

RESUMO

Nos últimos anos, tem sido demonstrado que o uso de cultura de células como um modelo *in vitro*, fornece um sistema experimental adequado para o estudo de mecanismos tóxicos a nível celular e molecular, por permitir um ambiente controlado e isolado dos sistemas fisiológicos múltiplos que regulam suas atividades *in vivo*.

Os peixes são considerados excelentes modelos biológicos, pois fatores como a manutenção em laboratório, cuidados com a limpeza, alimentação, fácil aquisição dos exemplares e baixos custos de manutenção, favorecem a utilização deste grupo em trabalhos de toxicologia. Neste sentido, a cultura de células de peixes torna-se uma ferramenta promissora para o estudo da toxicidade. No entanto, não existem dados relacionados ao uso de cultivo primário de células nervosas da traíra (*Hoplias malabaricus*), e tão pouco estudos de efeitos e de mecanismos de toxicidade relativas aos contaminantes de origem antrópica.

Neste trabalho, glias e neurônios provenientes do encéfalo de traíra, uma espécie nativa, foram isoladas através de dissociações mecânica e enzimática, separadas por centrifugação utilizando um gradiente de separação Optiprep, e cultivadas pelo período de até 45 dias. Após o isolamento, estimou-se a viabilidade celular pelo método de exclusão de Tripán e pelo teste de MTT (metabolismo mitocondrial). As células foram cultivadas em meio DMEM-F12 e incubadas à 24°C sobre placas de 96 poços tratados com Poli-L-Lisina, Matrigel ou Fibronectina, sendo que as células não aderiram quando na ausência das proteínas de matriz. Na tentativa de identificar e caracterizar morfológicamente os tipos celulares obtidos em cultura foram realizados ensaios de imunofluorescência usando anticorpos que reconhecem proteínas específicas de glia e neurônio de camundongo. Entretanto, não foi possível diferenciar as células das culturas primárias.

O experimento consistiu em desenvolver uma metodologia de cultivo primário das células da glia de peixe para testes de neurotoxicidade. Os resultados contribuirão para a avaliação da contaminação antes da ocorrência de efeitos críticos nas células nervosas propriamente ditas e o estudo das respostas celulares possibilitará a detecção rápida e sensível de distúrbios ambientais.

Palavras-chave: Células Nervosas, Cultivo Primário, *Hoplias malabaricus*, Toxicologia Celular, Ecotoxicologia

1. INTRODUÇÃO

1.1 CULTIVO CELULAR NO ESTUDO DA TOXICIDADE

A toxicologia é uma ciência que utiliza diferentes abordagens para identificar ameaças e entender os processos básicos relacionados a distúrbios na homeostasia celular que podem ocorrer nos sistemas biológicos. Modelos *in vitro* que retenham as condições básicas das interações *in vivo* mais complexas são muito úteis nesse campo de pesquisa (BAKSI e FRAZIER, 1990). A pesquisa toxicológica nos peixes é baseada na maior parte em estudos *in vivo*, principalmente no campo do monitoramento ambiental. A justificativa para esses estudos é derivada do fato de que a ecotoxicologia avalia os efeitos dos poluentes químicos (xenobióticos) em populações e ecossistemas de forma preditiva. Sendo assim, as técnicas que evidenciam as respostas em níveis inferiores de organização biológica são muito úteis se utilizadas de forma preventiva. Nesse sentido, as culturas de células têm sido bastante exploradas como uma ferramenta para o estudo de toxicologia (BUCIO *et al.*, 1995), principalmente por oferecer uma alternativa para os animais *in vivo*. Apesar dos estudos *in vitro* não poderem substituir completamente os estudos da toxicidade em animais, tem sido demonstrado que o uso de cultura de células, fornece o melhor sistema experimental para o estudo de mecanismos tóxicos a nível molecular e celular, isto porque permiti um ambiente controlado e isolado dos sistemas fisiológicos múltiplos que regulam suas atividades *in vivo* (DUNCAN-ACHANZAR *et al.*, 1996).

O Laboratório de Toxicologia Celular tem nos últimos 6 anos, de forma pioneira no Brasil, adaptando metodologias de cultivo primário de células de peixes com fins aos estudos de toxicologia de xenobióticos. Foram estabelecidos protocolos para cultivo primário de hepatócitos de 3 espécies nativas, incluindo *Hoplias malabaricus* (FILIPAK NETO *et al.*, 2006; BUSSOLARO *et al.*, 2010).

1.2 CELULAS DA GLIA

De acordo com Lent, 2001, o estudo microscópico do tecido nervoso, iniciado no final do século XIX, revelou a existência não só dos neurônios, mas também da célula glial como as unidades principais do Sistema Nervoso Central (SNC). A princípio, acreditava-se que as células gliais eram encarregadas apenas de nutrir e garantir a saúde dos neurônios, mas atualmente, tem-se constatado, entre outras funções, a participação dessas células na orientação do crescimento e da migração dos neurônios durante o desenvolvimento, na comunicação entre eles durante a vida adulta, e na defesa e reconhecimento em situações patológicas. Embora não se possa afirmar que estejam envolvidas no processo de transmissão do impulso nervoso, são conhecidas outras funções vitais dessas células, a exemplo da sustentação dos neurônios, constituindo, dessa maneira, parte fundamental da estrutura do cérebro, da participação na separação e isolamento de grupos neuronais e conexões sinápticas, e da capacidade fagocítica de fragmentos celulares após dano ou morte neuronal (KANDEL *et al.*, 2000). Outras atividades conhecidas dessas células dizem respeito à captação de nutrientes e de oxigênio do sangue para os neurônios, assim como a manutenção do equilíbrio osmótico do SNC e a defesa imunitária (TARDY *et al.*, 1991; KANDEL, 2000; LETOURNEL – BOULLAND *et al.*, 1994; BARRES & BARDES, 2000).

As células gliais compreendem a maioria das células do SNC de vertebrados, correspondendo a 65% nos roedores e 90% em humanos. A neurógliia, conjunto de células gliais do SNC (figura 1), divide-se em três grupos principais: A macroglia representada pelos oligodendrócitos e os astrócitos; as células microgliciais ou microglia e, as células ependimárias. Estas últimas recobrem internamente os ventrículos e demais cavidades do tecido nervoso. Os oligodendrócitos possuem prolongamentos celulares relacionados à mielinização em torno dos axônios, garantindo maior eficiência na condução do estímulo nervoso. Não apresentam mudanças reativas e são bastante similares aos danos neuronais e as alterações no microambiente cerebral (LENT, 2001; STREIT *et al.*, 1999). As células da microglia representam as células imuno-efetoras do SNC e pertencem à linhagem de fagócitos mononucleares. São derivadas de células mesodérmicas precursoras da linhagem hematopoiética e povoam o encéfalo desde o início do seu desenvolvimento

(VILHARDT, 2005). A microglia realiza no encéfalo funções similares às desempenhadas pelos macrófagos em outros órgãos, incluindo a fagocitose, a indução à inflamação e a apresentação de antígenos, constituindo, dessa maneira, a primeira linha de defesa contra patógenos invasores (ALOISI, 2001). Estas células tanto podem facilitar a sobrevivência dos neurônios, pela secreção de substâncias neurotróficas e ativação de astrócitos (GIULIAN *et al.*, 1994), como também, estão associadas a doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (MCMILLAN, 1999; LEVY E NESSETA, 2003; PERL E OLANOW, 2007).

Os astrócitos constituem cerca da metade de toda a população glial, estando diretamente relacionados com o desenvolvimento, homeostasia e detoxificação do SNC (TARDY *et al.*, 1991; KANDEL, 2000). Estas células contribuem ativamente para o suporte energético e para a resposta imune do SNC contra agentes químicos, infecciosos ou traumatismos (LETOURNEL – BOULLAND *et al.*, 1994; BARRES & BARDES, 2000). São geralmente denominados protoplasmáticos e fibrosos, que se encontram respectivamente, na substância cinzenta e na substância branca. Esta nomenclatura baseia-se apenas em diferenças morfológicas, visto que não se conhecem diferenças funcionais marcantes entre esses dois subtipos celulares (KRIEGSTEIN & GOTZ, 2003; LENT, 2001). Estas células apresentam prolongamentos a partir do corpo celular, os quais se ramificam formando uma densa rede. Tais prolongamentos penetram nos espaços interneuronais, envolvendo sinapses e nós de Ranvier, onde podem capturar transmissores, ou outros produtos do fluido extracelular. Constituem também o revestimento interno da parede das cavidades intercerebrais e das meninges, fazendo uma proteção dos capilares sanguíneos do SNC, compondo, dessa maneira, a base física da barreira hematoencefálica (BHE). Além de suas características morfo-funcionais, os astrócitos maduros têm sido identificados mais recentemente pela expressão de uma proteína do filamento intermediário do citoesqueleto, a chamada proteína ácida do gliofilamento - GFAP – um marcador exclusivo desse tipo celular e também o responsável pela forma típica destas células (CAJAL, 1995).

Os astrócitos apresentam capacidade de proliferação após traumas no tecido nervoso. Além de se multiplicarem, deslocam-se para as proximidades da lesão, formando uma cicatriz glial ao seu redor através do acúmulo de filamentos ricos em GFAP. Estas alterações caracterizam a reatividade astrocitária, constituindo o fenômeno conhecido como astrogliose ou simplesmente gliose (ASCHNER, 1998;

LENT, 2001). O crescimento dos axônios ocorre na presença dos astrócitos, que os guiam, tanto durante o desenvolvimento do encéfalo, quanto após danos, em indivíduos adultos (CLEMENT *et al.*, 1998; GARWOOD *et al.*, 1999; COSTA *et al.*, 2002; NADARAJAH, 2003).

Pouco se conhece sobre as intrincadas relações funcionais que existem entre células microgliais e astrocitárias. Sabe-se que em culturas puras, a microglia apresenta-se frequentemente com fenótipo tipicamente macrofágico, ou seja, arredondado e com poucos prolongamentos. No entanto, quando cultivado sobre camadas de astrócitos, torna-se ramificada e mostra morfologia semelhante à da microglia quiescente (ramificada) do SNC. Este comportamento sugere que a função dessas células também seja influenciada pela presença de astrócitos (STREIT *et al.*, 1999).

Diante da importância das células da glia na composição e funcionamento do SNC e da necessidade de melhor compreender o mecanismo exato da neurotoxicidade de xenobióticos, foi desenvolvido neste estudo uma metodologia de culturas primárias de células do tecido nervoso, obtidas do peixe neotropical *Hoplias Malabaricus* (traíra) (figura 2).

1.3 HOPLIAS MALABARICUS (TRAÍRA)

Os peixes são importantes recursos vivos, seja pelo seu potencial comercial, seja pelo aspecto ecológico. Vários trabalhos utilizam estes vertebrados para avaliar os efeitos tóxicos de diversos contaminantes, dentre eles os organoclorados, policíclicos aromáticos, carbamatos e outros pesticidas (SILVA FILHO *et al.*, 2000; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005). São considerados excelentes modelos biológicos, pois se encontram em diversos ambientes, em diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar além de alguns possuírem ampla distribuição geográfica.

A traíra, *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794), é uma espécie de ampla distribuição na América do Sul ocorrendo desde a América Central até a Argentina e Chile. Pertence a classe Actinopterygii, ordem Characiformes e família Erythrinidae (SANTOS, 1981). É uma espécie de corpo alongado e cilíndrico, irregularmente manchado; dentes caninos no maxilar e língua com dentículos ásperos (BARBIERI

et al., 1982; MOYLE & CECH 1996). Habita preferencialmente águas paradas ou de pouca correnteza, nas margens ou em pequenas profundidades, sobre fundos de lama e em áreas abrigadas por vegetação aquática. É frequentemente encontrada nas margens alagadas dos rios, nas poças dos brejos e nas represas, conseguindo sobreviver em coleções de água muito restritas (PAIVA, 1972).

Durante a fase larval é planctófaga e os alevinos, cujo comprimento varia de 50 mm até 100 mm, são principalmente insetívoros e muito vorazes, suportando menores períodos de jejum. Na fase juvenil, quando atingem em torno dos 140 mm de comprimento total, são também ictiófagos, sendo que até este comprimento ingerem grãos de areia e pedras, sugerindo que se alimentam à custa de organismos bentônicos (PAIVA, 1974; BISTONI *et al.*, 1995). Na fase adulta, a partir de 200 mm de comprimento padrão, *H. malabaricus* é um peixe predominantemente ictiófago, parecendo ingerir indiscriminadamente peixes que estejam disponíveis. Em decorrência de hábitos sedentários, sua frequência alimentar é bastante variável, podendo apresentar grande resistência aos períodos de jejum, independente de estarem na fase reprodutiva (ao contrário da maioria dos peixes) (PAIVA, 1974; BARBIERI *et al.*, 1982; BISTONI *et al.*, 1995; REID *et al.*, 2000; RIOS *et al.*, 2002).

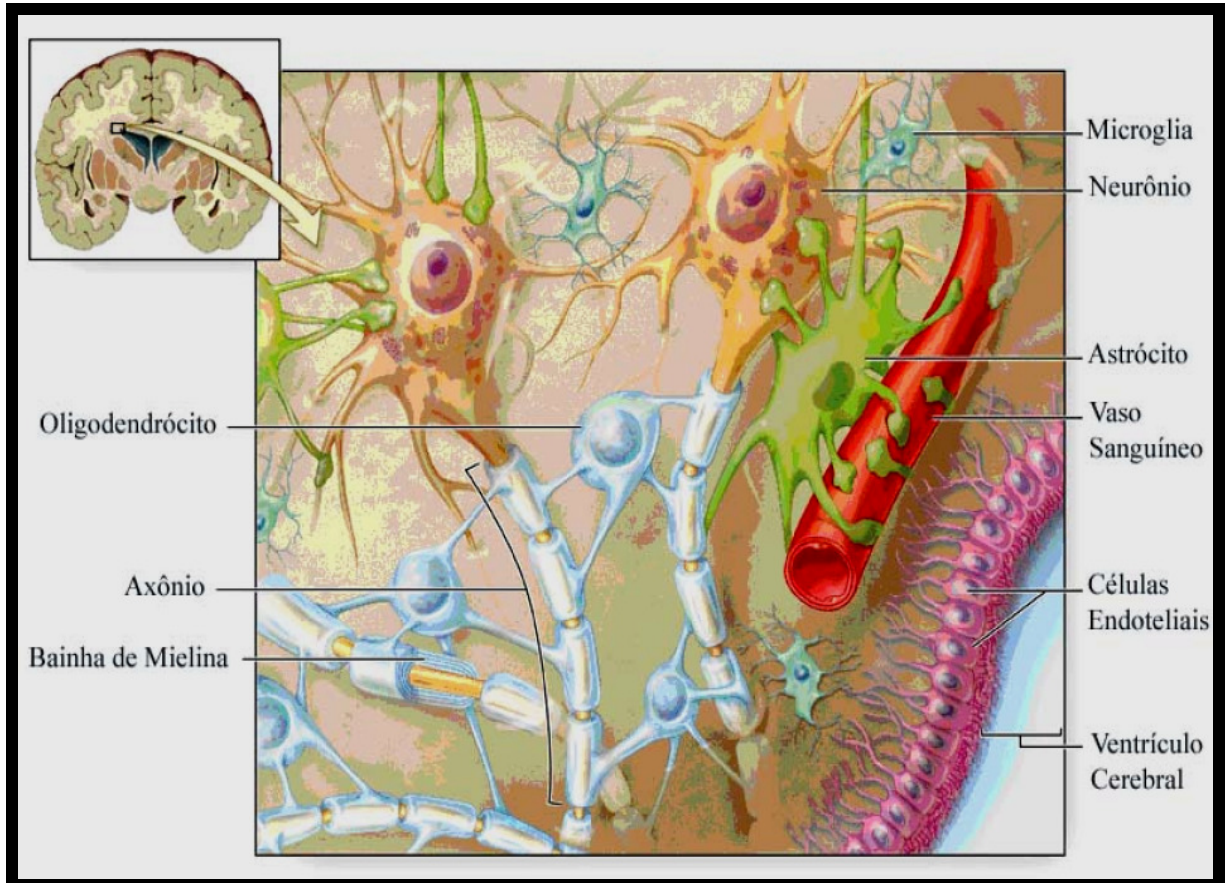


FIGURA 1 – PRINCIPAIS GRUPOS CELULARES DO SNC E SUAS INTER-RELAÇÕES: NEURÔNIOS: CÉLULAS CONDUTORAS DE ESTÍMULOS NERVOSOS; OLIGODENDRÓCITOS: RESPONSÁVEIS PELA MIELINIZAÇÃO DOS AXÔNIOS; ASTRÓCITOS, OS QUAIS APRESENTAM DIVERSAS FUNÇÕES, DENTRE ELAS A NUTRIÇÃO, A HOMEOSTASIA E A DEFESA IMUNITÁRIA DO SNC; CÉLULAS EPENDIMÁRIAS QUE REVESTEM AS CAVIDADES CEREBRAIS; MICROGLIA: CÉLULAS IMUNO-EFETORAS DO SCN. ADAPTADO DE WWW.INDIANA.EDU (2006)



FIGURA 2 – EXEMPLAR ADULTO DE *HOPLIAS MALABARICUS* (TRAÍRA)

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer uma metodologia de cultivo primário de células da glia da espécie de peixe *Hoplias malabaricus* para ser utilizada em estudos de neurotoxicidade de xenobióticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar fragmentos teciduais do encéfalo de *Hoplias malabaricus* para isolar células da glia;
- Adaptar a metodologia de extração das células da glia bem como padronizar o meio de cultivo, uso de garrafas e microplacas;
- Avaliar a viabilidade das células da glia como forma de determinar o sucesso do método;
- Disponibilizar uma ferramenta capaz de avaliar os efeitos neurotóxicos xenobióticos através da exposição das células da glia;

3. JUSTIFICATIVA

Diante da importância das células da glia na composição e funcionamento do SNC e da necessidade de melhor compreender seu papel em situações de estresse químico, é de fundamental importância que estudos sejam realizados com o intuito de disponibilizar métodos que avaliem os efeitos de xenobióticos nos mecanismos de toxicidade envolvendo células nervosas, uma vez que várias classes de contaminantes atuam neste tipo celular. Logo, o desenvolvimento de culturas primárias mistas de células da glia torna-se um importante modelo *in vitro* na investigação da toxicidade de xenobióticos, principalmente aqueles de origem antrópica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E CUIDADOS COM OS PEIXES

Os peixes adultos da espécie *Hoplias malabaricus* foram obtidos de uma Estação de Piscicultura localizada na região de Garuva-SC. Os animais foram transportados ao Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná e aclimatados por 15 dias em aquários de 30l, com fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro, aeração constante e temperatura da água mantida a $23^{\circ}\text{C} \pm 2$ (figura 3- A,B).

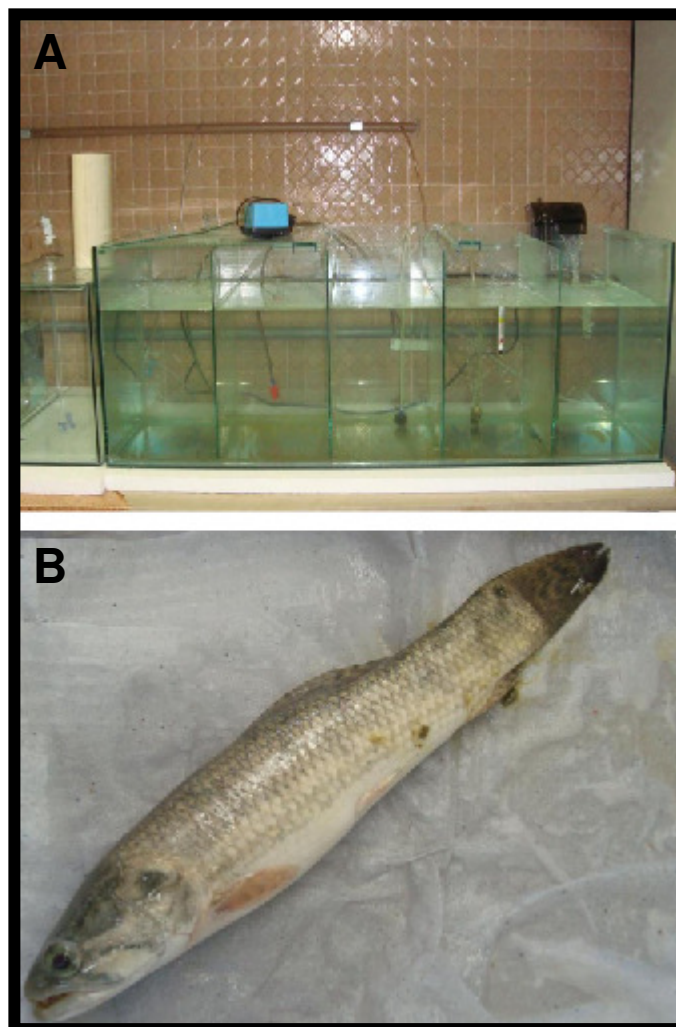


FIGURA 3 – AQUÁRIOS DE 30L PARA ACLIMATAÇÃO DE TRAÍRAS ADULTAS (A). TRAÍRA ADULTA ANESTESIADA COM BENZOCAÍNA A 1% (B)

4.2 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS

As culturas primárias das células da glia foram realizadas no Laboratório de Cultivo Celular do AQUATOXI, Setor de Ciências Biológicas. Esse método adaptado para peixe da espécie *Hoplias malabaricus* (BREWER & TORRICELLI, 2007), que já está em desenvolvimento pelo Laboratório de Toxicologia Ambiental, do Departamento de Farmacologia/UFPR, baseia-se na separação dos principais tipos celulares do encéfalo de mamíferos através do gradiente optiprep para cultivo primário de neurônios (figura 4). As células da glia, que antes eram descartadas, passaram a ser aproveitadas pelo nosso Laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

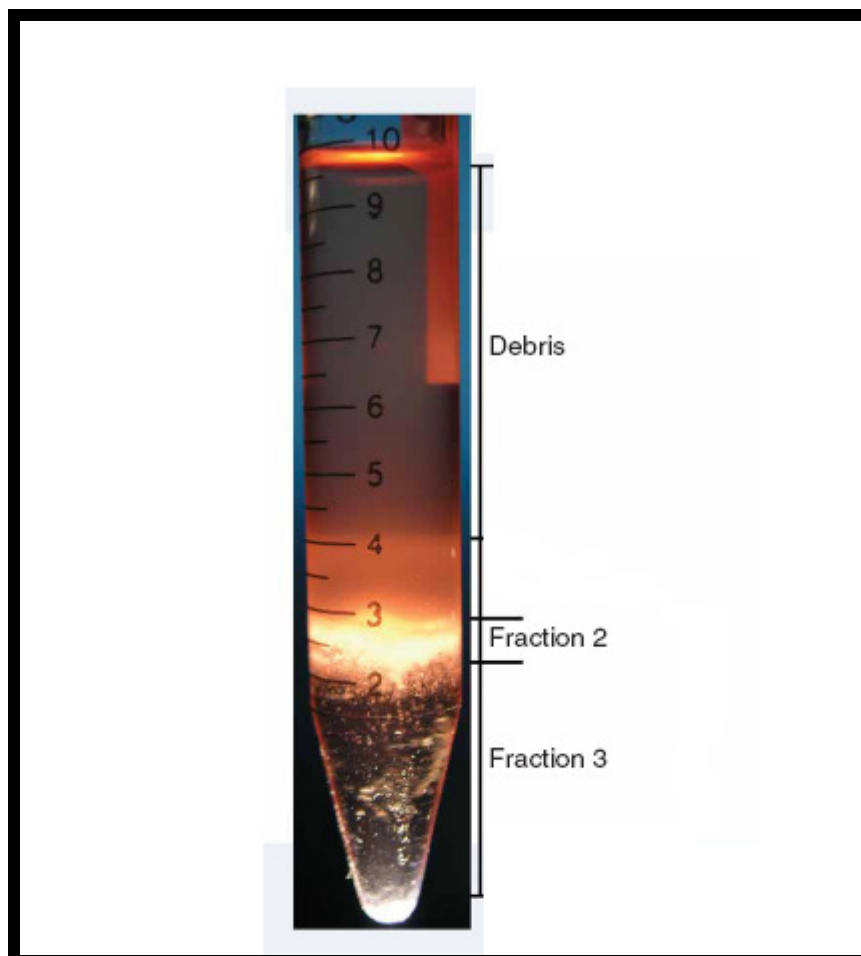


FIGURA 4 – GRADIENTE DE SEPARAÇÃO OPTIPREP. FRAÇÃO 2: NEURÔNIOS E FRAÇÃO 3: POSSÍVEIS CÉLULAS DA GLIA QUE ESTÃO SENDO INVESTIGADAS. ADAPTADO DE (BREWER & TORRICELLI, 2007)

Cada animal, de um total de 12, foi anestesiado com Benzocaína a 1% e sofreu a eutanásia por secção espinhal logo abaixo do crânio para a remoção do encéfalo em fluxo laminar (figura 3- B). Foi realizada a assepsia com etanol a 70% e clorooxidina alcoólica a 2 % (figura 5- C, D, figura 6- E, F e figura 7- G e H). Em seguida, as meninges foram removidas em lupa estereoscópica e o órgão foi cortado com o auxílio de pinças e lâmina de bisturi estéreis em solução tampão de HBSS-.

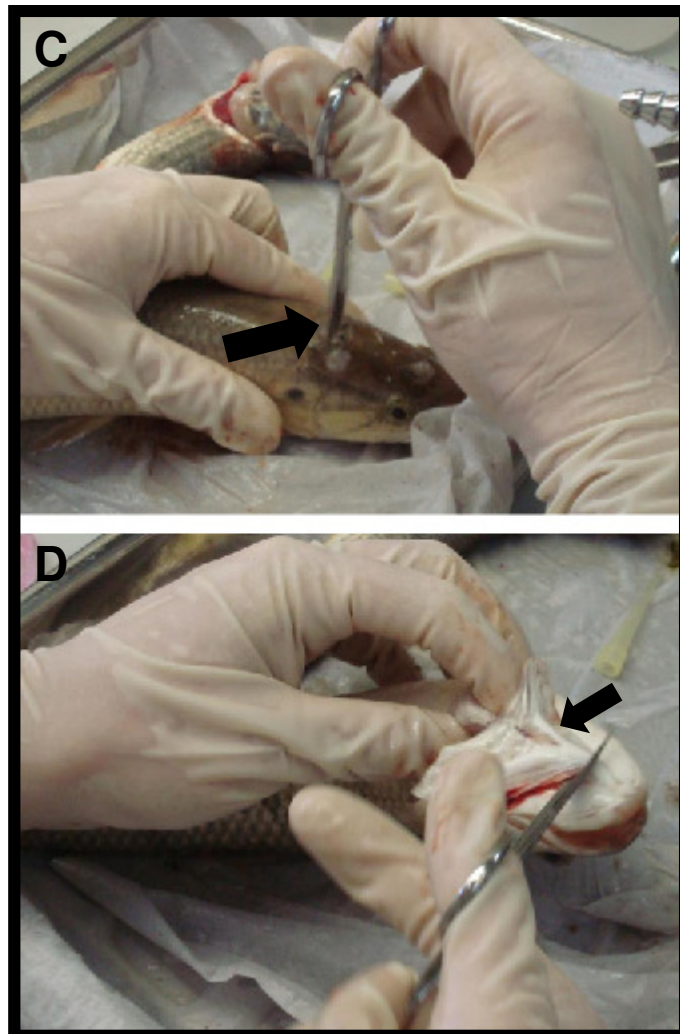


FIGURA 5 – EUTANÁSIA POR SECÇÃO ESPINHAL (C). INCISÃO FEITA NA REGIÃO BRANQUIAL PARA EXPOR CÉREBRO (D) [SETA]



FIGURA 6 – ASSEPSIA COM ETANOL A 70% E CLOROEXIDINA ALCOÓLICA A 2% (E, F) [SETA]

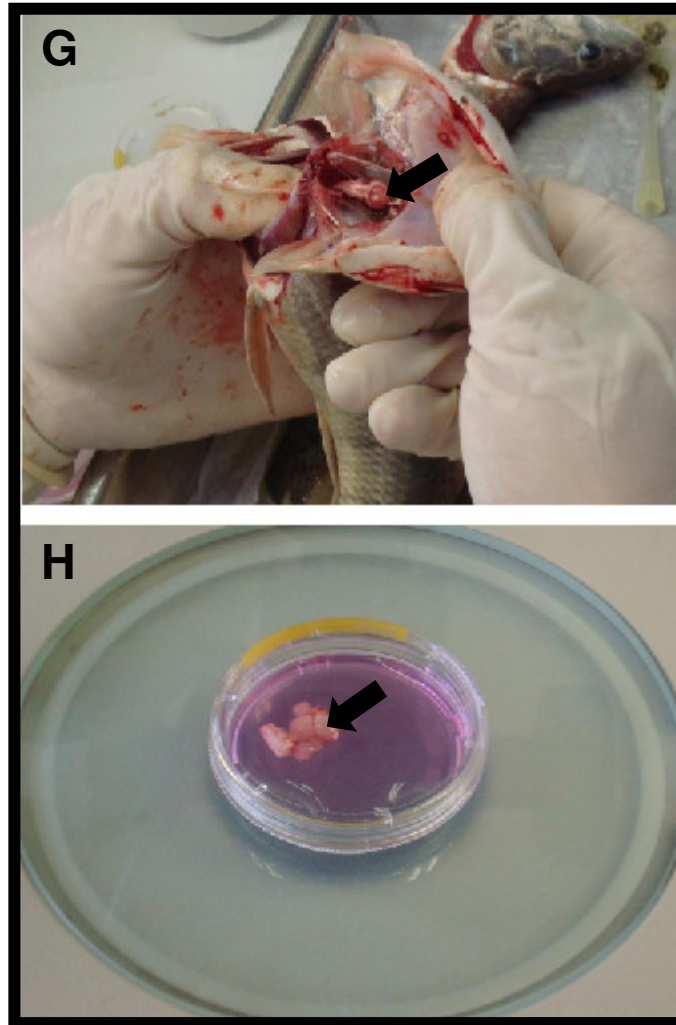


FIGURA 7 – ENCÉFALO EXPOSTO (G) [SETA]. CÉREBRO APÓS A RETIRADA DAS MENINGES (H) [SETA]

Os fragmentos do encéfalo foram transferidos para um tubo de 15 ml contendo proteases (Dispase ou papaína) para a dissociação enzimática tecidual e deixados, fixos em um rotator, na incubadora (30°C) por 30 minutos. Com a finalidade de triturar o resto tecidual, a solução foi, delicadamente, aspirada e espirada durante cerca de um minuto utilizando uma pipeta *Pasteur* de vidro estéril e colocada novamente na incubadora por 15 minutos. Esse procedimento foi repetido mais uma vez utilizando, entretanto, uma pipeta Pasteur com diâmetro menor e incubado por mais 15 minutos. Após esse tempo, o extrato celular foi transferido para um tubo contendo o gradiente OptiPrep (densidade 1.32), centrifugado por 15 minutos a 800 x g e separado por diferença de densidade: fração contendo debris, fração contendo neurônios e uma fração contendo tipos celulares de glias a serem investigadas no presente trabalho (figura 8-l). Em seguida, estes foram lavados com meio de cultivo

(DMEM/F12), centrifugadas por mais 5 minutos e lavadas novamente para ser adicionado o meio completo DMEM/F12 a 5% e soro fetal bovino (SFB).

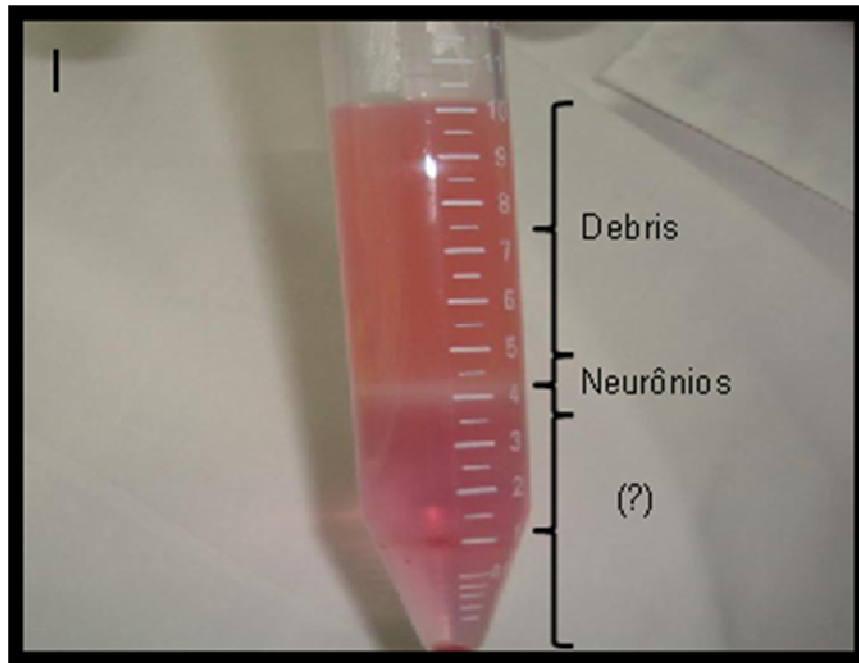


FIGURA 8 – GRADIENTE DE SEPARAÇÃO OPTIPREP. NOTAR A BANDA Densa PROeminente DA FRAÇÃO DE NEURÔNIOS (I) E LOGO ABAIXO A FRAÇÃO DE TIPOS CELULARES DE GLIAS

4.3 CONDIÇÕES PARA O CULTIVO CELULAR

O número de células isoladas foi determinado por contagem manual em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi estimada através do teste de exclusão do corante azul de Tripán segundo DeRENZIS e SCHECHTMANN, 1973. As células foram classificadas visualmente em viáveis (células não coradas e com membrana íntegra) e não viáveis (células coradas e com membrana não íntegra) sob microscopia de contraste de fase. Após a contagem, as células foram semeadas em placas de cultura ou garrafa contendo o meio DMEM/ F12 (Invitrogen) (sais, glicose, aminoácidos e vitaminas) suplementado com B27 (Invitrogen) e soro fetal bovino 5%. A placa foi mantida a 24 °C em estufa de cultura com CO₂ a 1,7%.

4.4 PRÉ-TRATAMENTO PARA MELHORAR A ADESÃO CELULAR

A placa de cultura de 96 poços de poliestireno (Corning) foi previamente tratada com matrigel, poli-L-lisina ou fibronectina (Invitrogen 0,1%) (substrato) para melhorar a adesão das células. Os substratos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata, do Departamento de Patologia Básica, do Setor de Ciências Biológicas/ UFPR.

Após a cobertura dos poços com os substratos citados, e a incubação, eles foram lavados com o próprio meio.

4.5 DESENHO EXPERIMENTAL

Após serem isoladas de uma traíra, as células gliais foram diluídas em meio de cultivo e plaqueadas em placa de 96 poços de poliestireno (Corning). Uma alíquota da solução foi retirada para o teste de viabilidade. Cada poço recebeu 1 ml de meio, que foi substituído por um novo meio de cultura a cada 3 dias.

As células foram cultivadas por 24 h em incubadora (24°C) para a recuperação das células do procedimento de isolamento, adesão e reagregação. A maioria das células não aderidas e mortas foram removidas na troca do meio antigo por um meio novo.

Todo o procedimento de obtenção, plaqueamento e troca de meio das células gliais foi realizado no fluxo laminar vertical (Tecnal – Brasil) do laboratório de Cultivo Celular do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular, e o material utilizado foi esterilizado (em autoclave a 1,3 atm e 40 min ou membrana de 0,22 µm) ou obtido estéril.

4.6 MICROSCOPIA ÓPTICA

A fim de verificar a progressiva organização celular e a possibilidade de contaminação, utilizou-se o microscópio de contraste de fase DMIL com câmera fotográfica MPS30 acoplada (ambos da Leica – Alemanha), localizados no laboratório de Cultivo Celular do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR.

4.7 CARACTERIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DAS CÉLULAS

A fim de identificar os neurônios e as células gliais em cultura, foram utilizados anticorpos primários específicos para proteínas de tais células. Os anticorpos foram gentilmente cedidos pela professora Dr^a Elizabeth de Moraes, do Departamento de Patologia Básica, do Setor de Ciências Biológicas/ UFPR (quadro1). Para a marcação celular, foi utilizado o marcador nuclear DAPI (4,6 Diamidino-2-phenylindole).

Anticorpo Primário	Origem	Fabricante	Tipo de identificação	Diluição
GFAP	Coelho	Sigma	Células gliais	1:400
Classe III β -tubulina	Camundongo	Sigma	Neurônios	1:500

Anticorpo Secundário	Obtido de cabra contra	Fabricante	Tipo de identificação	Diluição
Alexa-fluor	Coelho	Molecular Probes	Células gliais	1:800
Texas-red	Camundongo	Molecular Probes	Neurônios	1:800

QUADRO 1 – ANTICORPOS UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS E DAS CÉLULAS GLIAIS

4.8 TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS DOS DADOS

No teste do Metabolismo Mitocondrial (MTT) para a escolha da matriz após a definição da Papaína 30 U, foi utilizada a análise de variância de uma via (one way ANOVA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CULTIVO PRIMÁRIO

Até o momento há carência de informação a respeito do cultivo primário de células da glia de peixes, o que dificulta a investigação e a otimização das técnicas bem como a discussão dos resultados provenientes dos métodos empregados durante todo o procedimento deste trabalho. Com relação à espécie *Hoplias malabaricus*, a Poli-L-Lisina mostrou ser adequada para a adesão dessas células, através da simples criação de cargas positivas na superfície da placa. Porém, não foi descartado o uso de Matrigel ou Fibronectina nas culturas. Para linhagens celulares de peixe, tem sido demonstrado que matrizes extracelulares influenciam na diferenciação fenotípica (KANEKO et al., 1995), mas para as células da glia não há disponibilidade de dados conclusivos.

Embora o meio de cultivo para glias varie conforme o trabalho, o meio mais utilizado é o DMEM/F12 (PINHEIRO et al., 2006; ALMEIDA-LEITE e ARANTES, 2010 e MOUSSAD e DRAHEIM, 2010). Não foram realizadas alterações na composição do meio por falta de dados disponíveis na literatura.

Apesar dos efeitos negativos que o soro de mamífero (neste caso, soro fetal bovino) possa causar nas células de peixes (HASCHEMEYER e MATHEWS, 1983 e TOCHER et al., 1988), optou-se por utilizá-lo a 5% no meio, já que não houve acesso a soro de peixes, que sofre de falta de padronização e distribuição e de alto risco de contaminação por micoplasmas, quando isolados do próprio pesquisador (KOKAL et al., 1988 e BAKSI e FRAZIER, 1990). Não foram realizadas análises que permitam afirmar se houve alterações morfológicas ou funcionais nas células da glia devido ao uso deste soro.

5.2 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS

As células supostamente gliais de traíra, em cultivo, sofreram mudanças morfológicas e de organização ao longo do período do cultivo, como segue na descrição. Até 72 horas após o plaqueamento, as células possuem formato arredondado (figura 9- 1, 2, 3, 4 e 5). Após 10 dias de cultivo, as células emitem poucos prolongamentos da membrana plasmática à procura de outras células (figura 10-7, 8 e 9). A partir do décimo quinto dia, as células passam a desenvolver prolongamentos citoplasmáticos em todas as direções e em grande quantidade, sendo possível perceber a formação de um “circuito ”através do contato entre as células adjacentes (figura 10- S, T e U; figura 11- 13, 14, 15, 16, 17 e 18; figura 12- 19, 20, 21 e 22).

De acordo com a literatura, as células gliais são classificadas em dois grupos: a macroglia e a microglia. A macroglia é constituída pelos oligodendrócitos e pelos astrócitos (PEREA & ARAQUE, 2005; JESSEN, 2004). Os astrócitos compreendem aproximadamente 50% de toda massa cerebral e são as células gliais mais abundantes do sistema nervoso central (GEE & KELLER, 2005). Sendo assim, diante da persistência morfológica encontrada durante o cultivo, algumas células gliais foram caracterizadas como sendo astrócitos (figura 13-J). Células semelhantes foram observadas em cultivos primários de astrócitos de ratos (B.HILDEBRAND *et al.*, 1997) (figura 14). No entanto, não foi possível caracterizar os oligodendrócitos e as microglias através da análise morfológica sendo necessário o uso da imunocitoquímica para identificar tais células.

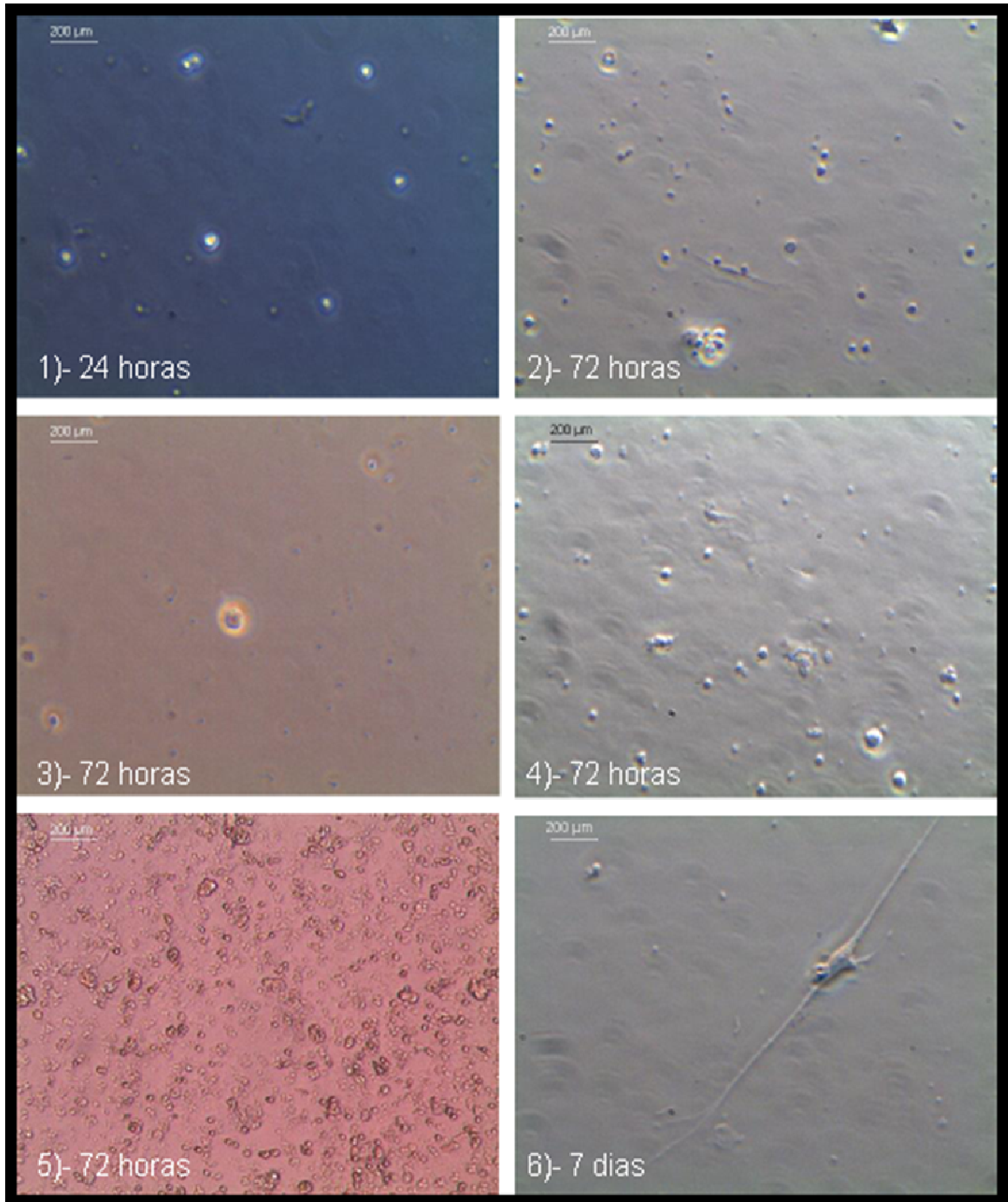


FIGURA 9 – CÉLULAS SUPOSTAMENTE GLIAIS DE TRAÍRA, SOB MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE, APÓS 24H (1), 72H (2,3,4 E 5) E 7DIAS (6). BARRA = 200 µM

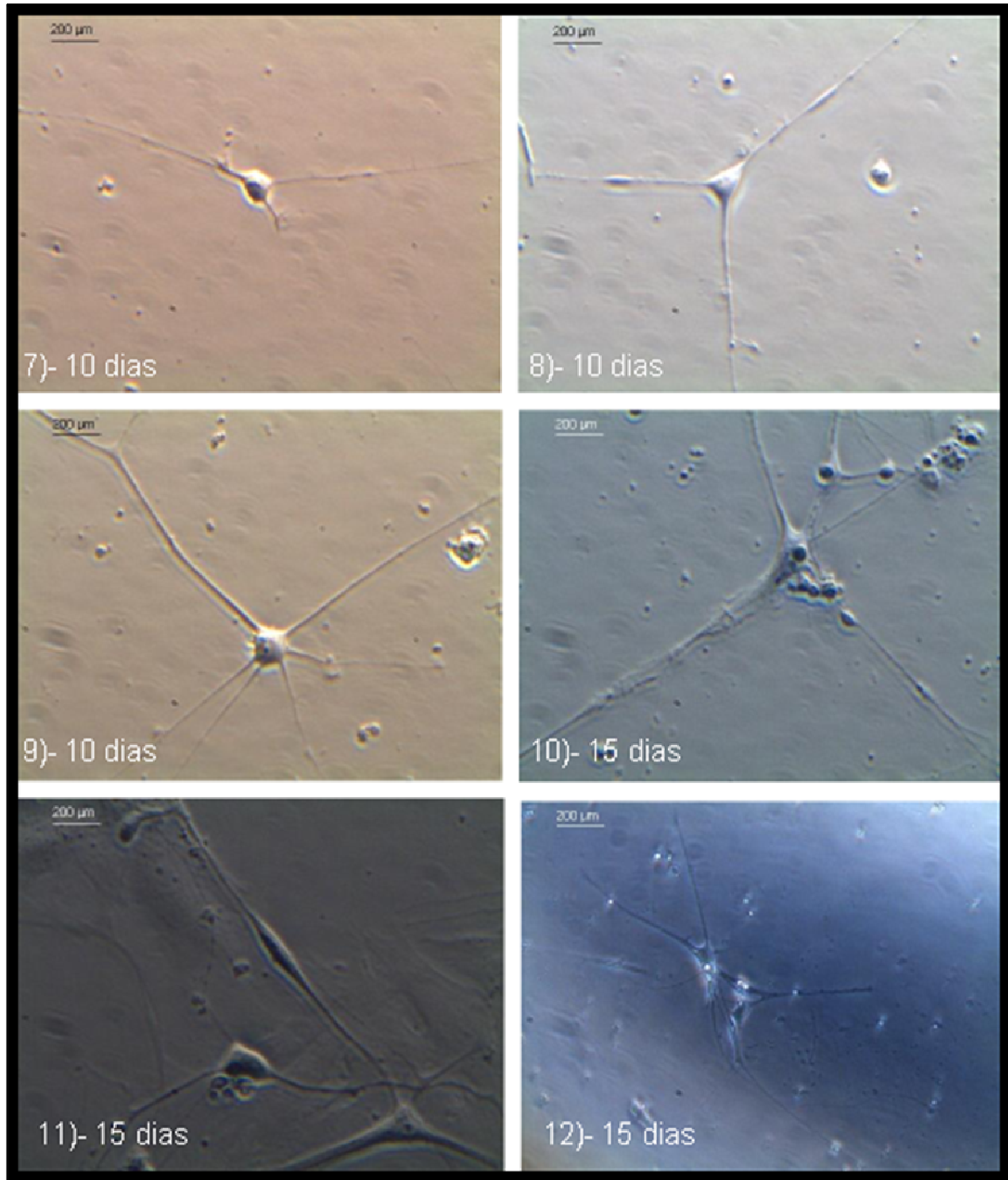


FIGURA 10 –CÉLULAS SUPOSTAMENTE GLIAIS DE TRAÍRA, SOB MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE, APÓS 10 DIAS (7, 8 E 9) E 15 DIAS (10, 11 E 12). BARRA = 200 µM

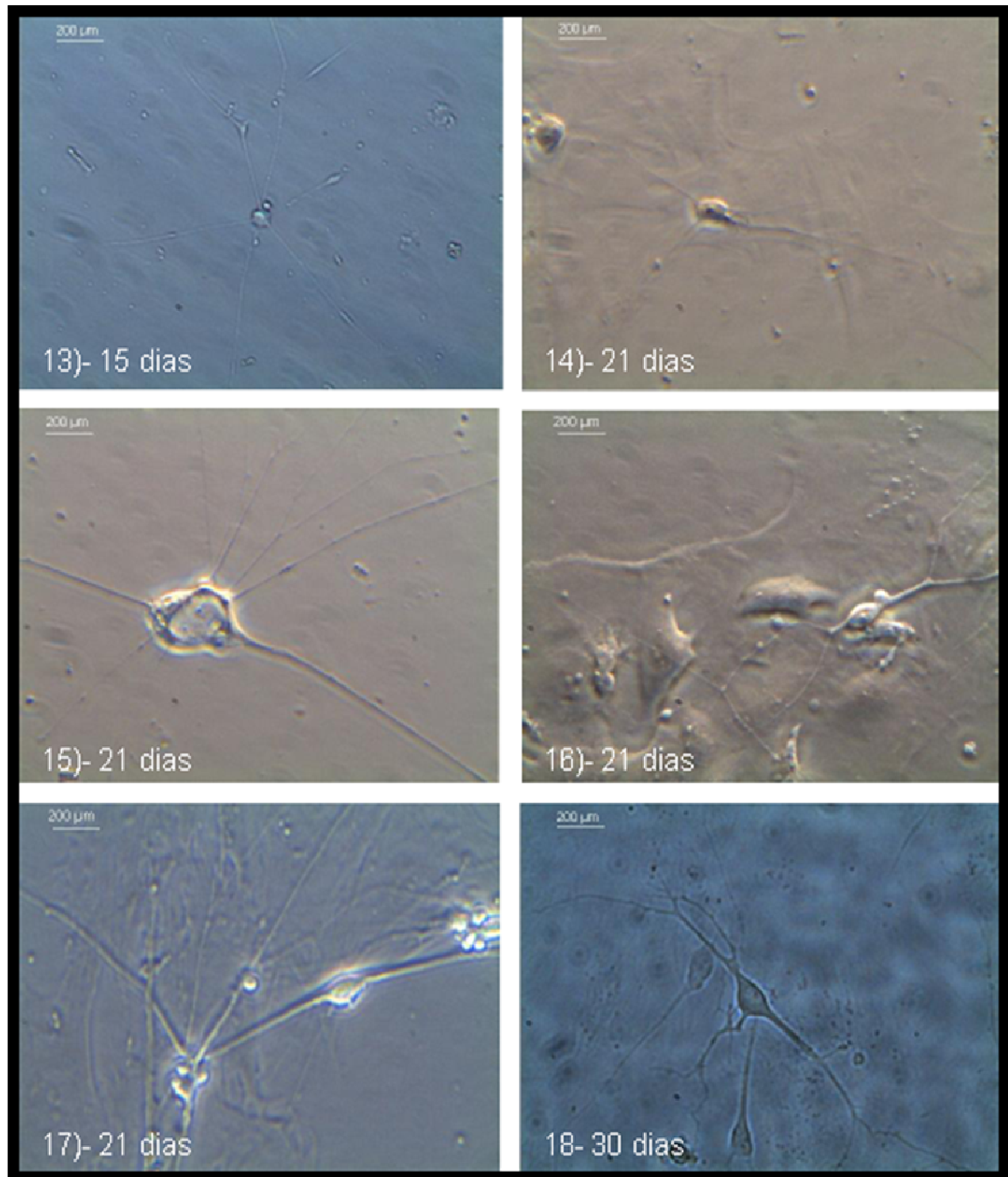


FIGURA 11 – CÉLULAS SUPOSTAMENTE GLIAIS DE TRAÍRA, SOB MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE, APÓS 15 DIAS (13), 21 DIAS (14, 15,16 E 17) E 30 DIAS (18). BARRA = 200 µM

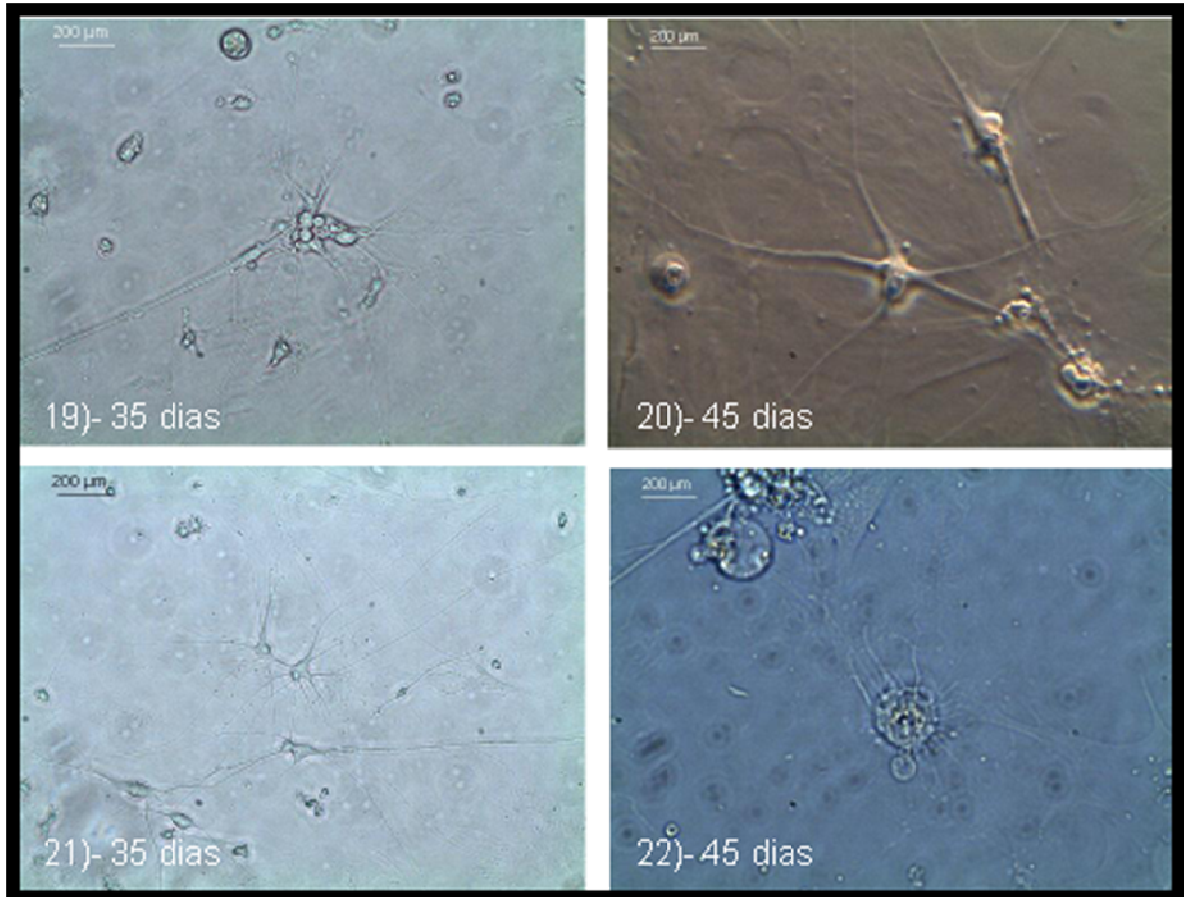


FIGURA 12 – CÉLULAS SUPOSTAMENTE GLIAIS DE TRAÍRA, SOB MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE, APÓS 35 DIAS (19 E 21) E 45 DIAS (20 E 22). BARRA = 200 μM



FIGURA 13 – CÉLULAS SUPOSTAMENTE GLIAIS DE TRAÍRA, SOB MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE, APÓS 35 DIA [SETAS]. BARRA = 200 μM

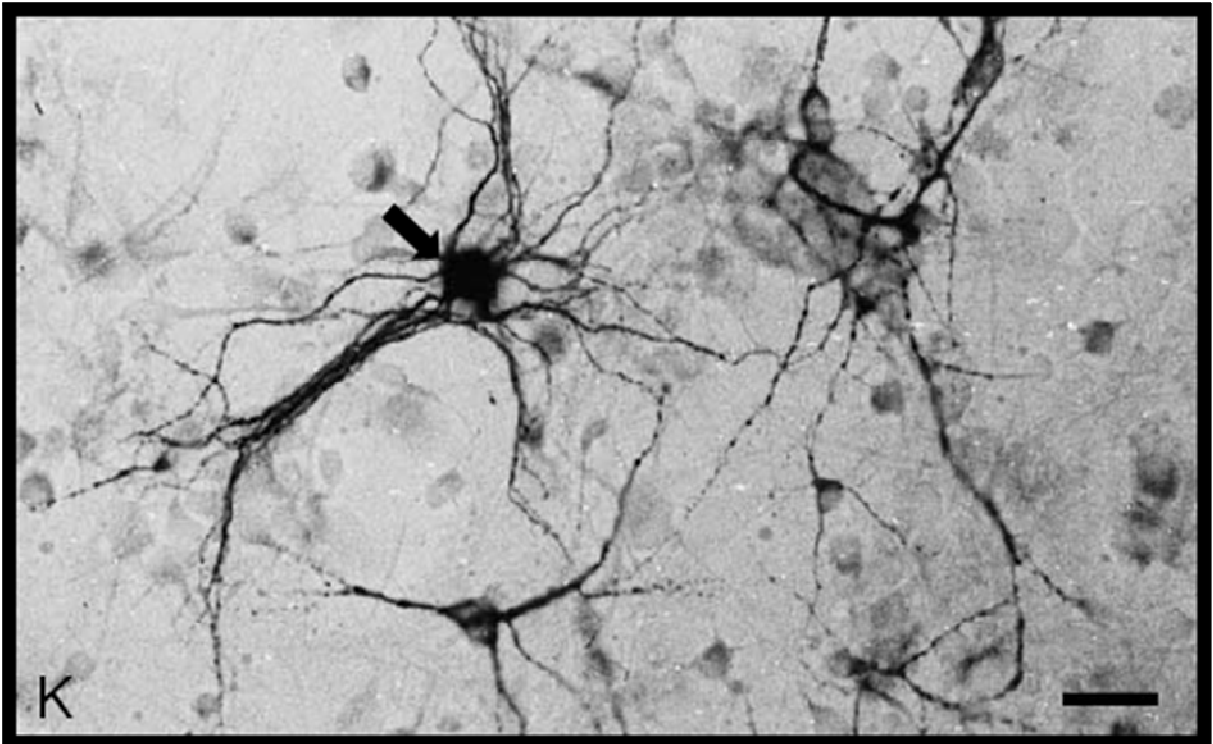


FIGURA 14 – CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS [SETA]. BARRA = 25 μ M (ADAPTADO DE B.HILDEBRAND *ET AL*)

5.3 CARACTERIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DAS CÉLULAS

Para a identificação celular por imunofluorescência, culturas foram fixadas e marcadas com anticorpos que reconhecem proteínas específicas de células da glia e neurônios a fim de se caracterizar o tipo celular. O anticorpo primário utilizado para identificar os astrócitos foi o anti - GFAP (1:400, Sigma), e o anticorpo secundário o anti IgG coelho Alexa-Fluor (1:800, Molécula Probes).

A Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) é a subunidade protéica de filamentos intermediários do tipo III do citoesqueleto glial e é expressa principalmente em astrócitos diferenciados no Sistema Nervoso Central (RODNIGHT *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 1999).

Inicialmente isolada de lesões cerebrais (placas) de pacientes com esclerose múltipla (ENG *et al.*, 2000), a GFAP é reconhecida e amplamente utilizada como um marcador de astrócitos e de tumores de linhagem astrocítica.

Vários estudos utilizam esse marcador específico em culturas primárias de astrócitos, principalmente em culturas de ratos (BARBES *et al.*, 2000; BAYDAS *et al.*, 2003; COLEMAN *et al.*; 2004).

A imunoreatividade do marcador da célula glial em ratos e camundongos é descrito na literatura (JESSEN *et al.*, 1984; JESSEN e MIRSKY, 1984; SCHACHNER *et al.*, 1984; ELFVIN *et al.*, 1987; HALL e LANDIS, 1992; LEIN *et al.*, 2002; OKANO *et al.*, 2005).

É sugerido que a GFAP seja muito expressa *in situ* pelas células da glia não mielinizadas, não sendo expressa pelas células de Schwann (JESSEN *et al.*, 1984; JESSEN e MIRSKY, 1984; HANANI, 2010). Embora o GFAP tenha sido descrito estar presente nas células da medula óssea, condrócitos, fibroblastos da dura-máter e no tecido conjuntivo da cavidade oral de camundongos (HAINFELLNER *et al.*, 2001), é considerado um confiável marcador celular glial pela maioria dos neurocientistas (JESSEN *et al.*, 1984; JESSEN e MIRSKI, 1984; HANANI, 2010).

O anticorpo primário utilizado para identificar os neurônios foi o anti β tubulina classe III (1:500, Sigma), e o anticorpo secundário o anti Igg camundongo Texas-red (1:800, Molecular Probes).

Os resultados mostram que foi verificada uma marcação inespecífica tendo em vista que houve a marcação de todas as células pelo anticorpo Classe III β -tubulina, incluindo aquelas imunomarcadas por GFAP. Experimentos terão que ser repetidos mantendo-se o marcador de astrócitos GFAP sendo necessário buscar um marcador neuronal mais específico para peixe (HINSCH, K; ZUPANC, G.K.H, 2006).

Não foram feitas as imunocaracterizações dos oligodendrócitos e das microglias, pois não havia anticorpos disponíveis. Trabalhos recentes demonstram estudos imunohistoquímicos em culturas *in vitro* de glias com MAb6D2 (marcador de oligodendrócitos) e NN-2 (marcador microglial) (HOUALLA e LEVINE, 2003).

O cultivo primário de células gliais apresentou imunopositividade para o marcador GFAP. No entanto, não foi possível visualizar e diferenciar a morfologia das células através da imunofluorescência, visto que a totalidade das células foi marcada com anticorpo anti β tubulina classe III, anticorpo que reconhece a proteína murina.

Este método de isolamento, caracterização morfológica e imunocitquímica das glias de cérebro de traíra em cultura mostrou ser uma ferramenta útil, porém, necessita ser aperfeiçoada.

5.4 TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS DOS DADOS

Três tipos de matrizes foram testadas (Poli-L-Lisina, Matrigel e Fibronectina) através do teste do Metabolismo Mitocondrial (MTT). Foram utilizadas aproximadamente 200.000 células para cada poço em triplicatas em um total de 5 experimentos independentes (Quadro 2). Não houve diferença significativa na viabilidade celular quando utilizado Poli-L-Lisina, Matrigel ou Fibronectina (gráfico2). Além disso, é importante salientar que não houve aderência das células na ausência de matriz.

A viabilidade celular durante as várias tentativas de isolamento e cultivo das glias de traíra ficou entre 66,54 e 88.2%

EXPERIMENTO	POLI-L-LISINA			MATRIGEL			FIBRONECTINA		
I	0,111	0,105	0,102	0,098	0,1	0,098	0,097	0,104	0,104
II	0,094	0,089	0,083	0,091	0,086	0,085	0,074	0,085	0,084
III	0,109	0,111	0,122	0,121	0,116	0,12	0,1	0,12	0,116
IV	0,105	0,1	0,103	0,1	0,099	0,096	0,095	0,101	0,087
V	0,09	0,088	0,1	0,087	0,08	0,082	0,08	0,077	0,081

QUADRO 2 – ABSORBÂNCIA: MTT PARA A ESCOLHA DA MATRIZ APÓS A DEFINIÇÃO DA PAPAÍNA 30 U

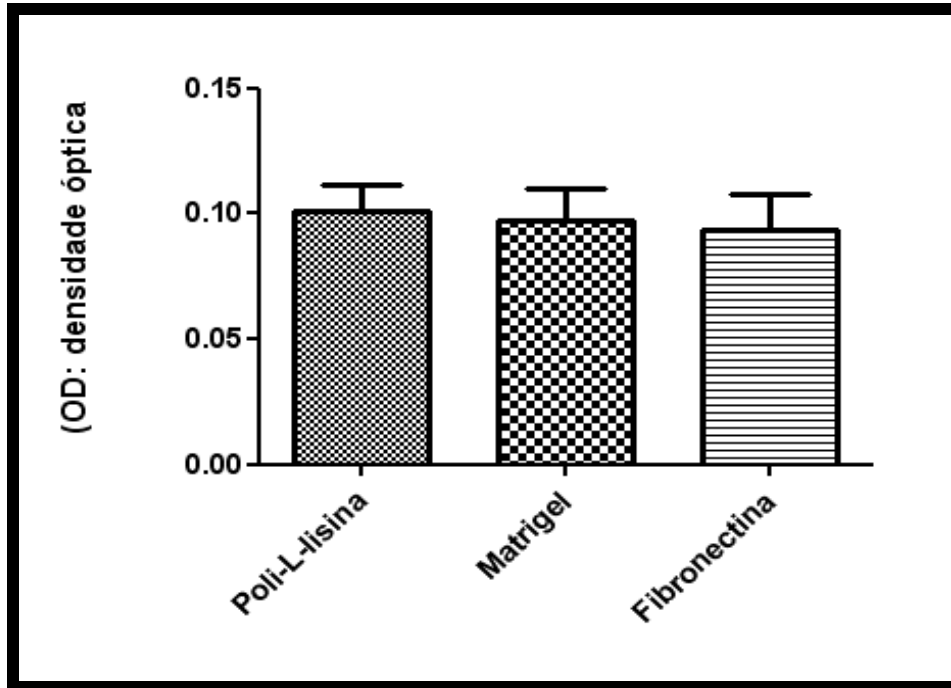


GRÁFICO 1 – TESTE DO METABOLISMO MITOCONDRIAL (MTT) PARA A ESCOLHA DA MATRIZ APÓS A DEFINIÇÃO DA PAPAÍNA 30 U. NÃO HOUE DIFERENÇA SIGNIFICATIVA NA VIABILIDADE CELULAR QUANDO UTILIZADO POLI-L-LISINA, MATRIGEL OU FIBRONECTINA

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi o início de um projeto mais amplo, que na sua continuidade, deverá aprimorar a manutenção das células vivas e funcionais por períodos de tempo compatíveis com os experimentos de neurotoxicidade de xenobióticos, principalmente os metais tóxicos envolvidos com neurodegeneração. Dentre os metais, o mecanismo exato da neurotoxicidade do manganês (Mn), cujo sistema nervoso central é o seu principal alvo, ainda não é conhecido, no entanto sabe-se que uma das células alvo é a célula da glia. Desta forma, o estudo *in vitro* com estes tipos celulares possibilitará a investigação de detalhes relacionados com os mecanismos e respostas celulares e moleculares envolvidos na toxicidade do Mn. Além disso, o presente trabalho confirma que a traíra (*Hoplias malabaricus*), espécie nativa doadora das células nervosas, mostrou ser um excelente modelo biológico de estudo para ensaios *in vitro* (dados dos Laboratórios de Toxicologia Celular e Toxicologia ambiental da Universidade Federal do Paraná), o que sugere uma ampla utilização do cultivo primário de glias dessa espécie em um futuro próximo. No entanto, surge um empecilho uma vez que não existem, ou se tem pouco conhecimento, de culturas envolvendo células da glia de peixes, sendo nativos ou não. Algo que deverá ser motivo de preocupação em experimentos posteriores, mas que ao mesmo tempo torna-se um desafio a mais nos estudos destas células e na importância que terão os resultados se bem trabalhados e aprimorados.

O próximo passo será, portanto o avanço na padronização do método primeiramente na caracterização imunocitoquímica destas células, sua identificação, separação e manutenção para estudos exclusivamente com estas células, cujo papel na manutenção dos neurônios é já bem esclarecido, fazendo disso um

estímulo a mais no estudo das mesmas em sistema de cultivo primário, no que se refere ao potencial neurotóxico de xenobióticos.

REFERÊNCIAS

- ALOISI, F (2001). Immune function of microglia. **Glia** 36:165-179.
- ALMEIDA LEITE, C.M; ARANTES, R.M.E. Primary culture of glial cells from mouse sympatric cervical ganglion: A valuable tool for studying glial cell biology. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 194, p.81-86, 2010.
- ASHNER, M (1998). Astrocytes as Mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. **Neurotoxicology** 19 (2): 269-82.
- BAKSI, S.M. & FRAZIER, J.M. (1990). Isolated fish hepatocytes: - model systems for toxicology research: **review. Aquatic Toxicology** 16, 229-256.
- BARBER, A.J., ANTONETTI, D.A e GARDNER, T.W. (2000) Altered Expression of retinal occluding and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. **Invest. Ophthalm. Vis. Sci.**, 41: 3561-3568.
- BARBIERI, G., VERANI, J.R & BARBIERI M.C. (1982). Dinâmica quantitativa da nutrição de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974) a repres do Lobo (Brotas – Itirapina/SP), Pisces, Erythrinidae. **Brasil. Biol.** V.42 (2), p. 295 – 302.
- BAYDAS, G., NEDZVETSKII, V.S., TUZEU, M., YASAR, A. E KIRICHENKO, S.V. (2003) Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin **Eur. J. Pharmacol.**, 462: 67-71.
- BARRES, BA; BARDE, YA (2000). Neuronal and glial cell biology. **Current Opinion in Neurobiology**. v.10: 642-648.
- BREWER, G.J; TORRICELLI, J.R. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. **Protocol**. 2007.
- BUCIO, L; SOUZA, V.; ALBORES, A.; SIERRA,A.; CHÁVEZ, E.; CÁRABEZ, A.; GUTIERREZ-RUIZ,M. C. (1995) Cadmium and Mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). **Toxicology**; 102: 285–299.
- BUSSOLARO, D. FILIPAK NETO, C; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Responses of hepatocytes t \hat{o} DDT and methyl Mercury exposure. **Toxicology in vitro**. 2010.
- CLEMENT, AM; NADANAKA, S; MASAYAMA, K; MANDL, C; SUGAHARA, K; FAISSNER, A (1998). The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfatio, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. **J. Biolog, Chem** 273 (43): 28444-53.
- CAJAL, SR (1995). Histology of the nervous system of man and vertebrates. Oxford: University Press, Oxford, Inglaterra p.95-97.

COLEMAN, E., JUDD, R., HOE, L., DENNIS, J. E POSNER, P. (2004) Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. **Glia**, 48:166-178.

COSTA, SL; PLANCHENAU, T; CHARRIERE-BERTRAND, C; MOUCHEL, Y; FAGES, C; JULIANO, S; LEFRANÇOIS, T; BARLOVATZ-MEIMON, G; TARDY, M (2002). Astroglial permissivity for neurotic outgrowth in neuron-astrocyte co-cultures depends on regulation of lamini bioavailability. **Glia** 37:105-13.

DeRENZIS, F. A. e SCHECHTMANN, A. Staining by neutral red and trypan blue in sequence for assaying vital and nonvital cultured cells. **Stains Technology**, v.48, p. 135 – 136, 1973.

DUNCAN-ACHANZAR, K., B.; JONES, J. T.; BURKE, M. F.; CARTER, D. E.; LAIRD, H. E. (1996) Inorganic Mercury Chloride-Induced Apoptosis in the Cultured Porcine Renal Cell Line. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. Vol. 277, 1726-1732pp.

ELFVIN LG, BJORKLUND H, DAHL D, SEIGER A. Neurofilament-like and glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivities in rat and guinea-pig sympathetic ganglia *in situ* and after perturbation. **Cell Tissue Res** 1987; 250: 79-86.

ENG, L.F., GHIRNIKAR, R.S. e LEE, Y.L. (2000) Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969-2000). **Neurochem. Res.** 25: 1439-1451.

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, A. M.; RANDI, M.A.F; PELLETIER, É.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Hepatocytes primary culture the Netropical fish, trahira *Hoplias malabaricus*(Bloch). **Journal of Fish Biology**. v.69: 1524-1532.

GARWOOD, J; SHNADELBACH, O; CLEMENT, A; SHUTTE, K; BACH, A; FAISSNER, A (1999). DSD-1-proteoglycan in the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. **J. Neurosci.** 19(10): 3888-99.

GEE, J.R e KELLER, J.N. (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein Eur. Int. J. **Biochem. Cell Bioll.**, 37: 1145-1150.

GIULIAN, D; LEARA, J; LI, J and KEENEN, C (1994). Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. **Neurochem. Int.** 25:227-232.

GOMES, F.C.A., PAULIN, D. E MOURA NETO, V. (1999) Glial Fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 32: 619-631.

HAINFELLNER JA, VOIGTLANDER T, STROBEL T, MAZAL PR, MADDALEBA AS, AGUZZI, *et al.* Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) *in vivo*. **J Neuropathol Exp Neurol** 2001; 60: 449-61.

HALL AK, LANDIS SC. Division and migration of satellite glia in the embryonic rat superior cervical ganglion. **J Neurocytol** 1992; 21: 635-47.

HANANI M. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: in search of function. **Brain Res Rev** 2010.

HANANI M, CASPI A, BELZER V. Peripheral inflammation augments gap junction-mediated coupling among satellite glial cells in mouse sympathetic ganglia. **Neuron Glia Biol** 2010: 1-5.

HASCHEMEYER, A. E. V. E DETRICH, H. W. Characteristics of leucine transport by isolated hepatocytes of antarctic fish. **Physiol. Zoology**, v.56, p. 78-87, 1983.

HILDEBRAND, B; OLENIK, C; MEYER, D.K. Neurons are generated in confluent astroglial cultures of rat neonatal neocortex. **Neuroscience**. v.78, p.957-966, 1997.

HINSCH, K; ZUPANC, G.K.H. Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain. **Journal of Neuroscience Methods**. v.158. p.75-88, 2006.

HOUALLA, T; LEVINE, R. L. The isolation and culture of microglia-like cells from the goldfish brain. **Journal of Neuroscience methods**. v.131, p.121-131, 2003.

JESSEN, K.R; MIRSKY, R. Nonmyelin-forming Schwann cells coexpress surface proteins and intermediate filaments not found in myelin-forming cells: a study of Ran-2, A5E3 antigen and glial fibrillary acidic protein. **J Neurocytol** 1984; 13: 923-934.

JESSEN, K.R; THORPE, R; MIRSKY, R. Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. **J Neurocytol** 1984; 13: 187-200.

JESSEN, K.R. (2004) Glial cells. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 36: 1861-1867.

KANEKO, Y.; IGARASHI, M.; IWASHITA, M.; SUZUKI, K.; KOJIMA, H.; KIMURA, S.; HASOBE, M. Effects of fish and calf type I collagens as culture substrate in the adhesion and spreading process of established fish cells. **In Vitro Cell Dev Biology**, v.31, p. 178-182, 1995.

KANDEL, ER; SCHWARTZ, JH; JESSELL, TM. Nerve cells and behavior. In: **Principles of neuronal science, 4 ed, New York: McGraw Hill**, p.5-35, 2000.

KOKAL, T.; QUINN, B.A.; SMITH, I.R; FERGUSON, H.W.; HAYES, M.A. Use of trout serum to prepare primary attached monolayer cultures of hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **In Vitro Cell Dev Biology**, v.24, p.304-308, 1988.

KRIEGSTEIN, A; GOTZ, M (2003). Radial glia diversity: a matter of cell fate. **Glia** 43:37-43.

LEIN PJ, BECH HN, CHANDRASEKARAN V, GALLAGHER PJ, CHEN HL, LIN Y, *et al*. Glia induce dendritic growth in cultured sympathetic neurons by modulating the

balance between bone morphogenetic proteins (BMPs) and BMP antagonists. **J Neurosci** 2002, 22: 10377-87.

LENT, R. Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência. São Paulo: Atheneu, p. 66-95, 2001.

LETOURNEL-BOULLAND, ML; ML; FAGES, C; ROLLAND, B; TARDY, M (1994). Lipopolysaccharides (LPS) up-regulate the IL-1-mRNA and downregulate the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamine synthetase (GS) – mRNAs in astroglial primary culture. **Euro Cytokine Network** 5 (1): 51-6.

LEVY, B.S., NASSETA, W.J Neurologic effects of manganese in humans: a review. **Int. J. Occup. Environ. Health** 9, 153-163, 2003.

MCMILLAN, D.E. A brief history of the neuropathology of manganese: some unanswered questions. **NeuroToxicology** 20 499-507, 1999.

MOUSSAUD, S; DRAHEIM, H.J. A new method to isolate microglia from adult mice and culture them for an extend period of time. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 187, p. 243-253, 2010.

NADARAJAH, B (2003). Radial glia and somal tranlocation of radial neurons in the developing cerebral cortex. **Glia** 43: 33-6.

OKANO H, BAMABA H, HISA Y, MAKINO S, ANDO S, TAMIYA G, *et al.* Immunohistochemical study of TAFII250 in the rat laryngeal nervous system. **Histol Histopathol** 2005; 20: 1029-35.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla Anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 53-69, 2005.

PAIVA, M.P (1974). Crescimento, alimentação e reprodução da traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch), no nordeste brasileiro. Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 216 p.

PEREA, G. e ARAQUE, A. (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. **Cell Calcium**, 38: 375-382.

PERL, D.P., OLANOW, C.W. The neuropathology of manganese-induced parkinsonism. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 66, 675-682, 2007.

PINHEIRO, A.M; COSTA, S.L; FREIRE,S.M; ALMEIDA, M.A.O; TARDY, M; EL BACHÁ, R; COSTA, M.F.D. Astroglial cells in primary culture: A valid model to study *Neorospora caninum* infection in the CNS. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 113, p. 243-247, 2006.

RODNIGHT, R., GONÇALVES, C.A., WOFCHUCK, S.T. e LEAL, R. (1997) Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in

the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in the astrocyte plasticity. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 30: 325-338.

SANTOS, E. **Peixes de água doce**. Belo Horizonte, Ed. Itatiaia Limitada, v. 02, p. 201-203 e 9-19. 1981.

SCHACHNER M, SOMMER I, LAGENAUR C. Expression of glial antigens C1 and M1 in the peripheral nervous system during development and regeneration. **Brain Res** 1984; 316: 165-78.

SILVA FILHO, M.V.; OLIVEIRA, M.M. CUNHA, B.V.L.F.; ALVES, M.V & CUNHA, B.J. (2000). Validação de espécies sentinelas para biomarcação com colinesterase de peixes. In: **Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI** (ESPÍNDOLA, E. L. G.; PASNCHOAL, C. M. R. B.; ROCHA, O.; BOHRER, M. B. C. & OLIVEIRA NETO, A. L.) São Carlos, Rima, 2000.

STREIT, WJ; WALTER, SA; PENNEL, NA (1999). Reactive microgliosis. **Progress in Neurobiology**. 57:563-581.

TARDY, M (1991). Astrocyte et homeostasie. **Médecine Science** 8 (7): 799-804.

VILHARDT, F (2005). Microglia: phagocyte and glia cell. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology** 37 :17-21.