

TANARA VIEIRA PERES

**AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE DO MANGANÊS EM
MODELOS *IN VITRO* DE FATIAS ESTRIATAIS E
HIPOCAMPAIS DE RATOS E CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo
Bainy Leal

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte elaborado pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

P437a Peres, Tanara Vieira

Avaliação da neurotoxicidade do manganês em modelos in vitro de fatias estriatais e hipocâmpais de ratos e células de neuroblastoma humano SH-SY5Y [dissertação] / Tanara Vieira Peres ; orientador, Rodrigo Bainy Leal. - Florianópolis, SC, 2011.

62 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Manganês. 3. Neurotoxicologia. 4. Hipocampo (Cérebro). 5. Corpo estriado. I. Leal, Rodrigo Bainy. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDU 577

**“Avaliação da neurotoxicidade do manganês em
modelos in vitro de fatias estriatais e
hipocampais de ratos e células de
neuroblastomas humano SH-SY5Y”**

por


Tanara Vieira Peres

Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final pelos membros titulares da
Banca Examinadora (Port.
04/PPGBQA/2011) do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica - UFSC,
composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:




Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal (Presidente/Orientador)



Profa. Dra. Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar
(Externo/PPGPGN/UFSC)



Prof. Dr. Nelson Horácio Gabilan (UFSC)



Profa. Dra. Andreza Fabre de Bem
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo incentivo de seguir em frente...

Ao Professor Rodrigo B. Leal, meu orientador, pelos ensinamentos...

Aos companheiros de laboratório Amanda Jacques, Ângela Bernardes, Daniela Zótico, Débora Rieger, Fabiano Cordova, Filipe Gonçalves, Mariana Maestri, Mark Lopes e Michael Russi pela convivência feliz e toda a ajuda que me deram no desenvolvimento deste projeto...

Aos Professores Marcelo Farina e Cláudia Nedel e às suas alunas Paula Monteiro, Danúbia Bonfanti e Alessandra Antunes, pela ajuda com a cultura de células...

A todos os professores e alunos da PPG-BQA que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho...

Aos professores Nelson Gabilan, Cláudia Nedel e Alcir Dafré por participarem da banca examinadora desta dissertação e pela valiosa contribuição na sua correção...

Ao CNPq, CAPES, FAPESC e FINEP, pelo apoio financeiro...

Aos meus amigos e familiares que acreditaram em mim e que contribuíram para o encerramento de mais esta etapa em minha vida...

...Muito Obrigada

RESUMO

A contaminação ambiental por metais é um fator de risco para a saúde pública, sendo o sistema nervoso central (SNC) um importante alvo desses compostos. Exposição excessiva ao manganês (Mn^{2+}) pode causar uma síndrome semelhante ao Parkinson, com perda de neurônios dopaminérgicos, chamada manganismo. Estresse oxidativo e alteração de vias de sinalização intracelular em resposta ao Mn^{2+} têm sido demonstrados em vários modelos de culturas celulares. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade do Mn^{2+} (1-1000 μM) de gerar morte celular e alterar a atividade de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) após incubações *in vitro* de fatias hipocâmpais e estriatais obtidas de ratos imaturos e ratos adultos. Avaliamos também a viabilidade celular pelo teste do MTT em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y indiferenciadas expostas ao metal. Os resultados mostraram que o Mn^{2+} (1-1000 μM) não causou alteração na viabilidade das células SH-SY5Y avaliada em 12 e 24h. Os testes de liberação da lactato desidrogenase (LDH) e endocitose do corante vermelho neutro realizados após 3 horas de incubação com Mn^{2+} não demonstraram alteração da viabilidade celular das fatias estriatais de ratos imaturos. Os resultados do teste do MTT demonstraram uma queda de 19% da viabilidade em fatias estriatais obtidas de ratos adultos e após 6 horas de exposição ao metal. Esse efeito foi acompanhado por um aumento na fosforilação de $p38^{MAPK}$, avaliada por *western blotting*. Nas fatias estriatais obtidas de ratos imaturos não houve alteração da viabilidade, entretanto, ocorreu aumento na fosforilação de ERK2 e JNK1/2 após 6 horas de incubação com o Mn^{2+} . Estes dados reforçam a idéia do estriado como região vulnerável à neurotoxicidade do Mn^{2+} . Além disso, mostram que o Mn^{2+} pode alterar a atividade de vias de sinalização intracelular dependentes de MAPKs em fase crítica do desenvolvimento neural. Os resultados obtidos com o modelo de cultura celular não estão de acordo com a literatura, porém é preciso confirmar se as células SH-SY5Y indiferenciadas são ideais como modelo de neurônios dopaminérgicos.

Palavras chave: Manganês; neurotoxicidade; MAPKs; hipocampo; estriado.

ABSTRACT

Environmental contamination by metals is a risk factor for public health, and the central nervous system (CNS) is an important target. Excessive exposure to manganese (Mn^{2+}) can cause a syndrome similar to Parkinson's disease, with loss of dopaminergic neurons, called manganism. Oxidative stress and alteration of intracellular signaling pathways in response to Mn^{2+} have been demonstrated in various models of cell cultures. The aim of this study was to evaluate the ability of Mn^{2+} (1-1000 μM) to generate cell death and alter the activity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) after *in vitro* incubations of hippocampal and striatal slices obtained from immature rats and adult rats. We also evaluated cell viability by the MTT assay in undifferentiated human neuroblastoma cells SH-SY5Y exposed to the metal. The results showed that Mn^{2+} (1-1000 μM) did not change the SH-SY5Y cells viability after 12 and 24 hours. Tests for release of lactate dehydrogenase (LDH) and endocytosis of neutral red dye showed no changes in cell viability of the striatal slices from immature rats after 3h exposure to Mn^{2+} . The results of the MTT assay showed a 19% decrease in the cell viability of striatal slices obtained from adult rats after 6 hours of exposure to the metal. This effect was accompanied by an increase in phosphorylation of $p38^{MAPK}$, assessed by western blotting. In striatal slices obtained from immature rats Mn^{2+} did not alter the cell viability, however, it induced an increase in ERK2 and JNK1/2 phosphorylation after 6 hours of incubation. These data reinforce the striatum as a vulnerable region to Mn^{2+} neurotoxicity. Moreover, it suggests that Mn^{2+} can alter the activity of cell signaling pathways dependent on MAPKs in a critic neurodevelopmental period. The results obtained with the cell culture model are not in agreement with the literature. However, we must confirm that the undifferentiated SH-SY5Y cells are a suitable model of dopaminergic neurons.

Keywords: Manganese; neurotoxicity; MAPKs, hippocampus, striatum.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Mecanismos de transporte do manganês através da barreira hematoencefálica em condições fisiológicas.....	20
Figura 2: Estruturas alvo para acumulação do manganês no cérebro. .	22
Figura 3: Vias de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs).	24
Tabela 1: Fabricante, número do catálogo e diluição dos anticorpos utilizados para <i>western blotting</i>	33
Figura 4: Efeito do MnCl ₂ sobre a viabilidade de fatias estriatais de ratos imaturos na ausência (controle) ou presença de MnCl ₂ (1-200 µM) por um período de 3 horas.....	35
Figura 5: Efeito do MnCl ₂ sobre a viabilidade de fatias hipocampais e estriatais de ratos imaturos na ausência (controle) ou presença de MnCl ₂ (5-1000 µM) por períodos de 1, 2 e 3 horas.....	37
Figura 6: Efeito do MnCl ₂ sobre a viabilidade de fatias hipocampais e estriatais de ratos imaturos (PN14) e adultos na ausência (controle) ou presença de MnCl ₂ (5-1000 µM) por períodos de 6 horas	38
Figura 7: Efeito do MnCl ₂ sobre a viabilidade de cultura de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas com MnCl ₂ (5-1000 µM) por períodos de 12 ou 24 horas.....	39
Figura 8: Efeito do MnCl ₂ sobre a fosforilação de MAPKs em fatias hipocampais obtidas de ratos imaturos (PN14) após 1, 2, 3 e 6 horas de incubação na ausência (controle) ou presença de MnCl ₂ (1-1000 µM), analisadas por <i>western blotting</i> . A revelação foi realizada por quimioluminescência.....	40
Figura 9: Efeito do MnCl ₂ sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias estriatais de ratos imaturos (PN14) após 3 e 6 horas de incubação na ausência (controle) ou presença de MnCl ₂	42
Figura 10: Efeito do MnCl ₂ sobre a fosforilação de p38 ^{MAPK} em fatias estriatais de ratos imaturos (PN14) após 3 e 6 horas de incubação na ausência (controle) ou presença de MnCl ₂	43
Figura 11: Efeito do MnCl ₂ sobre a fosforilação de JNK2/1 em fatias estriatais de ratos imaturos (PN14) após 3 e 6 horas de incubação na ausência (controle) ou presença de MnCl ₂	44
Figura 12: Efeito do MnCl ₂ sobre a fosforilação de MAPKs em fatias estriatais de ratos adultos (PN60) após 6 horas de incubação na ausência (controle) ou presença de MnCl ₂ (10, 100 e 1000 µM), analisadas por <i>western blotting</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

ASK1: cinase reguladora de sinais apoptóticos

ATP: trifosfato de adenosina

BMK1: *big mitogen activated protein kinase*

CREB: *cAMP response element binding protein*

DA: dopamina

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: dimetil sulfoxido

DMT-1: transportador de metais divalentes 1

DO: densidade ótica

EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético

EP: erro padrão

ERK: cinase regulada por sinal extracelular

Grb2: *growth factor receptor-binding protein 2*

HEPES: ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-Etanosulfônico

Hsp27: proteína de choque térmico de 27kDa

JNK: cinase c-Jun N-terminal

KRB: tampão Krebs-Ringer bicarbonato

LDH: lactato desidrogenase

LPS: lipopolissacarídeo

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

MAP2K: cinase da proteína cinase ativada por mitógeno

MAP3K: cinase da cinase da proteína cinase ativada por mitógeno

MEK: cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular

MEKK: cinase da cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular

MKP-1: fosfatase da MAP cinase
MLK: cinase de linhagem mista
MMT: metilciclopentadienil manganês tricarbonil
MPP⁺: 1-metil-4-fenil-piridina
MTT: brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium
p38^{MAPK}: proteína cinase ativada por mitógeno de 38 kDa
PBS: tampão salina fosfato
ROS: espécies reativas de oxigênio
RTK: receptor tirosina cinase
SAPK: proteína cinase ativada por estresse
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SFB: soro fetal bovino
SNC: sistema nervoso central
SOD: superóxido dismutase
SOS: *son of sevenless*
TA: Temperatura ambiente
TBS: tampão tris-salina
TBS-T: tampão tris-salina acrescido de Tween-20
TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina
Tf: transferrina
TfR: transportador de transferrina
TH: tirosina hidroxilase
ZIP8: transportador de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Manganês.....	18
1.2 Transporte do Mn ²⁺ ao SNC.....	19
1.3 Mecanismos moleculares de ação do Mn ²⁺	21
1.4 Proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPKs).....	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos específicos.....	27
3. METODOLOGIA	29
3.1 Animais.....	29
3.2 Preparo de fatias hipocâmpais e estriatais.....	29
3.3 Tratamentos <i>in vitro</i>	30
3.3.1 Tratamento de fatias.....	30
3.3.2 Tratamento de células SH-SY5Y.....	30
3.4 Avaliação da viabilidade celular.....	30
3.5 <i>Western blotting</i>	31
3.5.1 Preparo das amostras para eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	31
3.5.2 Separação de proteínas por eletroforese (SDS-PAGE).....	31
3.5.3 Eletrotransferência.....	32
3.5.4 Imunodeteção.....	32
3.6 Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS	35
4.1 Viabilidade celular após tratamento com Mn ²⁺	35
4.1.1 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do vermelho neutro e LDH em fatias estriatais expostas ao Mn ²⁺	35
4.1.2 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT em fatias estriatais e hipocâmpais expostas ao Mn ²⁺	35
4.1.3 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT em culturas de neuroblastoma humano SH-SY5Y expostas ao Mn ²⁺	36
4.2 Modulação das MAPKs em fatias hipocâmpais e estriatais expostas ao Mn ²⁺	39
4.2.1 Modulação de MAPKs em fatias obtidas de ratos imaturos.....	39
4.2.2 Modulação de MAPKs em fatias estriatais obtidas de ratos adultos.....	45
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	53
7. BIBLIOGRAFIA	55

1. INTRODUÇÃO

O cérebro humano adulto, em toda a sua complexidade, é produto de instruções genéticas, sinalização célula-célula e, eventualmente, de interações com o mundo externo que ocorrem na fase embrionária. Esses eventos iniciais incluem o estabelecimento do sistema nervoso primordial no embrião, a geração inicial de neurônios a partir de células precursoras indiferenciadas, a formação das regiões do cérebro, e a migração dos neurônios a partir de seus sítios de geração às suas posições finais. A sinalização celular e a regulação da expressão gênica durante o início do desenvolvimento neural são especialmente vulneráveis aos efeitos de mutações genéticas, e às ações de drogas e toxinas que podem comprometer a formação de um sistema nervoso normal (PURVES et al., 2004).

Os tipos celulares que constituem o sistema nervoso central (SNC) de vertebrados incluem: células nervosas (neurônios) e células gliais (glia) representadas pelos astrócitos e microglia. A função cerebral depende da correta comunicação entre todas essas células (KANDEL et al., 2003). Neurônios podem ser excitatórios, inibitórios ou modulatórios, com relação a seu efeito, e podem ser motores, sensores ou secretórios, em termos de função. Essas células podem ser moduladas por diversos neurotransmissores e hormônios (SIEGEL et al., 2006). As funções da glia incluem sustentação dos neurônios, produção da mielina (pelos oligodendrócitos e células de Schwann), captação de neurotransmissores liberados na fenda sináptica, formação da barreira hematoencefálica, defesa, entre outras (KANDEL et al., 2003). Dentre as células gliais os astrócitos se destacam por manter em grande parte a homeostase do SNC, incluindo: regulação da concentração extracelular de glutamato, síntese de fatores neurotróficos, participação na resposta imune e defesa antioxidante (SIEGEL et al., 2006).

A contaminação ambiental por metais é um fator de risco para a saúde pública, como demonstram vários estudos, e o SNC é um importante alvo (WEISS, 2010). A exposição a metais durante o desenvolvimento pode alterar a neurogênese, aprendizado e memória e predispor a distúrbios neurodegenerativos (LERET et al., 2003). O neurodesenvolvimento começa no útero e continua durante todo o período pós-natal. Este período de rápido desenvolvimento é altamente suscetível à toxicidade de metais (MOLINA et al., 2011). Estudos mostrando a toxicidade do chumbo (Pb^{2+}) para o SNC em desenvolvimento foram os primeiros a despertar para a possibilidade de que agentes químicos industriais podem levar a mudanças neurocomportamentais. Esta constatação levou ao maior controle do uso

de Pb^{2+} e proibição de seu uso em aditivos da gasolina (GRADJEAN; LANDRIGAN, 2006). Atualmente têm sido apontados diversos compostos com propriedades neurotóxicas para o desenvolvimento do SNC incluindo solventes, pesticidas e metais entre os quais o manganês. Déficits neurocognitivos causados pela exposição ao Mn^{2+} durante o período de desenvolvimento têm sido relatados em humanos e animais (MOLINA et al., 2011).

1.1 Manganês

Manganês (Mn^{2+}) é um metal essencial envolvido no funcionamento de diversas enzimas, sendo necessário para vários processos fisiológicos, como modulação do sistema imune e metabolismos de proteínas e carboidratos (TAKEDA, 2003; BENEDETTO et al., 2009). Porém, exposição a elevadas doses do metal por períodos prolongados pode causar uma síndrome neurológica denominada manganismo, que se assemelha ao Parkinson. Parkinsonismo é um termo que define pacientes que apresentam tremores, bradicinesia, rigidez e distúrbios da marcha, sintomas de disfunção dos gânglios da base. Existem diversas causas para síndromes parkinsonianas: doenças neurodegenerativas, drogas, lesões estruturais, doenças cerebrovasculares, infecções e agentes tóxicos (CERSOSIMO; KOLLER, 2006). Os primeiros relatos da ação neurotóxica do Mn^{2+} datam de 1837, quando John Couper descreveu uma desordem neurológica em cinco trabalhadores de uma mina de manganês, exibindo sintomas semelhantes ao da doença descrita apenas vinte anos antes, por James Parkinson (COUPER, 1837; ASCHNER et al., 2009). A principal forma de intoxicação por Mn^{2+} é a exposição ocupacional. Esta ocorre em atividades de mineração, soldagem, fundição, na indústria de baterias e pelo uso de inseticidas que contenham Mn^{2+} (CERSOSIMO; KOLLER, 2006; SANTAMARIA, 2008; ASCHNER et al., 2009). O período de exposição ocupacional que pode levar ao desenvolvimento do manganismo é de 6 meses a 2 anos (BENEDETTO et al., 2009). A exposição ocupacional a metais figura entre as 10 mais prevalentes doenças ocupacionais na China. Nos Estados Unidos 750.000 mineradores foram ou estão sendo expostos a metais (ASCHNER et al., 2009). Também são fontes de contaminação para a população em geral a água contendo altos níveis do metal e a fumaça emitida pelos automóveis. Esta última tem sido uma preocupação crescente devido à utilização na gasolina do aditivo metilciclopentadienil manganês tricarbonil (MMT). Pacientes com disfunção hepática e aqueles recebendo nutrição parenteral, principalmente os recém-nascidos, também são suscetíveis à

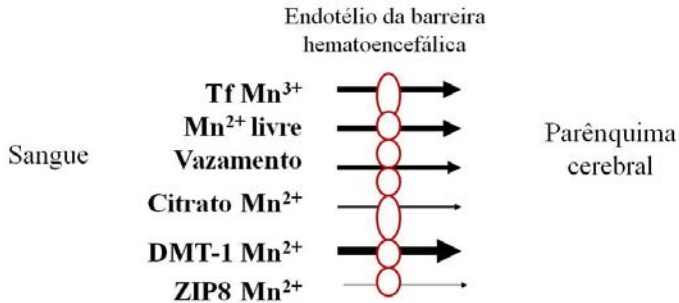
acumulação do metal (SANTAMARIA, 2008; ASCHNER et al., 2009). A maior parte do Mn^{2+} necessário é obtida pela dieta, estando o metal presente em grãos, chás e vegetais com folhas verdes. Porém a toxicidade pela forma oral de exposição é rara devido ao balanço regulado pelos enterócitos (entrada) e células dos ductos biliares (excreção) (DOBSON; ERIKSON; ASCHNER, 2004). Já a exposição por via olfatória pode levar ao acúmulo do Mn^{2+} via bulbo olfatório em regiões específicas do SNC, como estriado, além de causar inflamação do epitélio nasal (BENEDETTO et al., 2009).

Aumento nos biomarcadores de Mn^{2+} em seres humanos, como a concentração de Mn^{2+} no cabelo, tem sido associado com deficiência de aprendizagem, hiperatividade e déficit de atenção (MOLINA et al., 2011). Os cérebros neonatais ou em desenvolvimento são mais suscetíveis à toxicidade do Mn^{2+} . A absorção do metal no intestino é geralmente elevada na primeira semana de vida, seguido por uma diminuição constante com a idade. Esses fatores contribuem para o risco consideravelmente maior de neurotoxicidade para recém-nascidos quando expostos ao excesso de Mn^{2+} , porém os efeitos moleculares e comportamentais do Mn^{2+} durante o desenvolvimento precoce não estão totalmente caracterizados (MOLINA et al., 2011).

1.2 Transporte do Mn^{2+} ao SNC

A manutenção da homeostase do Mn^{2+} é indispensável para qualquer organismo. Por se tratar de um metal essencial para o funcionamento de enzimas que atuam no SNC, dentre elas, superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD, uma conhecida metaloproteína) e glutamina sintetase (presente em células gliais), o Mn^{2+} possui mecanismos de transporte específico (TAKEDA, 2003; DOBSON; ERIKSON; ASCHNER, 2004). O Mn^{2+} pode ter acesso ao cérebro a partir da corrente sanguínea por meio da barreira hematoencefálica ou do líquido cefalorraquidiano. Vários mecanismos envolvidos no transporte deste metal através da barreira hematoencefálica foram identificados, entre eles: difusão facilitada, transporte ativo, transportador de metal divalente 1 (DMT-1), ZIP-8 [transportador de zinco (Zn^{2+}), membro da família dos transportadores de íons divalentes] e transporte dependente de transferrina (Tf) (Figura 1A) (ROTH et al., 2002; ASCHNER et al., 2007).

A TRANSPORTE DE MANGANÊS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL



B

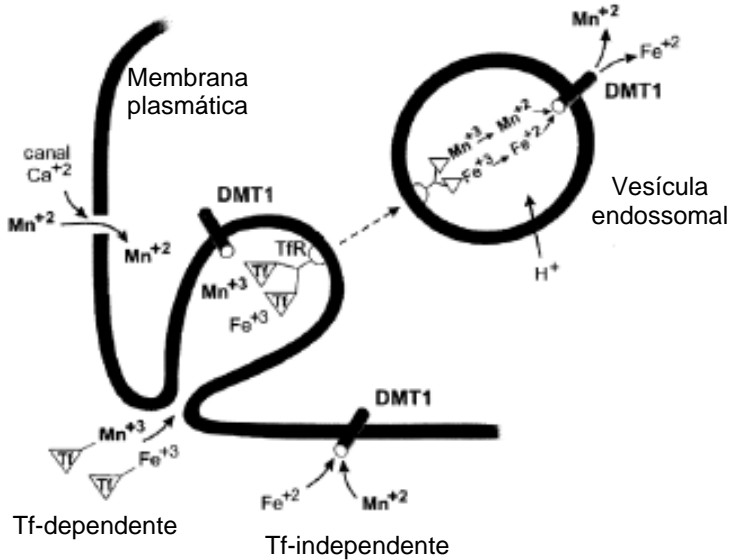


Figura 1: Mecanismos de transporte do manganês através da barreira hematoencefálica em condições fisiológicas. (A) Os transportadores associados com o transporte do metal (dependendo do seu estado de oxidação) estão indicados na figura. A espessura das setas representa a importância relativa de cada tipo de transporte neste processo. Modificado de Aschner et al. (2007). (B) Transporte do manganês ao interior de células PC12. Este ocorre de forma semelhante ao ferro e pode ser dependente ou não de transferrina (Tf). O transportador de metais divalentes (DMT-1) também é importante para este processo. Modificado de Roth et al. (2002).

O transporte do Mn^{2+} para o interior de neurônios ou células gliais ocorre de maneira semelhante ao transporte do ferro. Mn^{2+} pode ser conjugado à Tf, quando na forma Mn^{3+} e então ser transportado para o interior de neurônios ou células gliais por mecanismo dependente de transportador de transferrina (TfR) (Figura 1B). Neste caso, o Mn conjugado à Tf, se liga a TfR presentes na superfície celular. Após sofrer endocitose, ainda na vesícula endossomal, o Mn^{3+} é liberado do complexo Tf-TfR, reduzido a sua forma divalente e posteriormente transportado através da membrana endossomal para o citoplasma celular por meio de transportadores do tipo DMT-1 (transportador de metal divalente-1). Além deste mecanismo, o transporte de Mn^{2+} também pode ocorrer de uma forma independente de Tf através de DMT-1 (Figura 1B). Em células despolarizadas, foi também demonstrado um mecanismo de transporte de Mn^{2+} mediado por canais de cálcio (Ca^{2+}), competindo assim com o Ca^{2+} (ROTH et al., 2002).

A concentração fisiológica de Mn^{2+} no tecido cerebral do adulto normal varia de 2 a 8 μM (PAL; SAMII; CALNE, 1999). Durante o desenvolvimento é consideravelmente mais alta tanto em humanos quanto em ratos, podendo atingir 200 μM em áreas específicas do cérebro do rato, como o corpo estriado (CHAN et al., 1992; DOBSON; ERIKSON; ASCHNER, 2004). Essa maior concentração de Mn^{2+} no SNC em desenvolvimento se deve ao fato de a barreira hematoencefálica não estar completamente formada, facilitando o acesso do metal ao cérebro (ROTH et al., 2002).

1.3 Mecanismos moleculares de ação do Mn^{2+}

Os mecanismos moleculares de ação do Mn^{2+} e as bases de sua seletividade neurotóxica não foram completamente elucidados. Porém vários estudos têm caracterizado o transporte do metal ao SNC e seus efeitos sobre a função neuronal bem como sua capacidade de produzir resposta inflamatória via ativação de células gliais em regiões afetadas do cérebro (ASCHNER et al., 2009). O Mn^{2+} em excesso acumula-se em estruturas dos gânglios da base, especialmente corpo estriado (caudado, putâmem e núcleo acúmbens), globo pálido e substância negra (Figura 2) causando distonia, bradicinesia e rigidez devido a danos aos neurônios dopaminérgicos e gliose (TAKEDA, 2003; GUNTER et al., 2006; ERIKSON et al., 2007; ASCHNER et al., 2009). Não existe tratamento eficiente que bloqueie ou reverta a neurotoxicidade causada pelo Mn^{2+} (CERSOSIMO; KOLLER, 2006). O tratamento mais utilizado é a terapia quelante, mas este não é totalmente eficaz visto que

os sintomas podem piorar mesmo anos após cessar a exposição ao metal. Assim a elucidação dos mecanismos celulares e moleculares desencadeados pelo manganismo é a melhor forma de desenvolver estratégias terapêuticas (ASCHNER et al., 2009).

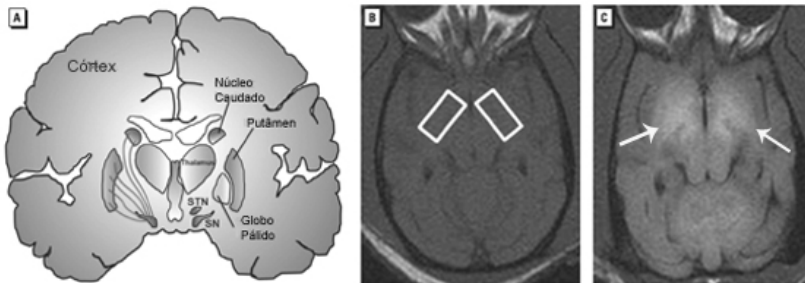


Figura 2: Estruturas alvo para acumulação do manganês no cérebro. (A) Esquema demonstrando os núcleos da base. STN: núcleo subtalâmico, SN: substância negra. (B) Imagens de ressonância magnética no nível do globo pálido (quadros brancos) de primata não humano controle. (C) Primata não humano exposto a Mn^{2+} . As áreas esbranquiçadas indicam acúmulo do metal (setas brancas). Adaptado de Guilarte (2010).

Devido às semelhanças entre manganismo e doença de Parkinson e por se acumular em regiões ricas em neurônios dopaminérgicos, a alteração do metabolismo da dopamina (DA) tem sido considerada um aspecto importante entre as ações moleculares do Mn^{2+} (MARTIN et al., 2008; GUILARTE et al., 2008b). Foi demonstrado *in vitro* que o metal diminui os níveis de DA no estriado, por causar sua oxidação (SISTRUNK; ROSS; FILIPOV, 2007) e o mesmo ocorre no sistema dopaminérgico de moluscos bivalves (MARTIN et al., 2008). Em modelos de macacos expostos ao metal demonstrou-se disfunção de terminais dopaminérgicos e diminuição da liberação de dopamina levando a alterações motoras (GUILARTE et al., 2008b). Além disso, Posser e colaboradores (2009) demonstraram que Mn^{2+} pode estimular, de forma prolongada, a fosforilação de Ser-40 de tirosina hidroxilase (TH), a enzima limitante na síntese de DA, em células PC12, levando a ativação prolongada da enzima (POSSER et al., 2009).

Astrócitos podem representar um sítio inicial dos danos causados pelo Mn^{2+} . Estas células são capazes de acumular Mn^{2+} em concentrações 10-50 vezes maiores do que o meio extracelular, diferente de neurônios, que não possuem essa capacidade. Essa concentração de

Mn^{2+} no citosol de astrócitos é importante para o funcionamento da glutamina sintetase, porém pode facilitar o acúmulo do metal nas mitocôndrias e causar danos às células (ASCHNER; GANNON; KIMELBERG, 1992; GUNTER et al., 2006). A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi detectada em astrócitos expostos ao Mn^{2+} , levando à ativação de caspase 3 e apoptose (YIN et al., 2008; GONZALEZ et al., 2008). Como os astrócitos são essenciais para manter a atividade neuronal, a interrupção de suas funções pode contribuir para a lesão neuronal presente no manganismo (GONZALEZ et al., 2008). Células microgliais também são afetadas pelo metal, com aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (FILIPPOV et al., 2005), podendo ativar os astrócitos a liberar mediadores inflamatórios, como prostaglandina E_2 e óxido nítrico (CHEN et al., 2006).

Vários estudos apontam a mitocôndria como alvo do Mn^{2+} . Injeções intraestriatais do metal em ratos resultaram em comprometimento do metabolismo energético, com queda na produção de ATP e aumento de lactato levando à perda de neurônios dopaminérgicos, semelhante à toxicidade causada por outros agentes tóxicos para a mitocôndria, como 1-metil-4-fenil-piridina (MPP^+) (BROUILLET et al., 1993). Inibição de complexos da cadeia respiratória mitocondrial e produção de ROS foram observadas em mitocôndrias isoladas do cérebro de ratos tratadas com Mn^{2+} (ZHANG; FU; ZHOU, 2004).

Assim, observa-se que o metal exerce sua neurotoxicidade de maneira complexa, ativando diversos mecanismos moleculares em células do SNC. Além disso, fatores como a idade em que a exposição ocorre (em modelos *in vivo*), a concentração do metal utilizada e o tempo de exposição influenciam o progresso da doença (ASCHNER et al., 2009).

1.4 Proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPKs)

Uma importante via de sinalização intracelular, cuja participação na neurotoxicidade do Mn^{2+} já foi relatada em diversos estudos (HIRATA; MEGURO; KIUCHI, 2006; ITO et al., 2006; YIN et al., 2008; POSSER et al., 2009) é a das proteínas cinases ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*; MAPKs). MAPKs são serina-treonina cinases mediadoras de várias respostas celulares, como proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, morte e transformação (KIM; CHOI, 2010). As três principais MAPKs identificadas são as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), cinase c-Jun N-terminal (JNK) e as $p38^{MAPK}$ (CHANG; KARIN, 2001;

CHEN et al., 2001; THOMAS; HUGANIR, 2004; WAETZIG; HERDEGEN, 2004). Também foram identificadas ERK 4/3 e BMK1 (*big mitogen activated protein kinase*) ou ERK5. Todas as vias operam em forma de cascata (Figura 3), com uma MAP cinase cinase cinase (MAP3K) ativando por fosforilação uma MAP cinase cinase (MAP2K) que por sua vez fosforila e ativa a MAP cinase (MAPK). A desativação das MAPKs é dependente de fosfatases específicas, como a MKP-1 (fosfatase da MAP cinase) (McCUBREY; LaHAIR; FRANKLIN, 2006; SIEGEL et al., 2006).

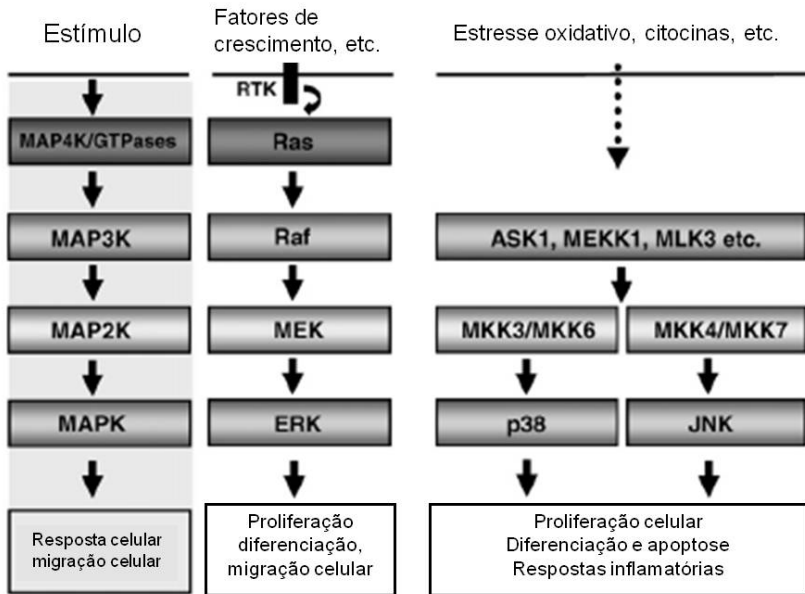


Figura 3: Vias de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). MAPKs medeiam a sinalização intracelular iniciada por fatores extracelulares ou intracelulares. Todas as vias operam em forma de cascata. MAP3Ks, que podem ser ativadas tanto por MAP4Ks ou GTPases, fosforilam MAP2Ks que por sua vez fosforilam e ativam MAPKs. Uma vez ativadas, MAPKs fosforilam vários substratos, incluindo fatores de transcrição, regulando, portanto uma variedade de atividades celulares, como proliferação, diferenciação, migração, respostas inflamatórias e morte celular. Em mamíferos, a família de MAPKs possui ERK, p38^{MAPK} e JNK. Adaptado de Kim; Choi (2010).

As proteínas ERK estão envolvidas em respostas celulares a fatores de crescimento e outros mitógenos e exercem ações regulatórias sobre mecanismos de proliferação e diferenciação (THOMAS; HUGANIR, 2004). ERK1/2 é translocada do citosol para o núcleo, onde fosforila fatores de transcrição como CREB (*cAMP response element binding protein*), regulando a transcrição gênica. Sua via de sinalização é iniciada por diversos estímulos extracelulares, capazes de ativar receptores tirosina cinase (RTK), que através de um proteína adaptadora, como Grb2 (*growth factor receptor-binding protein 2*) / SOS (*son of sevenless*) pode ativar Ras, uma proteína G. Ras recruta Raf (MAP3K), uma serina-treonina cinase, que ativa MEK (cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular), uma MAP2K, que fosforila ERK num resíduo de treonina e tirosina, ativando-a (Figura 3) (SIEGEL et al., 2006; KIM; CHOI, 2010). Yin e colaboradores (2008) demonstraram em culturas primárias de astrócitos que a exposição ao Mn^{2+} causa ativação de ERK 1/2 de maneira concentração dependente e está associada à morte celular.

JNK e $p38^{MAPK}$ são também conhecidas como proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs). Essas proteínas são ativadas por citocinas e insultos citotóxicos, estando frequentemente relacionadas a estresse e morte celular (MIELKE; HERDEGEN, 2000; COWAN; STOREY, 2003). Entre os diversos alvos destas cinases podem ser citados fatores de transcrição (por exemplo, c-Jun), enzimas, proteínas de choque térmico (por exemplo, Hsp27) e proteínas relacionadas à morte ou sobrevivência celular (MIELKE; HERDEGEN, 2000; HARPER; LOGRASSO, 2001; RAIVICH; BEHRENS, 2006; NAGAI et al., 2007). A via da JNK consiste de uma MAP3K tal como ASK1 (cinase reguladora de sinais apoptóticos), MEKK1 ou cinase de linhagem mista (MLK) ativando uma MAP2K como SEK1 (também conhecida como MKK4) ou MKK7 (Figura 3) (KIM; CHOI, 2010).

Na via de sinalização da $p38^{MAPK}$, MAP2Ks distintas, como MKK3 e MKK6 ativam a $p38^{MAPK}$ e são ativadas pelas mesmas MAP3Ks da via da JNK (como ASK1) (Figura3). ASK1 é ativada em resposta a uma variedade de agentes estressores, incluindo espécies reativas de oxigênio, o lipopolissacarídeo (LPS), estresse do retículo endoplasmático, e influxo de Ca^{2+} (KIM; CHOI, 2010). As $p38^{MAPK}$ são ativadas por diversos estímulos, incluindo hormônios, ligantes de receptores acoplados a proteínas G e estresses. Estão envolvidas em processos inflamatórios e apoptóticos em diferentes tipos celulares, incluindo neurônios (SIEGEL et al., 2006; MOLZ et al., 2008). Entretanto, um possível papel neuroprotetor via $p38^{MAPK}$ também tem

sido sugerido em modelos de fatias hipocampais de ratos imaturos expostos ao cádmio (Cd^{2+}) (RIGON et al., 2008).

Visto que o estriado é um importante alvo para a neurotoxicidade do Mn^{2+} , avaliamos neste estudo os efeitos *in vitro* do Mn^{2+} sobre a fosforilação de MAPKs e a viabilidade celular de fatias estriatais obtidas de ratos imaturos, 14º dia pós-natal, PN14 – um período crítico para o desenvolvimento do SNC e adultos (idade superior a PN60). Os efeitos do metal durante períodos críticos do desenvolvimento é um aspecto pouco estudado da neurotoxicidade do Mn^{2+} , apesar das evidências que sugerem que o metal pode prejudicar a função neurológica posteriormente na vida (MORENO et al., 2009). Avaliamos também o efeito deste metal no modelo de fatias hipocampais obtidas de ratos imaturos, já que poucos estudos relacionados ao Mn^{2+} foram realizados em estruturas além dos gânglios da base (GUILARTE et al., 2008a). Além disso, utilizamos um modelo de cultura de neuroblastoma humano SH-SY5Y, que são células dopaminérgicas bastante utilizadas em estudos relacionados ao Mn^{2+} e Parkinson (LI et al., 2010).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar as ações do Mn^{2+} sobre diferentes modelos de exposição *in vitro*: fatias hipocampais e estriatais obtidas de ratos imaturos (14º dia pós-natal, PN14) e adultos (idade superior a PN60) e cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

2.1 Objetivos específicos

- 1- Determinar a viabilidade celular em fatias hipocampais e estriatais de ratos imaturos e adultos expostas ao Mn^{2+} (1-1000 μM) por períodos de incubação variando de 1 a 6 horas.
- 2- Determinar a capacidade de modulação de MAPKs (ERK1/2, p38^{MAPK} e JNK1/2) pelo Mn^{2+} , em fatias hipocampais e estriatais de ratos imaturos e adultos expostas ao metal *in vitro*.
- 3- Avaliar a viabilidade celular em células SH-SY5Y expostas ao Mn^{2+} (1-1000 μM) por um período de 12 ou 24 horas de incubação com o metal.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados ratos de ambos os sexos da linhagem Wistar com idade de 14 dias pós-natal (PN14; imaturos) ou fêmeas com idade superior a 60 dias (adultos), fornecidos pelo Biotério Central (UFSC). Os ratos adultos foram mantidos no biotério setorial de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica, em ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura entre 22 e 25° C, com água e ração *ad libitum*. Os animais foram manipulados e eutanasiados obedecendo ao código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo PP00345/CEUA-UFSC).

3.2 Preparo de fatias hipocampais e estriatais

Os animais foram eutanasiados por decapitação, os cérebros foram imediatamente retirados a 4°C e os hipocampos e estriados dissecados e fatiados na espessura de 400µm, utilizando um fatiador de tecidos McIlwain. Nos experimentos com incubação de até 3 horas, as fatias foram obtidas em tampão *Cutting Solution* devidamente oxigenado (sacarose 110mM, NaCl 60mM, KCl 3mM, KH₂PO₄ 1,25mM, HEPES 25mM, CaCl₂ 0,5mM, MgSO₄ 7mM, glicose 5mM, pH 7,4). Após a separação das fatias seguiu-se uma pré-incubação de 30 minutos à temperatura ambiente (TA) para recuperação metabólica das fatias no tampão HEPES-salina (NaCl 124mM, KCl 3mM, MgSO₄ 1,2mM, HEPES 25mM, glicose 12mM e CaCl₂ 1mM, pH 7,4) (LEAL et al., 1997; CORDOVA et al., 2004). Alternativamente, nos experimentos com posterior incubação de 6 horas, as fatias foram obtidas e pré-incubadas por 30 min em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB; composto por NaCl 122 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 25 mM, glicose 10 mM) gaseificado com carbogênio (95 % O₂, 5 % CO₂) para atingir o pH 7,4 (MOLZ et al, 2008).

3.2 Cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

As células SH-SY5Y de neuroblastoma humano foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (Brasil). As células foram mantidas em cultura no meio DMEM-F12 (Gibco, 12500-062) acrescido de 2mM glutamina, 0,06% bicarbonato de sódio, 1U/ml penicilina e 1µg/ml estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida de 5% CO₂ em frascos de 25cm² ou 75cm² de área de crescimento celular

(TPP, Suíça). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e ao atingir confluência as células foram repicadas para novos frascos, utilizando tripsina por no máximo 5 minutos a TA para soltá-las da superfície. A reação da tripsina foi cessada pela adição de SFB. As células em suspensão foram passadas pra um tubo estéril e centrifugadas a 1300 RPM por 3 minutos. O sedimento foi ressuspensão em meio de cultura fresco e as células transferidas para uma nova garrafa. Para a realização dos experimentos, as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na densidade de 10^4 células/poço em placas de 96 poços e mantidas até atingir confluência em estufa úmida de CO_2 .

3.3 Tratamentos *in vitro*

3.3.1 Tratamento de fatias

As fatias foram incubadas 1-3h (37°C) tampão HEPES-Salina (NaCl 124mM, KCl 3mM, MgSO_4 1,2mM, HEPES 25mM, glicose 12mM e CaCl_2 1mM, pH 7,4) ou tampão HEPES-Salina contendo MnCl_2 (1-1000 μM) (Sigma, EUA). Para as incubações de 6h as fatias foram mantidas em um meio de incubação composto por 50% de KRB (NaCl 122 mM, KCl 3 mM, CaCl_2 1,3 mM, MgSO_4 1,2 mM, KH_2PO_4 0,4 mM, NaHCO_3 25 mM, glicose 10 mM), 50% de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), 20 mM de HEPES e 100 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, a 37°C e em atmosfera contendo 5% de CO_2 .

3.3.2 Tratamento de células SH-SY5Y

Após a contagem em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 (TPP, Suíça) na densidade de 10^4 células/poço. Após três dias o meio de cultura foi substituído por DMEM-F12 sem SFB contendo 1-1000 μM MnCl_2 . Como controles as células foram mantidas em meio DMEM-F12 sem SFB. O período de tratamento com o metal foi de 12 e 24 horas. As células permaneceram a 37°C e em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Foram utilizadas células nas passagens 12 a 15.

3.4 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico que mede a redução do MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium) adicionado às fatias hipocâmpais e estriatais após o período de incubação (LIU et al., 1997). Este reagente é convertido, nas células vivas e viáveis, em cristais azuis insolúveis (formazana) por diversas desidrogenases (especialmente a enzima mitocondrial succinato desidrogenase). A formazana foi solubilizada pelo dimetil sulfoxido

(DMSO), formando um composto colorido cuja densidade ótica (DO) foi medida em leitor de microplacas ($\lambda=540$ nm). A quantificação da coloração obtida é proporcional à viabilidade celular. Utilizamos também o método do corante vermelho neutro, que é endocitado e se acumula nos lisossomos de células viáveis (BORENFREUND; PUERNER, 1985). Após os tratamentos, as fatias foram incubadas por 30 minutos a 37°C com o corante (50 μ g/ml). Foram feitas duas lavagens com tampão salina fosfato (PBS, pH 7,4) por 5 minutos a TA sob agitação e posteriormente foi adicionado o tampão de extração composto por ácido acético – etanol – água (1:50:49), formando um composto colorido cuja DO foi medida em leitor de microplacas ($\lambda=540$ nm). Também foi utilizado o método de liberação da LDH (lactato desidrogenase) para avaliar a integridade celular. Nesse protocolo, ao final do período de incubação das fatias, coletou-se o meio extracelular para quantificar a LDH com o auxílio de um kit de LDH (Doles®, Brasil) através de reações de oxi-redução. Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (considerado 100%).

3.5 Western blotting

3.5.1 Preparo das amostras para eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

Após os tratamentos, as fatias foram solubilizadas em tampão de amostra contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 4%, Tris 50 mM, EDTA 100mM e β -mercaptoetanol 8%, (pH 6,8) por 5 minutos a 100°C. Após homogeneização uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. Em seguida adicionou-se numa proporção de 25:100 (v/v) a solução de diluição de amostra (glicerol 40%, Tris 25mM e azul de bromofenol, pH 6,8). As proteínas totais das amostras de fatias hipocâmpais e estriatais foram dosadas pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977).

3.5.2 Separação de proteínas por eletroforese (SDS-PAGE)

As proteínas foram isoladas através de SDS-PAGE unidimensional. O gel de empilhamento continha 4% acrilamida e o gel de separação 10% acrilamida. Para preparo dos géis foi utilizado um sistema de eletroforese em mini-gel utilizando espaçadores de 1 mm de espessura. A eletroforese foi realizada com corrente de 15 mA por placa e voltagem máxima de 140 V durante aproximadamente 2 horas, TA, utilizando-se os tampões superior (glicina 190 mM, Tris 25 mM e SDS

0,1%) e inferior (Tris 50 mM; pH 8,3). Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

3.5.3 Eletrotransferência

Após a eletroforese o gel foi incubado com tampão de equilíbrio (Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 5% e SDS 0,1%) por 30 minutos. As proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose através de um sistema *semi-dry* utilizando tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 5%) com uma corrente de 1,2 mA/cm² de gel durante 1h30min. Por fim coraram-se as membranas com solução de Ponceau (Ponceau 0,5% em ácido acético 1%) para verificar a eficiência da eletrotransferência.

3.5.4 Imunodeteção

As membranas de nitrocelulose foram cortadas nas posições correspondentes às massas moleculares adequadas para o uso de anticorpos específicos contra formas fosforiladas de ERK1/2 (44-42 kDa), JNK1/2 (46-54 kDa) e p38^{MAPK} (~38 kDa). Primeiramente as membranas foram lavadas com TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5) para retirar a marcação com Ponceau, e a seguir foram bloqueadas por 1 hora com de leite desnatado (Molico®) 5% em TBS, TA. Então as membranas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com TBS-T (Tween-20 0,05%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5) e incubadas com os anticorpos de interesse (Tabela 1) *overnight* a 4°C em agitação constante. Após 3 lavagens de 5 min com TBS-T incubaram-se as membranas por 1 hora a TA com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. Por fim as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e 2 vezes com TBS, e reveladas por quimioluminescência com o reagente LumiGLO (Cell Signaling Technology, EUA) segundo especificações do fabricante. Para a detecção do conteúdo total das MAPKs foi realizado *stripping* das membranas utilizadas anteriormente. O *stripping* foi realizado com NaOH 0,2N por 5 minutos. Após esse procedimento as membranas foram lavadas em água e TBS-T para, a seguir, proceder ao bloqueio e demais passos para a detecção das formas totais utilizando os anticorpos específicos conforme a tabela 1 (CORDOVA, et al., 2004; LEAL et al., 2007; RIGON et al., 2008). A densitometria das bandas foi determinada utilizando o programa Scion Image® versão Beta 3 e os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle. Observa-se que a expressão de fosforilação é dada como uma razão DO da banda fosforilada/DO da banda total, das respectivas MAPKs.

Tabela 1: Fabricante, número do catálogo e diluição dos anticorpos utilizados para *western blotting*.

ANTICORPO	FABRICANTE (Nº CAT.)	DILUIÇÃO
<i>Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/ Tyr204)</i>	Cell Signalling Technology (#4370)	1:2000
<i>Anti-Mitogen Activated protein kinase (ERK1 & ERK2)</i>	Sigma (M 5670)	1:40000
<i>Anti-phospho-p38 (pThr¹⁸⁰/pTyr¹⁸²)</i>	Sigma (P 1491)	1:1000
<i>Anti-p38 MAP kinase</i>	Sigma (M 0800)	1:10000
<i>Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)</i>	Cell Signalling Technology (#9251)	1:1000
<i>Anti-c-Jun N-Terminal Kinase (JNK1, JNK2)</i>	Sigma (J 4500)	1:5000
<i>Goat anti-Rabbit IgG, Peroxidase Conjugated secondary antibody</i>	Millipore (AP 132 P)	1:5000

3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através do teste estatístico ANOVA de uma ou duas vias, seguido do teste post hoc de Duncan, quando apropriado. A análise estatística foi feita no programa STATISTICA 5.1 e os gráficos preparados no programa *GraphPad Prism 4.0*. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Viabilidade celular após tratamento com Mn^{2+}

4.1.1 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do vermelho neutro e LDH em fatias estriatais expostas ao Mn^{2+}

Fatias estriatais obtidas de ratos imaturos (PN14) foram incubadas com $MnCl_2$ (5-200 μM) por um período de 3 horas. Avaliou-se então a viabilidade celular das fatias por dois métodos: coloração com o corante vermelho neutro, que avalia a capacidade endocítica das células e quantificação da lactato desidrogenase (LDH), que avalia a integridade celular medindo a liberação de LDH no meio extracelular. Não foi observada alteração significativa da viabilidade celular em nenhuma das concentrações de metal utilizadas (Figura 4 A e B).

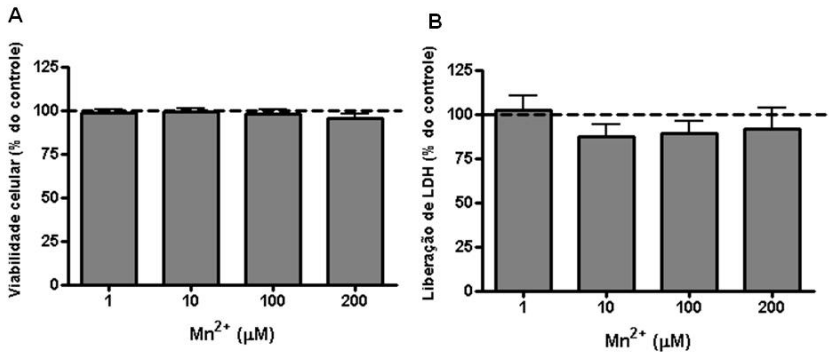


Figura 4: Efeito do $MnCl_2$ sobre a viabilidade de fatias estriatais de ratos imaturos na ausência (controle) ou presença de $MnCl_2$ (1-200 μM) por um período de 3 horas. (A) Viabilidade avaliada pelo teste do vermelho neutro. Após o tratamento foi avaliada a capacidade de endocitose pela leitura do corante vermelho neutro. N=6. (B) Viabilidade avaliada pelo teste do LDH. Após o tratamento, coletou-se o meio extracelular para realização do método e quantificação de LDH. N=6. Os dados representam a porcentagem de células vivas em relação ao controle (linha tracejada) e expressam a média \pm EP.

4.1.2 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT em fatias estriatais e hipocámpais expostas ao Mn^{2+}

Fatias hipocámpais e estriatais de ratos PN14 foram incubadas com $MnCl_2$ (5-1000 μM) por períodos de 1, 2 e 3 horas. Após a incubação realizou-se o teste do MTT, que avalia a viabilidade celular através da capacidade de redução do sal MTT, formando cristais de formazana. Não observamos queda significativa da viabilidade celular

(Figura 5 A e B). Dessa forma, para confirmar a capacidade do Mn^{2+} causar um possível dano as células, optamos por estender o tempo de incubação das fatias com o metal para 6 horas. O teste do MTT não demonstrou queda significativa da viabilidade das fatias (Figura 6 A e C).

Adicionalmente avaliamos, no período de 6 horas, fatias hipocâmpais e estriatais obtidas de ratos adultos, para verificar possíveis diferenças na sensibilidade das fatias ao insulto com o Mn^{2+} em relação ao período do desenvolvimento. Os resultados (Figura 6D) mostraram uma redução significativa ($p < 0,01$) de 18,6%, com um erro padrão de 3,54 ($18,6\% \pm 3,54$; $p < 0,01$) na viabilidade das fatias estriatais de ratos adultos, tratadas com a concentração mais alta (1mM) de $MnCl_2$. Essa queda não foi observada nas fatias estriatais obtidas de ratos PN14. A viabilidade das fatias hipocâmpais não foi alterada pelo metal (Figura 6B).

4.1.3 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT em culturas de neuroblastoma humano SH-SY5Y expostas ao Mn^{2+}

As culturas celulares SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 96 poços e ao atingir confluência foram expostas ao $MnCl_2$ (1-1000 μM) na ausência de SFB por períodos de 12 e 24 horas. As culturas foram tratadas também com $CdCl_2$ (50 μM) para controle positivo de morte celular. Após a incubação a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Não foi observada queda significativa da viabilidade celular (Figura 7).

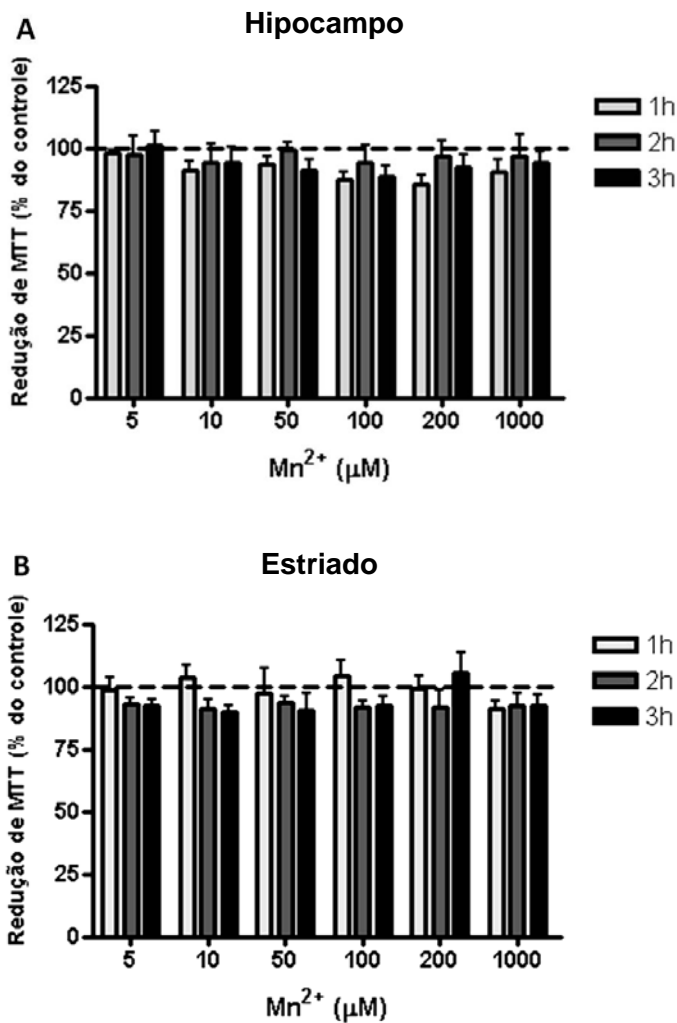


Figura 5: Efeito do MnCl₂ sobre a viabilidade de fatias hipocámpais e estriatais de ratos imaturos na ausência (controle, linha tracejada) ou presença de MnCl₂ (5-1000 μM) por períodos de 1, 2 e 3 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT. (A) Viabilidade de fatias hipocámpais. N=5. (B) Viabilidade de fatias estriatais. N=5. Os dados representam a porcentagem de células vivas em relação ao controle e expressam a média ±EP.

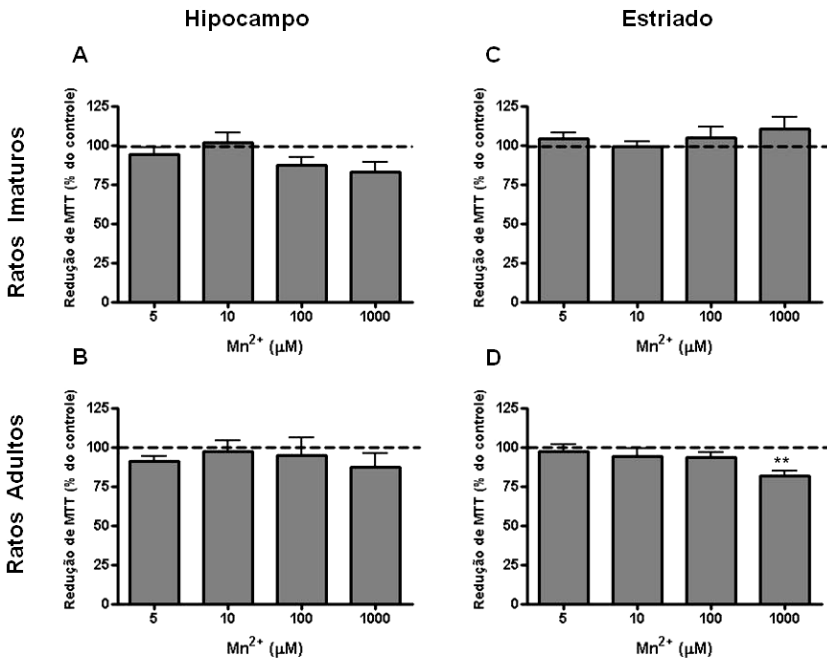


Figura 6: Efeito do MnCl₂ sobre a viabilidade de fatias hipocâmpais e estriatais de ratos imaturos (PN14) e adultos na ausência (controle, linha tracejada) ou presença de MnCl₂ (5-1000 µM) por períodos de 6 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT. (A) Viabilidade de fatias hipocâmpais de ratos imaturos. (B) Viabilidade de fatias hipocâmpais de ratos adultos. (C) Viabilidade de fatias estriatais de ratos imaturos. (D) Viabilidade de fatias estriatais de ratos adultos. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle e expressam a média ±EP de 4 experimentos. **p<0,01 comparado com o controle.

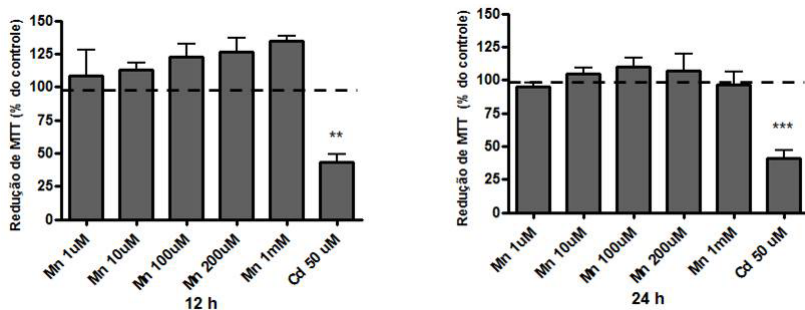


Figura 7: Efeito do $MnCl_2$ sobre a viabilidade de cultura de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas com $MnCl_2$ (5-1000 μM) por períodos de 12 ou 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT. $CdCl_2$ (50 μM) foi usado como controle positivo para morte celular. As células foram utilizadas nas passagens 12 a 15. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle (ausência de $MnCl_2$, linha tracejada) e expressam a média $\pm EP$ de 3 experimentos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado com o controle.

4.2 Modulação das MAPKs em fatias hipocâmpais e estriatais expostas ao Mn^{2+}

Estresse oxidativo tem sido implicado na neurotoxicidade do manganês (YIN et al., 2008; MILATOVIC et al., 2009). Este tipo de insulto pode levar a ativação de MAPKs, envolvidas em vários tipos de respostas celulares (YIN et al., 2008). Em nosso estudo, avaliamos a ativação por fosforilação de ERK1/2, $p38^{MAPK}$ e JNK2/1 em fatias de hipocampo e de corpo estriado tanto de ratos imaturos quanto de ratos adultos. As fatias foram expostas por 1, 2, 3 e 6 horas ao $MnCl_2$ em concentrações variando de 1 μM a 1mM e posteriormente analisadas através de *western blotting*.

4.2.1 Modulação de MAPKs em fatias obtidas de ratos imaturos

4.2.1.1 Modulação de MAPKs em fatias hipocâmpais

Avaliamos o efeito do metal no modelo de fatias hipocâmpais obtidas de ratos PN14, um período crítico do desenvolvimento. A modulação das MAPKs ERK e $p38^{MAPK}$ foi avaliada após incubações de 1,2 e 3 horas com $MnCl_2$ (1-1000 μM). ERK, $p38^{MAPK}$ e JNK foram avaliadas após incubações de 6 horas com $MnCl_2$ (1-1000 μM). Não foi observada alteração na fosforilação destas proteínas, nem em seu conteúdo total (Figura 8 A, B e C).

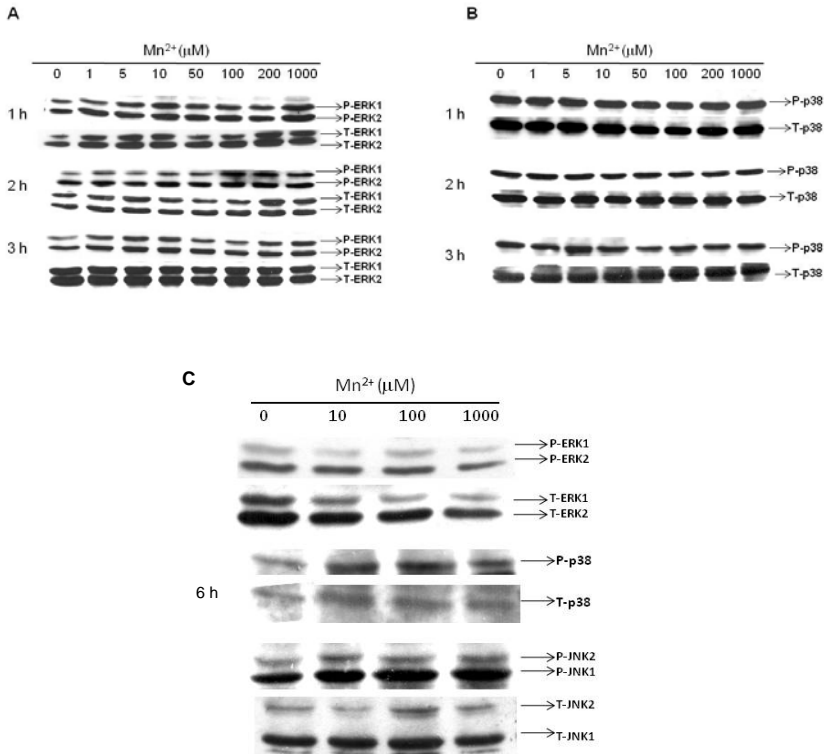


Figura 8: Efeito do MnCl_2 sobre a fosforilação de MAPKs em fatias hipocâmpais obtidas de ratos imaturos (PN14) após 1, 2, 3 e 6 horas de incubação na ausência (controle) ou presença de MnCl_2 (1-1000 μM), analisadas por *western blotting*. A revelação foi realizada por quimioluminescência. (A) *Western blotting* para a fosforilação de ERK1/2 e seu conteúdo total em incubações de 1, 2 e 3 horas. (B) *Western blotting* para a fosforilação de p38^{MAPK} e seu conteúdo total em incubações de 1, 2 e 3 horas. (C) *Western blotting* para a fosforilação de ERK, p38^{MAPK} e JNK e seus conteúdos totais em incubação de 6 horas.

4.2.1.2 Modulação de MAPKs em fatias estriatais

Avaliamos o efeito do Mn^{2+} no modelo de fatias estriatais obtidas de ratos imaturos. A fosforilação e o conteúdo total das MAPKs ERK, $p38^{MAPK}$ e JNK após incubações de 3 horas com $MnCl_2$ (1-1000 μM) não sofreu alterações (Figuras 9A, 10A, e 11A). Ao estender o período de incubação para 6 horas observamos aumento significativo na fosforilação de ERK2 (16,97% \pm 5,8; $p < 0,05$) (Figura 9B), JNK1 (32,73% \pm 10,27; $p < 0,05$) e JNK2 (20,87% \pm 7,49; $p < 0,05$) (Figura 11B), mas não de $p38^{MAPK}$ (Figura 10B). Esse aumento foi observado apenas na concentração mais alta de $MnCl_2$ (1mM).

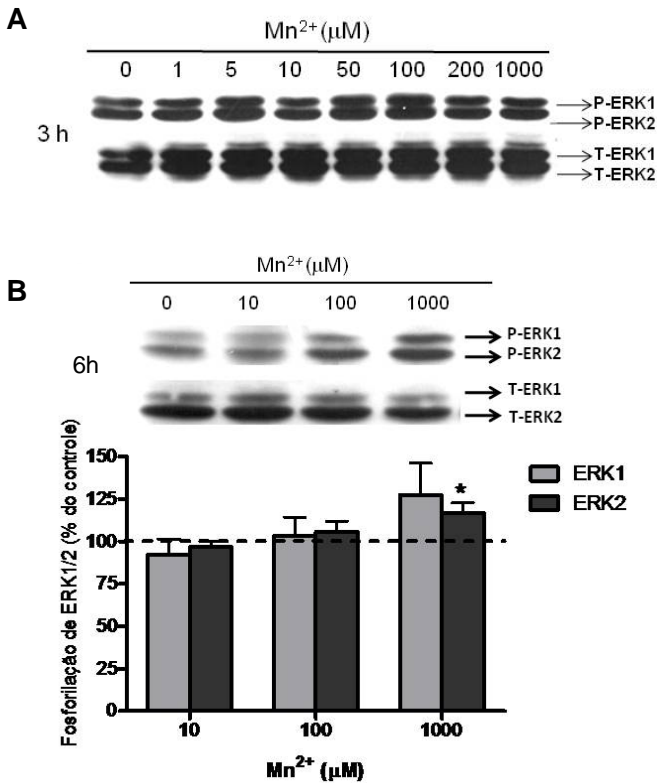


Figura 9: Efeito do $MnCl_2$ sobre a fosforilação de ERK1/2 em fatias estriatais de ratos imaturos (PN14) após 3 e 6 horas de incubação na ausência (controle) ou presença de $MnCl_2$. A revelação foi realizada por quimioluminescência. A densitometria das bandas foi determinada usando o programa Scion Image®. As fatias foram expostas a 1-1000 μM de $MnCl_2$ por 3 horas (A) ou 6 horas (B) e posteriormente analisadas por *western blotting* para a fosforilação de ERK1/2 e seu conteúdo total. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle (linha tracejada) e expressam a média $\pm EP$ de 4 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

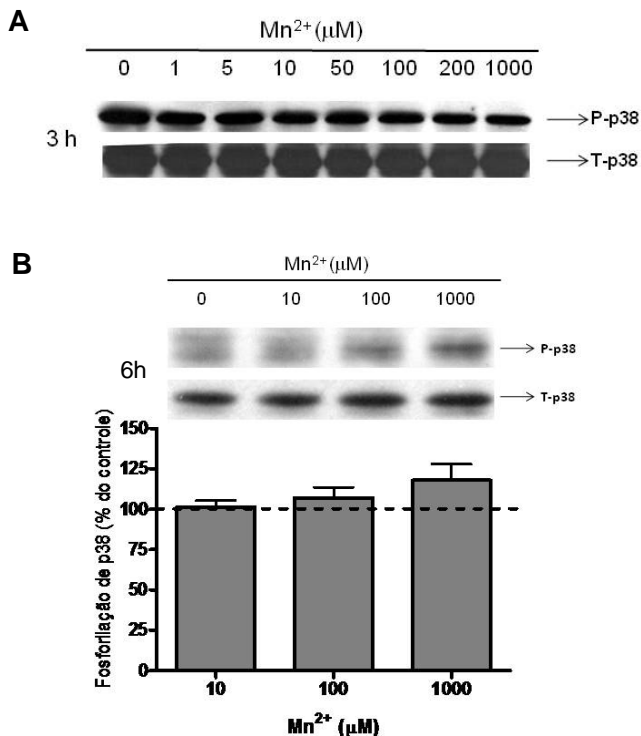


Figura 10: Efeito do $MnCl_2$ sobre a fosforilação de $p38^{MAPK}$ em fatias estriatais de ratos imaturos (PN14) após 3 e 6 horas de incubação na ausência (controle) ou presença de $MnCl_2$. A revelação foi realizada por quimioluminescência. A densitometria das bandas foi determinada usando o programa Scion Image®. As fatias foram expostas a 1-1000 μM de $MnCl_2$ por 3 horas (A) ou 6 horas (B) e posteriormente analisadas por *western blotting* para a fosforilação de $p38^{MAPK}$ e seu conteúdo total. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle (linha tracejada) e expressam a média $\pm EP$ de 4 experimentos.

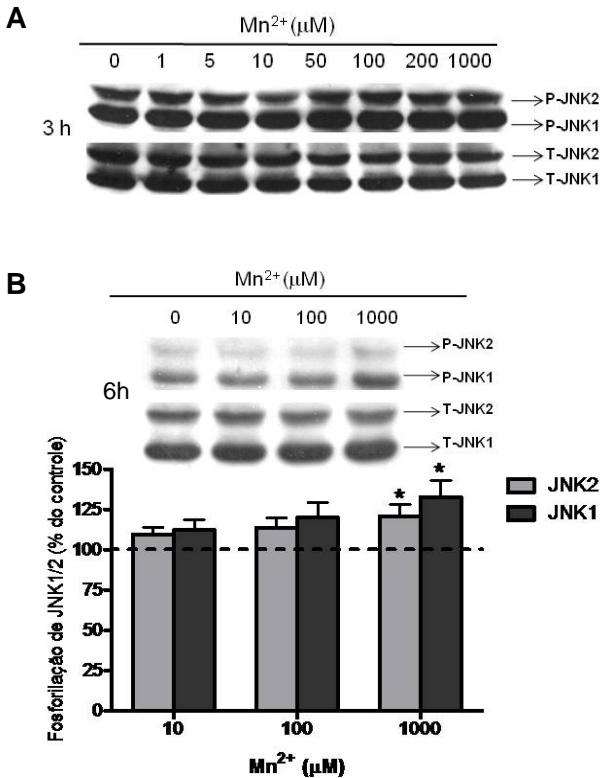


Figura 11: Efeito do $MnCl_2$ sobre a fosforilação de JNK1/2 em fatias estriatais de ratos imaturos (PN14) após 3 e 6 horas de incubação na ausência (controle) ou presença de $MnCl_2$. A revelação foi realizada por quimioluminescência. A densitometria das bandas foi determinada usando o programa Scion Image®. As fatias foram expostas a 1-1000 μM de $MnCl_2$ por 3 horas (A) ou 6 horas (B) e posteriormente analisadas por *western blotting* para a fosforilação de JNK1/2 e seu conteúdo total. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle (linha tracejada) e expressam a média $\pm EP$ de 4 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

4.2.1 Modulação de MAPKs em fatias estriatais obtidas de ratos adultos

Nas fatias obtidas do corpo estriado de ratos adultos tratadas com $MnCl_2$ (10, 100 e 1000 μM) por um período de 6 horas foi observado por *western blotting* aumento significativo na fosforilação de $p38^{MAPK}$ (12,43% \pm 2,58; $p < 0,01$) na concentração mais alta do metal (Figura 12B) e não de ERK1/2 e JNK2/1 (Figura 12 A e C). A proteína cinase $p38^{MAPK}$, uma SAPK, é frequentemente relacionada a estresse e morte celular (MIELKE; HERDEGEN, 2000; COWAN; STOREY, 2003).

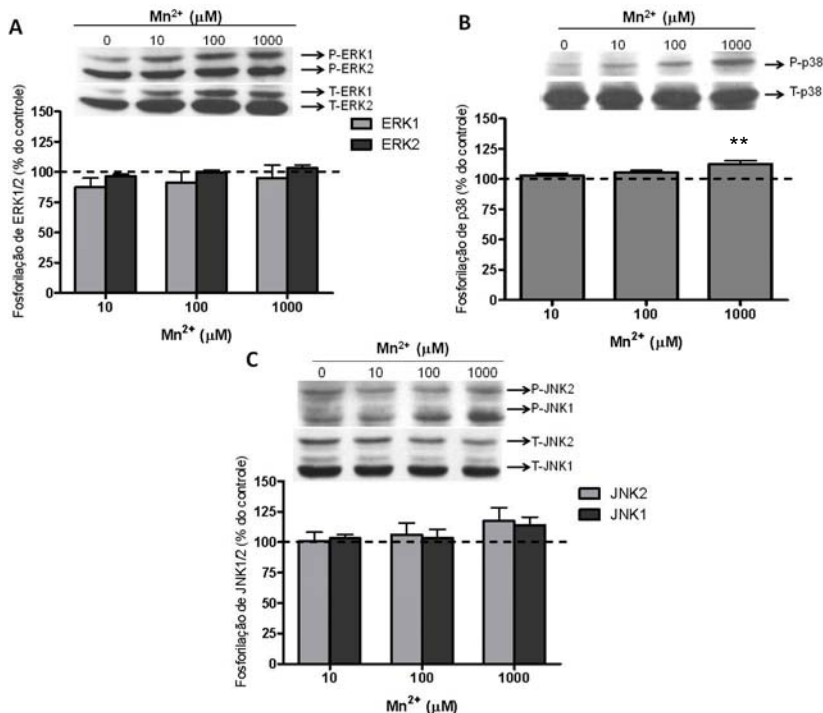


Figura 12: Efeito do $MnCl_2$ sobre a fosforilação de MAPKs em fatias estriatais de ratos adultos após 6 horas de incubação na ausência (controle) ou presença de $MnCl_2$ (10, 100 e 1000 μM), analisadas por *western blotting*. A revelação foi realizada por quimioluminescência. A densitometria das bandas foi determinada usando o programa Scion Image®. (A) *Western blotting* para a fosforilação e conteúdo total de (A) ERK1/2, (B) $p38^{MAPK}$, (C) JNK1/2. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle (linha tracejada) e expressam a média \pm EP de 4 experimentos. ** $p < 0,01$ comparado ao controle.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, o modelo de fatias do estriado de ratos foi escolhido para avaliar a neurotoxicidade do Mn^{2+} , pois é uma região do cérebro rica em neurônios dopaminérgicos e alvo para o acúmulo do metal (ASCHNER et al., 2009). O modelo de fatias cerebrais de ratos mantém a matriz extracelular, conexões neuronais e interações entre neurônios e glia, sendo, portanto, um modelo experimental apropriado para estudo da fosforilação de proteínas e sua modulação por agentes externos (GONG et al., 2001; HIRATA; NAGATSU, 2005). Nosso estudo também utilizou fatias hipocâmpais, pois poucos estudos relacionados ao Mn^{2+} foram realizados em estruturas além dos gânglios da base (GUILARTE et al., 2008a). Adicionalmente, tem sido reconhecido que a exposição a metais durante o desenvolvimento pode alterar a neurogênese, aprendizado e memória dependentes do hipocampo (LERET et al., 2003). No hipocampo, o Mn^{2+} não modificou nenhum dos parâmetros avaliados a saber, viabilidade (Figuras 5A, 6A e 6B) e fosforilação de MAPKs (Figura 8). Nossos resultados estão de acordo com resultados obtidos em outros estudos, demonstrando que o Mn^{2+} não possui ação sobre o hipocampo (ESCHENKO, et al., 2010; JACKSON, et al., 2011). Como o estriado expressa maiores níveis de DMT-1, responsável em parte pelo transporte do Mn^{2+} , em relação ao córtex e hipocampo, isso pode explicar o maior acúmulo de Mn^{2+} e por consequência os efeitos tóxicos mais proeminentes nessa região (AU; BENEDETTO; ASCHNER, 2008; ÁVILA et al., 2010). Outro fator para a maior susceptibilidade do estriado é seu conteúdo de dopamina (DA), que contribui para a geração de estresse oxidativo na presença de Mn^{2+} (PRABHAKARAN et al., 2008; ESCHENKO, et al., 2010). A seletividade do Mn^{2+} por estruturas dos gânglios da base é confirmada pelos danos motores observados em diversos modelos de exposição ao metal *in vivo* (ÁVILA et al., 2010). No entanto, o córtex pré-frontal, uma área que acumula menos Mn^{2+} do que os gânglios da base, também é afetado pelo metal, com presença de placas de β -amilóide, demonstrado em macacos expostos ao $MnSO_4$ por 40 semanas (GUILARTE et al., 2008a).

O Mn^{2+} apresenta neurotoxicidade seletiva contra neurônios dopaminérgicos através de mecanismos não totalmente esclarecidos, mas possivelmente devido à interação com a dopamina, causando a sua oxidação e aumentando o estresse oxidativo (PRABHAKARAN et al., 2008). Em um estudo *in vivo* de injeções intra-cerebroventricular de $MnCl_2$ (1 μ mol/ μ l) por 7 dias, observou-se 70% de diminuição de neurônios dopaminérgicos da substância negra de ratos adultos

(ZHAO et al., 2009). Embora o modelo de fatias preserve as características fisiológicas do tecido vivo, a incubação por um período de 3 ou 6 horas com $MnCl_2$ não induziu diminuição significativa na viabilidade celular em fatias estriatais de ratos PN14 (Figuras 4, 5B e 6C). Entretanto, causou uma queda na viabilidade das fatias de ratos adultos na concentração mais alta do metal (18,6% \pm 3,54; $p < 0,01$; Figura 6D). Portanto, nossos resultados parecem concordar com Sistrunk e colaboradores (2007), que utilizando um modelo *in vitro* de fatias estriatais (de ratos adultos) não observaram morte celular induzida por $MnCl_2$ (1-1000 μM) após 4 horas de tratamento. Tem sido documentado que os astrócitos acumulam níveis mais elevados de Mn^{2+} do que os neurônios e são também o local inicial de dano induzido pelo Mn^{2+} , diminuindo assim o acúmulo de Mn^{2+} nos neurônios e funcionando como um mecanismo de proteção contra a perda neuronal (GONZALEZ et al., 2008). Assim, nossos resultados sugerem que no modelo de fatias estriatais, a ação de Mn^{2+} não está associada com morte celular precoce. Deve ser considerado que o modelo de fatias permite apenas um período de exposição relativamente curto, com um limite máximo de 6 horas, pois após esse período a viabilidade celular começa a decair (MOLZ et al., 2008). Portanto, o modelo de fatias é ideal para estudo dos efeitos agudos do metal, como já demonstrado para outros metais como Cd^{2+} (RIGON et al., 2008), Pb^{2+} (CORDOVA et al., 2004) e Zn^{2+} (dados não publicados). Considerando todos os aspectos, pode ser inferido que o Mn^{2+} necessita de períodos de exposição mais longos para expressar sua neurotoxicidade de forma mais proeminente com indução de morte celular em fatias estriatais. Entretanto, podem ser observadas mudanças na sinalização intracelular, que ocorreram na concentração mais alta do metal (1 mM).

A incubação de fatias estriatais de ratos PN14 com $MnCl_2$ (1-1000 μM) por 3 horas não alterou a fosforilação de MAPKs (Figuras 9A, 10A, 11A). Ao estender o tempo de incubação para 6 horas, foi observado um aumento da fosforilação de ERK2 (16,97% \pm 5,8; $p < 0,05$; Figura 9B), e de JNK1/2 (32,73% \pm 10,27; $p < 0,05$; 20,87% \pm 7,49; $p < 0,05$; Figura 11B) e nenhuma mudança na fosforilação de $p38^{MAPK}$ (Figura 10B). Esses achados concordam parcialmente com os resultados observados em um estudo da exposição *in vivo* de ratos imaturos ao Mn^{2+} , onde também ocorre aumento da atividade de ERK sem alteração de $p38^{MAPK}$ (dados não publicados). Neste modelo, os ratos imaturos receberam doses intraperitoneais de $MnCl_2$ do 8^o ao 12^o dia pós-natal (PN8-12), e as vias de sinalização foram avaliadas no PN14. Além

disso, outro estudo desenvolvido em nosso grupo (POSSER et al., 2009) utilizando um modelo de células dopaminérgicas (PC12) foi observado aumento da fosforilação de JNK1/2 e p38^{MAPK} em altas concentrações de Mn²⁺ (> 500µM) após 24 horas de incubação, evento esse acompanhado de morte celular. Considerando todos os aspectos pode-se verificar que o modelo de fatias estriatais de ratos imaturos expostas *in vitro* pode reproduzir parcialmente alguma das modificações observadas *in vivo* ou produzidas *in vitro* em células expostas por períodos mais longos.

A incubação de fatias estriatais de ratos adultos com MnCl₂ (10, 100, 1000 µM) por 6 horas alterou apenas a fosforilação de p38^{MAPK} (12,43% ±2,58; p<0,01; Figura 12B). Molz e colaboradores (2008) demonstraram que p38^{MAPK} pode participar de mecanismos de morte celular em resposta a insultos isquêmicos e excitotóxicos no hipocampo de ratos de 30 dias. Porém, em outros estudos utilizando animais PN14 demonstramos um papel citoprotetor para p38^{MAPK} no hipocampo em modelos de insulto com Cd²⁺ (RIGON et al., 2008) e Zn²⁺ (dados não publicados). Em células microgliais, exposição ao Mn²⁺ causou ativação de p38^{MAPK} e isto está relacionado à potencialização do efeito pró-inflamatório de lipopolissacarídeo (LPS) (CRITTENDEN; FILIPOV, 2008). A fosforilação de p38^{MAPK} em nosso modelo poderia estar associada à morte celular que foi observada nas fatias estriatais de ratos adultos (Figura 6D), porém será necessário realizar experimentos utilizando o inibidor de p38^{MAPK} para confirmar essa possibilidade.

Comparando as fatias estriatais de ratos imaturos e adultos, observamos queda de viabilidade nas fatias de ratos adultos (Figura 6D), demonstrando que o metal age de forma diferente nos dois modelos. Apesar da maior preocupação com a exposição ocupacional ao Mn²⁺, que atinge adultos, os jovens também podem sofrer com a exposição ao metal através da água contaminada, nutrição parenteral ou MMT (adicionado à gasolina). Durante o desenvolvimento, isso é mais preocupante, pois insultos tóxicos podem causar danos ao SNC que afetam a função cerebral na vida adulta (GRADJEAN; LANDRIGAN, 2006). Poucos estudos relacionados ao Mn²⁺ investigam o papel da exposição precoce ao metal com disfunções cerebrais, comportamentais e aparecimento de doenças neurodegenerativas na vida adulta ou na velhice. Moreno e colaboradores (2009) fizeram um estudo comparativo entre camundongos expostos ao Mn²⁺ apenas enquanto jovens, apenas enquanto adultos ou em ambas as fases (pré-expostos enquanto jovens e novamente expostos na fase adulta). Os resultados demonstraram maior sensibilidade dos animais jovens (com maiores danos motores) do que

dos adultos e que a exposição durante o desenvolvimento torna os animais mais suscetíveis a insultos neurotóxicos numa fase mais tardia. A ativação de ERK2 e JNK1/2 observada nas fatias estriatais de ratos PN14 (Figuras 9B, 10B, 11B), um período crítico para o desenvolvimento do SNC, nos leva a acreditar que a exposição a altas doses de Mn^{2+} causa distúrbios da sinalização intracelular que podem afetar o desenvolvimento em casos de exposição *in vivo* ao metal. Já foi demonstrado, por exemplo, que ERK1/2 e p38^{MAPK} sofrem uma variação fisiológica de sua atividade durante o desenvolvimento do sistema visual de ratos (OLIVEIRA et al., 2008). Dessa forma podemos postular que a alteração da atividade dessas enzimas por agentes tóxicos como o Mn^{2+} , durante estágios específicos do desenvolvimento do SNC, possa levar a importantes modificações da sinaptogênese (COSTA et al., 2004; RIGON et al., 2008) com reflexos funcionais em fases mais tardias da vida.

Avaliamos ainda a viabilidade de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y após o tratamento com $MnCl_2$. Nossos resultados não mostraram alteração significativa de viabilidade celular após exposição das células ao metal por 12-24 h (Figura 7), mesmo em altas concentrações (1 mM). Estas células têm sido utilizadas como um modelo para estudos dos aspectos moleculares relacionados à toxicidade do Mn^{2+} e Parkinson (LI et al., 2010) e foi demonstrado que 500 μM de $MnCl_2$ por um período inferior a 24 horas pode produzir apoptose e aumento da expressão de α -sinucleína nesse modelo (LI et al 2010). Higashi e colaboradores (2004) também utilizaram o modelo de células SH-SY5Y e demonstraram queda da viabilidade de forma concentração-dependente após 24 horas de exposição ao $MnCl_2$ (100-800 μM). Esse modelo celular apresenta características de neurônios dopaminérgicos, como expressão de transportadores de dopamina (DAT), expressão de tirosina hidroxilase (TH) e síntese de DA. Porém, existem limitações para o uso de células SH-SY5Y indiferenciadas. Seus níveis de DA são menores por causa da baixa atividade de TH e sua expressão de DAT também é menor em comparação com células diferenciadas. Diversas evidências sugerem que a diferenciação de células SH-SY5Y com diferentes agentes diferenciadores, como o ácido retinóico, resulta em fenótipo neuronal maduro (XIE; HU; LI, 2010). Em um estudo a respeito do mecanismo molecular de ação de neurotoxinas (rotenona e Mn^{2+}) sobre células dopaminérgicas, o modelo de células PC12 foi escolhido por conter maior nível de catecolaminas do que as células SH-SY5Y (HIRATA; MEGURO; KIUCHI, 2006). Para confirmar em nosso laboratório se o uso de células SH-SY5Y indiferenciadas é ideal para

avaliar os efeitos do Mn^{2+} será preciso realizar experimentos com células diferenciadas para comparação.

Neste estudo demonstramos que as fatias estriatais representam um modelo de exposição aguda ao Mn^{2+} com capacidade de reproduzir algumas modificações observadas *in vivo* e em modelos celulares. Adicionalmente, nós reforçamos a hipótese de que alterações sutis na atividade de enzimas envolvidas na modulação da sinalização intracelular durante fases críticas do desenvolvimento do SNC, pode ser um aspecto de grande relevância no que trata da exposição a agentes tóxicos ambientais, como é o caso do Mn^{2+} .

6. CONCLUSÕES

- ✓ Com relação à neurotoxicidade do Mn^{2+} nosso modelo *in vitro* demonstrou que o tratamento com $MnCl_2$ (1-1000 μ M) por períodos de 1, 2, 3 e 6 horas não altera a viabilidade celular de fatias hipocâmpais e estriatais obtidas de ratos imaturos (PN14), nem de fatias hipocâmpais de ratos adultos (PN60) tratadas por 6 horas. Em fatias estriatais obtidas de ratos adultos uma concentração alta de $MnCl_2$ (1mM) causou queda da viabilidade celular após 6 horas de incubação.
- ✓ Com relação à modulação das MAPKs no modelo de exposição *in vitro* ao Mn^{2+} demonstramos que a modulação de MAPKs não foi alterada em fatias hipocâmpais e estriatais obtidas de ratos imaturos tratadas com $MnCl_2$ por 1, 2 e 3 horas. O tratamento mais longo, 6 horas, causou aumento na fosforilação de ERK1/2, e JNK2/1 em fatias estriatais de ratos imaturos e na fosforilação de p38^{MAPK} em fatias estriatais de ratos adultos.
- ✓ Em cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y a incubação com $MnCl_2$ (12, 24 horas) não afetou a viabilidade celular. Não está claro se estas células indiferenciadas disponíveis em nosso laboratório são ideais como modelo de células dopaminérgicas para estudo dos efeitos do Mn^{2+} .
- ✓ Em conjunto nossos resultados indicam que o Mn^{2+} pode afetar a sinalização celular em período crítico do desenvolvimento do SNC. Além disso, indicam que os efeitos envolvendo morte celular e alterações mais proeminentes da sinalização celular parecem não ocorrer de forma aguda, mas serem dependentes de períodos mais longos do que 6 horas de exposição ao metal.

7. BIBLIOGRAFIA

ASCHNER, M.; GANNON, M.; KIMELBERG, H.K. Manganese uptake and efflux in cultured rat astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, v. 58, p. 730–735, 1992.

ASCHNER M.; GUILARTE T.R.; SCHNEIDER J.S.; ZHENG W. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 221, p. 131-147, 2007.

ASCHNER, M.; ERIKSON, K.M.; HERNANDEZ, E.H.; TJALKENS, R. Manganese and its role in Parkinson's disease: From transport to neuropathology. *Neuromolecular Medicine*, v. 11, p. 252-266, 2009.

ÁVILA, D.S.; COLLE, D.; GUBERT, P.; PALMA, A.S; PUNTEL, G.; MANARIN, F.; NOREMBERG, S.; NASCIMENTO, P.C; ASCHNER, M.; ROCHA, J.B.T.; SOARES, F.A.A. A possible neuroprotective action of a vinylic telluride against Mn-induced neurotoxicity. *Toxicological Sciences*, v. 115(1), p. 194–201, 2010.

AU, C., BENEDETTO, A., ASCHNER, M. Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. *Neurotoxicology*, v. 29, p. 569–576, 2008.

BENEDETTO, A.; AU, C.; ASCHNER, M. Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shared with parkinson's disease. *Chemical Reviews*, v. 109 (10), p. 4862–4884, 2009.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, v. 24, p. 119-124, 1985.

BROUILLET, E.P.; SHINOBU, L.; MCGARVEY, U.; HOCHBERG, F.; BEAL, M.F. Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Experimental neurology*, v. 120, p. 89–94, 1993.

CERSOSIMO, M.G.; KOLLER, W.C. The diagnosis of manganese-induced parkinsonism. *Neurotoxicology*, v. 27, p. 340-346, 2006.

CHAN A.W.K.; MINSKI M.J.; LIM L.; LAI J.C.K. Changes in brain regional manganese and magnesium levels during postnatal development: modulation by chronic manganese administration. *Metabolic Brain Disease*, v. 7, p. 21–33, 1992.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, v. 410, p. 37-40, 2001.

CHEN, Z.; GIBSON, T.B.; ROBINSON, F.; SILVESTRO, L.; PEARSON, G.; XU, B.; WRIGHT, A.; VANDERBILT, C.; COBB, M.H. MAP kinases. *Chemical Reviews*, v. 101, p. 2449-2476, 2001.

CHEN, C.J.; OU, Y.C.; LIN, S.Y.; LIAO, S.L.; CHEN, S.Y.; CHEN, J. Manganese modulates pro-inflammatory gene expression in activated glia. *Neurochemistry International*, v. 49(1), p. 62–71, 2006

CORDOVA F.M.; RODRIGUES A.L.; GIACOMELLI M.B.; OLIVEIRA C.S.; POSSER T.; DUNKLEY, P.R.; LEAL R.B. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats, *Brain Research*, v. 998, p. 65-72, 2004.

COSTA, L.G.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O.P. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 44, p. 87-110, 2004.

COUPER, J. On the effects of black oxide of manganese when inhaled into the lungs. *British Annals of Medicine, Pharmacy, Vital Statistics, and General Science*, v. 1, p. 41–42, 1837.

COWAN, K.J.; STOREY, K.B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 1107-1115, 2003.

CRITTENDEN, P.L.; FILIPOV, N.M. Manganese-induced potentiation of *in vitro* proinflammatory cytokine production by activated microglial cells is associated with persistent activation of p38 MAPK. *Toxicology in Vitro*, v. 22, p. 18–27, 2008.

DOBSON, A.W.; ERIKSON, K.M.; ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1012, p. 115–128, 2004.

ERIKSON, K.M.; THOMPSON, K.; ASCHNER, J.; ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 113 (2), p. 369-377, 2007.

ESCHENKO, O.; CANALS, S.; SIMANOVA, I.; LOGOTHETIS, N.K. Behavioral, electrophysiological and histopathological consequences of systemic manganese administration in MEMRI. *Magnetic Resonance Imaging*, v. 28, p. 1165–1174, 2010.

FILIPOV, N.M.; SEEGAL, R.F.; LAWRENCE, D.A. Manganese potentiates *in vitro* production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by microglia through a nuclear factor kappa B-dependent mechanism. *Toxicological Sciences*, v. 84, p. 139–148, 2005.

GONG, C.; LIDSKY, T.; WEGIEL, J.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain. *Brain Research Protocols*, v. 6, p. 134– 140, 2001.

GONZALEZ, L.E.; JUKNAT, A.A.; VENOSA, A.J.; VERRENGIA, N.; KOTLER, M.L. Manganese activates the mitochondrial apoptotic pathway in rat astrocytes by modulating the expression of proteins of the Bcl-2 family. *Neurochemistry International*, v. 53, p. 408-415, 2008.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P.J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*, v. 368, p. 2167–2178, 2006.

GUILARTE, T.R., BURTON, N.C., VERINA, T., PRABHU, V.V., BECKER, K.G., SYVERSEN, T., SCHNEIDER, J.S. Increased APLP1 expression and neurodegeneration in the frontal cortex of manganese-exposed non-human primates, *Journal of Neurochemistry*, v. 105(5), p. 1948-59, 2008a.

GUILARTE, T.R.; BURTON, N.C.; MCGLOTHAN, J.L.; VERINA, T.; ZHOU, Y.; ALEXANDER, M.; PHAM, L.; GRISWOLD, M.; WONG, D.F.; SYVERSEN, T.; SCHNEIDER, J.S. Impairment of nigrostriatal dopamine neurotransmission by manganese is mediated by pre-synaptic

mechanism(s): Implications to manganese-induced parkinsonism. *Journal of Neurochemistry*, v. 107, p. 1236–1247, 2008b.

GUILARTE, T.R. Manganese and Parkinson's disease: A critical review and new findings. *Environmental Health Perspectives*, v. 118, p. 1071-1080, 2010.

GUNTER, T.E.; GAVIN, C.E.; ASCHNER, M.; GUNTER, K.K. Speciation of manganese in cells and mitochondria: A search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology*, v. 27, p. 765–776, 2006.

HARPER, S.J.; LOGRASSO, P. Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cell Signaling*, v. 13, p. 299-310, 2001.

HIGASHI, Y.; ASANUMA, M.; MIYAZAKI, I.; HATTORI, N.; MIZUNO, Y.; OGAWA, N. Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *Journal of Neurochemistry*, v. 89, p. 1490–1497, 2004.

HIRATA, Y.; FURUTA, K.; MIYAZAKI, S.; SUZUKI, M.; KIUCHI, K. Anti-apoptotic and pro-apoptotic effect of NEPP11 on manganese-induced apoptosis and JNK pathway activation in PC12 cells. *Brain Research*, v. 1021, p. 241-247, 2004.

HIRATA, Y., NAGATSU, T. Rotenone and CCCP inhibit tyrosine hydroxylation in rat striatal tissue slices. *Toxicology*, v. 216, p. 9–14, 2005.

HIRATA, Y.; MEGURO, T.; KIUCHI, K. Differential effect of nerve growth factor on dopaminergic neurotoxin-induced apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, v. 99, p. 416-425, 2006.

ITO, Y.; OH-HASHI, K.; KIUCHI, K.; HIRATA, Y. p44/42 MAP kinase and c-Jun N-terminal kinase contribute to the up-regulation of caspase-3 in manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Brain Research*, v. 1099, p. 1-7, 2006.

JACKSON, S.J.; HUSSEY, R.; JANSEN, M.A.; MERRIFIELD, G.D.; MARSHALL, I.; MACLULLICH, A.; YAU, J.L.W.; BAST,T.

Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of rat brain after systemic administration of $MnCl_2$: Hippocampal signal enhancement without disruption of hippocampus-dependent behavior. *Behavioural Brain Research*, v. 216, p. 293–300, 2011.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. Princípios da Neurociência. 4ª Edição. São Paulo: Manole Ltda., 2003. 1430 p.

KIM, E.K.; CHOI, E.J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1802, p.396–405, 2010.

LEAL, R.B.; GONCALVES, C.A.; RODNIGHT, R. Calcium-dependent phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the rat hippocampus: a comparison of the kinase/phosphatase balance in immature and mature slices using tryptic phosphopeptide mapping. *Brain Research. Developmental Brain Research*, v. 104, p. 1-10, 1997.

LEAL, R.B.; POSSER, T.; RIGON, A.P.; OLIVEIRA, C.S.; GONCALVES, C.A.; GELAIN, D.P.; DUNKLEY, P.R. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology*, v. 234, p. 34-43, 2007.

LERET, M.L.; MILLAN, J.A.; ANTONIO, M.T. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. *Toxicology*, v. 186(1-2), p. 125-30, 2003.

LIU Y.; PETERSON D.A.; KIMURA H.; SCHUBERT D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*, v. 69, p. 581-593, 1997.

LI, Y.; SUN, L.; CAI, T.; ZHANG, Y.; LV, S.; WANG, Y.; YE, L. α -Synuclein overexpression during manganese-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Research Bulletin*, v. 81, p. 428–433, 2010.

MARTIN, K.; HUGGINS, T.; KING, C.; CARROLL, M.A.; CATAPANE, E.J. The neurotoxic effects of manganese on the dopaminergic innervation of the gill of the bivalve mollusc, *Crassostrea*

virginica. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, v. 148(2), p. 152-159, 2008.

McCUBREY, J.A.; LAHAIR, M.M.; FRANKLIN, R.A. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 8, p. 1775-1789, 2006.

MIELKE, K.; HERDEGEN, T. JNK and p38 stress kinases-degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, v. 61, p. 45-60, 2000.

MILATOVIC, D.; ZAJA-MILATOVIC, S.; GUPTA, R.C.; YU, Y.; ASCHNER, M. Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 240, p. 219-225, 2009.

MOLINA, R.M; PHATTANARUDEE, S.; KIM, J.; THOMPSON, K.; WESSLING-RESNICK, M.; MAHER, T.J; BRAIN, J.D. Ingestion of Mn and Pb by rats during and after pregnancy alters iron metabolism and behavior in offspring. *Neurotoxicology*, 2011 doi:10.1016/j.neuro.2011.03.010

MOLZ, S.; DECKER, H.; DAL-CIM, T.; CREMONEZ, C.; CORDOVA, F.M.; LEAL, R.B.; TASCA, C.I. Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 (MAPK) signaling. *Neurochemical Research*, v. 33, p. 27-36, 2008.

MORENO, J.A.; YEOMANS, E.C.; STREIFEL, K.M.; BRATTIN, B.L.; TAYLOR, R.J.; TJALKENS, R.B. Age dependent susceptibility to manganese-induced neurological dysfunction. *Toxicological Sciences*, v. 112(2), p. 394-404, 2009.

NAGAI, H.; NOGUCHI, T.; TAKEDA, K.; ICHIJO, H. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, p. 1-6, 2007.

OLIVEIRA, C.S.; RIGON, A.P.; LEAL, R.B.; ROSSI, F.M. The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 26, p. 355-362, 2008.

PAL, K.P.; SAMII, A.; CALNE, D.B. Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology*, v. 20, p. 227–238, 1999.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, v. 83, p. 346-356, 1977.

POSSER, T.; FRANCO, J.L.; BOBROVSKAYA, L.; LEAL, R.B.; DICKSON, P.W.; DUNKLEY, P.R. Manganese induces sustained Ser40 phosphorylation and activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, v. 110, p. 848-856, 2009.

PRABHAKARAN, K.; GHOSH, D.; CHAPMAN, G.D.; GUNASEKAR P.G. Molecular mechanism of manganese exposure-induced dopaminergic toxicity. *Brain Research Bulletin*, v. 76, p. 361-367, 2008.

PURVES, D; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W.C.; LAMANTIA, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M. Neuroscience. 3rd Edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2004. 833 p.

RAIVICH, G.; BEHRENS, A. Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Progress in Neurobiology*, v. 78, p. 347-363, 2006.

RIGON, A.P.; CORDOVA, F.M.; OLIVEIRA, C.S.; POSSER, T.; COSTA, A.P.; SILVA, I.G., SANTOS, D.A., ROSSI, F.M., ROCHA, J.B., LEAL, R.B. Neurotoxicity of cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for p38 MAPK. *Neurotoxicology*, v. 29, p. 727-734, 2008.

ROTH, J.A.; HORBINSKI, C.; HIGGINS, D.; LEIN, P.; GARRICK, M.D. Mechanisms of Manganese-Induced Rat Pheochromocytoma (PC12) Cell Death and Cell Differentiation. *Neurotoxicology*, v. 23, p. 147–157, 2002.

SANTAMARIA, A.B. Manganese exposure, essentiality & toxicity. *Indian Journal of Medical Research*, v. 128, p. 484-500, 2008.

SIEGEL, G.J.; Albers R.W.; Brady S.T.; Price, D.L. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects. 7th Edition. Londres: Elsevier Academic Press, 2006. 1016 p.

SISTRUNK S.C.; ROSS M.K.; FILIPOV N.M. Direct effects of manganese compounds on dopamine and its metabolite DOPAC: An *in vitro* study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 23, p. 286–296, 2007

TAKEDA, A. Manganese action in brain function. *Brain Research. Brain Research Reviews*, v. 41, p. 79-87, 2003.

THOMAS, G.M.; HUGANIR, R.L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Reviews. Neuroscience*, v. 5, p. 173-183, 2004.

WAETZIG, V.; HERDEGEN, T. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neuroscience Letters*, v. 361, p. 64-67, 2004.

WEISS, B. Lead, manganese, and methylmercury as risk factors for neurobehavioral impairment in advanced age. *International Journal of Alzheimer's Disease*, v. 2011, 11 p., doi:10.4061/2011/607543.

XIE, H.; HU, L.; LI, G. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, v. 123(8), p. 1086-1092, 2010.

YIN, Z.; ASCHNER, J.L.; DOS SANTOS, A.P.; ASCHNER, M. Mitochondrial-dependent manganese neurotoxicity in rat primary astrocyte cultures. *Brain Research*, v. 1203, p. 1–11, 2008.

ZHANG, S.; FU, J.; ZHOU, Z. *In vitro* effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. *Toxicology In Vitro*, v. 18, p. 71–77, 2004.

ZHAO, F.; CAI, .T.; LIU, M.; ZHENG, G.; LUO, W.; CHEN, J. Manganese induces dopaminergic neurodegeneration via microglial activation in a rat model of manganism. *Toxicological Sciences*, v. 107(1), p. 156–164, 2009.