

Ariana Ern Schmitz

**INTERAÇÃO ENTRE A ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE  
CURCUMINA E DE MANGANÊS SOBRE PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a  
obtenção do Grau de Mestre em  
Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Alcir L.  
Dafre.

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Schmitz, Ariana Ern

INTERAÇÃO ENTRE A ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CURCUMINA E  
DE MANGANÊS SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E  
NEUROQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS [dissertação] / Ariana Ern  
Schmitz ; orientador, Alcir L. Dafre - Florianópolis, SC,  
2013.

84 p. ; 21cm

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

Inclui referências

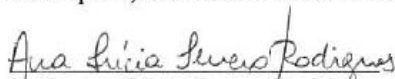
1. Neurociências. 2. Manganês. 3. Curcumina. 4.  
Parkinsonismo. 5. Comportamento. I. Dafre, Alcir L.. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências. III. Título.

**ARIANA ERN SCHMITZ**

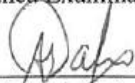
**“INTERAÇÃO ENTRE A ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA  
DE CURCUMINA E DE MANGANÊS SOBRE  
PARAMETROS COMPORTAMENTAIS E  
NEUROQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS”**


Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

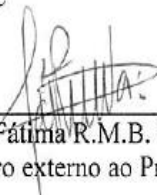
Florianópolis, 26 de fevereiro de 2013.

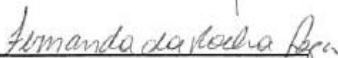
  
Profa. Ana Lúcia Severo Rodrigues  
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

  
Prof. Alcir Luiz Dafré  
Orientador – UFSC

  
Profa. Andreza Fabro de Bem  
Membro - UFSC

  
Profa. Fátima R.M.B. Silva  
Membro externo ao Programa

  
Profa. Fernanda da Rocha Lapa  
Membro externo ao Programa

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e meu irmão, que são a razão da minha existência, e que sempre me deram apoio e carinho em todos os momentos da minha vida...

A minha tia Irmtrauth e a Bettina, por terem me dado todo o apoio e incentivo pra que eu chegasse até aqui...

Ao prof. Alcir, pelas orientações preciosas, pela paciência, e pelo incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho...

A todos os meus colegas do Lab. de Defesas Celulares, Luiz, Rafael, Daiane, Mariana, Samara, Daniele, Mirna, Miriam e Gabriel pela ajuda em todos os momentos ao longo do desenvolvimento deste projeto, pelos cafés, conversas e risadas...

Aos meus amigos queridos, pelo apoio, compreensão e companheirismo que sempre me deram forças nos momentos difíceis...

A prof<sup>a</sup>. Débora Machado Fracalossi por ter cedido a estrutura do seu laboratório para o preparo da ração utilizada neste trabalho, e principalmente ao Douglas, pela paciência e pela enorme ajuda durante todo o preparo dos muitos e muitos quilos de ração...

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, bem como para o secretário da PPG de Neurociências, Nivaldo, por toda a paciência...

Aos órgãos financeiros que permitiram a realização deste trabalho: a CAPES pela bolsa de mestrado, ao CNPq e a FAPESC, pelo financiamento.

Obrigada!

## RESUMO

O manganês (Mn) é um dos metais mais abundantes da crosta terrestre, sendo encontrado em rochas, solos, água e alimentos. O manganismo, síndrome causada em consequência do acúmulo excessivo de Mn no sistema nervoso central, é caracterizado por apresentar sintomas similares aos observados na Doença de Parkinson (DP). Contudo, antes que apareçam os déficits motores (rigidez muscular, alterações de equilíbrio e tremor nos membros superiores), tanto no manganismo quanto na DP, se pode perceber a presença de sintomas mais sutis, como diminuição da cognição e da memória e distúrbios de comportamento. A curcumina, substância ativa extraída do rizoma da *Curcuma longa* L., uma planta pertencente à família Zingiberaceae, apresenta efeitos antioxidante e neuroprotetor. Dessa forma, no presente trabalho foi avaliado o efeito da administração crônica de curcumina na ração de camundongos *Swiss* com 2 meses de idade, nas doses de 500 e 1500 ppm. Um grupo de animais recebeu inalação crônica da mistura de cloreto de manganês ( $MnCl_2$  - 40 mM) e acetato de manganês ( $Mn(OAc)_3$  - 20 mM), por 1 hora, três vezes por semana, durante 14 semanas. Animais também foram tratados com a combinação de curcumina e Mn. O que se pôde observar foi que a inalação da mistura de Mn não alterou a capacidade locomotora no teste do *beam walking*. No entanto, tanto a curcumina quanto o Mn alteraram a capacidade motora acurada, avaliada pelo teste do *single pellet*. Além disso, os grupos que receberam curcumina e/ou Mn tiveram diminuição na memória (teste do *step down*). Com relação aos aspectos neuroquímicos, não foram encontradas alterações nas enzimas glutatona redutase e glutatona peroxidase, nas regiões do estriado e do hipocampo, nem no imunoconteúdo de tirosina hidroxilase no estriado. Interessantemente, nos grupos que receberam Mn e curcumina concomitantemente, houve um importante aumento nos níveis de Mn e ferro na região do hipocampo, acompanhada de importante diminuição nos níveis de serotonina e dopamina. Isto sugere que a região do hipocampo é mais susceptível que a região do estriado ao efeito da inalação de Mn. A interação entre curcumina e Mn é inesperada, mas revela o potencial tóxico da interação entre metais e flavonóides, que parece afetar a homeostase de metais e de neurotransmissores no hipocampo. Uma vez que o tratamento somente com Mn ou curcumina não causa a maioria destas alterações observadas, o déficit motor e de memória parece ser independente destas alterações neuroquímicas. O protocolo com o uso crônico do Mn resultou em efeitos motores leves, associado a perda de

memória, indicando que este protocolo é adequado como um modelo *in vivo* para o estudo das fases iniciais da DP.

**Palavras-chave:** manganês, curcumina, parkinsonismo, comportamento.

## ABSTRACT

Manganese (Mn) is one of the most abundant metals in the earth's crust, being found in rocks, soil, water and foods. The manganism, syndrome caused as a result of excessive accumulation of Mn in the CNS, has numerous symptoms similar to those seen in Parkinson's disease (PD). However, before the appearance of motor deficits (muscle rigidity, tremor and balance disorders in the upper limbs), both, manganism and PD, shared the appearance of symptoms that are more subtle than the motor symptoms, such as decreased cognition and memory, comportamental disorders. Curcumin, the active and mainly ingredient extracted from the rhizome of *Curcuma longa* L., a plant belonging to the family Zingiberaceae that has various well documented pharmacological effects, among which antioxidant and neuroprotective. This study evaluated the effect of chronic administration of curcumin in the diet of Swiss mice, with 2 months of age, at doses of 500 ppm and 1500 ppm, concurrently with chronic inhalation of manganese chloride mixture (Mn(OAc)<sub>3</sub> - 20 mM), for 1 hour, three times a week, 14 weeks compared to neurochemical and behavioral parameters. Inhalation of Mn did not impair locomotor capacity in the beam walking test, however both, curcumin as Mn, decreased performance of animals in the accurate motor ability, evaluated by the single pellet test. Moreover, the groups that received curcumin and Mn exhibited decreased memory scores in the step down test. Regarding the neurochemical aspects, there were no changes in the enzymes glutathione reductase, glutathione peroxidase, and acetylcholinesterase in the regions of the striatum and hippocampus, nor in the immunocontent of striatal tyrosin hydroxylase. There was a significant increase in the levels of Mn and Fe in the hippocampal region, in parallel to a significant decrease in dopamine and serotonin levels in the groups receiving concomitantly Mn and curcumin. This shows that the hippocampus is more susceptible than the striatum to the Mn inhalation. The interaction between curcumin and Mn is unexpected but revealed the potential toxic effect to flavonoid and metal interaction, which seem to affect neurotransmitter and metal homeostasis in the hippocampus. Since, Mn and curcumin alone did not cause most of these changes, motor and memory deficit seems to be independent of such neurochemical alterations. The Mn treatment protocol resulted in mild effect on motor performance allied to memory impairment, indicating that this protocol is appropriate as an *in vivo* initial phase PD model.

**Key words:** manganese, curcumin, parkinsonism, behavior.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1– Aspecto morfológico da <i>Curcuma longa</i> L.....	20
Figura 2– Estrutura química dos principais componentes do extrato de <i>Curcuma longa</i> .....	21
Figura 3– Vias de metabolização da curcumina.....	23
Figura 4 – Atividade locomotora avaliada por meio do teste do campo aberto.....	35
Figura 5 – Atividade motora avaliada através dos testes do <i>beamwalking</i> e do <i>single pellet</i> .....	37
Figura 6 – Desempenho dos camundongos submetidos ao teste do reconhecimento do objeto.....	39
Figura 7 – Avaliação da memória de curta duração (1,5 h) e longa duração (24 h) através do teste da esquiiva inibitória do tipo <i>step down</i> .....	42
Figura 8 – Avaliação da preferência pela maravalha nova (não-familiar) no teste da discriminação olfatória.....	40
Figura 9 – Concentração de Mn e Fe nas regiões do estriado e do hipocampo.....	43
Figura 10 – Imunodeteção de tirosina hidroxilase (TH) no estriado.....	44
Figura 11– Níveis de dopamina e serotonina no estriado e hipocampo.....	45
Tabela 01– Grupos experimentais.....	27
Tabela 02 – Atividade enzimática no estriado e do hipocampo.....	42



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE: acetilcolinesterase  
BHE: barreira hematoencefálica  
CAT: catalase  
DMSO: Dimetil sulfóxido  
DMT-1: transportador de metais divalentes 1  
DP: Doença de Parkinson  
EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético  
ERN: espécies reativas de nitrogênio  
ERO: espécies reativas de oxigênio  
GPx: glutaciona peroxidase  
GR: glutaciona redutase  
GSH: glutaciona  
GSSG: glutaciona oxidada  
HEPES: ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-Etanosulfônico  
Mn: manganês  
Mn(OAc)<sub>3</sub>: acetato de manganês  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NOX: NADPH-oxidase  
FAD: flavina adenina dinucleotídeo  
O<sub>2</sub><sup>-•</sup>: ânion superóxido  
ON: óxido nítrico  
ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito  
<sup>•</sup>OH: radical hidroxila  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS  
SNC: sistema nervoso central  
SOD: superóxido dismutase  
TBS: tampão tris-salina  
TH: tirosina hidroxilase  
ZIP8: transportador de zinco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1. Manganês.....	12
1.2. Doença de Parkinson.....	15
1.3. Estresse oxidativo.....	17
1.4. Defesas antioxidantes.....	18
1.5. Curcumina.....	19
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	25
3.1. Objetivo geral.....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	26
4.1. Animais.....	26
4.2. Preparo da ração.....	26
4.3. Tratamento.....	26
4.4. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	28
4.4.1. Teste do campo aberto.....	28
4.4.2. Teste do <i>beam walking</i> .....	28
4.4.3. Teste do <i>single-pellet</i> .....	28
4.4.4. Teste de realocação do objeto.....	29
4.4.5. Teste da esquivia inibitória do tipo <i>step down</i> .....	30
4.4.6. Teste da discriminação olfatória.....	30
4.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	31
4.5.1. Preparação das amostras.....	31
4.5.2. Atividade enzimática.....	31
4.5.3. Western blotting.....	32
4.5.4. Análise de metais.....	32
4.5.5. Análise de neurotransmissores.....	33
4.5.6. Análise estatística.....	33
<b>5. RESULTADOS</b> .....	35
5.1. Efeitos da inalação de Mn sobre a atividade comportamental.....	35
5.2. Efeitos da inalação de Mn sobre parâmetros neuroquímicos.....	41
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	47
6.1. Manganês.....	47
6.2. Curcumina.....	51
6.3. Interação entre os tratamentos com manganês e curcumina.....	54

<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Manganês

O manganês (Mn) é um dos metais mais abundantes da crosta terrestre (PERL; OLANOW, 2007), sendo encontrado em rochas, solos, água e alimentos (RIVERA-MANCÍA; RÍOS; MONTES, 2011). Os compostos orgânicos de Mn são utilizados principalmente como aditivos de combustíveis (manganês tricarbonil metilciclopentadieno), fungicidas (ex. maneb e mancozeb) e como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética (SANTAMARIA *et al.*, 2007).

Considerado um elemento traço, o Mn é essencial ao organismo. As recomendações de ingestão para o Mn são de 1,8 mg de Mn por dia para mulheres, e 2,3 mg por dia para homens (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002).

No cérebro, o Mn é encontrado na concentração de 1-2 µg/g de peso seco (MORELLO *et al.*, 2008; TAKEDA, 2003), sendo sua presença necessária para o funcionamento de diversas enzimas no sistema nervoso central (SNC), dentre elas a glutamina sintetase, a superóxido dismutase mitocondrial e a piruvato carboxilase (GONZALEZ-ZULUETA *et al.*, 1998; KEEN; ENSUNSA; CLEGG, 2000; MCCORD, 1976).

A principal rota fisiológica para a absorção do Mn é a via gastrointestinal, sendo sua absorção finamente controlada (AU; BENEDETTO; ASCHNER, 2008). A absorção via inalação é bastante relevante para a medicina ocupacional. Dentre as atividades que levam a exposição ao Mn estão indústrias (produção de baterias, aço e manufaturados de alumínio), soldagem, fundição, mineração e ainda no uso de fungicidas a base de Mn (KEEN; ENSUNSA; CLEGG, 2000; MYERS *et al.*, 2003, 2009). Quando a exposição ao Mn no ar se dá em concentrações acima de 5 µg/m<sup>3</sup>, podem ocorrer sintomas decorrentes da intoxicação causada por este metal. A doença causada pela exposição ao Mn é chamada de manganismo (YIN *et al.*, 2010). Outras situações podem levar a intoxicação por Mn como a nutrição parenteral total (HARDY, 2009), a ingestão de água com altos níveis de Mn (BOUCHARD *et al.*, 2007; KATSOYIANNIS; KATSOYIANNIS, 2006) e a insuficiência hepática crônica (ROSE *et al.*, 1999).

O manganismo, síndrome causada em consequência do acúmulo excessivo de Mn no SNC, é uma síndrome com sintomas similares aos observados na Doença de Parkinson (DP) (ASCHNER; ERIKSON; DORMAN, 2005; BARBEAU, 1984; CALNE *et al.*, 1994;

MARTIN, 2006). Os sintomas observados durante a intoxicação aguda do manganismo são: astenia, anorexia, apatia, dores de cabeça, hipersonia, espasmos, cansaço nas pernas, artralguas e irritabilidade (NORMANDIN *et al.*, 2004). Estes sintomas, decorrentes de exposição aguda a altas concentrações de Mn, são seguidos pela chamada fase intermediária, na qual se observam sinais como desordens de fala, inabilidade para realizar certos movimentos e presença de expressões faciais “mascaradas”. No estágio mais avançado da síndrome, ocorre rigidez muscular, desordens de equilíbrio e tremor nos membros superiores (MERGLER, 1999; RODIER, 1955).

Apesar de suas funções biológicas, a intoxicação por Mn é mais comum que sua deficiência, sendo ambos prejudiciais a saúde humana (RIVERA-MANCÍA; RÍOS; MONTES, 2011). Dentre os efeitos gerados pela deficiência de Mn estão malformações fetais, alterações na formação óssea, distúrbios reprodutivos e susceptibilidade aumentada para convulsões (FITSANAKIS *et al.*, 2007).

Em modelos animais de neurotoxicidade induzida pela administração de Mn foi constatado aumento nos níveis de Mn no cérebro, depleção nos níveis de dopamina no estriado, dano aos neurônios dos gânglios basais, e/ou desenvolvimento de distonia (desordem de movimentos) em camundongos, ratos e macacos (BONILLA; PRASAD, 1984; CORDOVA *et al.*, 2012; ERIKSSON *et al.*, 1987; KOMURA; SAKAMOTO, 1992).

Além disso, inúmeros estudos com animais, e até mesmo com humanos, têm demonstrado que o excesso de Mn no SNC é capaz de gerar alterações na capacidade cognitiva e na memória; também pode gerar aumento de ansiedade e agressividade (BETHARIA; MAHER, 2012; BLECHARZ-KLIN *et al.*, 2012; GRÜNECKER *et al.*, 2012; TORRES-AGUSTÍN *et al.*, 2012).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar o processo de neurotoxicidade causado pelo Mn, dentre eles o estresse oxidativo (ZHANG; FU; ZHOU, 2004), perturbação do metabolismo mitocondrial (ZHANG; HATTER; LIU, 2007), alterações na homeostase do ferro (KWIK-URIBE; SMITH, 2006), e alterações do metabolismo do glutamato e da dopamina (ERIKSON *ET AL.*, 2008; GWIAZDA; LUCCHINI; SMITH, 2007; NORMANDIN; HAZELL, 2002).

O Mn chega ao cérebro a partir da corrente sanguínea, e aparentemente, utiliza-se de diversos mecanismos para atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Dentre eles estão a participação do transportador de metal divalente (DMT-1) (ASCHNER; GANNON,

1994), mecanismos de transporte mediados por transportadores de zinco (ZIP8) (ASCHNER; GANNON, 1994), difusão facilitada (RABIN *et al.*, 1993), ligado a proteína transferrina (ROTH; GARRICK, 2003) entre outros.

Tanto o transporte de Mn, quanto o transporte de Fe para tecidos extra-hepáticos, inclusive para o cérebro, parecem ser dependentes do sistema transferrina/receptor de transferrina (CROWE; MORGAN, 1992; MALECKI *et al.*, 1999). A deficiência de Fe causa aumento nos níveis de transferrina e do receptor no SNC, principalmente nas regiões do estriado e da substância negra (ERIKSON *et al.*, 1997; PIÑERO *et al.*, 2000). Dentre as consequências neurobiológicas da deficiência de Fe se pode citar alterações comportamentais, de cognição e alteração no metabolismo de neurotransmissores (BEARD *et al.*, 1994; ERIKSON *et al.*, 2002).

Os núcleos da base, região especialmente rica em Fe livre (não ligado ao heme) (ASCHNER *et al.*, 2007), é uma das principais áreas do cérebro afetadas pelo excesso de Mn (CALNE *et al.*, 1994; OLANOW *et al.*, 1996; STANWOOD *et al.*, 2009). Acredita-se que isso provavelmente ocorra por esta ser uma região rica em receptores DMT-1 (BURDO *et al.*, 2001; MONTES *et al.*, 2001; ROSE *et al.*, 1999).

Alguns estudos mostram que o Mn deposita-se preferencialmente em astrócitos (ASCHNER; GANNON; KIMELBERG, 1992; ASCHNER; VRANA; ZHENG, 1999; GUNTER *et al.*, 2006), fato este, que provavelmente também está relacionado a expressão do transportador DMT-1, o qual possui alta afinidade por este metal ( $K_m = 0,3 \mu M$ ). A concentração de Mn nos astrócitos é cerca de 10-15 vezes maior que nos neurônios (ERIKSON; ASCHNER, 2006). Além disso, os astrócitos contêm glutamina sintetase, enzima que apresenta papel crucial para o metabolismo da amônia, a qual contém cerca de 80% do Mn total presente no cérebro (WEDLER; DENMAN, 1984). Portanto, os astrócitos mostram-se mais susceptíveis aos danos causados pelo excesso de Mn no cérebro (ASCHNER; GANNON; KIMELBERG, 1992).

Um dos mecanismos propostos para a neurotoxicidade induzida pelo Mn no cérebro é o aumento do estresse oxidativo que este metal pode causar em neurônios dopaminérgicos (DONALDSON; LABELLA; GESSER, 1981; HAMAI; BONDY, 2004). Estudos mostram que, nos neurônios afetados, a morte induzida pelo excesso de Mn está relacionada ao aumento da formação de radicais livres, depleção da glutatona e oxidação da dopamina (DUKHANDE *et al.*,

2006; HAMAI; BONDY, 2004; STOKES *et al.*, 2000; STREDRICK *et al.*, 2004).

A capacidade do Mn em ocasionar o estresse oxidativo é devido a sua transição do estado oxidativo  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$ , aumentando, assim, sua capacidade pró-oxidante (REANEY; KWIK-URIBE; SMITH, 2002). Evidências experimentais sugerem que a atividade pró-oxidante do  $Mn^{+2}$  é dependente da presença de traços de  $Mn^{+3}$  (HAMAI; BONDY, 2004). A conversão do  $Mn^{+2}$  para  $Mn^{+3}$  pode ser catalisada pela interação com o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), produzido na cadeia transportadora de elétrons (GUNTER *et al.*, 2006). Dessa forma, uma hipótese razoável para explicar a neurotoxicidade do Mn é que o  $Mn^{+3}$  seja responsável pela toxicidade causada aos neurônios dopaminérgicos. Neste caso, o  $Mn^{+2}$  passa por reações cíclicas envolvendo a formação de  $Mn^{+3}$ . Este, na presença de dopamina, resulta na produção de aminocromo, que é o principal produto tóxico da oxidação da dopamina levando a morte destas células (ARCHIBALD; TYREE, 1987; SISTRUNK; ROSS; FILIPOV, 2007).

## 1.2. Doença de Parkinson

A DP é caracterizada pelo aparecimento de sintomas motores como bradicinesia, rigidez, tremor de repouso e instabilidade postural (SWICK, 2012). Sendo que os sintomas motores constituem o critério essencial para a realização do diagnóstico desta doença. Contudo, sabe-se atualmente, que esta doença não gera dano somente nos sistemas motores, mas, na verdade, compreende uma gama de sintomas muito mais ampla (MARTINEZ-MARTIN *et al.*, 2007).

Além dos sintomas motores, a DP é acompanhada de sintomas não-motores, dentre os quais têm-se disfunção autonômica, alterações de humor, déficits cognitivos, diminuição da memória, dor, distúrbios gastrointestinais, perda da capacidade olfativa, psicose e distúrbios do sono (BARONE *et al.*, 2009; MARTINEZ-MARTIN *et al.*, 2007).

A principal característica da DP consiste na perda de células dopaminérgicas na substância nigra, juntamente, na maior parte dos casos, com a presença de emaranhados proteicos intracelulares chamados corpos de Lewy (ZHANG; GOODLETT, 2004). Além desses fatores, pode ocorrer degeneração colinérgica, noradrenérgica, serotoninérgica e peptidérgica em núcleos do tronco cerebral (JELLINGER, 1991).

Os mecanismos exatos envolvidos na patologia da DP ainda não estão totalmente elucidados. Aproximadamente 50% dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra pars compacta já foram perdidos ao aparecerem os primeiros sintomas motores, os quais, embora permitindo o diagnóstico de acordo com os critérios clínicos, tornam bastante difícil a busca por tratamentos efetivos para esta doença (MOLLENHAUER; ZHANG, 2012). A descoberta de diversos sintomas não-motores, os quais parecem preceder os aparecimentos de déficits motores, permite a possibilidade da realização de um diagnóstico precoce, além da possibilidade de terapias novas e mais eficientes no tratamento deste mal (ADLER, 2011).

A perda dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, gera diminuição nos níveis de dopamina na região do estriado, levando a alterações motoras, sintoma tipicamente observado na DP (ALBIN; YOUNG; PENNEY, 1989). A funcionalidade das vias motoras pode ser restaurada por meio da reposição dos níveis de dopamina. Assim, a principal terapia utilizada para o tratamento da DP, tem sido a administração do precursor da dopamina, L-DOPA, associado a inibidores periféricos da enzima dopa-descarboxilase ou com agonistas periféricos de receptores de dopamina (HURLEY; JENNER, 2006).

Dentre as monoaminas, devem ser destacadas a, serotonina e a dopamina, as quais estão envolvidas com diversas patologias do SNC. A enzima tirosina hidroxilase (TH) é a enzima que converte L-tirosina em L-DOPA. Esta conversão constitui o passo inicial e limitante na biossíntese das catecolaminas dopamina, noradrenalina e adrenalina (NAKASHIMA *et al.*, 2009). Além do seu papel essencial no controle dos movimentos motores, a dopamina também tem importante participação na regulação do humor, da atenção e das funções viscerais (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007).

Já a síntese da serotonina ocorre através da hidroxilação do aminoácido L-triptofano pela enzima triptofano hidroxilase, formando 5-hidroxitriptofano (5-HTP), o qual é imediatamente descarboxilado, convertendo-se em serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT), pela ação da enzima aminoácido descarboxilase (AADC) (LESCH *et al.*, 2012). Este neurotransmissor tem papel importantíssimo na regulação do humor, do comportamento emocional, do sono e de aprendizagem (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007).

Distintos mecanismos podem levar ao aumento destes neurotransmissores no cérebro, dentre eles bloqueio na recaptação sináptica, inibição da degradação intraneural ou bloqueando os auto e



hetero-receptores inibitórios dos neurônios pré-sinápticos (ELHWUEGI, 2004).

A enzima monoamina oxidase (MAO) é responsável pela degradação das monoaminas. Esta enzima apresenta duas isoformas, MAO-A e MAO-B, as quais se diferenciam principalmente pela preferência de substratos. A enzima MAO-A metaboliza preferencialmente serotonina, e a MAO-B metaboliza tanto serotonina quanto dopamina (BINDA *et al.*, 2011; ELHWUEGI, 2004). No SNC, a enzima MAO-A está presente no compartimento extraneuronal, ou seja, nos terminais nervosos de neurônios dopaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos e, a MAO-B encontra-se principalmente nas células da glia (YOUJIM; WEINSTOCK, 2004). Tanto a MAO-A quanto a MAO-B agem sobre o metabolismo exógeno e reservas intracelulares de aminas e também na regulação de neurotransmissores (BILLET, 2004).

A regulação dessas enzimas é de extrema importância em determinadas patologias. Por exemplo, alguns inibidores da MAO-A são utilizados no tratamento de depressão, visando aumentar as concentrações de serotonina e noradrenalina e, inibidores seletivos da MAO-B são utilizados no tratamento da DP (ADLER, 2011).

### 1.3. Estresse oxidativo

As ERO constituem uma variedade de metabólitos ativos e reativos parcialmente reduzidos da molécula de oxigênio. Algumas destas moléculas, como por exemplo, o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), são definidos como radicais livres, uma vez que são moléculas reativas que apresentam elétrons desemparelhados em sua camada de valência. Já outras ERO, como o peróxido de hidrogênio, não apresentam elétrons desemparelhados, sendo, portanto, agentes pró-oxidantes não-radicalares (NOVO; PAROLA, 2008).

As ERO são produzidas constantemente a partir do metabolismo celular, geradas em resposta a estímulos endógenos ou exógenos (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004; USHIO-FUKAI; NAKAMURA, 2008; GALARIS; SKIADA; BARBOUTI, 2008). As fontes endógenas incluem ERO produzidas durante o processo de respiração celular na mitocôndria e por neutrófilos e macrófagos durante o processo inflamatório (CADENAS, 1989; RIGOLET; YOBOUE; DEVIN, 2011). E, dentre os estímulos exógenos para a formação dessas moléculas, estão os raios ultravioleta, raios X e gamma, cigarro,

poluentes atmosféricos, agrotóxicos, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As ERO em excesso na célula estão associadas ao aparecimento de inúmeras patologias, como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, isquemia/reperfusão, doenças neurológicas e doenças relacionadas ao envelhecimento (DALLE-DONNE *et al.*, 2006; DHALLA *et al.*, 2000; JENNER, 2003; SAYRE *et al.*, 2001).

#### 1.4. Defesas antioxidantes

A exposição a diversos tipos de radicais livres e ERO, entre outros, fez com que os organismos desenvolvessem mecanismos diversificados de defesas para combater os efeitos danosos dessas moléculas. Dentre os mecanismos de defesa desenvolvidos para combater o estresse oxidativo, podem ser citados: (1) mecanismos de prevenção, (2) mecanismos de reparo, (3) defesas físicas, e (4) defesas antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; JONES, 2006).

As defesas antioxidantes podem ser classificadas de acordo com as suas três principais formas de atuação: (1) evitar a formação de espécies reativas, (2) neutralizar as espécies reativas e (3) reparar os danos ocasionados pelas espécies reativas. Dessa maneira, o termo antioxidante pode ser considerado como qualquer substância que atrase, impeça a formação ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Algumas defesas antioxidantes podem ser adquiridas de forma exógena, ou seja, por meio da dieta. Dentre elas, destacam-se o ácido ascórbico (vitamina C), a vitamina E e os carotenóides (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VALKO *et al.*, 2007).

Dentre os antioxidantes de produção endógena, destacam-se o sistema glutathiona (GSH) e as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT).

A GSH pode participar diretamente da eliminação de radicais livres por sua ação antioxidante, reduzir peróxidos ou conjugar-se com compostos eletrofílicos, em reações catalisadas, respectivamente, pelas enzimas glutathiona peroxidase (GPx) ou glutathiona S-transferase (GST) (MAHER, 2005). Além das funções desempenhadas pelo próprio peptídeo GSH, o sistema redox glutathiona/glutathiona dissulfeto (GSH/GSSG), atua na manutenção do estado redox característico da célula (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

O produto resultante da oxidação da GSH, a partir da reação catalisada pela GPx, é a GSSG, a qual pode ser reconvertida a GSH pela ação da enzima GR, em uma reação que depende da presença de NADPH como doador de elétrons (MAHER, 2005).

Os flavonóides são uma classe de compostos fenólicos consumidos normalmente na dieta humana. Entre os flavonóides estão flavonols, flavonas, flavanonas, flavanols, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonols e chalconas (PEREZ-VIZCAINO; DUARTE; SANTOS-BUELGA, 2012). Os flavonóides estão presentes em uma ampla variedade de alimentos, como frutas, vegetais, nozes, temperos, ervas entre outros (PEREZ-VIZCAINO; DUARTE; SANTOS-BUELGA, 2012). Estes compostos foram associados a inúmeros efeitos benéficos, dentre eles, aumento da capacidade antioxidante (LAMBERT; ELIAS, 2010; MARGINA *et al.*, 2012; SERAFINI *et al.*, 2003) e efeito neuroprotetor (COLE; TETER; FRAUTSCHY, 2007; HWANG; SHIH; YEN, 2012; PARK; KIM; CHOI, 2012).

### 1.5. Curcumina

A curcumina é a substância ativa extraída do rizoma da *Curcuma longa* L. (Figura 1), uma planta pertencente à família Zingiberaceae, originária da Índia e de outras partes do sudeste asiático (AMMON; WAHL, 1991). É conhecida popularmente como turmeric, cúrcuma, açafão, açafão-da-terra, gengibre-amarelo, açafão-da-índia, entre outros. A *Curcuma longa* é utilizada principalmente na alimentação como flavorizante e corante. A curcumina é o principal constituinte ativo e responsável pelas propriedades antioxidantes (RAMASWAMY; BANERJEE, 1948).



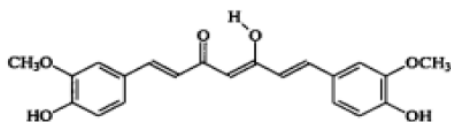
**Figura 1:** Aspecto morfológico da *Curcuma longa* L.

Na Índia, a medicina popular faz uso da *Curcuma longa* há séculos como remédio para uma grande variedade de doenças. Dentre estas doenças destacam-se disfunções respiratórias, hepatopatia, anorexia, reumatismo, sintomas da diabetes, coriza, tosse e sinusite, e o uso de uma pasta dessa substância em infecções oculares, picadas de insetos, queimaduras, acne e outras doenças de pele (ARAÚJO; LEON, 2001; HEATH *et al.*, 2003).

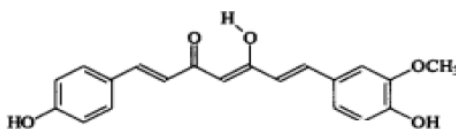
A curcumina apresenta vários efeitos farmacológicos documentados, como por exemplo, efeito antitrombótico (SRIVASTAVA *et al.*, 1985), antimetastático (MENON; KUTTAN; KUTTAN, 1999), antimicrobiano e carcinogênico (JORDAN; DREW, 1996; MAHADY *et al.*, 2002; KIM; CHOI; LEE, 2003; REDDY *et al.*, 2005), antiinflamatório (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003; SHARMA, 1976; RUBY *et al.*, 1995; SUGIYAMA; KAWAKISHI; OSAWA, 1996), antioxidante (SHARMA, 1976; RUBY *et al.*, 1995; SUGIYAMA; KAWAKISHI; OSAWA, 1996), efeito antireumático (DEODHAR; SETHI; SRIMAL, 1980), cardioprotetor (DIKSHIT *et al.*, 1995; NIRMALA; PUVANAKRISHNAN, 1996; MANIKANDAN *et al.*, 2004), melhora de doenças respiratórias (VENKATESAN, 2000), hepato e nefro-protetor (KISO *et al.*, 1983; VENKATESAN; PUNITHAVATHI; ARUMUGAM, 2000; VENKATESAN, 2000, 1998; REYES-GORDILLO *et al.*, 2007), hipoglicêmico (BABU; SRINIVASAN, 1997; ARUN; NALINI, 2002; WEISBERG; LEIBEL; TORTORIELLO, 2008) e neuroprotetor (COLE; TETER;

FRAUTSCHY, 2007). Acredita-se que o efeito neuroprotetor da curcumina deva estar associado a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (LIM *et al.*, 2001; THIYAGARAJAN; SHARMA, 2004; DUVOIX *et al.*, 2005).

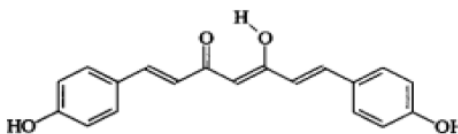
Os três principais curcuminóides que constituem a *Curcuma longa* são: a curcumina (diferuloilmetano), a demetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina (Figura 2). São encontrados ainda no rizoma da *Curcuma longa*, óleos voláteis (tumerona, atlantona e zingiberona), açúcares, proteínas e resinas (“NTP TOXICOLOGY AND CARCINOGENESIS STUDIES OF TURMERIC OLEORESIN (CAS NO. 8024-37-1) (MAJOR COMPONENT 79%-85% CURCUMIN, CAS NO. 458-37-7) IN F344/N RATS AND B6C3F1 MICE (FEED STUDIES)”, 1993).



curcumina  
PM=368



demetoxicurcumina  
PM=338



bisdemetoxicurcumina  
PM=308

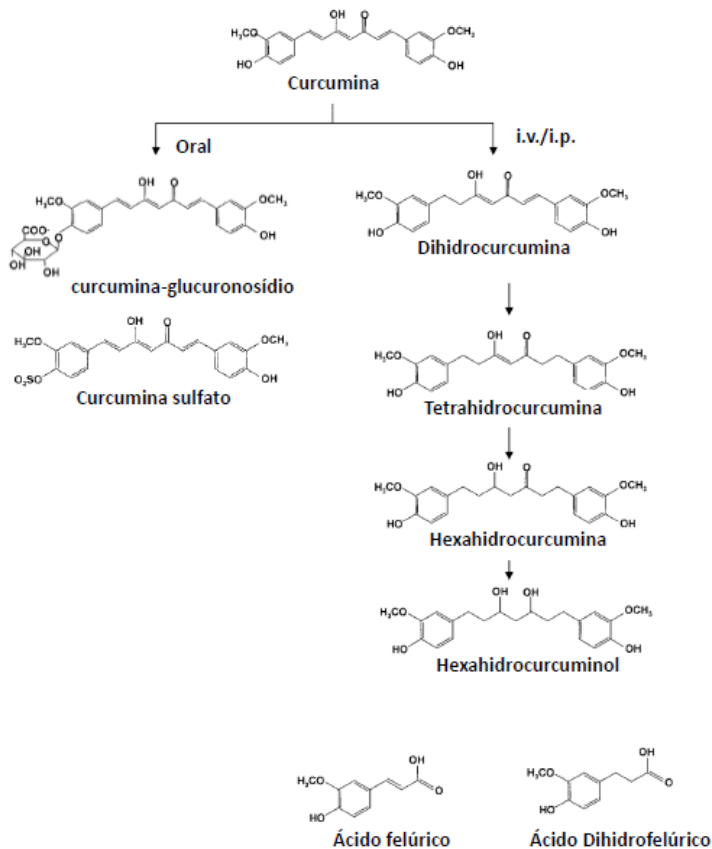
**Figura 2:** Estrutura química dos principais componentes do extrato de *Curcuma longa*. Adaptado de Hiserodt *et al.* (1996).

A curcumina é um polifenol lipofílico, insolúvel em água (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003), mas estável em pH ácido (WANG *et al.*, 1997), apresentando alta taxa de decomposição em pH neutro ou básico e susceptibilidade à degradação fotoquímica (TØNNESEN, 2002; TOMREN *et al.*, 2007).

Quando administrada por via oral, a curcumina apresenta uma taxa de absorção muito baixa no intestino (SHOBA *et al.*, 1998; PAK *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2006). Estudos têm mostrado que a biodisponibilidade da curcumina em humanos e roedores é bastante baixa, mediante a ampla gama de efeitos fisiológicos e farmacológicos que este composto apresenta (SHARMA, 1976; IRESOON *et al.*, 2001; GARCEA *et al.*, 2004).

Quando administrada por via oral, a curcumina sofre rápida metabolização enzimática, principalmente na mucosa intestinal, fígado e rins, por meio de processos de sulfatação, glucuronidação e redução. Sua metabolização culmina em rápida eliminação sistêmica, sendo este um fator limitante, levando a uma baixa concentração sanguínea e tecidual (GARCEA *et al.*, 2004; ANAND *et al.*, 2007). Estudos de Pan *et al.* (1999) mostraram que, no sangue de camundongos, a curcumina está presente majoritariamente na forma de conjugados glucuronilados (99 %). Entre os metabólitos da curcumina presentes em maior quantidade estão a curcumina-glucuronosídeo, dihidrocurcumina-glucuronosídeo, a tetrahidrocurcumina (THC)-glucuronosídeo e a tetrahidrocurcumina (THC) (Fig. 3).

Os conjugados de curcumina atingem níveis plasmáticos máximos (0,22 µg/mL) após 1 hora de administração oral, decaindo até o nível mínimo de detecção (5 ng/mL) 6 horas após sua administração oral (ASAI; MIYAZAWA, 2000; PAN; HUANG; LIN, 1999). A curcumina e seus metabólitos podem ser observados esquematicamente na Figura 3. Em estudo clínico, foi observado que doses de até 12 g por dia são bem toleradas sem que ocorra nenhum efeito tóxico (CHENG *et al.*, 2001).



**Figura 3:** Vias de metabolização da curcumina. Adaptado de Anand *et al.* (2007).

A curcumina parece ter efeito neuroprotetor no SNC contra os efeitos danosos causados por níveis elevados de metais, tais como o ferro. O tratamento com curcumina leva a uma diminuição da peroxidação lipídica e do ciclo redox (DAIRAM *et al.*, 2008). A curcumina também apresenta efeito neuroprotetor em animais expostos ao alumínio (KUMAR; DOGRA; PRAKASH, 2009; SETHI *et al.*, 2009) e ao cobre (HUANG *et al.*, 2011).

Ainda não constam na literatura estudos que avaliem o efeito da curcumina sobre a exposição crônica ao Mn no SNC.

## 2. JUSTIFICATIVA

A intoxicação por Mn constitui um importante risco a saúde de subgrupos da população, como trabalhadores de indústrias químicas, por exemplo. As principais fontes ambientais de contaminação de Mn incluem a fabricação de ligas de aço, ferro, cerâmica, vidro, fertilizante e atividades mineradoras (BOWLER *et al.*, 2007; RÖLLIN; NOGUEIRA, 2011).

Um dos mecanismos pelos quais ocorre neurotoxicidade induzida pelo Mn é o aumento do estresse oxidativo que este metal causa nos neurônios dopaminérgicos, localizados nos gânglios da base (HAMAI; BONDY, 2004). Estudos mostram que a morte neuronal induzida pelo excesso de Mn no cérebro está relacionada ao aumento da formação de radicais livres, depleção da GSH, e oxidação da dopamina dentro dos neurônios afetados (DUKHANDE *et al.*, 2006; STREDRICK *et al.*, 2004).

Além disso, a intoxicação com Mn também leva ao aparecimento de sintomas similares aos observados na DP (ASCHNER *et al.*, 2005). E ainda, a inalação de Mn parece favorecer o acúmulo desse metal na região dos núcleos da base, causando diminuição dos níveis de dopamina e, conseqüentemente levando ao aparecimento de déficits motores, similares aos observados em modelos animais de estudo de DP (ORDOÑEZ-LIBRADO *et al.*, 2008).

Já a curcumina é um composto fenólico amplamente estudado, devido às inúmeras propriedades farmacológicas que apresenta, dentre as quais podem ser destacadas: antioxidante (LIN *et al.*, 2012), e neuroprotetora (MANSOURI *et al.*, 2012; TRIPANICHKUL; JAROENSUPPAPERCH, 2012).

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar o possível efeito neuroprotetor da curcumina contra os déficits comportamentais (motores, cognitivos e de memória), bem como possíveis alterações neuroquímicas e cognitivas causadas pela exposição crônica ao Mn.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Caracterizar, em camundongos *Swiss*, o potencial efeito neuroprotetor da curcumina sobre os efeitos comportamentais e neuroquímicos da exposição crônica ao Mn.

#### 3.2. Objetivos específicos

- a. Investigar os efeitos da presença de curcumina na ração, nas concentrações de 500 e 1500 ppm, administrados durante o período de 14 semanas, sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos nas regiões do estriado e do hipocampo de camundongos *Swiss* adultos;
- b. Investigar os efeitos da administração crônica de manganês através de inalações feitas a cada 48 horas de uma mistura de cloreto e acetato de manganês (40 : 20mM), durante o período de 14 semanas, sobre os parâmetros comportamentais e neuroquímicos nas regiões do estriado e do hipocampo de camundongos *Swiss* adultos;
- c. Verificar se a co-administração de curcumina é capaz de amenizar os possíveis danos comportamentais e neuroquímicos causados pela inalação de manganês.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade, com peso médio de 40-50 g. Os animais foram mantidos em ciclos de 12h/12h de claro e escuro, com temperatura de  $22 \pm 2$  °C, água *ad libidum*. A ingestão de comida foi controlada de modo que os animais mantivessem o peso estável. Os animais utilizados foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no biotério setorial nas mesmas condições. Todos os procedimentos envolvendo animais foram executados de acordo com as normas do Comitê de Ética da UFSC (protocolo N° PP00735) .

### 4.2. Preparo da ração

A ração foi acrescida do composto fenólico curcumina, nas doses de 500 e 1500 ppm (FRAUTSCHY *ET AL.*, 2001; JYOTI; SETHI; SHARMA, 2009; YANG *et al.*, 2005). A curcumina foi adquirida comercialmente da farmácia de manipulação Essentia®, sendo que a mesma apresentava laudo de pureza de 98%. Para o preparo da ração modificada, utilizou-se como base a ração comercial da marca Biotec®. A mesma foi moída em partículas de 500 µm e, em seguida acrescida do flavonóide nas respectivas concentrações. Após ser misturada de forma homogênea, a ração foi repeletizada e seca em estufa a 60° C *overnight*.

Após a secagem, a ração foi acondicionada em recipientes escuros, de modo a evitar seu contato direto com a luz, e armazenada em geladeiras, de modo a evitar oscilações de temperatura.

### 4.3. Tratamento

Para fazer a inalação, os animais foram acondicionados em uma caixa acrílica fechada, onde inalaram aproximadamente 20 mL de uma mistura (1:1) de cloreto de manganês ( $MnCl_2$  - 40 mM) e acetato de manganês ( $Mn(OAc)_3$  - 20 mM), por 1 hora, três vezes por semana, durante 14 semanas (adaptado de Ordoñez-Librado *et al.*, 2008). A curcumina foi administrada por meio da ração nas concentrações de 500

e 1500 ppm (FRAUTSCHY *ET AL.*, 2001; JYOTI; SETHI; SHARMA, 2009; YANG *et al.*, 2005). Os animais recebiam diariamente a ração, em quantidades suficientes para que mantivessem o peso (aproximadamente 5g/animal/dia). Quarenta e oito horas após a última inalação de Mn os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e o cérebro rapidamente removido e dissecado sobre uma superfície a 4 °C, obtendo-se uma amostra do estriado e hipocampo, as quais foram congeladas a -80 °C até a sua utilização.

Para a realização do tratamento, os animais foram divididos randomicamente em seis grupos experimentais. O tratamento de cada grupo está esquematizado na Tabela 01.

**Tabela 01:** Grupos experimentais.

<i>Grupo</i>	<i>Ração</i>	<i>Inalação</i>
Ctl	Ração padrão	Água deionizada
Cur500	Ração com curcumina 500 ppm	Água deionizada
Cur1500	Ração com curcumina 1500 ppm	Água deionizada
Mn	Ração padrão	MnCl <sub>2</sub> (40 mM)/Mn(OAc) <sub>3</sub> (20 mM) dissolvido em água deionizada
Mn + Cur500	Ração com curcumina 500 ppm	MnCl <sub>2</sub> (40 mM)/Mn(OAc) <sub>3</sub> (20 mM) dissolvido em água deionizada
Mn + Cur1500	Ração com curcumina 1500 ppm	MnCl <sub>2</sub> (40 mM)/Mn(OAc) <sub>3</sub> (20 mM) dissolvido em água deionizada

## 4.4. TESTES COMPORTAMENTAIS

### 4.4.1. Teste do campo aberto

O teste do campo aberto permite a avaliação da atividade locomotora e exploratória do animal. Para a realização do teste, os animais foram colocados individualmente, em um aparato redondo, medindo 52 cm de diâmetro e 27 cm de altura, dividido internamente em 12 quadrantes iguais. A atividade locomotora de cada animal foi determinada através da filmagem durante um período de 5 minutos, a qual foi posteriormente analisada (CAPRA *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2011; TOLARDO *et al.*, 2010).

### 4.4.2. Teste do *beam walking*

Esse teste avalia a habilidade do animal de se manter equilibrado e atravessar caminhando uma coluna de 3 mm de largura e 100 cm de comprimento, elevada 75 cm do chão em um ângulo de 15°, de modo a alcançar uma plataforma que dá acesso a sua caixa de contenção (ambiente seguro), conforme descrito por Ordoñez-Librado *et al.*, (2008). O animal é colocado na parte mais baixa da coluna de modo que ao deslocar-se para cima alcance a caixa-alvo.

Para a realização do teste, os animais foram previamente treinados por quatro dias, realizando quatro tentativas por dia. Durante o treino os animais foram posicionados no início da coluna de madeira, sem qualquer inclinação. Uma vez que os animais atravessassem a coluna de madeira, em um intervalo máximo de 20 segundos, eles completavam mais duas tentativas consecutivas com a viga inclinada, com tempo máximo para realizar a travessia de 60 segundos. Após o período de treino, os animais realizaram os testes somente na viga elevada.

### 4.4.3. Teste do *single-pellet*

Para a realização deste teste utilizou-se uma caixa de acrílico medindo 19,5 cm de comprimento, 8 cm de altura e 20 cm de largura. A parte frontal da caixa contém uma fenda vertical de 1 cm de largura. Um suporte de plástico de 0,2 cm de espessura (8,3 cm de comprimento e

3,8 cm de largura), situado a 1,1 cm do chão, na frente da caixa. Antes do treinamento, os animais foram privados de comida por 24 horas. A partir de então, receberam uma dieta restrita de aproximadamente 50 g/kg de peso corporal, ajustada para manter o seu peso corporal constante. Para a realização do treinamento, pellets de ração com 20 mg foram posicionados no espaço denteado, distante 1 cm da fenda e de forma central as extremidades. Os animais foram treinados individualmente.

Durante o treino, cada animal deveria pegar dez pellets de ração, de modo que se o animal conseguisse agarrar o pellet através da fenda, sem deixar que o mesmo caísse no chão, a tentativa seria considerada bem sucedida. No entanto, se o animal batesse no pellet sem pegá-lo ou deixasse o pellet cair após pegá-lo, a tentativa era considerada como fracassada (FARR; WHISHAW, 2002). A avaliação qualitativa consiste em analisar o “desempenho de alcance”, a mudança postural e a extensão do membro, objetivando, a supinação-pronação da pata durante o movimento e a liberação da pelota de comida na boca. Este teste foi realizado como descrito previamente Ordoñez-Librado *et al.* (2008).

#### 4.4.4. Teste de realocação do objeto

O teste de realocação do objeto foi realizado de acordo com o método descrito por Assini *et al.* (2009). Os animais foram colocados no centro do aparato de campo aberto, diante de dois objetos idênticos, afastados 7 cm das paredes, durante 3 minutos. O tempo de exploração de cada objeto (segundos) foi aferido com cronômetro, ou seja, quando o animal olhava, cheirava ou estava em contato com o objeto, investigando-o com menos de 1 cm de distância. Para que o animal pudesse se localizar na arena, uma pista foi colada na parede do aparato. Os animais foram reexpostos ao aparato para a sessão de teste 90 minutos após a sessão de treino. Para o teste, um dos objetos foi deslocado e o tempo de exploração de cada objeto foi aferido durante 3 minutos. O desempenho cognitivo dos animais foi analisado por meio do índice de localização descrito por Murai *et al.* (2007):  $(T \text{ deslocado} \times 100) / (T \text{ deslocado} + T \text{ familiar})$ , onde T deslocado é o tempo de exploração do objeto deslocado e T familiar é o tempo gasto explorando o objeto familiar (não-deslocado).

#### 4.4.5. Teste da esQUIVA inibitória do tipo *step down*

Neste teste é avaliada a capacidade de aprendizagem do animal por meio da aplicação de um estímulo aversivo (choque). Para a realização deste teste, o animal é colocado em uma caixa acrílica (50 x 25 x 25 cm), sobre uma plataforma (4 x 6 cm e 2 cm de altura) localizada no centro do aparato. O chão do aparato consiste de barras de aço com 1,0 mm de diâmetro, espaçadas uma da outra em 1,0 cm. Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo de latência (segundos) até que o animal descesse com as quatro patas foi registrado. Uma vez fora da plataforma com as quatro patas, o animal recebeu um choque de 0,3 mA de intensidade com duração de 2 segundos, de acordo com o descrito por Prediger *et al.* (2010). Durante o teste, os animais não recebiam choque e tinham um tempo máximo de 180 segundos para descer da plataforma. De modo a avaliar a memória de curta duração e a memória de longa duração, os animais foram testados 1,5 h e 24 h após a sessão de treino.

#### 4.4.6. Teste de discriminação olfatória

O teste de discriminação olfatória avalia a capacidade dos animais de diferenciar odores, e foi aplicado de acordo com o método descrito primeiramente por Soffié e Lamberty (1988) e posteriormente adaptado por Prediger *et al.*, (2005). Para a realização do teste, os animais foram colocados durante 5 minutos em uma caixa plástica, dividida em dois compartimentos de tamanhos idênticos (30 x 30 x 20 cm) separados por uma abertura, através da qual o animal podia se movimentar, passando de um compartimento para outro. Em um dos compartimentos foi colocado serragem limpa (não-familiar) e no outro compartimento foi colocado serragem retirada da caixa onde o animal esteve nas últimas 48 horas antes do teste (familiar). O tempo (segundos) que o animal explorou a serragem limpa (não-familiar) foi mensurado.

## 4.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 4.5.1. Preparação das amostras

Vinte e quatro horas após a realização dos testes comportamentais, os animais foram decapitados, e o cérebro removido e dissecado sobre gelo, sendo extraídos o estriado e hipocampo. As estruturas foram armazenadas em microtubos e imediatamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

### 4.5.2. Atividade enzimática

O estriado e o hipocampo foram homogeneizados em tampão HEPES 20 mM, pH 7,4. O homogenato foi então centrifugado a 20.000 g por 30 min em centrífuga refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi separado para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

*Glutathione Peroxidase (GPx)*: A atividade da GPx foi avaliada pelo método descrito por Wendel (1981), onde o meio de reação contém tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, 1 mM EDTA, GSH 1 mM, NADPH 0,225 mM e 0,2 U/ml de GR. Inicia-se a reação pela adição de peróxido de cumeno (CHP) a uma concentração final de 1,0 mM. A enzima GPx presente na amostra degrada o CHP a partir da utilização da GSH como doador de elétrons, resultando em álcool do CHP, GSSG e água. A GSSG formada é rapidamente reduzida pela GR com o consumo de NADPH, que pode ser medido espectrofotometricamente em 340 nm. A atividade da GPx é proporcional ao consumo de NADPH.

*Glutathione reductase (GR)*: A atividade da GR foi medida pelo método de Carlberg; Mannervik (1985), onde o meio de reação contém tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, 1,0 mM de EDTA e NADPH 0,225 mM. Ao adicionar GSSG, 1,0 mM, concentração final, a GR presente na amostra reduz a GSSG para GSH, consumindo para isso NADPH. Esse consumo de NADPH pode ser quantificado, a partir da leitura em 340 nm em espectrofotômetro.

*Dosagem de proteína*: A atividade enzimática foi relativizada à concentração de proteína. A dosagem de proteína foi efetuada de acordo com o método de Bradford (1976), usando a albumina do soro bovino como proteína-padrão.

#### 4.5.3. Western blotting

As amostras das regiões do estriado dos animais tratados foram diluídas em glicerol 10 %, SDS 2,0 %, azul de bromofenol 0,004 %, Tris-HCl 0,106 M, pH 6,85, com ou sem 2-mercaptoetanol 5,0 %. As proteínas (50 µg/poço) foram separadas por gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) usando um aparato Mini-protean tetra (Bio-Rad, São Paulo). A eletroforese foi realizada com uma voltagem fixa de 120 volts por 90 minutos, ou até o corante ter alcançado o final do gel, utilizando-se para isso um tampão de corrida contendo 190 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1 % de SDS. Após a separação, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose, utilizando o aparato Mini Trans-Blot (Bio-Rad, São Paulo), por 90 minutos a 100 volts e sob-refrigeração. As membranas foram então bloqueadas com leite desnatado 5,0 % e incubadas *overnight* com anticorpos contra Tirosina Hidroxilase (Santa Cruz – Califórnia, USA) na diluição de 1:2000. Após a incubação com anticorpo secundário anti-mouse ligado a peroxidase (1:4000), a revelação foi feita com uma solução quimioluminescente seguida da exposição em filme radiográfico.

#### 4.5.4. Análise de metais

A dosagem dos níveis de Mn e Fe foi realizada no hipocampo e no estriado, sendo que foi utilizada uma estrutura inteira (2 hemisférios) de cada animal para as análises. As estruturas foram secas em estufa a 100° C durante aproximadamente 24h. O tecido seco de cada animal foi pesado e, em seguida acidificado com 1,5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado por 1 hora a temperatura ambiente e incubado em banho-seco, de modo a completar o processo de digestão da amostra, por mais 1 hora ou até que o material estivesse completamente digerido. Ao final deste processo, o volume foi ajustado para 20 mL (~10 mg/20 mL).

As análises para determinação dos níveis de Fe foram realizadas através da técnica de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) (725-ES, Varian) e as determinações de Mn foram realizadas por meio da técnica do instrumento ICP-MS (X Series 2, Thermo Scientific).

Para a análise das amostras foi utilizada uma curva de calibração (solução de 10 ng/mL de índio), e em seguida foi realizada a calibração para os parâmetros desejados. As curvas padrões para Mn e



Fe foram preparadas utilizando-se soluções certificadas. As análises foram realizadas na Universidade de Plymouth (Reino Unido), no departamento de School of Geography, Earth and Environmental Sciences (Faculty of Science and Technology), no laboratório do Dr. Andrew Fischer.

#### 4.5.5. Análise de neurotransmissores

As análises das concentrações de dopamina e serotonina foram adaptadas de método previamente estabelecido (ALMEIDA *et al.*, 2003), e realizadas na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) no laboratório do Prof. Dr. Eduardo Almeida.

A concentração das monoaminas neurotransmissoras foi determinada por HPLC acoplado a um detector eletroquímico coulométrico (Coulchem III ESA, Bedford, MA), associado a uma célula condicionada Modelo 5021 mantida em um potencial de + 900 mV e uma célula dual analítica Modelo 5011 fixada em 50 mV (primeira célula) e em 700 mV (segunda célula).

As amostras foram separados em uma coluna C-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) a um fluxo isocrático de 0,9 mL.min<sup>-1</sup> e a identificação e quantificação do pico da dopamina e serotonina foram realizadas por meio do software EasyChrom (Agilent Technologies). Com estas condições, a dopamina, claramente, eluiu-se em cerca de cinco minutos, enquanto que a serotonina em cerca de 10 minutos. A concentração das monoaminas foi expressa em pg/mg de tecido e foi quantificada com base em uma curva padrão com concentrações conhecidas.

#### 4.5.6. Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados para homocedasticidade (Teste de Grubbs) e normalidade (Teste de Shapiro-Wilk). Quando os dados apresentavam distribuição normal e suas variâncias não diferiam, foi feita a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do Teste de Newman-Keuls, quando necessário.

No teste do *single pellet*, onde o número de sucessos é contado, os dados foram transformados em fração referenciado sucesso máximo, os valores assim obtidos foram convertidos em ArcoSenso, e em seguida analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguidos pelo Teste

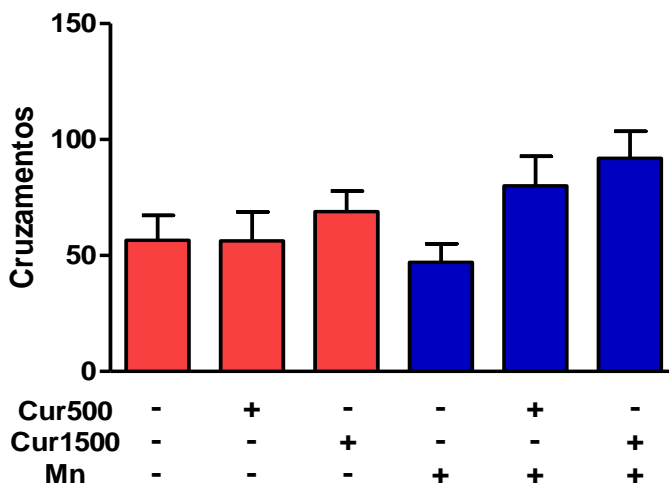
Newman-Keuls. Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

No teste da esquia inibitória do tipo *step down* a análise estatística dos dados foi feita por meio do teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste t de Student. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (\*).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efeitos da inalação de Mn sobre a atividade comportamental

O tratamento com Mn, segundo dados da literatura, leva ao desenvolvimento de prejuízos das habilidades motoras (CORDOVA *et al.*, 2012; ORDOÑEZ-LIBRADO *et al.*, 2008). Dessa forma, ao longo ou após o tratamento por inalação com a mistura de  $\text{MnCl}_2$  (40 mM) +  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (20 mM) por 14 semanas, a habilidade motora dos animais foi avaliada por meio de três testes motores distintos.



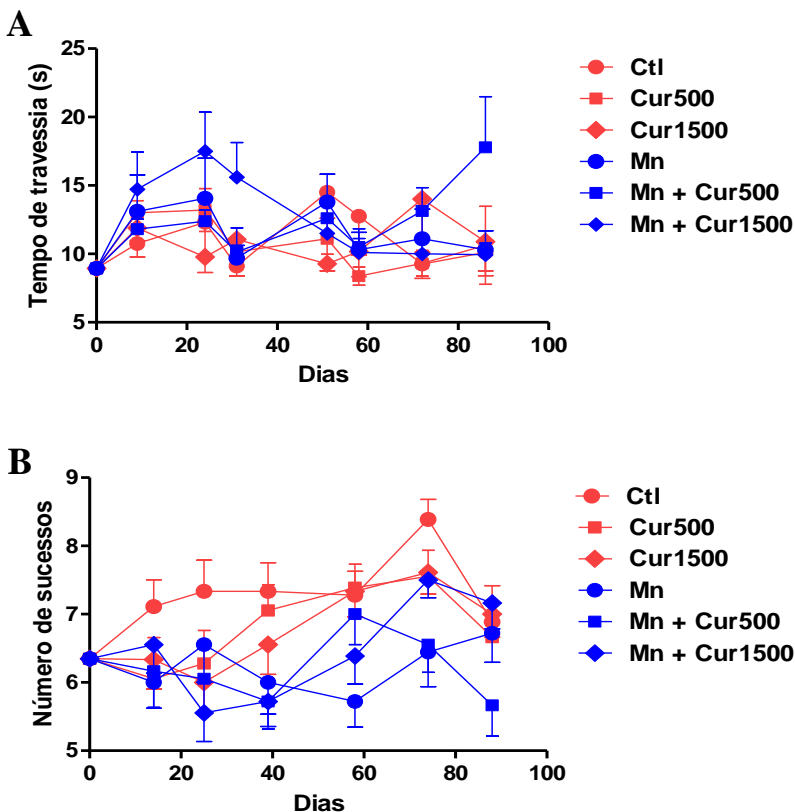
**Figura 4: Atividade locomotora avaliada por meio do teste do campo aberto.** Não foram encontradas diferenças significativas com o teste estatístico ANOVA de uma via ( $n=10-12$ ). Dados são apresentados como média e erro padrão.

No teste do campo aberto, o qual avalia a locomoção espontânea do animal em uma arena, nenhum dos grupos tratados apresentou qualquer alteração na atividade locomotora (Fig. 4). Além deste teste, foram realizados ainda dois outros testes, visando avaliar o

desempenho motor, são eles o teste do *beam walking* e o teste do *single pellet*.

O teste do *beam walking* exige que o animal apresente equilíbrio motor para a sua realização, bem como firmeza nas patas, de modo que possa atravessar a coluna de madeira sem deslizar. Já o teste do *single pellet* avalia a capacidade de realizar movimentos motores precisos e refinados, uma vez que para a realização deste teste, o animal necessita passar a pata por uma fenda para ter acesso a ração. Ao direcionar o alimento para a boca, as habilidades motoras também precisam estar preservadas para evitar que o *pellet* de ração caia (ORDOÑEZ-LIBRADO *et al.*, 2008).

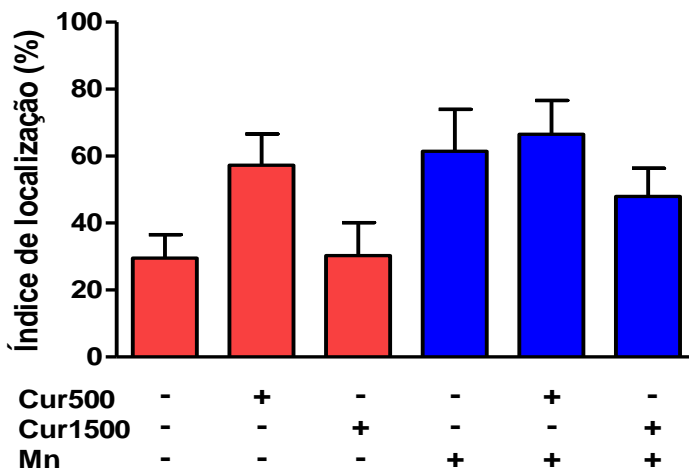
No teste do *beam walking* (Fig. 5A), segundo o teste estatístico ANOVA de uma via, a inalação da mistura de  $\text{MnCl}_2$  (40 mM) +  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (20 mM) por 14 semanas, não foi capaz de afetar de forma significativa a capacidade de equilíbrio motor dos animais ao longo do tratamento, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais.



**Figura 5: Atividade motora avaliada através dos testes do *beam walking* e do *single pellet*.** (A) Teste do *beam walking* - não foram encontradas diferenças estatísticas segundo teste estatístico de ANOVA de uma via (n=18). (B) Teste do *single pellet* - O número de cruzamentos foi convertido em porcentagem do controle e transformado em ArcoSeno. Os valores de ArcoSeno, foram, então, comparados com o teste de variância ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls (n=18). Os grupos tratados com curcumina 500 ou 1500 ppm, Mn ( $\text{MnCl}_2$  (40 mM) +  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (20 mM)), ou a combinação destes, obtiveram desempenho estatisticamente ( $p < 0,05$ ) inferior ao grupo controle (Ctl vs. Cur500; Ctl vs. Cur1500; Ctl vs. Mn; Ctl vs. Mn+Cur500; Ctl vs. Mn+Cur1500). Dados são apresentados como número médio de sucesso e erro padrão.

No teste do *single pellet* (Fig. 5B), no entanto, a habilidade motora de realizar movimentos refinados, encontra-se reduzida após a inalação da mistura de  $\text{MnCl}_2$  (40 mM) +  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (20 mM) por 14 semanas, em camundongos *Swiss* adultos jovens. Conforme pode ser observado na Fig. 5B, durante todo o tratamento o grupo Ctl permaneceu com desempenho superior. Além disso, ambos os grupos que apenas recebiam curcumina na ração (Cur500 e Cur1500), apresentaram desempenho bastante próximo ao grupo Ctl a partir do dia 60, no entanto, nos 40 dias iniciais o desempenho foi inferior, o que foi confirmado pelo teste estatístico.

Em estudos realizados por Blecharz-Klin *et al.*(2012) e Schneider *et al.*(2009), com ratos machos de 3 meses de idade ( $\text{MnCl}_2$  - 0,8 mg/Kg) e primatas não-humanos adultos de 5-6 anos de idade ( $\text{MnSO}_4$  - 15 a 20 mg/Kg), respectivamente, foi demonstrado que o Mn tem a capacidade de causar déficits cognitivos e de memória. Assim, ao final do tratamento com a inalação de  $\text{MnCl}_2$  (40 mM) +  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (20 mM) por 14 semanas, juntamente com o acréscimo de curcumina na ração, os animais foram submetidos a testes de memória distintos, o teste da realocação do objeto e o teste da esQUIVA inibitória do tipo *step down*.

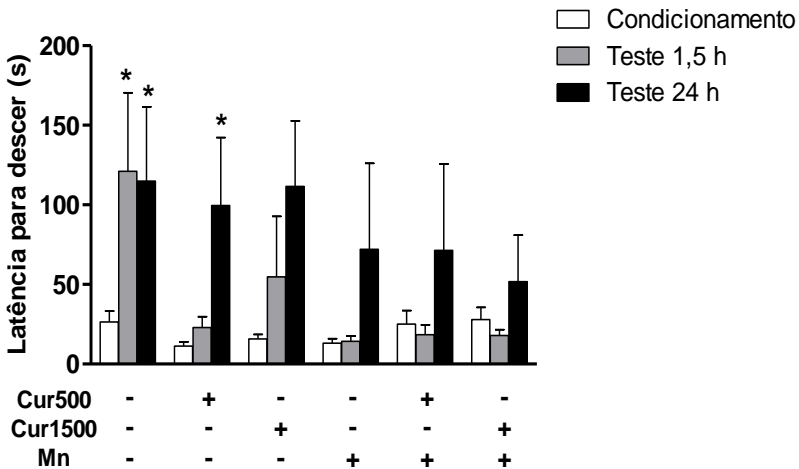


**Figura 6: Desempenho dos camundongos submetidos ao teste do reconhecimento do objeto.** O desempenho cognitivo dos animais foi analisado por meio do índice de realocação ( $T \text{ deslocado} \times 100 / (T \text{ deslocado} + T \text{ familiar})$ ), onde  $T \text{ deslocado}$  é o tempo de exploração do objeto deslocado e  $T \text{ familiar}$  é o tempo gasto explorando o objeto familiar (não-deslocado). Segundo o teste estatístico ANOVA de uma via, não foram encontradas diferenças significativas ( $n=8-10$ ). Dados são apresentados como média e erro padrão.

No teste da realocação do objeto, avaliou-se a capacidade exploratória dos animais. Conforme indicado na Fig. 6, o teste estatístico ANOVA de uma via, não detectou diferenças significativas entre os grupos.

O teste da esquiwa inibitória do tipo *step down* avalia memória de curta e de longa duração, além da capacidade de aprendizado (Prediger *et al.*, 2008). A Fig. 7 mostra que o grupo controle apresentou aumento significativo no tempo de latência (~100 s) para descer da plataforma tanto após 1,5 h, assim como, 24 h após o condicionamento. O grupo Cur500 mostrou uma capacidade de aprendizado e memória de curta duração diminuída 1,5 h após o teste, uma vez que sua latência para descer da plataforma não sofreu aumento (Fig. 7). Entretanto, houve retenção de memória de longo prazo, uma vez que os animais, da mesma maneira que o grupo controle, aumentaram a latência para descer

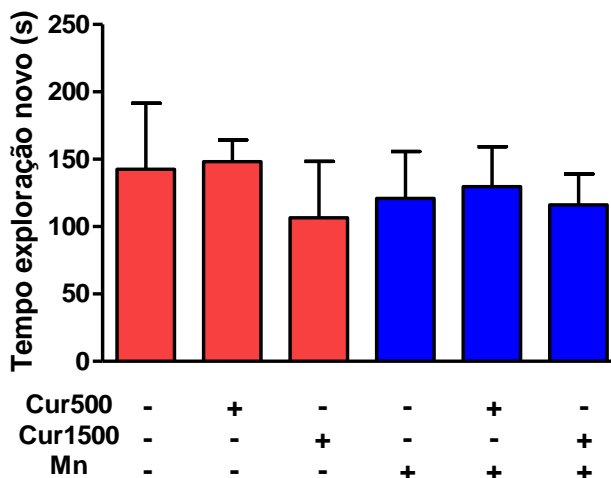
da plataforma (~100 s). Com relação aos grupos Cur1500, Mn, Mn+Cur500 e Mn+Cur1500, pode-se perceber que não houve retenção da memória de curta e nem de longa duração, pois nenhum destes apresentou diferenças significativas com relação ao tempo de latência para descer da plataforma após o condicionamento para nenhum dos tempos testados (1,5 h e 24 h).



**Figura 7: Avaliação da memória de curta duração (1,5 h) e longa duração (24 h) através do teste da esquiiva inibitória do tipo *step down*.** A análise estatística dos dados foi feita por meio do teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste t de Student (n=6-8). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (\*).

Como o tratamento com a mistura de  $\text{MnCl}_2$  (40 mM) +  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (20 mM) foi realizado por via inalatória durante um longo período (14 semanas), julgamos ser importante a análise da capacidade olfativa dos animais. Dessa forma, os animais foram submetidos, ao final do tratamento, ao teste da discriminação olfatória. Como indicado na Fig. 8. Segundo a análise estatística ANOVA de uma via, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, demonstrando que o tratamento não afetou a capacidade olfativa dos animais.





**Figura 8: Avaliação da preferência pela maravalha nova (não-familiar) no teste da discriminação olfatória.** Segundo o teste estatístico ANOVA de uma via, não foram encontradas diferenças significativas (n= 6-8). Dados são apresentados como média e erro padrão.

## 5.2. Efeitos da inalação de Mn sobre parâmetros neuroquímicos

Além de avaliar o efeito da inalação de Mn e da ingestão de curcumina sobre os parâmetros comportamentais de camundongos, foram analisados também parâmetros bioquímicos em diferentes estruturas do cérebro.

Vários trabalhos mostram que o Mn é capaz de gerar aumento do dano oxidativo no SNC, levando, por exemplo, ao aumento de peroxidação lipídica (AVILA *et al.*, 2008; MILATOVIC *et al.*, 2009, 2011), e da formação de ERO (ALI *et al.*, 1995; ZHANG; ZHOU; FU, 2003). Dessa forma, a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR foi analisada nas regiões do estriado e do hipocampo (Tab. 2). No entanto, as diferenças na atividade destas enzimas entre os grupos não foram significativas.

**Tabela 02: Atividade enzimática no estriado e do hipocampo**

Grupo <sup>1</sup>	Estriado		Hipocampo	
	GR <sup>2</sup>	GPx	GR	GPx
<i>Ctl</i>	66,9±3,6 <sup>3</sup>	42,3±1,8	65,1±3,0	29,6±3,0
<i>Cur500</i>	68,1±7,3	43,6±4,2	62,7±6,2	31,2±2,6
<i>Cur1500</i>	68,0±6,5	38,7±7,0	66,1±7,1	31,3±8,4
<i>Mn</i>	68,5±2,0	40,7±1,9	67,8±4,1	28,1±2,6
<i>Mn+Cur500</i>	72,1±2,4	44,9±6,1	64,4±5,6	33,7±3,9
<i>Mn+Cur1500</i>	70,8±7,0	45,9±5,9	64,6±0,5	31,5±2,1

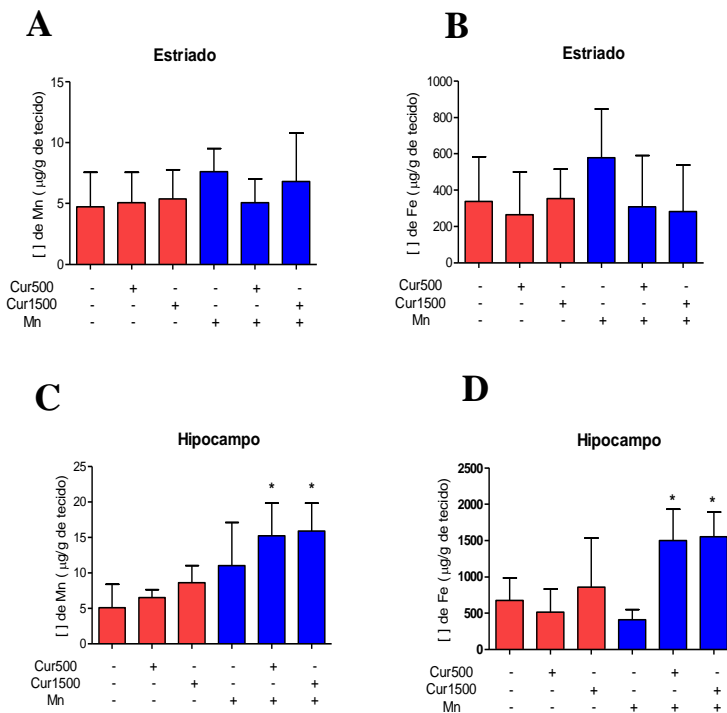
<sup>1</sup> Não foram encontradas diferenças significativas com o teste ANOVA de uma via  $P > 0,05$  (n = 5-6); <sup>2</sup>GR, Glutathione redutase; GPx, glutathione peroxidase; <sup>3</sup>Valores são apresentados como média e erro padrão em nmol/min/mg de proteína.

Segundo a literatura, quando inalado, o Mn se acumula no cérebro, principalmente nas regiões produtoras de dopamina, dentre elas o estriado (ERIKSON *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2011). Além disso, o hipocampo, região relacionada a memória e aprendizado também sofre influências negativas com o tratamento de Mn (CHANG *et al.*, 2010; SCHNEIDER *et al.*, 2009; TORRES-AGUSTÍN *et al.*, 2012; VEZÉR *et al.*, 2005). Portanto, os níveis de Mn foram avaliados em ambas as regiões do SNC, estriado e hipocampo (Fig. 9).

Além do Mn, avaliou-se também os níveis de Fe nestas regiões, uma vez que distúrbios nos níveis de metais de transição poderiam ocorrer de forma secundária ao tratamento com o Mn (MORENO *et al.*, 2009). Tanto os níveis de Mn quanto os de Fe, na região do estriado, não foram alteradas de forma significativa pelos tratamentos. A curcumina não exerceu influência no acúmulo de Mn ou de Fe nem no hipocampo e nem no estriado, uma vez que os grupos Cur500 e Cur1500 não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Em estudo realizado por Cordova *et al.* (2012), ratos neonatos tratados via i.p. durante 5 dias com MnCl<sub>2</sub> nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg, apresentaram aumento significativo nos níveis de Mn nas regiões do estriado e do hipocampo. Contudo, conforme demonstrado na Figura 11, a mistura MnCl<sub>2</sub> (40 mM) + Mn(OAc)<sub>3</sub> (20 mM) quando inalada

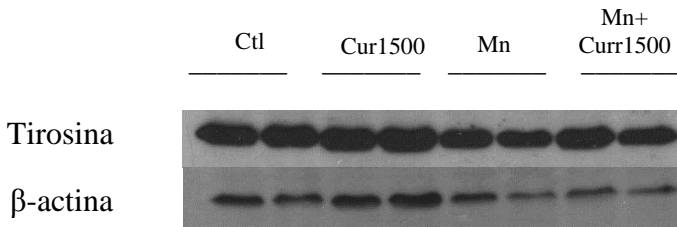
durante 14 semanas, não é capaz de alterar significativamente as concentrações de Fe e Mn nestas regiões. Porém, de forma inesperada, a combinação de curcumina com Mn elevou os níveis de Mn e de Fe a valores que correspondem a praticamente ao triplo dos valores encontrados no grupo controle.



**Figura 9: Concentração de Mn e Fe nas regiões do estriado e do hipocampo.** Níveis de Mn (A) e de Fe (B) no estriado (n=4); Níveis de Mn (C) e de Fe (D) no hipocampo (n=4). A análise dos dados foi realizada através do teste ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. As diferenças do grupo controle são representadas por \*  $p < 0,05$  e as diferenças em relação aos grupos Mn são representadas por # ( $p < 0,05$ ) e ## ( $p < 0,01$ ).

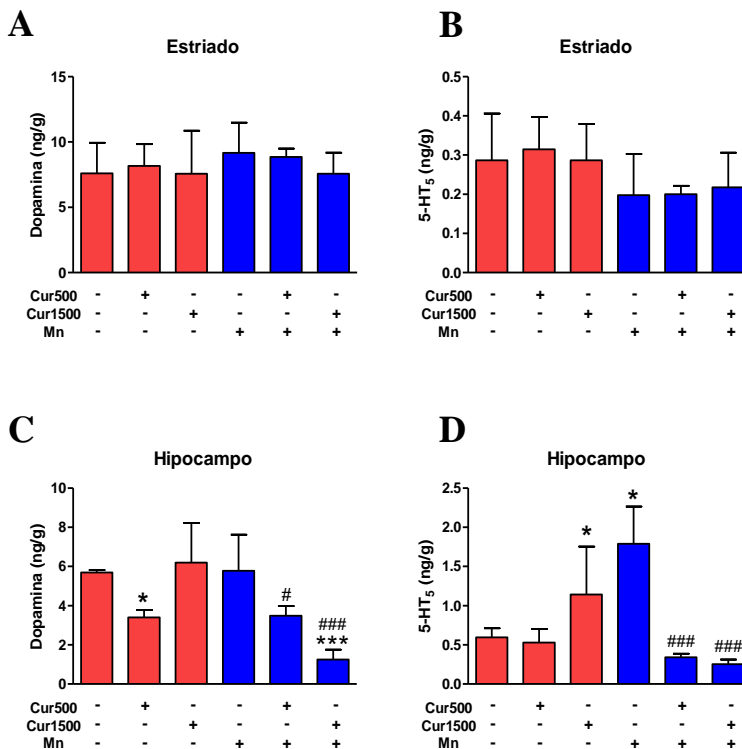
Em estudo de Ordoñez-Librado *et al.* (2008), foi demonstrado que o tratamento de camundongos CD-1, com a mesma solução de Mn ( $\text{MnCl}_2$  (40 mM) +  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (20 mM)), e com o mesmo número de inalações que as realizadas neste trabalho, foi capaz de levar a uma redução significativa na marcação para tirosina hidroxilase (TH) no estriado. Contudo, neste estudo os autores utilizaram animais da linhagem CD-1, com 8 meses de idade, contrastando com os animais utilizados no presente estudo que tinham 2 meses de idade.

Dessa forma, no presente trabalho investigou-se se os efeitos da inalação de Mn sobre o imunoconteúdo de TH seriam similares em camundongos *Swiss* adultos, submetidos ao mesmo tratamento que camundongos CD-1 com 8 meses de idade. Os níveis de TH no estriado foram avaliados por meio da técnica de western blotting (Fig. 10). Os níveis de TH não apresentaram diferenças estatísticas entre si, de acordo com análise dos dados através do teste ANOVA de um via.



**Figura 10: Imunodeteção de tirosina hidroxilase (TH) no estriado.** Não foram encontradas diferenças significativas através do teste ANOVA de uma via ( $n=4$ ).

Por fim, em estudos com Mn por via i.p. em ratos adultos, foi demonstrado que o tratamento com Mn leva a diminuição dos níveis de dopamina e serotonina no estriado e no hipocampo (BLECHARZ-KLIN *et al.*, 2012). Desta maneira, no presente trabalho também foram investigados os efeitos da inalação de  $\text{MnCl}_2$  (40 mM) +  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (20 mM) sobre os níveis de catecolaminas (dopamina e serotonina) nas regiões do estriado e do hipocampo (Fig. 11).



**Figura 11: Níveis de dopamina e serotonina no estriado e hipocampo.** Níveis de dopamina (A) e de serotonina (B) no estriado (n=4); Níveis de dopamina (C) e de serotonina (D) no hipocampo (n=4). A análise dos dados foi realizada através do teste ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. As diferenças do grupo controle são representadas por \*  $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ , diferenças em relação aos grupos Mn são representadas por # ( $p < 0,05$ ) e ### ( $p < 0,001$ ).

Na região do estriado (Fig. 11A e 11B), não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos neurotransmissores analisados. Contudo, no hipocampo (Fig. 11C) os animais do grupo Cur500 mostraram níveis de dopamina cerca de 40% menores em relação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças dos grupos Cur1500 e Mn com relação ao grupo controle. Os grupos Mn+Cur500 e

Mn+Cur1500 também apresentaram níveis de dopamina bastante diminuídos com relação ao grupo Mn, sendo as diferenças de 39% e 64%, respectivamente. Além disso, o grupo Mn+Cur1500 apresentou quantidades de dopamina aproximadamente 75% menores quando comparado ao grupo controle.

Ainda no hipocampo, conforme observa-se na Figura 11D, os níveis de serotonina também apresentaram uma variação bastante ampla entre os grupos, sendo que os grupos Cur1500 e Mn apresentaram um aumento nos níveis deste neurotransmissor em torno de 91% e 190%, respectivamente. Interessantemente, nos grupos Mn+Cur500 e Mn+Cur1500 este aumento observado no grupo Mn não foi observado, sendo que os níveis de serotonina foram muito próximos aos observados no grupo controle.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Manganês

Altas doses de Mn, se inaladas de forma crônica, acumulam-se no cérebro levando ao aparecimento de sintomas similares aos observados na DP. Quando aparecem os distúrbios de movimentos, os sintomas característicos são bradicinesia, rigidez e tremor de repouso. Esses distúrbios de equilíbrio podem ser seguidos de distonia axial e nas extremidades (MENA *et al.*, 1967).

Dentre os muitos modelos para se estudar a DP, encontra-se a intoxicação por Mn. Ou seja, altas doses deste metal no SNC, acumulam-se na região dos núcleos da base, causando a morte dos neurônios dopaminérgicos, fato este, que em consequência gera sintomas similares aos observados na DP.

Um fator relevante que merece ser destacado, é que este é o primeiro trabalho a investigar o efeito da mistura de  $\text{MnCl}_2$  (40 mM) +  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (20 mM) sobre camundongos da linhagem *Swiss* adultos jovens (2 meses de idade). De modo que muitos dos resultados obtidos aqui, possam ser reflexo das características da linhagem e da idade dos animais estudados. Outro fator relevante estudado neste trabalho, foi a via de administração escolhida para o tratamento, uma vez que na literatura é sugerido que os efeitos do Mn são mais proeminentes no SNC quando administrado por via inalatória (ORDOÑEZ-LIBRADO *et al.*, 2008; ROELS *et al.*, 1997). Quando administrado por meio das vias aéreas as partículas de Mn são distribuídas pelo trato respiratório de acordo com seu tamanho. As frações que se depositam nos alvéolos pulmonares sofrem solubilização, permitindo a absorção do Mn (ROELS *et al.*, 1997).

A atividade locomotora espontânea, avaliada por meio do teste do campo aberto, é afetada pelo tratamento com Mn (SANTOS *et al.*, 2012; VEZÉR *et al.*, 2005). O tratamento com Mn (15-60 mg/Kg, via i.p.) de forma crônica (5 dias por semana, 10 semanas via i.p.) em ratos jovens é capaz de gerar diminuição significativa na atividade locomotora no teste do campo aberto. Porém, no presente trabalho, o Mn não causou alterações na atividade locomotora dos animais. Deve-se ressaltar que este trabalho difere do acima citado com relação ao tempo de tratamento e a espécie dos animais, bem como a via de administração do Mn, além das doses utilizadas no presente estudo que são muito

inferiores àquelas utilizadas nos estudos anteriormente citados (SANTOS *et al.*, 2012; VEZÉR *et al.*, 2005).

Os efeitos marcantes do tratamento com Mn em roedores podem ser observados em animais com maior idade (ORDOÑEZ-LIBRADO *et al.*, 2008; SANCHEZ-BETANCOURT *et al.*, 2012), sendo que fortes sintomas motores foram observados em animais da linhagem CD-1 a partir de 8 meses de idade. Nestes animais, o tratamento crônico, similar ao empregado no presente trabalho, gerou déficits motores no teste do *beam walking* e do *single pellet* (ORDOÑEZ-LIBRADO *et al.*, 2008; SANCHEZ-BETANCOURT *et al.*, 2012). No presente trabalho, os sinais de toxicidade do Mn foram bem menores, sendo que somente foram observados déficits motores no teste do *single pellet*, mas não no teste do *beam walking*. Como o teste do *beam walking* avalia a capacidade de equilíbrio e firmeza dos animais (ORDOÑEZ-LIBRADO *et al.*, 2008), neste trabalho, o Mn não foi capaz de alterar estas habilidades. No entanto, nos animais tratados com Mn, déficits motores significativos foram observados no teste do *single pellet*, indicando comprometimento da habilidade de realização de movimentos precisos e refinados (ORDOÑEZ-LIBRADO *et al.*, 2008).

O movimento de “agarrar”, necessário para a o sucesso no teste do *single pellet*, é formado por vários subcomponentes comportamentais, dentre os quais movimento do membro em direção ao pellet de ração, pronação da pata sobre o pellet de ração para agarrá-lo, e supinação da pata com o pellet de ração de modo que esta possa ser levada a boca sem que caia (ORDOÑEZ-LIBRADO *et al.*, 2008). Em humanos apresentando DP um dos sintomas apresentados é justamente a perda de habilidade manual acurada, a qual se agrava a medida que a doença progride (JACKSON; JACKSON; HINDLE, 2000). Dessa forma, os dados obtidos por meio do teste do *single pellet* indicam que o tratamento crônico de Mn é capaz de afetar a capacidade de realização de movimentos acurados, da mesma forma ao que ocorre nos estágios iniciais da DP.

Antes de aparecerem sintomas clínicos de perda na capacidade motora, a DP pode se manifestar por meio do surgimento de sintomas não-motores, dentre os quais perda da capacidade olfativa, distúrbios do sono, alterações da capacidade cognitiva e comprometimento da memória (ADLER, 2011; DUBOIS; PILLON, 1997; HAMAI; BONDY, 2004; MUSLIMOVIC *et al.*, 2005).

Os dados obtidos no presente trabalho indicam que o Mn é capaz de afetar a memória de camundongos adultos jovens,



comprometendo tanto a memória de curta (1,5 h), quanto na memória de longa duração (24 h), avaliada pelo teste da esQUIVA inibitória do tipo *step down*.

Em estudo realizado com primatas não-humanos entre 5-6 anos de idade, a exposição crônica a sulfato de Mn, 10-15 mg/kg/semana, i.p., por um período de aproximadamente 272 dias, não produziu alterações significativas nos níveis de atenção ou na capacidade de memorização destes animais. O estudo *post-mortem* no cérebro destes primatas mostrou que não houve alterações significativas nos níveis de dopamina no estriado (SCHNEIDER *et al.*, 2006). A forma de administração e o protocolo são determinantes para o aparecimento da toxicidade do Mn. Em estudo prévio, a exposição pré-natal a Mn nas doses de 0,2 e 10 mg/mL na água de beber, não alterou a memória espacial e tampouco a capacidade de aprendizado em ratos quando estes chegaram a 25 e 95 dias de idade (PAPPAS *et al.*, 1997). Por outro lado, estudo realizado com Mn nas doses de 275 e 550 mg/kg/dia, na água de beber de ratos adultos, demonstrou diminuição da memória no teste do labirinto aquático de Morris (TORRENTE; COLOMINA; DOMINGO, 2005).

Os efeitos do Mn sobre os parâmetros comportamentais estão diretamente relacionados ao seu acúmulo no SNC, sendo que este metal tem grande afinidade pelas regiões produtoras de dopamina no SNC, dentre elas, o estriado (ERIKSON *et al.*, 2005; STREDRICK *et al.*, 2004). Contudo, o tratamento com Mn tende a gerar aumento deste metal também em outras regiões como, por exemplo, no hipocampo (CHANG *et al.*, 2010; SCHNEIDER *et al.*, 2006). Interessantemente, o presente trabalho mostra que apesar das análises dos níveis de Mn e Fe não revelarem alterações significativas no hipocampo e no estriado no grupo que inalou Mn, o tratamento foi capaz de produzir prejuízo na memória de curto e de longo prazo no teste do *step down*. Assim, os dados indicam que a perda de memória pode acontecer em uma fase anterior ao acúmulo mensurável dos níveis de Mn.

Além do Mn aumentar a auto-oxidação da dopamina, gerando assim, maior formação de ERO (ARCHIBALD; TYREE, 1987), este metal (principalmente em sua forma  $Mn^{3+}$ ) também pode influenciar o processo de fosforilação oxidativa, causando inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons e aumento na produção de ERO (CHEN *et al.*, 2001; TAYLOR *et al.*, 2006; WORLEY *et al.*, 2002). No entanto, os dados aqui demonstrados, indicam que o tratamento crônico de Mn não foi capaz de alterar a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR. Isto indica que provavelmente neste tratamento, o Mn não

alterou de forma significativa a expressão destas enzimas, indicando alterações modestas ou insignificantes no sistema antioxidante envolvendo a eliminação de peróxidos pela GPx.

Outra enzima que parece sofrer influência dos níveis de Mn no SNC é a TH, enzima limitante na síntese de catecolaminas por catalisar o primeiro passo da via bioquímica para a formação de dopamina (DUNKLEY *et al.*, 2004). No presente trabalho, o Mn não foi capaz de gerar alterações significativas no imunoconteúdo de TH na região do estriado, indicando que não houve comprometimento na síntese de dopamina nesta região. Entretanto, os níveis de neurotransmissores podem ser alterados por uma série de fatores, não somente através da modulação da expressão da TH, permanecendo para ser esclarecido em estudos futuros.

Os trabalhos com relação ao Mn e aos níveis de TH no SNC são contraditórios. Em trabalho realizado em células dopaminérgicas nas concentrações de 3 a 10  $\mu\text{M}$ , não houve alteração dos níveis de TH (ZHANG *et al.*, 2011). Por outro lado, o Mn administrado via inalatória em camundongos CD-1 de 8 meses de idade, diminuiu significativamente os níveis dessa enzima no estriado (ORDOÑEZ-LIBRADO *et al.*, 2008). Isto provavelmente ocorre porque a idade dos animais pode ser um fator limitante para a susceptibilidade aos danos causados pelos Mn no SNC. Conforme estudo citado acima, em camundongos com idade mais avançada, os danos neurotóxicos são mais proeminentes, quando comparados aos danos causados por este metal em animais adultos jovens, como os utilizados no presente trabalho.

O Mn também pode agir sobre a neurotransmissão serotoninérgica (BLECHARZ-KLIN *et al.*, 2012), contudo, ainda não são encontrados muitos dados na literatura a este respeito. A 5-HT é uma monoamina envolvida na manutenção do estado emocional de humanos. Alterações nos níveis de 5-HT têm sido associadas a sintomas como depressão, raiva, alterações de sono e perda de memória (LESCH *et al.*, 1996). Coincidentemente, todos estes sintomas estão presentes na fase inicial da intoxicação por Mn (ADLER, 2011; MUSLIMOVIC *et al.*, 2005). No presente trabalho, o Mn gerou aumento nos níveis de serotonina no hipocampo, indicando que possivelmente este metal possa, de alguma forma, interferir no metabolismo da 5-HT por interferir em mecanismos de síntese, liberação, recaptação ou degradação deste neurotransmissor.

Dados da literatura mostram que a administração intranasal de  $\text{MnCl}_2$  em ratos gera mudanças regionais na síntese e no turnover de monoaminas, sendo a região do hipocampo, a qual tem relação bem

estabelecida com a memória e o aprendizado, uma das mais afetadas (BLECHARZ-KLIN *et al.*, 2012). A administração de  $MnCl_2$  (0,8 mg/kg durante 2 semanas em ratos com 3 meses de idade) levou a diminuição dos níveis de serotonina no hipocampo e no estriado, não alterando os níveis de dopamina no estriado, mas diminuindo-os no hipocampo (BLECHARZ-KLIN *et al.*, 2012). Ratos neonatos tratados com  $MnCl_2$  (25 ou 50  $\mu g/g$ /dia) por via intragástrica ou na dieta (1 mg/g ração), quando avaliados na fase adulta, não apresentam alterações nos níveis de dopamina e serotonina estriatais (KONTUR; FECHTER, 1988). Além disto, a administração i.p. de Mn diminuiu a atividade da MAO-A e da MAO-B nas regiões do estriado e do hipotálamo, mas aumentou sua atividade no córtex, sem dados para o hipocampo (KAWATA, 1990). Os dados da literatura acima descritos, bem como os dados obtidos neste trabalho, indicam que o Mn claramente interfere nos níveis de 5-HT, e que a região do hipocampo é a mais susceptível aos danos causados por este metal, uma vez que no hipocampo os animais que receberam Mn apresentaram um aumento de cerca de 200% nos níveis de 5-HT. No entanto, mais estudos que se direcionem à investigação exata do mecanismo pelo qual o Mn é capaz de gerar tal efeito ainda são necessários.

Dessa forma, os dados obtidos no presente trabalho, indicam que em camundongos *Swiss* adultos, a inalação de Mn não é capaz de gerar alterações neuroquímicas na região do estriado. Por outro lado, na região do hipocampo, importantes alterações nos níveis de 5-HT foram constatadas, mostrando que esta região é mais susceptível aos danos causados pelo Mn. Além disso, a inalação de Mn gerou prejuízos na capacidade de realizar movimentos motores acurados e na memória dos animais. Assim, os dados obtidos mostram-se compatíveis com as fases iniciais da DP, indicando que o protocolo crônico de inalação de Mn, quando utilizado em camundongos *Swiss* com 2 meses de idade, mostra-se um bom modelo para o estudo de mecanismos de neuroproteção associados ao desenvolvimento da DP.

## 6.2. Curcumina

Conforme mencionado anteriormente, a curcumina apresenta diversos efeitos benéficos e bem documentados na literatura, com destaque para seu efeito neuroprotetor (DONG *et al.*, 2012; SETHI *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2005). Com relação a DP, há muitos estudos mostrando que a curcumina apresenta efeitos benéficos e protetores.

Por exemplo, em modelo de Parkinson causado pela lesão com 6-hidroxi-dopamina no estriado de ratos, com 50 dias de idade e que receberam pré-tratamento via intragástrica com curcumina, foi visto que este flavonóide apresentou efeito protetor contra depleção de dopamina e diminuição dos níveis de Fe no estriado (DU *et al.*, 2012). Além disso, em estudo *in vitro* com neurônios dopaminérgicos e *in vivo* com camundongos da linhagem C57Bl/6 com 10 meses de idade, a curcumina administrada via i.p. protegeu contra a depleção dos níveis de GSH (JAGATHA *et al.*, 2008). Ainda, ratos de 16 semanas de idade, em modelo de Parkinson induzido por 6-hidroxi-dopamina intraestriatal, tratados com curcumina via oral, demonstraram proteção contra peroxidação lipídica, depleção de GSH, e manutenção da atividade das enzimas GPx, GR, SOD, CAT e TH (KHUWAJA *et al.*, 2011). Contudo, ainda não são encontrados na literatura trabalhos que correlacionem os possíveis efeitos protetores da curcumina sobre os efeitos neurotóxicos do Mn, similares aos observados na DP.

Não há muitos dados na literatura que documentem os efeitos da curcumina com relação a capacidade motora, contudo, em estudo utilizando modelo de DP, foi visto que o pré-tratamento de curcumina (80 mg/kg, administrada diariamente por 21 dias) foi capaz de proteger contra os déficits motores gerados por lesão com 6-hidroxi-dopamina causada por uma única administração da droga na região do estriado, em ratos com 16 semanas de idade (KHUWAJA *et al.*, 2011).

A dopamina é o principal neurotransmissor relacionado ao controle da capacidade motora (ADLER, 2011), portanto, na DP a manutenção dos níveis de dopamina é essencial para a diminuição dos déficits motores. Porém, no presente trabalho os dados mostraram que o tratamento crônico de curcumina, em ambas as concentrações, diminuiu o desempenho dos animais quanto a habilidade de realizar movimentos motores acurados, quando comparado ao grupo controle. De forma intrigante, os níveis de dopamina no estriado não sofreram alteração, indicando que este flavonóide possa afetar o comportamento motor por vias que não envolvam a dopamina, como por exemplo, agindo sobre outra estrutura como o cerebelo, o qual também tem importante papel na execução dos movimentos motores (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007).

No presente trabalho, além de causar alterações no comportamento motor, a curcumina gerou também déficits de memória. Foi demonstrado que em ratos de 15 meses de idade, o consumo de aproximadamente 12 g/dia de curcumina durante 12 semanas, foi capaz de aumentar a neurogênese e a cognição (DONG *et al.*, 2012). Além

disso, em estudos toxicológicos com ratos adultos (90 – 110 dias de idade) tratados com tabaco, a curcumina foi capaz de reverter os efeitos prejudiciais do tabaco sobre a capacidade cognitiva e de memória dos animais nas doses de 12 a 25 mg/kg, administrada 5 dias por semana durante 30 dias (JAQUES *et al.*, 2013, 2012).

Ao contrário do esperado, e dos dados apresentados acima, no presente estudo, o tratamento crônico com curcumina foi capaz de gerar prejuízos significativos na memória de curto prazo nas doses de 500 e 1500 ppm avaliada pelo teste da esQUIVA inibitória do tipo *step down*. Interessantemente, na dose de 1500 ppm o tratamento com curcumina também afetou a memória de longa duração. No entanto, na dose de 500 ppm, a curcumina gerou diminuição dos níveis de dopamina, a qual tem papel importante na aquisição e formação de memórias no hipocampo (SHOHAMY; ADCOCK, 2010). Este efeito da curcumina merece maiores estudos a fim de esclarecer os mecanismos envolvidos.

Por outro lado, na dose de 1500 ppm, a curcumina elevou as concentrações de 5-HT no hipocampo, fato este que concorda com dados prévios da literatura. Em estudo realizado anteriormente o tratamento com curcumina nas doses de 5 e 10 mg/kg, em dose única, via oral, gerou aumento nos níveis de serotonina no hipocampo, sem no entanto, alterar os níveis de dopamina (XU *et al.*, 2005). Além disso, a curcumina (20-80 mg/kg) gera diminuição na atividade da enzima MAO-A, gerando, portanto, aumento dos níveis de 5-HT (KULKARNI; BHUTANI; BISHNOI, 2008). Contudo, não existem trabalhos que relatem o efeito de doses tão baixas quanto as utilizadas neste estudo com relação a atividade da enzima MAO.

Além de seus efeitos sobre os neurotransmissores, dados da literatura mostram que a curcumina é capaz de interagir com o Fe, ligando-se a ele, e protegendo contra os efeitos decorrentes do excesso desse metal no SNC (DAIRAM *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2012). Da mesma maneira, a curcumina pode complexar-se com o Mn, exercendo função similar a superóxido dismutase na célula (EYBL *et al.*, 2006; KHUWAJA *et al.*, 2011). No presente estudo, a curcumina não gerou alteração nos níveis de Mn e Fe nas regiões do estriado e do hipocampo, logo, conclui-se que as alterações nos níveis de neurotransmissores não estão relacionadas a concentração desses metais nestas regiões. Porém, os dados obtidos não permitem maiores conclusões sobre os mecanismos de ação da curcumina, sendo que mais estudos são necessários.

### 6.3. Interação entre os tratamentos com manganês e curcumina

Os flavonóides são moléculas com atividade antioxidante bem estudada (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Estas moléculas competem pela ligação/oxidação com moléculas biológicas, impedindo que estas sofram oxidação (TAY; SILVA, DA; MING, 2013). No entanto, há também relatos de que estas moléculas apresentem efeito pró-oxidante (LAMBERT; SANG; YANG, 2007). Em estudo realizado com o polifenol epigallocatequina-3-galato em cultura celular, foi demonstrado que esta molécula é instável, podendo sofrer polimerização oxidativa, aumentando a produção de  $H_2O_2$  (HONG *et al.*, 2002; WEISBURG *et al.*, 2004). Além disso, o flavonóide quercetina também aumenta a peroxidação lipídica e o dano na molécula de DNA *in vitro*, apresentando claro efeito pró-oxidante (SAHU; GRAY, 1993).

A curcumina é capaz de diminuir a viabilidade de células A2780 (linhagem de células de carcinoma ovariano) quando combinada com metais de transição como Fe, cobre e zinco (LOU *et al.*, 2010). Além disso, a curcumina é capaz de ligar-se a molécula de cobre, e uma vez dentro da célula liberá-lo, agindo como um ionóforo, e aumentando assim, as concentrações de cobre livre dentro da célula, e consequentemente seus efeitos deletérios (LOU *et al.*, 2010).

No presente trabalho, foi visto que a curcumina em associação ao Mn foi capaz de gerar déficits na capacidade motora acurada sem, no entanto, alterar os níveis de Mn, Fe e de neurotransmissores na região do estriado. Isto mostra que a região do estriado é menos susceptível aos efeitos causados pela interação entre este flavonóide e os metais. Ou ainda, que a associação destes compostos pode ter efeito sobre outras vias relacionadas ao controle do movimento motor, antes de atingir a região do estriado.

Apesar de o Fe estar em maior concentração fisiológica na região dos núcleos da base, mediante situações de injúria, parece que o hipocampo é a primeira região onde este metal tende a se acumular de forma tóxica (LI *et al.*, 2012). Além disso, foi visto que em indivíduos idosos, há correlação positiva entre aumentos dos níveis circulantes de Fe e declínio na função cognitiva (UMUR *et al.*, 2011). Dessa maneira, o aumento nos níveis de Fe parece estar diretamente associado ao aparecimento de prejuízos de memória. Já níveis aumentados de Mn, também estão relacionados a declínio da capacidade cognitiva e de memória, além de diminuir a neurogênese na região do hipocampo, quando o Mn é administrado em ratos neonatos (CORDOVA *et al.*, 2012; OHISHI *et al.*, 2012).

No presente estudo, na região do hipocampo, foi demonstrado que os grupos que receberam Mn em associação com curcumina (500 e 1500 ppm) tiveram aumento significativo nas concentrações de Mn e Fe, quando comparado aos animais controle, bem como aos animais que receberam somente Mn sem a presença de curcumina. Dessa maneira, fica evidenciado um efeito sinérgico entre a curcumina e os metais Mn e Fe no hipocampo.

Sabe-se que no hipocampo, a 5-HT tem papel importantíssimo relacionado a ingestão alimentar, regulação do humor e memória (BERUMEN *et al.*, 2012). A 5-HT também está relacionada ao processo de reforço emocional, durante o processo de memorização (BERUMEN *et al.*, 2012). Já a dopamina no hipocampo está intimamente relacionada ao processo de memorização, uma vez que é essencial para a formação de memórias de longa duração e por ter papel fundamental na plasticidade neural durante o processo de aquisição de memória (LEMON; MANAHAN-VAUGHAN, 2006; SHOHAMY; ADCOCK, 2010). Os neurotransmissores são moléculas que podem sofrer oxidação, dando origem a metabólitos tóxicos, os quais podem comprometer a função celular (MUÑOZ *et al.*, 2012). No presente trabalho, os grupos que receberam Mn em associação com curcumina em ambas as doses, também tiveram diminuição significativa dos níveis de dopamina e 5-HT no hipocampo. Dessa maneira, a diminuição destes neurotransmissores, na região do hipocampo pode estar diretamente relacionada a diminuição da capacidade cognitiva e de memória dos animais que receberam Mn e curcumina. Além disso, é possível que a curcumina leve a diminuição dos neurotransmissores 5-HT e dopamina por induzir a oxidação dessas moléculas, uma vez que conforme citado previamente, os flavonóides podem ter efeitos pró-oxidantes (SAHU; GRAY, 1993). Dessa maneira, aparentemente o hipocampo mostra-se mais susceptível aos danos causados decorrentes do acúmulo excessivo de metais no SNC, do que o estriado. Novos experimentos são necessários para estudar os mecanismos envolvidos na interação entre a inalação de Mn e a ingestão de curcumina em tratamentos crônicos.

Assim, fica evidente um claro efeito sinérgico entre o flavonóide curcumina e ambos os metais de transição, Mn e Fe, em camundongos adultos, sendo que a região do hipocampo é a mais susceptível, uma vez que os efeitos sobre o acúmulo de metais e a diminuição dos níveis de neurotransmissores foi mais intensa nos grupos que receberam a curcumina juntamente com o Mn.

Além disso, uma possível explicação para o aumento dos níveis de Mn e Fe no hipocampo, bem como da diminuição dos níveis de

dopamina e serotonina, nos grupos que receberam Mn + curcumina, é que a curcumina aumente as concentrações de Fe e Mn nas células hipocâmpais, agindo talvez como uma molécula ionófora (LOU *et al.*, 2010). O acúmulo excessivo destes metais pode, então, levar a aumentos na oxidação/hidroilação de grupos catecol e fenol levando à diminuição nos níveis de neurotransmissores como dopamina e 5-HT.

Este não é o primeiro trabalho a demonstrar efeito sinérgico entre flavonóides e metais. Em estudo previamente realizado, foi visto que o flavonóide quercetina tem efeito sinérgico com o metilmercúrio (MeHg), em tratamento *in vivo*, realizado com camundongos adultos fêmeas, no qual o MeHg foi administrado via oral (40 mg/L *ad libitum*) e a quercetina foi dada via i.p. nas doses de 5 e 50mg/kg. Desta forma, o estudo previamente citado demonstrou que mesmo a menor dose de quercetina (5 mg/kg), quando administrada em conjunto com o MeHg, já era capaz de gerar déficits na capacidade motora e aumentar os níveis de peroxidação lipídica no cerebelo (Martins *et al.*, 2009).

Contudo, no presente estudo, é intrigante o fato de apenas a região do hipocampo ter apresentado alterações neuroquímicas, e não a região do estriado. Sendo que diversos trabalhos tenham demonstrado a eficiência do método de inalação aqui empregado, para causar déficits motores (ORDOÑEZ-LIBRADO *et al.*, 2008; SANCHEZ-BETANCOURT *et al.*, 2012). No entanto, as diferenças genéticas entre as linhagens de camundongos, bem como as diferentes idades entre os animais, como mencionado previamente, podem ter sido o fator determinante para as diferenças encontradas. Em estudos de modelos sobre doença de Huntington, por exemplo, a linhagem dos animais utilizados para o estudo, é determinante para o surgimento de danos estriatais, mesmo que os protocolos experimentais sejam idênticos (MCLIN; THOMPSON; STEWARD, 2006). O presente trabalho é o primeiro a demonstrar o efeito sinérgico entre o Mn e a curcumina.

Dessa maneira, pode-se concluir que em camundongos *Swiss* adultos jovens, o modelo de inalação da mistura de Mn é mais efetivo em causar danos na região do hipocampo, relacionados a prejuízos cognitivos e de memória. A região do estriado não foi afetada pelo tratamento nas doses e no tempo de tratamento aqui utilizados, não sendo possível associar os déficits motores a alterações no estriado. Além disso, o modelo utilizado no presente trabalho, parece ser promissor para o estudo da DP, podendo ser associado a outro modelo (droga), utilizando ambos em doses subtóxicas, de modo a investigar efeitos tanto na parte cognitiva e de memória, como na parte motora.



## 7. CONCLUSÕES

- O tratamento por via inalatória da mistura de  $\text{MnCl}_2$  (40 mM) +  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (20 mM) **foi capaz** de gerar:
  - Déficit locomotor moderado no teste do *single pellet*, mas não no teste do *beam walking* ou no teste do campo aberto;
  - Déficit de memória de curta e de longa duração no teste de esquivas inibitórias do tipo *step down*;
  - Aumentar em ~200% os níveis de serotonina no hipocampo;
- O tratamento por via inalatória da mistura de  $\text{MnCl}_2$  (40 mM) +  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (20 mM) **não foi capaz** de :
  - Gerar déficits cognitivos no teste do reconhecimento do objeto;
  - Alterar a capacidade olfatória no teste de discriminação olfatória, bem como gerar déficits em comportamentos motores não-refinados em camundongos *Swiss* adultos.
  - Alterar a atividade das enzimas antioxidantes GR e GPx;
  - Alterar os níveis de Fe e de Mn no estriado e no hipocampo;
  - Alterar o imunoconteúdo de TH no estriado;
  - Alterar os níveis de dopamina e serotonina no estriado e dopamina no hipocampo;
- O tratamento com curcumina, quando fornecida na ração, **produziu** vários efeitos adversos:
  - Déficit motor no teste do *single pellet* nas concentrações de 500 e 1500 ppm;
  - Prejuízo na memória de curto prazo nas concentrações de 500 e 1500 ppm e de longo prazo na concentração de 1500 ppm;

- Diminuir os níveis de dopamina no hipocampo na concentração de 500ppm;
  - Aumentar os níveis de serotonina no hipocampo na concentração de 1500 ppm;
- Houve interação ou efeito sinérgico entre o tratamento de Mn por via inalatória e de curcumina fornecida na ração:
  - No acúmulo de Mn e Fe no hipocampo nas concentrações de 500 e 1500 ppm. Os níveis de Fe e Mn aumentaram cerca de 200 % no tratamento combinado de Mn e curcumina, nas duas concentrações testadas;
  - Na queda dos níveis de dopamina no hipocampo nas concentrações de curcumina de 500 e 1500 ppm;
  - Na queda dos níveis de serotonina no hipocampo nas concentrações de 500 e 1500 ppm. O aumento nos níveis de serotonina causado pelo tratamento com Mn foi completamente bloqueado pelo tratamento com curcumina.
- O presente trabalho:
  - Reproduziu de forma leve, os efeitos comportamentais similares aos observados na fase inicial da DP (déficit cognitivo e de memória e dificuldade de realizar movimentos motores acurados), através do tratamento crônico com Mn por via inalatória em camundongos *Swiss* jovens. Contudo, neste modelo, provavelmente, os efeitos observados são decorrentes de alterações no hipocampo e não no estriado.
  - Demonstrou que o tratamento prolongado com curcumina adicionada a ração é capaz de apresentar alguns efeitos adversos (prejuízo motor e de memória e alteração nos níveis de neurotransmissores dopamina e serotonina no hipocampo);
  - Demonstrou que a combinação de curcumina e Mn produziu efeito sinérgico, mas ao contrário do que se

esperava, produziu vários efeitos adversos (acúmulo de Mn e Fe no hipocampo, alterações nos níveis de neurotransmissores no hipocampo).

## 8 REFERÊNCIAS

ADLER, C. H. Premotor symptoms and early diagnosis of Parkinson's disease. **The International journal of neuroscience**, v. 121 Suppl 2, p. 3–8, 2011.

AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, v. 23, n. 1A, p. 363–398, fev. 2003.

ALBIN, R. L.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends in neurosciences**, v. 12, n. 10, p. 366–375, out. 1989.

ALI, S. F. *et al.* Manganese-induced reactive oxygen species: Comparison between Mn<sup>+2</sup> and Mn<sup>+3</sup>. **Neurodegeneration**, v. 4, n. 3, p. 329–334, set. 1995.

ALMEIDA, E. A. *et al.* Effects of trace metal and exposure to air on serotonin and dopamine levels in tissues of the mussel *Perna perna*. **Marine pollution bulletin**, v. 46, n. 11, p. 1485–1490, nov. 2003.

AMMON, H. P.; WAHL, M. A. Pharmacology of *Curcuma longa*. **Planta Medica**, v. 57, n. 1, p. 1–7, fev. 1991.

ANAND, P. *et al.* Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, dez. 2007.

ARAÚJO, C. C.; LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 723–728, jul. 2001.

ARCHIBALD, F. S.; TYREE, C. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 256, n. 2, p. 638–650, 1 ago. 1987.

ARUN, N.; NALINI, N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. **Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 57, n. 1, p. 41–52, 2002.

ASAI, A.; MIYAZAWA, T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. **Life Sciences**, v. 67, n. 23, p. 2785–2793, 27 out. 2000.

ASCHNER, M. *et al.* Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 221, n. 2, p. 131–147, 1 jun. 2007.

ASCHNER, M.; ERIKSON, K. M.; DORMAN, D. C. Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 1–32, jan. 2005.

ASCHNER, M.; GANNON, M. Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier: saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. **Brain research bulletin**, v. 33, n. 3, p. 345–349, 1994.

ASCHNER, M.; GANNON, M.; KIMELBERG, H. K. Manganese uptake and efflux in cultured rat astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 58, n. 2, p. 730–735, fev. 1992.

ASCHNER, M.; VRANA, K. E.; ZHENG, W. Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS). **Neurotoxicology**, v. 20, n. 2-3, p. 173–180, jun. 1999.

ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behavioural brain research**, v. 204, n. 1, p. 206–211, 1 dez. 2009.

AU, C.; BENEDETTO, A.; ASCHNER, M. Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 4, p. 569–576, jul. 2008.

AVILA, D. S. *et al.* Involvement of striatal lipid peroxidation and inhibition of calcium influx into brain slices in neurobehavioral alterations in a rat model of short-term oral exposure to manganese. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 6, p. 1062–1068, nov. 2008.

BABU, P. S.; SRINIVASAN, K. Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced

diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 166, n. 1-2, p. 169–175, jan. 1997.

BARBEAU, A. Manganese and extrapyramidal disorders (a critical review and tribute to Dr. George C. Cotzias). **Neurotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 13–35, 1984.

BARONE, P. *et al.* The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 24, n. 11, p. 1641–1649, 15 ago. 2009.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neuroscience: Exploring the Brain**. [S.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

BEARD, J. L. *et al.* Altered monamine metabolism in caudate-putamen of iron-deficient rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 48, n. 3, p. 621–624, jul. 1994.

BERUMEN, L. C. *et al.* Serotonin Receptors in Hippocampus. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

BETHARIA, S.; MAHER, T. J. Neurobehavioral effects of lead and manganese individually and in combination in developmentally exposed rats. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 5, p. 1117–1127, out. 2012.

BILLETT, E. E. Monoamine oxidase (MAO) in human peripheral tissues. **Neurotoxicology**, v. 25, n. 1-2, p. 139–148, jan. 2004.

BINDA, C. *et al.* Lights and shadows on monoamine oxidase inhibition in neuroprotective pharmacological therapies. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 22, p. 2788–2796, nov. 2011.

BLECHARZ-KLIN, K. *et al.* Effect of intranasal manganese administration on neurotransmission and spatial learning in rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 265, n. 1, p. 1–9, 15 nov. 2012.

BONILLA, E.; PRASAD, A. L. Effects of chronic manganese intake on the levels of biogenic amines in rat brain regions. **Neurobehavioral Toxicology and Teratology**, v. 6, n. 5, p. 341–344, out. 1984.

BOUCHARD, M. *et al.* Hair manganese and hyperactive behaviors: pilot study of school-age children exposed through tap water. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 1, p. 122–127, jan. 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio. 1976.

BURDO, J. R. *et al.* Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. **Journal of Neuroscience Research**, v. 66, n. 6, p. 1198–1207, 15 dez. 2001.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 79–110, 1989.

CALNE, D. B. *et al.* Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. **Neurology**, v. 44, n. 9, p. 1583–1586, set. 1994.

CAPRA, J. C. *et al.* Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 643, n. 2-3, p. 232–238, 25 set. 2010.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484–490, 1985.

CHANG, Y. *et al.* Altered working memory process in the manganese-exposed brain. **NeuroImage**, v. 53, n. 4, p. 1279–1285, dez. 2010.

CHEN, J. Y. *et al.* Differential cytotoxicity of Mn(II) and Mn(III): special reference to mitochondrial [Fe-S] containing enzymes. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 175, n. 2, p. 160–168, 1 set. 2001.

CHENG, A. L. *et al.* Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Research**, v. 21, n. 4B, p. 2895–2900, ago. 2001.

CHTOUROU, Y. *et al.* Improvement of cerebellum redox states and cholinergic functions contribute to the beneficial effects of silymarin against manganese-induced neurotoxicity. **Neurochemical research**, v. 37, n. 3, p. 469–479, mar. 2012.

COLE, G. M.; TETER, B.; FRAUTSCHY, S. A. Neuroprotective effects of curcumin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 595, p. 197–212, 2007.

CORDOVA, F. M. *et al.* In vivo manganese exposure modulates Erk, Akt and Darpp-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function. **PLoS one**, v. 7, n. 3, p. e33057, 2012.

CROWE, A.; MORGAN, E. H. Iron and transferrin uptake by brain and cerebrospinal fluid in the rat. **Brain research**, v. 592, n. 1-2, p. 8–16, 2 out. 1992.

DAIRAM, A. *et al.* Antioxidant and iron-binding properties of curcumin, capsaicin, and S-allylcysteine reduce oxidative stress in rat brain homogenate. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3350–3356, 14 maio. 2008.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601–623, abr. 2006.

DEODHAR, S. D.; SETHI, R.; SRIMAL, R. C. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). **The Indian Journal of Medical Research**, v. 71, p. 632–634, abr. 1980.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of Hypertension**, v. 18, n. 6, p. 655–673, jun. 2000.

DIKSHIT, M. *et al.* Prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin & quinidine in the cat heart. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 101, p. 31–35, jan. 1995.

DONALDSON, J.; LABELLA, F. S.; GESSER, D. Enhanced autoxidation of dopamine as a possible basis of manganese neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 2, n. 1, p. 53–64, jan. 1981.



DONG, S. *et al.* Curcumin enhances neurogenesis and cognition in aged rats: implications for transcriptional interactions related to growth and synaptic plasticity. **PLoS one**, v. 7, n. 2, p. e31211, 2012.

DU, X.-X. *et al.* Curcumin protects nigral dopaminergic neurons by iron-chelation in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience bulletin**, v. 28, n. 3, p. 253–258, jun. 2012.

DUBOIS, B.; PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **Journal of neurology**, v. 244, n. 1, p. 2–8, jan. 1997.

DUKHANDE, V. V. *et al.* Manganese-induced neurotoxicity is differentially enhanced by glutathione depletion in astrocytoma and neuroblastoma cells. **Neurochemical Research**, v. 31, n. 11, p. 1349–1357, nov. 2006.

DUNKLEY, P. R. *et al.* Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. **Journal of neurochemistry**, v. 91, n. 5, p. 1025–1043, dez. 2004.

DUVOIX, A. *et al.* Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. **Cancer Letters**, v. 223, n. 2, p. 181–190, 8 jun. 2005.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435–451, maio. 2004.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, p. 88–95, jul. 1961.

ERIKSON, K. M. *et al.* Regional brain iron, ferritin and transferrin concentrations during iron deficiency and iron repletion in developing rats. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 10, p. 2030–2038, out. 1997.

ERIKSON, K. M. *et al.* Manganese accumulates in iron-deficient rat brain regions in a heterogeneous fashion and is associated with neurochemical alterations. **Biological trace element research**, v. 87, n. 1-3, p. 143–156, 2002.

ERIKSON, K. M. *et al.* Manganese accumulation in striatum of mice exposed to toxic doses is dependent upon a functional dopamine

transporter. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 390–394, nov. 2005.

ERIKSON, K. M. *et al.* Duration of airborne-manganese exposure in rhesus monkeys is associated with brain regional changes in biomarkers of neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 3, p. 377–385, maio. 2008.

ERIKSON, K. M.; ASCHNER, M. Increased manganese uptake by primary astrocyte cultures with altered iron status is mediated primarily by divalent metal transporter. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 1, p. 125–130, jan. 2006.

ERIKSSON, H. *et al.* Effects of manganese oxide on monkeys as revealed by a combined neurochemical, histological and neurophysiological evaluation. **Archives of Toxicology**, v. 61, n. 1, p. 46–52, 1987.

EYBL, V. *et al.* The influence of curcumin and manganese complex of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements status in tissues of mice. **Journal of applied toxicology: JAT**, v. 26, n. 3, p. 207–212, jun. 2006.

FARR, T. D.; WHISHAW, I. Q. Quantitative and qualitative impairments in skilled reaching in the mouse (*Mus musculus*) after a focal motor cortex stroke. **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 33, n. 7, p. 1869–1875, jul. 2002.

FINKELSTEIN, Y.; MILATOVIC, D.; ASCHNER, M. Modulation of cholinergic systems by manganese. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 5, p. 1003–1014, set. 2007.

FITSANAKIS, V. A. *et al.* Putative proteins involved in manganese transport across the blood-brain barrier. **Human & Experimental Toxicology**, v. 26, n. 4, p. 295–302, abr. 2007.

FRAUTSCHY, S. A. *et al.* Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology. **Neurobiology of aging**, v. 22, n. 6, p. 993–1005, dez. 2001.

GALARIS, D.; SKIADA, V.; BARBOUTI, A. Redox signaling and cancer: the role of “labile” iron. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 21–29, 18 jul. 2008.

GARCEA, G. *et al.* Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 5, p. 1011–1015, 8 mar. 2004.

GONÇALVES, A. E. *et al.* The antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: Evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. **European Journal of Pharmacology**, 12 nov. 2011.

GONZALEZ-ZULUETA, M. *et al.* Manganese superoxide dismutase protects nNOS neurons from NMDA and nitric oxide-mediated neurotoxicity. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 2040–2055, 15 mar. 1998.

GRÜNECKER, B. *et al.* Regional specificity of manganese accumulation and clearance in the mouse brain: implications for manganese-enhanced MRI. **NMR in biomedicine**, 20 nov. 2012.

GUNTER, K. K. *et al.* Determining the oxidation states of manganese in NT2 cells and cultured astrocytes. **Neurobiology of Aging**, v. 27, n. 12, p. 1816–1826, dez. 2006.

GWIAZDA, R.; LUCCHINI, R.; SMITH, D. Adequacy and consistency of animal studies to evaluate the neurotoxicity of chronic low-level manganese exposure in humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**, v. 70, n. 7, p. 594–605, 1 abr. 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 edition ed. Oxford, UK: Clarendon Press, 2007.

HAMAI, D.; BONDY, S. C. Oxidative basis of manganese neurotoxicity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, p. 129–141, mar. 2004.

HARDY, G. Manganese in parenteral nutrition: who, when, and why should we supplement? **Gastroenterology**, v. 137, n. 5 Suppl, p. S29–35, nov. 2009.

HEATH, D. D. *et al.* Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 783, n. 1, p. 287–295, 5 jan. 2003.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, out. 2002.

HISERODT, R. *et al.* Characterization of powdered turmeric by liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 740, n. 1, p. 51–63, 26 jul. 1996.

HONG, J. *et al.* Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. **Cancer research**, v. 62, n. 24, p. 7241–7246, 15 dez. 2002.

HUANG, H.-C. *et al.* Dual effects of curcumin on neuronal oxidative stress in the presence of Cu(II). **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 49, n. 7, p. 1578–1583, jul. 2011.

HURLEY, M. J.; JENNER, P. What has been learnt from study of dopamine receptors in Parkinson's disease? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 3, p. 715–728, set. 2006.

HWANG, S.-L.; SHIH, P.-H.; YEN, G.-C. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 4, p. 877–885, 1 fev. 2012.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**, 2002.

IRESON, C. *et al.* Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. **Cancer Research**, v. 61, n. 3, p. 1058–1064, 1 fev. 2001.

JACKSON, G. M.; JACKSON, S. R.; HINDLE, J. V. The control of bimanual reach-to-grasp movements in hemiparkinsonian patients. **Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale**, v. 132, n. 3, p. 390–398, jun. 2000.

JAGATHA, B. *et al.* Curcumin treatment alleviates the effects of glutathione depletion in vitro and in vivo: therapeutic implications for Parkinson's disease explained via in silico studies. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, n. 5, p. 907–917, 1 mar. 2008.

JAQUES, J. A. D. S. *et al.* Free and nanoencapsulated curcumin prevents cigarette smoke-induced cognitive impairment and redox imbalance. **Neurobiology of learning and memory**, v. 100C, p. 98–107, fev. 2013.

JAQUES, J. A. DOS S. *et al.* Curcumin protects against cigarette smoke-induced cognitive impairment and increased acetylcholinesterase activity in rats. **Physiology & behavior**, v. 106, n. 5, p. 664–669, 16 jul. 2012.

JELLINGER, K. A. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. **Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid**, v. 14, n. 3, p. 153–197, jun. 1991.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 53 Suppl 3, p. S26–36; discussion S36–38, 2003.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865–1879, out. 2006.

JORDAN, W. C.; DREW, C. R. Curcumin--a natural herb with anti-HIV activity. **Journal of the National Medical Association**, v. 88, n. 6, p. 333, jun. 1996.

JYOTI, A.; SETHI, P.; SHARMA, D. Curcumin protects against electrobehavioral progression of seizures in the iron-induced experimental model of epileptogenesis. **Epilepsy & behavior: E&B**, v. 14, n. 2, p. 300–308, fev. 2009.

KATSOYIANNIS, I. A.; KATSOYIANNIS, A. A. Arsenic and other metal contamination of groundwaters in the industrial area of Thessaloniki, Northern Greece. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 123, n. 1-3, p. 393–406, dez. 2006.

KAWATA, F. [Studies on monoamine metabolism in the rat brain with overdosage of manganese]. **Nihon hōigaku zasshi = The Japanese journal of legal medicine**, v. 44, n. 2, p. 137–146, abr. 1990.

KEEN, C. L.; ENSUNSA, J. L.; CLEGG, M. S. Manganese metabolism in animals and humans including the toxicity of manganese. **Metal Ions in Biological Systems**, v. 37, p. 89–121, 2000.

KHUWAJA, G. *et al.* Neuroprotective effects of curcumin on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: behavioral, neurochemical and immunohistochemical studies. **Brain research**, v. 1368, p. 254–263, 12 jan. 2011.

KIM, M.-K.; CHOI, G.-J.; LEE, H.-S. Fungicidal property of Curcuma longa L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1578–1581, 12 mar. 2003.

KISO, Y. *et al.* Antihepatotoxic principles of Curcuma longa rhizomes. **Planta Medica**, v. 49, n. 3, p. 185–187, nov. 1983.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 239–267, 2004.

KOMURA, J.; SAKAMOTO, M. Effects of manganese forms on biogenic amines in the brain and behavioral alterations in the mouse:

long-term oral administration of several manganese compounds. **Environmental Research**, v. 57, n. 1, p. 34–44, fev. 1992.

KONTUR, P. J.; FECHTER, L. D. Brain regional manganese levels and monoamine metabolism in manganese-treated neonatal rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 10, n. 4, p. 295–303, jul. 1988.

KULKARNI, S. K.; BHUTANI, M. K.; BISHNOI, M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system. **Psychopharmacology**, v. 201, n. 3, p. 435–442, dez. 2008.

KUMAR, A.; DOGRA, S.; PRAKASH, A. Protective effect of curcumin (*Curcuma longa*), against aluminium toxicity: Possible behavioral and biochemical alterations in rats. **Behavioural brain research**, v. 205, n. 2, p. 384–390, 28 dez. 2009.

KWIK-URIBE, C.; SMITH, D. R. Temporal responses in the disruption of iron regulation by manganese. **Journal of Neuroscience Research**, v. 83, n. 8, p. 1601–1610, jun. 2006.

LAI, J. C.; LEUNG, T. K.; LIM, L. Differences in the neurotoxic effects of manganese during development and aging: some observations on brain regional neurotransmitter and non-neurotransmitter metabolism in a developmental rat model of chronic manganese encephalopathy. **Neurotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 37–47, 1984.

LAMBERT, J. D.; ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 501, n. 1, p. 65–72, 1 set. 2010.

LAMBERT, J. D.; SANG, S.; YANG, C. S. Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. **Chemical research in toxicology**, v. 20, n. 4, p. 583–585, abr. 2007.

LEBDA, M. A.; EL-NEWESHY, M. S.; EL-SAYED, Y. S. Neurohepatic toxicity of subacute manganese chloride exposure and potential chemoprotective effects of lycopene. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 1, p. 98–104, jan. 2012.

LEMON, N.; MANAHAN-VAUGHAN, D. Dopamine D1/D5 Receptors Gate the Acquisition of Novel Information through Hippocampal Long-Term Potentiation and Long-Term Depression. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 29, p. 7723–7729, 19 jul. 2006.

LESCH, K. P. *et al.* Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. **Science (New York, N.Y.)**, v. 274, n. 5292, p. 1527–1531, 29 nov. 1996.

LESCH, K.-P. *et al.* Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2426–2443, 5 set. 2012.

LI, Y. *et al.* Disrupted iron metabolism and ensuing oxidative stress may mediate cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion. **Biological trace element research**, v. 150, n. 1-3, p. 242–248, dez. 2012.

LIAPI, C. *et al.* Effects of short-term exposure to manganese on the adult rat brain antioxidant status and the activities of acetylcholinesterase, (Na,K)-ATPase and Mg-ATPase: modulation by L-cysteine. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 103, n. 2, p. 171–175, ago. 2008.

LIM, G. P. *et al.* The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 21, p. 8370–8377, 1 nov. 2001.

LOU, J. R. *et al.* Transient metals enhance cytotoxicity of curcumin: potential involvement of the NF-kappaB and mTOR signaling pathways. **Anticancer research**, v. 30, n. 9, p. 3249–3255, set. 2010.

MAHADY, G. B. *et al.* Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. **Anticancer Research**, v. 22, n. 6C, p. 4179–4181, dez. 2002.



MAHER, P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. **Ageing Research Reviews**, v. 4, n. 2, p. 288–314, maio. 2005.

MALECKI, E. A. *et al.* Existing and emerging mechanisms for transport of iron and manganese to the brain. **Journal of neuroscience research**, v. 56, n. 2, p. 113–122, 15 abr. 1999.

MANIKANDAN, P. *et al.* Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 10, p. 1967–1980, out. 2004.

MARGINA, D. *et al.* Quercetin and epigallocatechin gallate effects on the cell membranes biophysical properties correlate with their antioxidant potential. **General physiology and biophysics**, v. 31, n. 1, p. 47–55, mar. 2012.

MARTIN, C. J. Manganese neurotoxicity: connecting the dots along the continuum of dysfunction. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 3, p. 347–349, maio. 2006.

MARTINEZ-GALISTEO, E. *et al.* Characterization of mammalian thioredoxin reductase, thioredoxin and glutaredoxin by immunochemical methods. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 111, n. 1, p. 17–25, maio. 1995.

MARTINEZ-MARTIN, P. *et al.* Prevalence of nonmotor symptoms in Parkinson's disease in an international setting; study using nonmotor symptoms questionnaire in 545 patients. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 22, n. 11, p. 1623–1629, 15 ago. 2007.

MARTINS, R. DE P. *et al.* Synergistic neurotoxicity induced by methylmercury and quercetin in mice. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 47, n. 3, p. 645–649, mar. 2009.

MCCORD, J. M. Iron- and manganese-containing superoxide dismutases: structure, distribution, and evolutionary relationships. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 74, p. 540–550, 1976.

MCLIN, J. P.; THOMPSON, L. M.; STEWARD, O. Differential susceptibility to striatal neurodegeneration induced by quinolinic acid and kainate in inbred, outbred and hybrid mouse strains. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 3134–3140, 2006.

MENA, I. *et al.* Chronic manganese poisoning. Clinical picture and manganese turnover. **Neurology**, v. 17, n. 2, p. 128–136, fev. 1967.

MENON, L. G.; KUTTAN, R.; KUTTAN, G. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. **Cancer Letters**, v. 141, n. 1-2, p. 159–165, 1 jul. 1999.

MERGLER, D. Neurotoxic effects of low level exposure to manganese in human populations. **Environmental research**, v. 80, n. 2 Pt 1, p. 99–102, fev. 1999.

MILATOVIC, D. *et al.* Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 240, n. 2, p. 219–225, 15 out. 2009.

MILATOVIC, D. *et al.* Protective effects of antioxidants and anti-inflammatory agents against manganese-induced oxidative damage and neuronal injury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 13 jun. 2011.

MOLLENHAUER, B.; ZHANG, J. Biochemical premotor biomarkers for Parkinson's disease. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 27, n. 5, p. 644–650, 15 abr. 2012.

MONTES, S. *et al.* Striatal manganese accumulation induces changes in dopamine metabolism in the cirrhotic rat. **Brain Research**, v. 891, n. 1-2, p. 123–129, 9 fev. 2001.

MORELLO, M. *et al.* Sub-cellular localization of manganese in the basal ganglia of normal and manganese-treated rats. An electron spectroscopy imaging and electron energy-loss spectroscopy study. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 1, p. 60–72, jan. 2008.

MORENO, J. A. *et al.* Age-dependent susceptibility to manganese-induced neurological dysfunction. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 112, n. 2, p. 394–404, dez. 2009.

MUÑOZ, P. *et al.* Dopamine oxidation and autophagy. **Parkinson's disease**, v. 2012, p. 920953, 2012.

MURAI, T. *et al.* Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. **Physiology & behavior**, v. 90, n. 1, p. 116–124, 30 jan. 2007.

MUSLIMOVIC, D. *et al.* Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease. **Neurology**, v. 65, n. 8, p. 1239–1245, 25 out. 2005.

MYERS, J. E. *et al.* Nervous system effects of occupational manganese exposure on South African manganese mineworkers. **Neurotoxicology**, v. 24, n. 4-5, p. 649–656, ago. 2003.

MYERS, J. E. *et al.* Estimating the prevalence of clinical manganism using a cascaded screening process in a South African manganese smelter. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 6, p. 934–940, nov. 2009.

NAKASHIMA, A. *et al.* Role of N-terminus of tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of catecholamines. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 116, n. 11, p. 1355–1362, nov. 2009.

NIRMALA, C.; PUVANAKRISHNAN, R. Protective role of curcumin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 159, n. 2, p. 85–93, 21 jun. 1996.

NORMANDIN, L. *et al.* Manganese distribution in the brain and neurobehavioral changes following inhalation exposure of rats to three chemical forms of manganese. **Neurotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 433–441, mar. 2004.

NORMANDIN, L.; HAZELL, A. S. Manganese neurotoxicity: an update of pathophysiologic mechanisms. **Metabolic Brain Disease**, v. 17, n. 4, p. 375–387, dez. 2002.

NOVO, E.; PAROLA, M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 1, n. 1, p. 5, 2008.

NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Turmeric Oleoresin (CAS No. 8024-37-1) (Major Component 79%-85% Curcumin, CAS

No. 458-37-7) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). **National Toxicology Program Technical Report Series**, v. 427, p. 1–275, ago. 1993.

OHISHI, T. *et al.* Reversible aberration of neurogenesis affecting late-stage differentiation in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to manganese chloride. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 34, n. 3, p. 408–419, nov. 2012.

OLANOW, C. W. *et al.* Manganese intoxication in the rhesus monkey: a clinical, imaging, pathologic, and biochemical study. **Neurology**, v. 46, n. 2, p. 492–498, fev. 1996.

ORDOÑEZ-LIBRADO, J. L. *et al.* Inhalation of divalent and trivalent manganese mixture induces a Parkinson's disease model: immunocytochemical and behavioral evidences. **Neuroscience**, v. 155, n. 1, p. 7–16, 31 jul. 2008.

ORDOÑEZ-LIBRADO, J. L. *et al.* Inhalation of divalent and trivalent manganese mixture induces a Parkinson's disease model: immunocytochemical and behavioral evidences. **Neuroscience**, v. 155, n. 1, p. 7–16, 31 jul. 2008.

PAN, M. H.; HUANG, T. M.; LIN, J. K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 27, n. 4, p. 486–494, abr. 1999.

PAPPAS, B. A. *et al.* Perinatal manganese exposure: Behavioral, neurochemical, and histopathological effects in the rat. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 19, n. 1, p. 17–25, jan. 1997.

PARK, H. Y.; KIM, G.-Y.; CHOI, Y. H. Naringenin attenuates the release of pro-inflammatory mediators from lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by inactivating nuclear factor- $\kappa$ B and inhibiting mitogen-activated protein kinases. **International journal of molecular medicine**, v. 30, n. 1, p. 204–210, jul. 2012.

PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J.; SANTOS-BUELGA, C. The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the

biological activity of flavonoids. **Journal of the science of food and agriculture**, 4 maio. 2012.

PERL, D. P.; OLANOW, C. W. The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 66, n. 8, p. 675–682, ago. 2007.

PIÑERO, D. J. *et al.* Variations in dietary iron alter brain iron metabolism in developing rats. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 2, p. 254–263, fev. 2000.

PREDIGER, R. D. S. *et al.* Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 465–473, 8 dez. 2008.

PREDIGER, R. D. S. *et al.* Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotoxicity research**, v. 17, n. 2, p. 114–129, fev. 2010.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiology of aging**, v. 26, n. 6, p. 957–964, jun. 2005.

RABIN, O. *et al.* Rapid brain uptake of manganese(II) across the blood-brain barrier. **Journal of neurochemistry**, v. 61, n. 2, p. 509–517, ago. 1993.

RAMASWAMY, T. S.; BANERJEE, B. N. Vegetable dyes as antioxidants for vegetable oils. **Annals of Biochemistry and Experimental Medicine**, v. 8, n. 1-2, p. 55–68, fev. 1948.

REANEY, S. H.; KWIK-URIBE, C. L.; SMITH, D. R. Manganese oxidation state and its implications for toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 9, p. 1119–1126, set. 2002.

REDDY, R. C. *et al.* Curcumin for malaria therapy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, n. 2, p. 472–474, 14 jan. 2005.

REYES-GORDILLO, K. *et al.* Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF-kappaB, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 6, p. 989–996, jun. 2007.

RIGOULET, M.; YOBOUE, E. D.; DEVIN, A. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 3, p. 459–468, 1 fev. 2011.

RIVERA-MANCÍA, S.; RÍOS, C.; MONTES, S. Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies. **Biomaterials: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine**, v. 24, n. 5, p. 811–825, out. 2011.

RODIER, J. Manganese poisoning in Moroccan miners. **British journal of industrial medicine**, v. 12, n. 1, p. 21–35, jan. 1955.

ROELS, H. *et al.* Influence of the route of administration and the chemical form (MnCl<sub>2</sub>, MnO<sub>2</sub>) on the absorption and cerebral distribution of manganese in rats. **Archives of toxicology**, v. 71, n. 4, p. 223–230, 1997.

ROSE, C. *et al.* Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. **Gastroenterology**, v. 117, n. 3, p. 640–644, set. 1999.

ROTH, J. A.; GARRICK, M. D. Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 1–13, 1 jul. 2003.

RUBY, A. J. *et al.* Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. **Cancer Letters**, v. 94, n. 1, p. 79–83, 20 jul. 1995.

SAHU, S. C.; GRAY, G. C. Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. **Cancer Letters**, v. 70, n. 1–2, p. 73–79, 15 jun. 1993.

SANCHEZ-BETANCOURT, J. *et al.* Manganese mixture inhalation is a reliable Parkinson disease model in rats. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 5, p. 1346–1355, out. 2012.

SANTAMARIA, A. B. *et al.* State-of-the-science review: Does manganese exposure during welding pose a neurological risk? **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews**, v. 10, n. 6, p. 417–465, dez. 2007.

SANTOS, D. *et al.* The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain. **Toxicology**, v. 292, n. 2-3, p. 90–98, 26 fev. 2012.

SAYRE, L. M.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 721–738, jun. 2001.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191–1212, 1 jun. 2001.

SCHNEIDER, J. S. *et al.* Effects of chronic manganese exposure on cognitive and motor functioning in non-human primates. **Brain research**, v. 1118, n. 1, p. 222–231, 6 nov. 2006.

SCHNEIDER, J. S. *et al.* Effects of chronic manganese exposure on working memory in non-human primates. **Brain research**, v. 1258, p. 86–95, 3 mar. 2009.

SERAFINI, M. *et al.* Plasma antioxidants from chocolate. **Nature**, v. 424, n. 6952, p. 1013, 28 ago. 2003.

SETHI, P. *et al.* Curcumin attenuates aluminium-induced functional neurotoxicity in rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 93, n. 1, p. 31–39, jul. 2009.

SHARMA, O. P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. **Biochemical Pharmacology**, v. 25, n. 15, p. 1811–1812, 1 ago. 1976.

SHOHAMY, D.; ADCOCK, R. A. Dopamine and adaptive memory. **Trends in cognitive sciences**, v. 14, n. 10, p. 464–472, out. 2010.

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, n. 3, p. 286–296, maio. 2007.

SOFFIÉ, M.; LAMBERTY, Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: Possible interaction with olfactory sensitivity. **Behavioural Processes**, v. 17, n. 3, p. 181–190, set. 1988.

SRIVASTAVA, R. *et al.* Anti-thrombotic effect of curcumin. **Thrombosis Research**, v. 40, n. 3, p. 413–417, 1 nov. 1985.

STANWOOD, G. D. *et al.* Manganese exposure is cytotoxic and alters dopaminergic and GABAergic neurons within the basal ganglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, n. 1, p. 378–389, jul. 2009.

STOKES, A. H. *et al.* Dopamine toxicity in neuroblastoma cells: role of glutathione depletion by L-BSO and apoptosis. **Brain Research**, v. 858, n. 1, p. 1–8, 6 mar. 2000.

STREDRICK, D. L. *et al.* Manganese-induced cytotoxicity in dopamine-producing cells. **Neurotoxicology**, v. 25, n. 4, p. 543–553, jun. 2004.

SUGIYAMA, Y.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Involvement of the beta-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, n. 4, p. 519–525, 23 ago. 1996.

SWICK, T. J. Parkinson's Disease and Sleep/Wake Disturbances. **Parkinson's Disease**, v. 2012, 2012.

TAKEDA, A. Manganese action in brain function. **Brain Research Reviews**, v. 41, n. 1, p. 79–87, jan. 2003.

TAY, W. M.; SILVA, G. F. Z. DA; MING, L.-J. Metal Binding of Flavonoids and Their Distinct Inhibition Mechanisms Toward the Oxidation Activity of Cu(2+)- $\beta$ -Amyloid: Not Just Serving as Suicide Antioxidants! **Inorganic chemistry**, v. 52, n. 2, p. 679–690, 18 jan. 2013.



TAYLOR, M. D. *et al.* Effects of inhaled manganese on biomarkers of oxidative stress in the rat brain. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 5, p. 788–797, set. 2006.

THIYAGARAJAN, M.; SHARMA, S. S. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. **Life Sciences**, v. 74, n. 8, p. 969–985, 9 jan. 2004.

TOLARDO, R. *et al.* Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 63–70, 2 mar. 2010.

TOMREN, M. A. *et al.* Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: stability, activity and complexation with cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, n. 1-2, p. 27–34, 29 jun. 2007.

TØNNESEN, H. H. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions. Studies of curcumin and curcuminoids, XXVIII. **Die Pharmazie**, v. 57, n. 12, p. 820–824, dez. 2002.

TORRENTE, M.; COLOMINA, M. T.; DOMINGO, J. L. Behavioral effects of adult rats concurrently exposed to high doses of oral manganese and restraint stress. **Toxicology**, v. 211, n. 1-2, p. 59–69, 1 jul. 2005.

TORRES-AGUSTÍN, R. *et al.* Effect of environmental manganese exposure on verbal learning and memory in Mexican children. **Environmental research**, 6 nov. 2012.

UMUR, E. E. *et al.* Increased iron and oxidative stress are separately related to cognitive decline in elderly. **Geriatrics & gerontology international**, v. 11, n. 4, p. 504–509, out. 2011.

USHIO-FUKAI, M.; NAKAMURA, Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 37–52, 18 jul. 2008.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VENKATESAN, N. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, n. 3, p. 425–427, jun. 1998.

VENKATESAN, N. Pulmonary protective effects of curcumin against paraquat toxicity. **Life Sciences**, v. 66, n. 2, p. PL21–28, 2000.

VENKATESAN, N.; PUNITHAVATHI, D.; ARUMUGAM, V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 2, p. 231–234, jan. 2000.

VEZÉR, T. *et al.* Behavioral and neurotoxicological effects of subchronic manganese exposure in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 797–810, maio. 2005.

WANG, Y. J. *et al.* Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 12, p. 1867–1876, ago. 1997.

WEDLER, F. C.; DENMAN, R. B. Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain. **Current Topics in Cellular Regulation**, v. 24, p. 153–169, 1984.

WEISBERG, S. P.; LEIBEL, R.; TORTORIELLO, D. V. Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabetes. **Endocrinology**, v. 149, n. 7, p. 3549–3558, jul. 2008.

WEISBURG, J. H. *et al.* In vitro cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 95, n. 4, p. 191–200, out. 2004.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1981.

WORLEY, C. G. *et al.* Effects of manganese on oxidative stress in CATH.a cells. **Neurotoxicology**, v. 23, n. 2, p. 159–164, jul. 2002.

XU, Y. *et al.* Antidepressant effects of curcumin in the forced swim test and olfactory bulbectomy models of depression in rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 82, n. 1, p. 200–206, set. 2005.

YANG, F. *et al.* Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 7, p. 5892–5901, 18 fev. 2005.

YIN, Z. *et al.* Ferroportin is a manganese-responsive protein that decreases manganese cytotoxicity and accumulation. **Journal of Neurochemistry**, v. 112, n. 5, p. 1190–1198, mar. 2010.

YOUDIM, M. B. H.; WEINSTOCK, M. Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. **Neurotoxicology**, v. 25, n. 1-2, p. 243–250, jan. 2004.

ZHANG, D. *et al.* Effects of manganese on tyrosine hydroxylase (TH) activity and TH-phosphorylation in a dopaminergic neural cell line. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, n. 2, p. 65–71, 15 jul. 2011.

ZHANG, J.; GOODLETT, D. R. Proteomic approach to studying Parkinson's disease. **Molecular neurobiology**, v. 29, n. 3, p. 271–288, jun. 2004.

ZHANG, P.; HATTER, A.; LIU, B. Manganese chloride stimulates rat microglia to release hydrogen peroxide. **Toxicology Letters**, v. 173, n. 2, p. 88–100, 10 set. 2007.

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: An International Journal Published in Association with BIBRA**, v. 18, n. 1, p. 71–77, fev. 2004.

ZHANG, S.; ZHOU, Z.; FU, J. Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. **Environmental Research**, v. 93, n. 2, p. 149–157, out. 2003.