

TANARA VIEIRA PERES

**ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS  
EM RESPOSTA À EXPOSIÇÃO PERINATAL AO MANGANÊS  
EM RATOS E *Caenorhabditis elegans***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutora em Neurociências na área de concentração Neurobiologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger

Florianópolis  
Março de 2015

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

Peres, Tanara Vieira  
Alterações neuroquímicas e comportamentais em resposta à  
exposição perinatal ao manganês em ratos e *Caenorhabditis  
elegans* / Tanara Vieira Peres ; orientador, Rodrigo Bainy  
Leal ; coorientador, Rui Daniel Schröder Prediger. -  
Florianópolis, SC, 2015.  
151 p.

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

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Manganês. 3. neurotoxicidade. 4.  
desenvolvimento. 5. *Caenorhabditis elegans*. I. Leal,  
Rodrigo Bainy. II. Prediger, Rui Daniel Schröder . III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências. IV. Título.

TANARA VIEIRA PERES

**“ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E  
COMPORTAMENTAIS EM RESPOSTA À EXPOSIÇÃO  
PERINATAL AO MANGANÊS EM RATOS *Caenorhabditis  
elegans*”.**

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

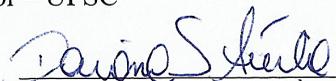
Florianópolis, 26 de fevereiro de 2015.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Rodrigo Bainy Leal  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

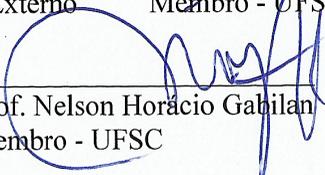
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Rodrigo Bainy Leal  
Orientador – UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Alcir Luiz Dafré  
Membro - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Daiana Silva de Ávila  
Membro da Banca Externo

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Daniel Pens Gelain  
Membro da Banca Externo

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Marcelo Farina  
Membro - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Nelson Horácio Gabilan  
Membro - UFSC



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, que me apoiaram desde o início dos meus estudos e contribuíram para o encerramento de mais esta etapa.

Ao professor Dr. Rodrigo B. Leal, pela orientação desde o mestrado, que foi fundamental para o desenvolvimento da minha carreira acadêmica e científica.

Ao professor Dr. Rui D. S. Prediger que foi o co-orientador desta tese e contribuiu para a realização e entendimento dos testes comportamentais apresentados neste trabalho.

Aos companheiros de laboratório Aline Siteneski, Ana Paula Costa, Daniela Pedro, Débora Venske, Fabiano Cordova, Helena Eyng, Isabella Heinrich, Jhonatas Knaut, Juliana Ben, Mariana Maestri, Mark Lopes e Sabrina Giovana pela convivência feliz e toda a ajuda que me deram no desenvolvimento deste projeto. Em especial ao Filipe Gonçalves, que foi essencial em todas as etapas deste trabalho, tanto na parte experimental quanto na troca de ideias.

Ao Professor Dr. Michael Aschner pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa. Aos companheiros do *Aschner Lab* Alessandra Antunes, Caridad Granero, Leticia Arantes, Mahfuz Miah, Marion Park, Megan Culbreth, Nancy Parmalee, Pan Chen, Patrícia Reckziegel, Priscila Gubert, Sam Caito, Sudipta Chakraborty, Thuy Nguyen e Ziyang Zhang por toda a ajuda que me deram com o modelo de *C. elegans*.

À CAPES e ao programa Ciência sem Fronteiras, que possibilitou o doutorado-sanduiche.

Ao Professor Dr. Marcelo Farina e a Dirleise Colle, Danúbia Bonfanti e Samantha Lopes, pela colaboração com os experimentos de atividade de enzimas antioxidantes e os testes comportamentais.

Ao Professor Dr. Peter Dunkley e ao Dr. Lin Ong pela avaliação da tirosina hidroxilase na School of Biomedical Sciences and Pharmacy and Hunter Medical Research Institute, The University of Newcastle, NSW, Austrália.

À Professora Dr. Tanja Schwerdtle e à Dr. Julia Bornhorst, pela dosagem de metais no Institute of Nutritional Sciences, University of Potsdam, Nuthetal, Alemanha.

Aos professores Dr. Alcir Dafré, Dr. Daiana Ávila, Dr. Daniel Gelain, Dr. Marcelo Farina, Dr. Nelson Gabilan e Dr. Patrícia Brocardo por participarem da banca examinadora desta tese e pela valiosa contribuição na sua correção.

A todos os professores e alunos do PPG-Neurociências que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. E ao secretário do PPG-Neurociências Nivaldo Vicente que sempre esteve disposto a ajudar no que fosse preciso.

Aos órgãos financiadores CNPq, CAPES, FAPESC e FINEP.

## RESUMO

A contaminação ambiental por metais é um fator de risco para a saúde pública, sendo o sistema nervoso central (SNC) um dos alvos destes agentes tóxicos. Durante o desenvolvimento do SNC em humanos, esta exposição pode estar relacionada a transtornos de aparecimento tardio. O manganês (Mn) é um metal essencial, porém em excesso pode causar uma síndrome semelhante à doença de Parkinson, chamada manganismo. Este estudo teve por objetivo investigar se a exposição perinatal ao Mn durante um período específico do desenvolvimento altera parâmetros neuroquímicos e comportamentais de forma persistente. Para isso foram utilizados ratos Wistar machos neonatos e o verme nematódeo *Caenorhabditis elegans* no estágio larval L1. Os ratos foram expostos a solução salina (controle) ou  $MnCl_2$  via intraperitoneal (5, 10 ou 20 mg/kg/dia) do dia pós-natal (PND) 8 ao 12. Os testes comportamentais foram realizados no PND 60-65. Os ratos apresentaram prejuízo motor avaliado no teste do rotarod. A memória de curto prazo foi prejudicada, avaliada nos testes de reconhecimento de objeto e reconhecimento social. A discriminação olfatória não foi alterada pelo Mn. A análise bioquímica foi realizada no estriado e no hipocampo no PND 14 e 70. No PND 14 o tratamento com Mn induziu aumento da atividade de catalase no estriado e de glutatona peroxidase (GPx) no hipocampo. Foi observado também aumento dos níveis de tirosina hidroxilase (TH) no estriado no PND 14. Na fase adulta observamos redução dos níveis de tióis não-proteicos (NPSH) e aumento dos níveis de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no estriado e aumento da atividade de catalase e de GPx no hipocampo no PND 70. O tratamento com Mn causou redução dos níveis de TH estriatal no PND 70 com elevação da fosforilação na Ser31, sugerindo uma ativação compensatória da enzima em resposta à redução de seu conteúdo. Para investigar vias de sinalização que podem participar da toxicidade do Mn foram utilizados *C. elegans* selvagens (N2) e mutantes com perda de função para proteínas das vias MAPKs e AKT. Os vermes foram expostos ao Mn por 1 h na fase larval L1 utilizando concentrações de 2,5 a 100 mM Mn. As cepas com perda de função em *akt-1*, *akt-2* e *sgk-1* apresentaram maior resistência ao Mn em comparação com o N2 no teste de viabilidade. Esta resistência pode estar relacionada com a resposta antioxidante. Os vermes N2 apresentaram queda dos níveis de GSH frente à exposição ao Mn, o que não ocorreu nos mutantes para proteínas da via AKT. A exposição ao Mn induziu aumento da expressão do gene que codifica o fator de transcrição SKN-1 nos

mutantes *akt-2* e a enzima antioxidante GCS-1 nos mutantes *akt-1*. Notavelmente, a expressão de *sod-3* encontrava-se aumentada nos vermes *akt-1* independente do tratamento com Mn. Porém os neurônios dopaminérgicos foram degenerados de forma semelhante nos vermes N2 e mutantes, avaliados pelo teste comportamental *basal slowing* e utilizando vermes que expressam proteína verde fluorescente (GFP) nos neurônios dopaminérgicos. Estes resultados sugerem que a via de sinalização da AKT participa da toxicidade induzida pelo Mn sobre *C. elegans* devido ao seu papel de antagonizar os fatores de transcrição SKN-1 e DAF-16, que são importantes para a produção de enzimas antioxidantes nos vermes. Entretanto, este efeito não está presente nos neurônios dopaminérgicos. Este estudo documenta que a exposição aguda ao Mn durante um período crítico do desenvolvimento neural induz disfunções cognitivas e motoras que duram até a idade adulta em ratos. Estas disfunções foram acompanhadas por alterações no sistema de defesa antioxidante, tanto no hipocampo quanto no estriado e alteração no conteúdo e fosforilação de TH. Este estudo demonstra a importância das vias de sinalização intracelular para a resposta antioxidante induzida pelo metal e caracteriza AKT como um importante ponto de investigação dentro dos mecanismos de toxicidade induzida pelo Mn.

**Palavras-chave:** Manganês; neurotoxicidade; desenvolvimento; *Caenorhabditis elegans*

## ABSTRACT

Environmental contamination by metals is a risk factor for public health and the central nervous system (CNS) is one of the targets of these toxic agents. Exposure during CNS development in humans is related to late onset damage. Manganese (Mn) is an essential metal, but in excess can cause a syndrome similar to Parkinson's disease, called manganism. This study aimed to investigate whether perinatal exposure to Mn in a specific developmental period would alter neurochemical and behavioral parameters persistently. For this we used neonate male Wistar rats and the nematode worm *Caenorhabditis elegans* in the L1 larval stage. Rats were exposed to saline (control) or intraperitoneal  $\text{MnCl}_2$  (5, 10 or 20 mg/kg/day) from postnatal day (PND) 8 to 12. The behavioral tests were performed on PND 60-65. Rats exhibited motor impairment evaluated in the rotarod test. The short-term memory was impaired, evaluated in the object recognition and social recognition tests. The olfactory discrimination was not affected by Mn. Biochemical analysis was performed in striatum and hippocampus on PND 14 and 70. On PND 14 Mn treatment induced an increase in catalase activity in the striatum and glutathione peroxidase (GPx) in the hippocampus. It was also observed increased levels of tyrosine hydroxylase (TH) in the striatum on PND 14. In adulthood we observed reduction in non-protein thiols (NPSH) levels and increased glial fibrillary acidic protein (GFAP) levels in the striatum and increased catalase and GPx activity in the hippocampus on PND 70. Treatment with Mn caused reduction of striatal TH levels on PND 70 with increased phosphorylation at Ser31, suggesting a compensatory activation of the enzyme in response to the reduction of its content. To investigate signaling pathways involved in Mn toxicity wild type (N2) and loss of function mutant (for proteins of the MAPK and AKT signaling pathways) *C. elegans* were used. The worms were exposed to Mn for 1 h at the L1 larval stage using concentrations of 2.5 to 100 mM Mn. Strains with loss of function in *akt-1*, *akt-2* and *sgk-1* had higher resistance to Mn compared to N2 in the survival test. This resistance may be related to the antioxidant response. The N2 worms had decreased levels of GSH after exposure to Mn, which did not occur in AKT pathway mutants. Mn exposure induced increase in the expression of the gene that codes SKN-1 transcription factor in *akt-2* mutants and GCS-1 antioxidant enzyme in *akt-1* mutants. Notably, the expression of *sod-3* was increased in the *akt-1* mutant worms independent of Mn treatment. However dopaminergic neurons were similarly degenerated in N2 and mutant

worms, evaluated in the basal slowing response test and using worms expressing green fluorescent protein (GFP) in dopaminergic neurons. These results suggest that AKT signaling pathway participates in Mn-induced toxicity in *C. elegans* due to its role antagonizing the transcription factors SKN-1 and DAF-16, which are important for the production of antioxidant enzymes in the worms. However, this effect is not present in the dopaminergic neurons. This study documents that acute exposure to Mn during a critical period of neural development induces cognitive and motor dysfunctions that last into adulthood in rats. These disorders are accompanied by changes in the antioxidant defense system, both in the hippocampus and in the striatum and changes in the content and phosphorylation of TH. This study demonstrates the importance of intracellular signaling pathways to the antioxidant response induced by Mn and features AKT as an important point of research into the mechanisms of toxicity induced by Mn.

**Keywords:** Manganese; neurotoxicity; development; *Caenorhabditis elegans*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas alvo para acumulação do manganês no cérebro.....	26
Figura 2: Esquema geral da ativação da via de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs).....	32
Figura 3: Via de sinalização da PI3K/AKT.....	33
Figura 4: Algumas estruturas anatómicas do verme nematódeo <i>Caenorhabditis elegans</i> hermafrodita adulto.....	37
Figura 5: Ciclo de vida do <i>Caenorhabditis elegans</i> em 22°C.....	39
Figura 6: Neurônios dopaminérgicos em <i>C. elegans</i> .....	42
Figura 7: Proteínas que constituem a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), MAPK cinase (MAPKK) e MAPK cinase cinase (MAPKKK) em mamíferos e seus homólogos em <i>C. elegans</i> .....	43
Figura 8: A via de sinalização tipo insulina em <i>C. elegans</i> .....	46
Figura 9: Modelo utilizado para avaliação da neurotoxicidade do Mn para o SNC em desenvolvimento.....	52
Figura 10: Representação esquemática do teste de discriminação olfatória.....	53
Figura 11: Representação esquemática do teste do campo aberto.....	54
Figura 12: Representação esquemática do teste de reconhecimento de objeto.....	55
Figura 13: Representação esquemática do teste de reconhecimento social.....	56
Figura 14: Representação esquemática do teste que avalia a resposta <i>basal slowing</i> .....	65
Figura 15: Microscopia de fluorescência de <i>C. elegans</i> da cepa BY200 [P <sub>dat-1</sub> ::GFP(vtis1)] demonstrando a degeneração dos neurônios dopaminérgicos CEP e ADE da cabeça após exposição a diferentes concentrações de MnCl <sub>2</sub> .....	67
Figura 16: Os níveis de Mn no hipocampo (A) e corpo estriado (B) e os níveis de Fe, no hipocampo (C) e corpo estriado (D), determinados por espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).....	72
Figura 17: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a função olfatória (teste de discriminação olfatória) em ratos machos adultos jovens (PND 30) e adultos (PND 60).....	74
Figura 18: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a atividade locomotora (teste de campo aberto) em ratos machos adultos (PND 61).....	75

Figura 19: Efeito da administração i.p. de MnCl <sub>2</sub> (20 mg/kg) durante o desenvolvimento (PND 8-12) sobre a memória espacial de curto prazo (teste de reconhecimento de objeto) em ratos machos adultos (PND 63) .....	76
Figura 20: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a memória social dos animais (teste de reconhecimento social) em ratos machos adultos (PND 64) .....	77
Figura 21: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a coordenação motora (teste do rotarod) em ratos machos adultos (PND 65) .....	78
Figura 22: Os níveis de tióis não proteicos (NPSH) em homogeneizados obtidos a partir do corpo estriado ou hipocampo de ratos machos no PND 14 (A, C) ou PND 70 (B, D) expostos ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10, 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12) .....	79
Figura 23: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a atividade da catalase em homogeneizados obtidos do hipocampo ou estriado dos ratos no PND 14 (A, C) ou PND 70 (B, D).....	80
Figura 25: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a atividade de glutationa redutase (GR) em homogeneizados obtidos do hipocampo ou estriado dos ratos no PND 14 (A, C) ou PND 70 (B, D).....	82
Figura 26: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a atividade de glutationa peroxidase (GPx) em homogeneizados obtidos do hipocampo ou estriado dos ratos no PND 14 (A, C) ou PND 70 (B, D).....	83
Figura 27: Expressão de GFAP no hipocampo (A) e estriado (B) de ratos no PND 70 expostos ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12).....	84
Figura 28: Fosforilação e conteúdo total de ERK1/2, p38 <sup>MAPK</sup> , JNK1/2/3 e AKT no hipocampo (A) e estriado (B) de ratos no PND 70 expostos ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12).....	85
Figura 29: Substratos fosforilados de PKA ou PKC no hipocampo (A) e estriado (B) de ratos no PND 70 expostos ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12). .....	86

Figura 30: Níveis de tirosina hidroxilase (TH) no estriado de ratos no PND 14 expostos ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12).....	88
Figura 31: Níveis de tirosina hidroxilase (TH) no estriado de ratos no PND 70 expostos ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12).....	89
Figura 32: O conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) foi medido por <i>western blotting</i> no estriado de ratos no PND 14 ou 70 expostos ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12).....	90
Figura 33: O conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) foi medido por <i>western blotting</i> no estriado de ratos no PND 14 expostos ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12).....	91
Figura 34: O conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) foi medido por <i>western blotting</i> no estriado de ratos no PND 70 expostos ao MnCl <sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12).....	92
Figura 35: Sobrevivência de <i>C. elegans</i> após exposição ao Mn (0-100 mM) por 1 hora.....	94
Figura 36: A resposta <i>basal slowing</i> mediada pela dopamina foi avaliada nos vermes selvagens (N2) e mutantes com perda de função em <i>nsy-1</i> (AU3), <i>pmk-3</i> (BS3383) ou <i>jnk-1</i> (VC8) expostos ao Mn por 1 h (5 ou 10 mM). Os controles foram incubados com NaCl 85 mM. O teste foi realizado 48 h após a exposição ao Mn.....	96
Figura 37: A resposta <i>basal slowing</i> foi avaliada nos vermes selvagens (N2) e mutantes com ganho de função em <i>akt-1</i> (GR1310) ou perda de função em <i>akt-1</i> (RB759), <i>akt-2</i> (VC204) ou <i>sgk-1</i> (VC345) expostos ao Mn por 1 h (10 ou 50 mM). Os controles foram incubados com NaCl 85 mM. O teste foi realizado 48 h após a exposição ao Mn.....	97
Figura 38: Cruzamento entre os vermes BY200 e VC204. ....	99
Figura 39: Morfologia dos CEPs e ADEs de pelos menos 20 vermes por grupo de BY200 (selvagens) ou da cepa obtida pelo cruzamento de BY200 com VC204 <i>akt-2(ok393)X</i> . Os vermes foram avaliados 2 h após o tratamento agudo de 1 h com MnCl <sub>2</sub> (5, 10, 25 ou 50 mM) por microscopia de fluorescência (aumento de 40 X). Os controles foram incubados com NaCl 85 mM.....	100
Figura 40: Níveis de GSH. Os vermes N2 (selvagens) e mutantes com ganho de função em <i>akt-1</i> (GR1310) ou perda de função em <i>akt-1</i> (RB759), <i>akt-2</i> (VC204) ou <i>sgk-1</i> (VC345) foram expostos ao Mn	

por 1 h (10 ou 50 mM). Os controles foram incubados com NaCl 85 mM. Os vermes foram processados ao final do tratamento para a quantificação de GSH utilizando uma curva padrão ( $\mu\text{M}$  de GSH/mg de proteína)..... 102

Figura 41: Expressão relativa de genes da resposta antioxidante. Os vermes N2 (selvagens) e mutantes com ganho de função em *akt-1* (GR1310) ou perda de função em *akt-1* (RB759), *akt-2* (VC204) ou *sgk-1* (VC345) foram expostos ao Mn por 1 h (10 ou 50 mM). Os controles foram incubados com NaCl 85 mM. O RNA foi extraído ao final do tratamento..... 103

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Dados dos anticorpos utilizados para <i>western blotting</i> .....	61
Tabela 2: Cepas mutantes de <i>C. elegans</i> utilizadas.....	63
Tabela 3: <i>Primers</i> utilizados para qRT-PCR.....	69



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE L/R: *deirids* anteriores  
ANOVA: análise de variância  
ASK1: cinase reguladora de sinais apoptóticos  
ATP: trifosfato de adenosina  
BHE: barreira hemato-encefálica  
BMK1: *big mitogen activated protein kinase*  
CEPDL/R: cefálico dorsal esquerdo/ direito  
CEPVL/R: cefálico ventral esquerdo/ direito  
DA: dopamina  
DAT: transportador de dopamina  
DMSO: dimetil sulfoxido  
DMT-1: transportador de metais divalentes 1  
DO: densidade ótica  
EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético  
EPM: erro padrão da média  
ERK: cinase regulada por sinal extracelular  
EROs: espécies reativas de nitrogênio  
ERNs: espécies reativas de oxigênio  
FOXO: *Forkhead Box class O*.  
GFAP: proteína glial fibrilar ácida  
GFP: *green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)  
GR: glutationa redutase  
GPx: glutationa peroxidase  
GSH: glutationa reduzida  
GSSG: glutationa oxidada  
JNK: cinase c-Jun N-terminal  
KO: *knockout*  
LPS: lipopolissacarídeo  
MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno  
MAP2K: cinase da proteína cinase ativada por mitógeno  
MAP3K: cinase da cinase da proteína cinase ativada por mitógeno  
MEK: cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular  
MEKK: cinase da cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular  
MKP-1: fosfatase da MAP cinase  
MLK: cinase de linhagem mista  
MMT: metilciclopentadienil manganês tricarbonil  
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NGM: meio para crescimento de nematódeos  
NRF-2: fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2  
p38<sup>MAPK</sup>: proteína cinase ativada por mitógeno de 38 kDa  
PBS: tampão salina fosfato  
PDE L/R: *deirids* posteriores  
PKA: proteína cinase A  
PKC: proteína cinase C  
PP2A: proteína fosfatase 2A  
RTK: receptor tirosina cinase  
SAPK: proteína cinase ativada por estresse  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS  
SGK: proteína cinase induzida por soro/glicocorticoide  
SLC: *solute carrier* (carreador de solutos)  
SNC: sistema nervoso central  
SOD: superóxido dismutase  
TA: Temperatura ambiente  
TBS: tampão tris-salina  
TBS-T: tampão tris-salina acrescido de Tween-20  
Tf: transferrina  
TfR: transportador de transferrina  
TH: tirosina hidroxilase  
VMAT: transportador de monoaminas vesicular

## LISTA DE PUBLICAÇÕES RELACIONADAS À TESE

**Peres, Tanara V.**, Cordova, Fabiano M., Lopes, Mark W., Costa, Ana P., Leal, Rodrigo B. Chapter 7 – Effect of manganese on signaling pathways In: Manganese in health and disease - Issues in Toxicology, 2015, DOI:10.1039/9781782622383-00182

Chen, Pan, Chakraborty, Sudipta, **Peres, Tanara V.**, Bowman, Aaron B., Aschner, Michael. Manganese-induced neurotoxicity: from *C. elegans* to humans. Toxicology Research, 2014. DOI: 10.1039/C4TX00127C

**Peres, Tanara V.**, Pedro, Daniela Z., Cordova, Fabiano M., Lopes, Mark W., Gonçalves, Filipe M., Mendes-De-Aguiar, Cláudia B.N., Walz, Roger, Farina, Marcelo, Aschner, Michael, Leal, Rodrigo B. In vitro manganese exposure disrupts MAPK signaling pathways in striatal and hippocampal slices from immature rats. BioMed Research International, v. 2013, p.1 - 12, 2013.

Cordova, Fabiano M., Aguiar, Aderbal S., **Peres, Tanara V.**, Lopes, Mark W., Gonçalves, Filipe M., Pedro, Daniela Z., Lopes, Samantha C., Pilati, Celso, Prediger, Rui D.S., Farina, Marcelo, Erikson, Keith M., Aschner, Michael, Leal, Rodrigo B. Manganese-exposed developing rats display motor deficits and striatal oxidative stress that are reversed by trolox. Archives of Toxicology, v.87, p.1231-1244, 2013.

Cordova, Fabiano M., Aguiar, Aderbal S., **Peres, Tanara V.**, Lopes, Mark W., Gonçalves, Filipe M., Remor, Aline P., Lopes, Samantha C., Pilati, Celso, Latini, Alexandra S., Prediger, Rui D. S., Erikson, Keith M., Aschner, Michael, Leal, Rodrigo B. In vivo manganese exposure modulates ERK, Akt and DARPP-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function. PLoS ONE 7(3): e33057, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0033057.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1 Essencialidade e toxicidade do manganês.....	24
1.2 Mecanismos de transporte do Mn ao SNC.....	27
1.3 Mecanismos de neurotoxicidade do Mn.....	29
1.3.1 Ação do Mn sobre vias de sinalização intracelular.....	29
1.3.2 Modulação da atividade da tirosina hidroxilase pelo Mn.....	29
1.3.3 Alteração na sinalização de MAPKs e AKT induzida por Mn.....	31
1.4 Mecanismos de defesa antioxidante.....	34
1.5 Modelos animais para estudo da neurotoxicidade do Mn.....	35
1.5.1 O sistema nervoso em <i>C. elegans</i> .....	38
1.5.2 O sistema dopaminérgico em <i>C. elegans</i> .....	40
1.5.3 Via de sinalização das MAPKs e AKT em <i>C. elegans</i> .....	42
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
2.1 Objetivos específicos:.....	49
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>51</b>
3.1 Experimentos utilizando ratos Wistar.....	51
3.1.1 Reagentes.....	51
3.1.2 Animais.....	51
3.1.3 Tratamento in vivo com manganês.....	51
3.1.4 Testes comportamentais.....	52
3.1.5 Análise dos níveis de Fe e Mn no tecido hipocampo e no estriado.....	56
3.1.6 Preparação tecidual para as análises bioquímicas.....	57
3.1.8 Atividade da catalase.....	57
3.1.9 Atividade da superóxido dismutase.....	58
3.1.10 Atividade da glutathiona redutase.....	58
3.1.11 Atividade da glutathiona peroxidase.....	58
3.1.12 Western blotting.....	58
3.1.13 Análise estatística.....	60
3.2 Experimentos utilizando vermes <i>C. elegans</i> .....	62
3.2.1 Reagentes.....	62
3.2.2 Cultura de <i>C. elegans</i> .....	62
3.2.3 Exposição de <i>C. elegans</i> ao Mn e avaliação da sobrevivência.....	63
3.2.4 Análise comportamental da resposta “basal slowing”.....	63
3.2.5 Obtenção de vermes machos para cruzamento.....	64

3.2.6	<i>Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose</i> .....	65
3.2.7	<i>Avaliação da viabilidade de neurônios dopaminérgicos</i> .....	66
3.2.8	<i>Quantificação dos níveis de glutatona</i> .....	67
3.2.9	<i>PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)</i> .....	68
3.2.10	<i>Análise estatística</i> .....	69
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
4.1	Exposição ao manganês durante o desenvolvimento induz danos motores e cognitivos e alterações neuroquímicas que persistem até a fase adulta .....	71
4.1.1	<i>Dosagem dos níveis de Mn no estriado e hipocampo</i> .....	71
4.1.2	<i>Testes comportamentais para avaliação da função motora e cognitiva nos ratos adultos</i> .....	73
4.1.3	<i>Avaliação dos níveis de tióis não-proteicos e da atividade de enzimas antioxidantes no hipocampo e estriado dos ratos em diferentes idades após a exposição ao Mn</i> .....	78
4.1.4	<i>Efeitos da exposição ao Mn durante o desenvolvimento sobre GFAP, MAPKs, AKT, PKA e PKC no estriado e hipocampo dos ratos adultos</i> .....	83
4.1.5	<i>Efeitos da exposição ao Mn sobre o estado de fosforilação e conteúdo total da tirosina hidroxilase</i> .....	86
4.2	Toxicidade do manganês em <i>Caenorhabditis elegans</i> mutantes para proteínas das vias de sinalização de MAPKs e AKT .....	93
4.2.1	<i>Sobrevivência de C. elegans selvagem ou mutantes frente à exposição ao Mn</i> .....	93
4.2.2	<i>Avaliação da integridade do sistema dopaminérgico de C. elegans selvagem ou mutantes frente à exposição ao Mn</i> .....	94
4.2.3	<i>Efeito do Mn sobre o conteúdo de GSH e o conteúdo relativo de mRNA de proteínas envolvidas na resposta antioxidante em C. elegans</i> .....	101
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>105</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>119</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>121</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) em mamíferos ocorre do período pré-natal até a adolescência. Durante este processo, ocorrem eventos complexos de proliferação celular, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose (RICE e BARONE, 2000; COSTA et al., 2004). A exposição gestacional ou perinatal a agentes tóxicos como os metais (mesmo em doses inferiores àquelas que afetam adultos) podem causar danos ao SNC. Tais danos manifestam-se na forma de alterações comportamentais, as quais podem surgir imediatamente ou tardiamente, incluindo alterações em processos cognitivos (aprendizado e memória), sensoriais e/ou motores, bem como pode predispor a distúrbios neurodegenerativos (CORDOVA et al., 2004; COSTA et al., 2004; GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2006; FOX et al., 2010). Isso se deve à capacidade limitada do SNC em desenvolvimento de compensar a perda de progenitores neurais, bem como à maior permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE), facilitando a entrada de agentes tóxicos ao SNC, tanto em humanos quanto em modelos animais (JÄRUP, 2003; COSTA et al., 2004; RAI et al., 2010).

O neurodesenvolvimento começa no útero e continua durante o período pós-natal. Este período de rápido desenvolvimento é altamente suscetível à toxicidade de metais, até mesmo quando estes possuem função fisiológica, como ocorre em exposição a doses elevadas do manganês (Mn) (MOLINA et al., 2011). Nos ratos, o desenvolvimento cortical do recém-nascido (PND 0-1) é equivalente a 4-5 meses de gestação em humanos (ROSEN e GALABURDA, 2000). A segunda semana de vida (PND 7-15), é caracterizada pela sinaptogênese e intenso crescimento dendrítico. Além disso, a neurogênese é inerente ao período pós-natal (PND 7-10), especialmente a gliogênese (KOLB et al., 1998). Portanto, este período pode ser altamente sensível à presença de agentes tóxicos, que podem alterar o curso normal do desenvolvimento. Neste sentido observa-se que a lesão cerebral leve em ratos neonatos pode causar alterações anatômicas e epigenéticas no tecido cerebral, que podem ser persistentes e terem consequências duradouras (MYCHASIUK et al., 2015).

Diversos relatos na literatura indicam que a exposição a metais durante o desenvolvimento do SNC é um importante problema de saúde pública, pois concebe a base para o desenvolvimento de doenças na fase adulta, especialmente doenças neurológicas. Assim, os distúrbios neurodegenerativos podem ter origem em eventos que precedem as suas

manifestações clínicas (WEISS, 2011). Atualmente têm sido apontados diversos compostos com propriedades neurotóxicas para o desenvolvimento do SNC incluindo solventes, pesticidas e metais (GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2014), dentre os quais destacamos o Mn (ERIKSON et al., 2007; MORENO, et al., 2009a; MOLINA et al., 2011).

### **1.1 Essencialidade e toxicidade do manganês**

O elemento químico Mn é um metal pesado que ocorre naturalmente, sendo o 5º metal mais abundante na crosta terrestre, e o 12º elemento mais abundante no total. O Mn é normalmente encontrado no meio ambiente formando óxidos, carbonatos e silicatos. A população humana é prontamente exposta ao Mn devido à sua prevalência no ar, solo e cursos d'água decorrente da erosão natural, bem como a partir de fontes industriais. No entanto, a principal via de exposição humana ao Mn surge da ingestão alimentar diária. Os cereais integrais, legumes, arroz e nozes contêm os mais altos níveis de Mn, que também pode ser encontrado no chocolate, chá, vegetais de folhas verdes, e algumas frutas. A variedade de fontes alimentares contendo Mn permite que os seres humanos facilmente obtenham níveis adequados de Mn (2,3 mg/dia para homens, 1,8 mg/dia para mulheres adultos) (ATSDR, 2012).

Os metais são classificados como essenciais quando participam de processos biológicos, atuando como cofatores enzimáticos ou grupos funcionais de proteínas, sendo requeridos em pequenas quantidades. O Mn é classificado como um metal essencial devido à sua participação em diversos processos fisiológicos. O Mn atua na gliconeogênese como ativador da piruvato carboxilase e no ciclo de Krebs como cofator da isocitrato desidrogenase. No sistema de defesa antioxidante, Mn age como cofator da superóxido dismutase (SOD). Além disso, o Mn atua no sistema nervoso central como cofator da glutamina sintetase, presente em células gliais (SANTAMARIA, 2008).

A neurotoxicidade do Mn foi descrita pela primeira vez em 1837 por John Couper, que observou uma síndrome parkinsoniana caracterizada por lentidão dos movimentos (bradicinesia) e alteração da marcha (instabilidade postural) em indivíduos expostos ocupacionalmente ao Mn. Portanto, observou-se que apesar da sua essencialidade, em níveis elevados o Mn poderia ser neurotóxico (ASCHNER et al., 2009). Os mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do Mn não foram completamente elucidados. No entanto, as alterações do metabolismo da dopamina (DA) (GUILARTE

et al., 2008a; GUILARTE, 2013), disfunções mitocondriais (MALECKI, 2001; GUNTER et al., 2010) e indução de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MILATOVIC et al., 2009) e nitrogênio (ERN) (MORENO et al., 2011) que levam à morte celular têm sido considerados aspectos importantes da ação do Mn.

A exposição crônica a doses elevadas por diferentes vias pode levar ao acúmulo do Mn no SNC. O Mn em excesso acumula-se preferencialmente em estruturas dos gânglios da base, especialmente no corpo estriado (caudado, putâmen e núcleo accumbens), globo pálido e na *substantia nigra*, exemplificado na Figura 1 (GUILARTE et al., 2006). Recentemente a *substantia nigra pars compacta* foi identificada com um sítio de acúmulo do Mn em ratos expostos via intraperitoneal (i.p.) (ROBISON et al., 2015). Os sintomas causados pelo acúmulo de Mn incluem distonia, bradicinesia e rigidez devido a danos aos neurônios dopaminérgicos e gliose, em um processo neurodegenerativo denominado manganismo (CERSOSIMO e KOLLER, 2006; GUNTER et al., 2006). O manganismo é uma síndrome semelhante à doença de Parkinson caracterizada por distúrbios psiquiátricos e motores e déficits cognitivos (BOWLER et al., 2006). O período de exposição ocupacional que pode levar ao desenvolvimento do manganismo é de 6 meses a 2 anos (BENEDETTO et al., 2009). Os sintomas motores e neuropsiquiátricos podem permanecer até mesmo 14 anos após o fim da exposição ao Mn (BOUCHARD et al., 2007).

O SNC imaturo é mais susceptível à neurotoxicidade do Mn que o adulto e evidências sugerem que a exposição ao metal durante o desenvolvimento pode afetar a função neurológica na fase adulta (MORENO, et al., 2009b; KERN et al., 2010; KERN e SMITH, 2011; BEAUDIN et al., 2013). A absorção do metal no intestino é geralmente elevada na primeira semana de vida, seguido por uma diminuição constante com a idade. Esses fatores contribuem para o risco consideravelmente maior de neurotoxicidade para recém-nascidos quando expostos ao excesso de Mn (MOLINA et al., 2011). Não está claro se outros fatores, ambientais ou genéticos, são responsáveis pelas alterações causadas no SNC na presença do Mn, ou se o metal por si só pode produzir esses efeitos (ATSDR, 2012). No geral, os fatores genéticos são responsáveis por 30-40% dos casos de distúrbios do desenvolvimento neurológico. Assim, fatores não genéticos, como exposições ambientais estão envolvidos na causa destas distúrbios através da interação com predisposições herdadas geneticamente (GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2014).

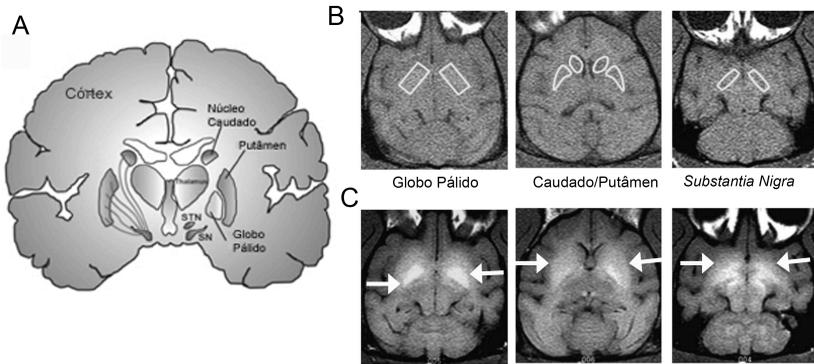


Figura 1: Estruturas alvo para acumulação do manganês no cérebro. (A) Esquema demonstrando os núcleos da base. (B) Imagens de ressonância magnética em diferentes níveis anatômicos (quadros brancos) de primata não humano controle. (C) Primata não humano exposto ao Mn. As áreas esbranquiçadas indicadas por setas demonstram acúmulo do metal. STN: núcleo subtalâmico, SN: *substantia nigra*. Adaptado de Guilarte et al. (2006) e Guilarte (2010).

A exposição ocupacional ao Mn ocorre em atividades de mineração, soldagem, fundição, na indústria de baterias e pelo uso de fungicidas que contenham o metal em sua composição, como o maneb e o mancozeb (JOSEPHS et al., 2005; CERSOSIMO e KOLLER, 2006; ASCHNER et al., 2009; SRIRAM et al., 2015). Além disso, causa muita preocupação a crescente liberação do Mn para a atmosfera em alguns países devido à utilização do aditivo metilciclopentadienil manganês tricarbonil (MMT) na gasolina (GULSON et al., 2006). Através da disponibilidade do metal no meio ambiente, tornam-se também fontes de contaminação para a população em geral a água ou alimentos contendo altos níveis de Mn (OULHOTE et al., 2014). Recentemente, cresceu a intoxicação por Mn em usuários da droga injetável metcatinona (efedrona) devido ao uso do permanganato de potássio na síntese do composto (STEPENS et al., 2008). De forma mais específica, pacientes com disfunção hepática e aqueles recebendo nutrição parenteral, principalmente recém-nascidos, também são suscetíveis à acumulação do metal (BOGGIO BERTINET et al., 2000; ASCHNER e ASCHNER, 2005; ASCHNER et al., 2009). O metal está presente em níveis considerados excessivos na dieta suplementar (fórmulas) para crianças (ASCHNER e ASCHNER, 2005). No Brasil, já foram relatados altos níveis de Mn no ar próximo a um complexo industrial na Bahia. As

crianças residentes neste local apresentaram QI mais baixo e memória de trabalho inferior, caracterizando danos no circuito fronto-estriatal, o qual é importante para este tipo de memória (CARVALHO, et al., 2013).

## 1.2 Mecanismos de transporte do Mn ao SNC

Uma vez que a homeostase dos níveis de Mn é essencial para os seres vivos, estes possuem mecanismos de transporte para o metal (TAKEDA, 2003; DOBSON et al., 2004; YOKEL, 2009; TUSCHL et al., 2013). Dentre os mecanismos descritos para o transporte de Mn estão: difusão (YOKEL et al., 2003), canais de cálcio (Ca) (ROTH et al., 2002a; CROSSGROVE e YOKEL, 2005), transportador de metais divalentes-1 (DMT1), também conhecido como proteína de macrófago associada à resistência natural (Nramp2) e SLC11A2 (ROTH et al., 2002a; THOMPSON et al., 2007; KIM et al., 2013), citrato (CROSSGROVE et al., 2003) ou transporte dependente da transferrina (Tf) (ASCHNER e ASCHNER, 1990; ROTH et al., 2002a; GUNTER et al., 2013) e ferroportina (Fpn, SLC40A1) (MADEJCZYK e BALLATORI, 2012).

O transportador SLC30A10 pertence à família dos transportadores de soluto (SLC, *solute carrier*). Recentemente foi identificado seu papel no transporte de Mn em seres humanos. A mutação no gene que codifica este transportador causa uma síndrome de hipermanganesemia com elevada acumulação de Mn no fígado e no cérebro sem que os indivíduos tenham sido expostos a níveis elevados de Mn (QUADRI et al., 2012; TUSCHL et al., 2012). A família dos transportadores SLC é conservada entre as espécies e está presente no SNC de ratos (SREEDHARAN et al., 2011). Vários estudos realizados em modelos de ratos e camundongos têm contribuído para a elucidação dos mecanismos de transporte do Mn.

Quando ingerido, o Mn pode ser transportado a partir do trato gastrointestinal através da superfície apical da mucosa intestinal para a corrente sanguínea por meio de DMT-1 e Tf, de forma semelhante ao transporte do ferro (Fe). Apenas 1-5% do Mn ingerido é absorvido e seu excesso é eficazmente excretado pelo fígado na bile através da circulação portal (ROTH, 2006). Empregando uma linhagem celular que imita o epitélio intestinal de absorção (células Caco-2), foi possível estudar a cinética de absorção do Mn e sua exportação. Verificou-se que o Mn é absorvido na superfície apical das células intestinais e é exportado por via basolateral em uma combinação de processos mediados por transportador e difusão. Os níveis de DMT-1 foram

reduzidos em células Caco-2 expostas ao Mn, possivelmente como um mecanismo para evitar a acumulação de Mn em níveis tóxicos nas células. Ao mesmo tempo, os níveis de Fpn1, uma proteína exportadora de Mn, foram aumentados em células Caco-2 expostas ao Mn, fornecendo evidências de que a expressão de Fpn responde aos níveis de Mn (LI et al., 2013).

A homeostase do Fe e do Mn são interdependentes devido às suas semelhanças químicas e seus mecanismos compartilhados de transporte (GUNSHIN et al., 1997), tanto em humanos quanto em modelos de roedores (CLAUS HENN et al., 2011). A deficiência de Fe leva ao aumento da expressão de DMT-1 e Tf. Como consequência, no caso da anemia por exemplo, a ausência de Fe para competir pelos mesmos transportadores poderia acarretar numa acumulação de Mn (ERIKSON et al., 2002; ROTH e GARRICK, 2003; ERIKSON et al., 2004; GARCIA et al., 2007). Há também evidência *in vitro* de que a presença do Fe é capaz de influenciar a absorção e as ações biológicas do Mn em células PC12 (ROTH, FENG, et al., 2002). Existem modelos *in vivo* que provaram ser eficientes para o estudo da homeostase do Fe e do Mn dependente de DMT-1: os ratos de Belgrado com deficiência de Fe (CHUA e MORGAN, 1997; FLEMING et al., 1998; BURDO et al., 2001) e os camundongos com anemia microcítica (mk) (CANONNE-HERGAUX et al., 2000), ambos os quais são caracterizados pela perda de função de DMT-1 devido a uma mutação com troca de sentido que provoca uma substituição de glicina por arginina (G185R) (FLEMING et al., 1998). Esta mutação prejudica o transporte de Fe ligado à Tf a partir das vesículas endocíticas para o citoplasma (GARRICK et al., 1999). No modelo do rato de Belgrado, foi demonstrado que os níveis de Fe e Mn são concomitantemente reduzidos. Desta forma, o modelo contribuiu para elucidar o papel do DMT-1 no transporte e homeostase do Fe e do Mn (CHUA e MORGAN, 1997). Além disso, os experimentos realizados com o rato de Belgrado indicam que o DMT-1 também participa do transporte de Mn através do epitélio olfatório (THOMPSON et al., 2007), revisado por Fitsanakis et al. (2010).

A troca de Mn do plasma para o cérebro ocorre através da BHE ou da barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (BSLCr) (LI et al., 2006). O mecanismo de transporte do Mn através da BHE envolve vários transportadores como endocitose mediada pelo receptor de Tf (ASCHNER e ASCHNER, 1990), mecanismo independente de Tf (MALECKI et al., 1999), canais de Ca (CROSSGROVE e YOKEL, 2005) ou quando o Mn se encontra conjugado ao citrato pode ser transportado por membros das famílias dos peptídeos transportadores de

ânions inorgânicos (OATP) ou dos transportadores do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) (CROSSGROVE et al., 2003).

### **1.3 Mecanismos de neurotoxicidade do Mn**

#### **1.3.1 Ação do Mn sobre vias de sinalização intracelular**

A sinalização celular, ou a transdução de sinal, pode ser definida como o processo pelo qual as células se comunicam com o seu ambiente e respondem aos sinais externos que são detectados por elas. A importância central deste fenômeno tem sido apreciada por um longo tempo. Como descrito por Bradshaw e Dennis (2011), as respostas dinâmicas das células aos estímulos externos são, em essência, uma descrição do processo da vida em si. Assim, é importante mencionar que uma parte significativa do genoma humano (25000 genes) codifica os elementos de sinalização celular, incluindo 1543 receptores, 518 proteínas cinases e ~150 fosfatases (PAPIN et al., 2005).

A modificação pós-traducional reversível de proteínas por fosforilação é um modo versátil para regular a atividade de proteínas e desta forma vários dos aspectos do desenvolvimento e da função das células (HUNTER, 2007). No SNC uma rede complexa e rica de sinalização intercelular e intracelular está envolvida na modulação do desenvolvimento do cérebro, na atividade sináptica e nas funções cognitivas. Os neurotransmissores ou moléculas tróficas, através da interação proteína-proteína e por modulação da produção de mensageiros intracelulares, podem modular a atividade das proteínas cinases e fosfatases, que modificam o estado de fosforilação de proteínas alvo, tais como enzimas, receptores, canais iônicos e fatores de transcrição (YOSHII e CONSTANTINE-PATON, 2010). Todos estes eventos conduzem uma diversidade de eventos celulares tais como a expressão gênica, a migração de células neurais, a diferenciação, a proliferação, a sobrevivência ou a morte celular e a plasticidade sináptica (GREENGARD, 2001; KANDEL, 2001; HUNTER, 2007). Devido a todos estes aspectos, a modulação de vias de sinalização intracelular por substâncias tóxicas se tornou uma parte significativa da pesquisa em Toxicologia Molecular.

#### **1.3.2 Modulação da atividade da tirosina hidroxilase pelo Mn**

Um aspecto importante que regula o metabolismo da DA é a sua taxa de síntese. A tirosina hidroxilase (TH) é a enzima limitante na síntese desta catecolamina e catalisa o primeiro passo de uma via de síntese bioquímica em que o aminoácido L-tirosina é convertido em L-

3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). A atividade de TH pode ser regulada agudamente pela fosforilação da proteína e cronicamente pelo seu nível de síntese. A fosforilação de TH pode ocorrer nos resíduos de serina (Ser) Ser8, Ser19, Ser31 e Ser40. A fosforilação representa um mecanismo importante para a manutenção dos níveis de DA em tecidos imediatamente após a secreção da DA (DUNKLEY et al., 2004). Embora outros sítios de fosforilação tenham sido reconhecidos em TH apenas Ser19, Ser31 e Ser40 são regulados *in vivo* (HAYCOCK, 1990). O sítio Ser40 é considerado o mais importante na ativação de TH por fosforilação, causando uma diminuição na inibição por *feedback* causada pela DA (FUJISAWA e OKUNO, 2005). A fosforilação na Ser31 pode aumentar em duas vezes a atividade de TH por alterar sua afinidade pelo cofator tetrahidrobiopterina (BH4). Além disso, a fosforilação na Ser31 ou na Ser19 pode facilitar a fosforilação na Ser40 (DUNKLEY et al., 2004). A proteína cinase A (PKA), a proteína cinase C (PKC) e a proteína fosfatase 2A (PP2A) estão envolvidas na fosforilação e desfosforilação da Ser40 da TH *in situ* (DUNKLEY et al., 2004; BOBROVSKAYA et al., 2007a; BOBROVSKAYA et al., 2007b; GELAIN et al., 2007). A PP2A é a principal serina/treonina fosfatase que age desfosforilando a TH, resultando em redução da sua atividade (HAAVIK et al., 1989). Ainda, uma interação funcional entre PKC $\delta$  e TH foi documentada, em que a PKC $\delta$  regula negativamente a atividade da TH e a síntese de DA ao aumentar a atividade de PP2A em neurônios dopaminérgicos (ZHANG et al., 2007).

Em outro estudo, o estresse induzido por choque nas patas causou aumento na fosforilação na Ser31 de TH, bem como na atividade da enzima, no córtex pré-foftral médio, *locus coeruleus* e medula adrenal. Sugere-se que a ERK esteja envolvida neste efeito na medula adrenal. No mesmo tecido, pSer40 também foi aumentada, efeito dependente de PKA (ONG et al., 2014). O retinol (vitamina A) possui diversos papéis fisiológicos e num estudo realizado *in vitro* foi demonstrado que age em células cromafim bovinas aumentando o influxo de cálcio e ativando a produção de ROS e vias de sinalização intracelular como ERK e PKC. Estas vias exercem influência sobre a fosforilação de TH na Ser31 e Ser40, respectivamente (GELAIN et al., 2007).

Quanto ao efeito do Mn sobre a atividade de TH, Posser e colaboradores (2009) demonstraram que o Mn (100  $\mu$ M por um período de 1 a 24 h) estimula a fosforilação sustentada de TH na Ser40 no modelo de células PC12 (linhagem de feocromocitoma de rato) sem alterar a síntese proteica de TH ou a viabilidade celular. Zhang e

colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento agudo (3 h) de células dopaminérgicas N27 diferenciadas com concentrações sub-tóxicas de  $MnCl_2$  (3  $\mu M$  e 10  $\mu M$ ) induziu um aumento na atividade de TH, bem como aumento dose-dependente nos níveis de fosforilação de TH na Ser40. Por outro lado, o tratamento com concentrações baixas de Mn e por longo período (0,1-1  $\mu M$  Mn durante 24 h), produziu uma diminuição da atividade da TH sem afetar a fosforilação na Ser40 (ZHANG et al., 2011). Logo, considerando os dados *in vitro* demonstrando que as alterações na atividade TH podem desempenhar um papel na ação de Mn sobre o sistema dopaminérgico, se torna interessante estudar o efeito do Mn sobre a atividade de TH *in vivo*.

### 1.3.3 Alteração na sinalização de MAPKs e AKT induzida por Mn

A família das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) é constituída por serina-treonina cinases que respondem a uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo estresse oxidativo (SON et al., 2011). Estas proteínas são responsáveis pela transdução de sinais em células eucarióticas que medeiam: proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, morte e transformação celular (KIM e CHOI, 2010, 2015). As três principais MAPKs identificadas são as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), cinase c-Jun N-terminal (JNK) e as  $p38^{MAPK}$ , conforme exemplificado na Figura 2. A via das MAPKs é evolutivamente conservada em células eucarióticas. Cada via é composta de três classes de proteínas cinases: MAPK, MAPK cinase (MAPKK) e MAPK cinase cinase (MAPKKK). Dentro da superfamília MAPKK, vários grupos foram também distinguidos, tais como MEK1/2 (MKK1/2), MKK3/6, MKK4 (SEK-1 ou JNKK-1) e MKK7 (JNKK-2). MEK1/2 têm sido relacionadas com a ativação de ERK, MKK4 pode ativar tanto a JNK e  $p38^{MAPK}$ , MKK7 é específica para o subgrupo de JNK, e MKK3/6 atuam como ativadores do subgrupo  $p38^{MAPK}$ . Os membros MAPKK são por sua vez ativados por membros da superfamília MAPKKK, como Raf, MEKK, ASK, TAK1, MLK, TAO e COT (CHANG e KARIN, 2001; THOMAS e HUGANIR, 2004). A desativação das MAPKs é dependente de fosfatases específicas, como a MKP-1 (fosfatase da MAP cinase) bem como de outras classes de proteínas fosfatases (MCCUBREY et al., 2006).

A ERK1/2 é ativada principalmente por fatores de crescimento, regulando a expressão gênica, a embriogênese, a proliferação, a morte/sobrevivência celular e a neuroplasticidade (CHEN et al., 2001; THOMAS e HUGANIR, 2004). A JNK1/2/3 e a  $p38^{MAPK}$  são classicamente conhecidas como proteínas cinases ativadas por estresse

(SAPKs), sendo ativadas por citocinas e insultos citotóxicos, e estão muitas vezes relacionadas com o estresse e a morte celular (MIELKE e HERDEGEN, 2000; COWAN e STOREY, 2003). No entanto, elas também podem regular o neurodesenvolvimento e a neuroplasticidade (WAETZIG e HERDEGEN, 2004; WAETZIG et al., 2006).

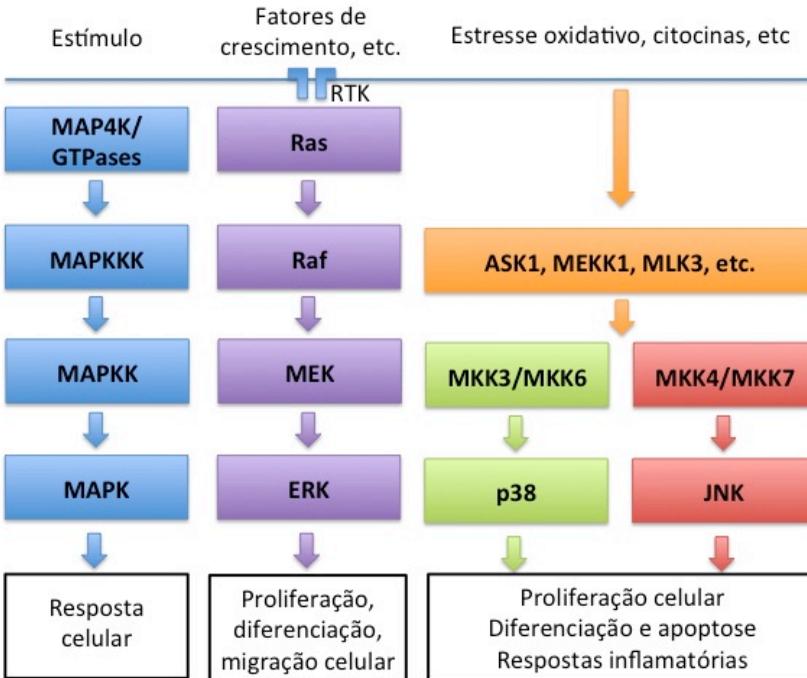


Figura 2: Esquema geral da ativação da via de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). MAPKs operam em forma de cascata e medeiam a sinalização intracelular iniciada por fatores extracelulares ou intracelulares. MAPKKKs, que podem ser ativadas tanto por MAP4Ks ou GTPases, fosforilam MAPKKs que por sua vez fosforilam e ativam MAPKs. Uma vez ativadas, MAPKs fosforilam vários substratos, incluindo fatores de transcrição, regulando desta maneira uma variedade de atividades celulares, como proliferação, diferenciação, migração, respostas inflamatórias e morte celular. Em mamíferos, a família de MAPKs é composta principalmente por ERK, p38<sup>MAPK</sup> e JNK. RTK: receptor tirosina cinase. Adaptado de Kim e Choi (2015).

A via da fosfatidilinositol-3 cinase/proteína cinase B (PI3K/AKT, ilustrada na Figura 3) pode ser ativada por vários fatores de

crescimento e desempenha um papel central na regulação do crescimento celular, da proliferação, da sobrevivência e do metabolismo celular, bem como da neuroplasticidade (BRUNET et al., 2001; BRAZIL et al., 2004; VAN DER HEIDE et al., 2006).

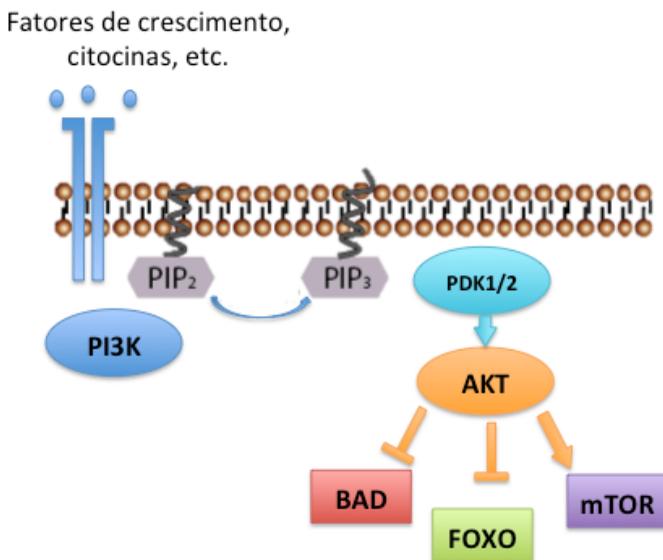


Figura 3: Via de sinalização da PI3K/AKT. A fosfatidil inositol 3 cinase (PI3K) fosforila fosfatidilinositol-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) na membrana celular, gerando PIP<sub>3</sub>, os quais recrutam tanto AKT quanto a cinase dependente de fosfoinosítido (PDK1/2). A fosforilação de AKT por PDK também ativa AKT. AKT por sua vez age sobre fatores de transcrição como FOXO, ou a proteína pró-apoptótica BAD e a via de sinalização mTOR. Regulando assim a sobrevivência celular e transcrição gênica. Adaptado de Bader et al. (2005).

A ativação de ERK1/2, JNK e p38<sup>MAPK</sup> relacionadas ou não com apoptose em resposta à exposição *in vitro* ao Mn têm sido relatadas em culturas primárias de astrócitos, microglia e em linhagens celulares (HIRATA et al., 2004; ITO et al., 2006; GONZALEZ et al., 2008; PRABHAKARAN et al., 2008; YIN et al., 2008; EXIL et al., 2014). Em relação ao estriado, foi demonstrado que o tratamento *in vivo* com Mn durante o desenvolvimento (dia pós-natal, PND 8 ao 12 ou PND 8 ao 27, via intraperitoneal, i.p.) pode estimular a fosforilação de AKT na Ser473 por um mecanismo desconhecido, mas aparentemente

independente do estresse oxidativo (CORDOVA et al., 2012; CORDOVA et al., 2013). A ativação prolongada de AKT no estriado também foi observada em ratos expostos ao Mn (via oral, PND 1 ao 21) (MCDUGALL et al., 2011). Além disso, a ativação no estriado de ERK1/2 em resposta à exposição ao Mn no PN8-12 e a ativação de p38<sup>MAPK</sup> em resposta a uma exposição prolongada (PND 8-27), de um modo dependente da produção de estresse oxidativo, foram relatados (CORDOVA et al., 2012; CORDOVA et al., 2013). Dado que a duração da sinalização pode alterar significativamente características qualitativas e quantitativas de seus elementos alvos, estas alterações do padrão de fosforilação de ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup> e AKT podem desencadear efeitos duradouros envolvidos na alteração da migração de células, da proliferação, da diferenciação ou da sobrevivência. É importante afirmar que os tipos de células do corpo estriado envolvidos nestas respostas ao Mn não foram determinados. No entanto, os estudos *in vitro* em células gliais tratadas com Mn mostraram a participação de ERK1/2 e AKT na expressão de iNOS em microglia (BAE et al., 2006) e COX-2 em astrócitos (LIAO et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que o Mn induziu a morte celular por apoptose por meio da via de sinalização da ERK1/2, com a ativação da caspase-3 em células PC12 (ITO et al., 2006). Ainda, em fatias estriatais obtidas de ratos imaturos, ativação de ERK1/2 e JNK foram observadas, sem queda da viabilidade celular (PERES et al., 2013). Portanto, a ativação de ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup> e AKT induzida por Mn pode estar associada com alterações na neuroplasticidade e/ou a viabilidade das células no estriado de ratos imaturos, assim prejudicando funções neurofisiológicas e o neurodesenvolvimento. Além disso, a resposta ao estresse oxidativo podem estar envolvida apenas na ativação de ERK1/2 e p38<sup>MAPK</sup>, uma vez que o efeito de Mn sobre estas cinases, mas não sobre AKT, foi abolido pelo antioxidante Trolox (CORDOVA et al., 2012).

#### 1.4 Mecanismos de defesa antioxidante

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas (EROs ou ERNs) excede a capacidade das células de neutralizar seus efeitos. Ocorre com isso o dano a membranas celulares, danos ao DNA e proteínas, alterações em vias de sinalização intracelular e eventualmente a morte celular. O tecido cerebral é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido ao seu alto consumo de oxigênio, relativamente baixa capacidade antioxidante e elevados níveis de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares (HALLIWELL, 2006).

O Mn induz a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) *in vitro* (POSSER et al., 2009) e radical hidroxil ( $HO\cdot$ ) *in vivo* (BALASZ et al., 2015), além de interagir com a DA extracelular, facilitando sua oxidação e geração de quinonas reativas (BENEDETTO et al., 2010). Diversos estudos relatam alterações em enzimas antioxidantes induzidas pelo Mn. Dentre as principais estratégias antioxidantes estudadas, destacamos as enzimas catalase, glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e o tripeptídeo gama-glutamil-cisteína ou glutatona (GSH) (LIMÓN-PACHECO e GONSEBATT, 2009).

A produção de enzimas antioxidantes está em grande parte sob o controle do fator de transcrição Nrf2 (fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2). Nrf-2 localiza-se no citoplasma, em um complexo inibitório com a proteína Keap-1, que além de retê-lo no citoplasma, o marca para degradação proteossomal. Estímulos estressores causam mudanças conformacionais em Keap-1 e também fosforilação de Nrf-2. Isto leva à liberação de Nrf2 e permite sua migração para o núcleo, onde liga-se à sequência de ativação reguladora 5', denominada elemento de resposta antioxidante (ARE), localizada na região promotora de genes que codificam enzimas antioxidantes (KENSLEER et al., 2007). Já foi descrito que a translocação de Nrf2 pode ser ativada por diferentes vias de sinalização. As vias das MAPKs, PI3K/AKT e PKC facilitam a translocação nuclear do Nrf2. Por outro lado, a glicogênio sintase cinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) regula negativamente a sinalização de Nrf2 através da fosforilação de resíduos específicos (SALAZAR et al., 2006; SUN et al., 2009).

Outro fator de transcrição conhecido por seu papel nas respostas celulares, incluindo metabolismo da glicose, ciclo celular, detoxificação de EROs, reparo do DNA e apoptose pertence à família das proteínas *Forkhead Box class O* (FOXO). Mamíferos possuem quatro isoformas, FOXO1, FOXO3, FOXO4 e FOXO6. Três destas isoformas, FOXO1, FOXO3 e FOXO4 são reguladas pela fosforilação dependente de AKT em três sítios específicos em resposta à estimulação pela insulina e fatores de crescimento. A insulina/IGF-1 e os fatores de crescimento inibem FOXO através de fosforilação em sítios específicos pela AKT. Em contrapartida, em resposta ao estresse, a via da JNK fosforila diretamente FOXO ativando a sua localização nuclear (WANG et al., 2014).

### **1.5 Modelos animais para estudo da neurotoxicidade do Mn**

O uso de modelos de roedores é uma importante ferramenta

para o estudo dos mecanismos de toxicidade do Mn, com foco no transporte do metal, sua homeostase e efeitos comportamentais. Os modelos animais facilitam a utilização de diferentes vias de exposição ao Mn, bem como o uso de diferentes formas químicas do Mn, que podem imitar a exposição ambiental ou ocupacional.

Os modelos animais de roedores têm sido usados para estudar os efeitos comportamentais do Mn, apesar da alegação de que os primatas não-humanos sejam um modelo animal mais adequado para refletir a condição humana (NEAL e GUILARTE, 2013). No entanto, a função cognitiva e motora tem sido avaliadas em modelos de roedores utilizando uma variedade de testes comportamentais: campo aberto (CALABRESI et al., 2001; DODD et al., 2005; CORDOVA et al., 2012; SANTOS et al., 2013), rotarod (MCDUGALL et al., 2008; NAM e KIM, 2008; CORDOVA et al., 2012; CORDOVA et al., 2013; BOUABID et al., 2014), *beam walking* (ORDOÑEZ-LIBRADO et al., 2008; SCHMITZ et al., 2014), *grip strength* (DODD et al., 2005), teste da escada de Montoya (BEAUDIN et al., 2013), *single pellet reaching* (ORDOÑEZ-LIBRADO et al., 2008; SCHMITZ et al., 2014), labirinto aquático de Morris (FITSANAKIS et al., 2009; BLECHARZ-KLIN et al., 2012) e esquivas inibitórias do tipo *step-down* (SCHMITZ et al., 2014).

Diversos modelos animais vêm contribuindo para a elucidação dos mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do Mn. Muito do que se conhece a respeito da resposta celular ao estresse induzido por concentrações tóxicas de metais foi obtido em modelos de mamíferos. Porém, tem crescido o interesse na utilização de novos modelos animais para estes estudos. Neste sentido, devido à sua homologia bioquímica com os mamíferos, a utilização do verme nematódeo *Caenorhabditis elegans* tem se destacado. Diversas alterações em resposta à exposição a metais, principalmente aquelas envolvendo expressão gênica e vias de sinalização intracelular, têm sido relatadas utilizando o nematódeo como modelo de estudo (CAITO et al., 2012).

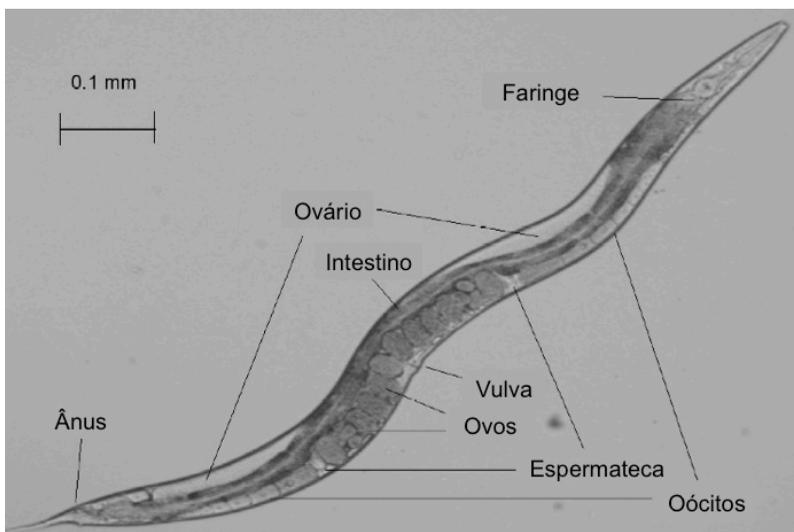


Figura 4: Algumas estruturas anatômicas do verme nematódeo *Caenorhabditis elegans* hermafrodita adulto. Adaptado de Yamaguchi et al. (2008).

O *C. elegans* é um animal de vida livre que habita solos úmidos, utiliza oxigênio atmosférico e se alimenta de bactérias (Figura 4). Este verme tem sido utilizado como modelo experimental desde as investigações realizadas pelo biólogo sul-africano Sydney Brenner, que utilizou o nematódeo para fazer uma prospecção no seu genoma em busca de mutações que poderiam alterar seu movimento, rendendo-lhe o prêmio Nobel em 2002 (HELMCKE et al., 2010). O *C. elegans* constitui um modelo experimental que comparado ao modelo de roedores, confere uma alternativa de mais simples criação, manipulação genética e análise *in vivo* de toxicidade de diversos compostos. Os vermes possuem tempo de vida curto (18-30 dias), passando por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) antes de se tornarem adultos. São hermafroditas em sua maioria e seu ciclo reprodutivo é breve (3 dias, a 22°C), com a geração de uma prole contendo até 300 indivíduos, conforme esquematizado na Figura 5 (BRENNER, 1974; AITLHADJ et al., 2011). Portanto, é um modelo bastante vantajoso e conveniente para análise genética, pois seu genoma já foi mapeado, apresentando grande ortologia em relação ao genoma humano (MARTINEZ-FINLEY e ASCHNER, 2011; ÁVILA et al., 2012a). O genoma do *C. elegans* possui aproximadamente 60% a 80% de homologia com o humano e contém muitas das proteínas regulatórias conservadas. Este alto grau de

conservação genética o torna relevante para o estudo da Toxicologia Molecular (KALETTA e HENGARTNER, 2006). Em conjunto, estas características fazem do *C. elegans* um modelo experimental para estudos *in vivo*, enquanto mantém as vantagens práticas de um modelo *in vitro* (HELMCKE et al., 2010).

### 1.5.1 O sistema nervoso em *C. elegans*

O sistema nervoso é o órgão mais complexo do *C. elegans*. Todas as funções básicas do verme e a regulação da alimentação, desenvolvimento, movimento, metabolismo e reprodução estão sob o controle do sistema nervoso (RANKIN, 2002; CHATTERJEE e SINHA, 2008). Assim, alterações em qualquer sistema neurotransmissor causam perturbações em funções específicas compatíveis com o tipo de neurônio afetado. O hermafrodita possui 302 células nervosas e 56 células epiteliogliais, que juntas equivalem a 37% de todas as suas células somáticas. Estas formam cerca de 5000 sinapses, 2000 junções neuromusculares e 600 junções-gap (WHITE et al., 1986).

Os trabalhos de White e colaboradores (1986) e mais recentemente Varshney e colaboradores (2011) descreveram a conectividade de todos os neurônios do sistema nervoso do verme hermafrodita, através de uma série de análises utilizando microscopia eletrônica de transmissão. Desta forma, foi estabelecido a organização do sistema nervoso do *C. elegans*. A maior parte de seu sistema nervoso se localiza na cabeça, que possui vários receptores sensoriais. Estes se organizam em grupos de órgãos sensoriais denominados *sensilla*. Cada um destes órgãos possui uma ou mais terminações nervosas ciliadas e duas células não neuronais: *sheath* e *socket*. *Sheath* é a célula tipo-glia que envolve as terminações neuronais. *Socket* é a célula que conecta o *sensillum* à hipoderme. A maioria dos neurônios do verme têm o corpo celular situado ao redor da faringe, formando o gânglio anterior. O verme também possui um gânglio dorsal, um par de gânglios laterais, um gânglio ventral, o gânglio retrovesicular, situado ao longo do corpo e terminando no gânglio pré-anal, além de mais três gânglios na região da cauda e uma par de gânglios laterais posteriores. Assim, os neurônios estão concentrados principalmente no anel nervoso que circunda a faringe, na cadeia ou nervo corda ventral e na cauda (HALL et al., 2006).

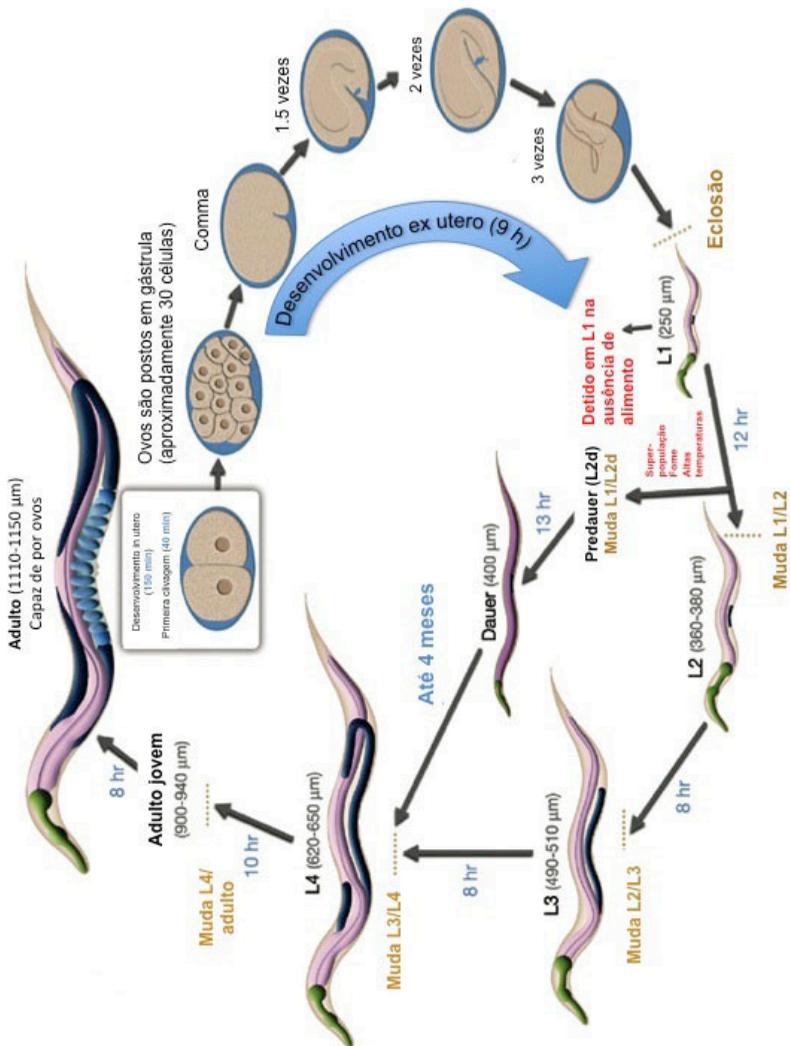


Figura 5: Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans* em 22°C. O tempo que o animal passa em um determinado estágio está indicado em azul ao longo das setas. A primeira clivagem ocorre cerca de 40 min pós-fertilização. Os ovos são postos cerca de 150 min pós-fertilização, durante a fase de gástrula. O comprimento do animal em cada fase está marcado em micrômetros. Os animais na fase L1 expostos a condições de superpopulação, fome ou altas temperaturas entram no estágio dauer. Em condições favoráveis se desenvolvem para L2, L3, L4 até a fase adulta. Adaptado de *WormAtlas*.

Os neurônios do verme são classificados em sensoriais, motores, interneurônios ou de função mista baseado nas suas características morfológicas e funcionais (HALL et al., 2006). Além disso, Jarrell e colaboradores (2012) estudaram o conectoma do *C. elegans* macho ajudando a entender especialmente o comportamento de acasalamento.

O verme contém neurotransmissores comuns ao sistema nervoso dos mamíferos, incluindo serotonina, dopamina (DA), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glutamato e acetilcolina, bem como numerosos neuropeptídeos. Os genes das enzimas necessárias para a síntese de DA, octopamina (uma monoamina de invertebrados, semelhante à norepinefrina) e serotonina (tirosina hidroxilase, dopamina  $\beta$ -hidroxilase, DOPA descarboxilase e triptofano hidroxilase) estão presentes no genoma de *C. elegans*. Transportadores e receptores específicos para neurotransmissores (de membrana e vesicular) também são altamente conservados em relação aos seus homólogos em mamífero (BARGMANN, 1998).

### 1.5.2 O sistema dopaminérgico em *C. elegans*

As monoaminas (DA, serotonina, octopamina e tiramina) modulam vários comportamentos em *C. elegans*, como locomoção, postura de ovos, defecação e forrageamento. Dentre as proteínas relacionadas à função dopaminérgica em humanos, foram identificados homólogos em *C. elegans* que incluem: CAT-2 homóloga à TH; DOP-1, DOP-2, DOP-3 e DOP-4, homólogos ao receptor de DA (CHASE e KOELLE, 2007); CAT-1, homólogo ao VMAT (transportador de monoaminas vesicular), expresso em neurônios dopaminérgicos e responsável pelo transporte da DA do citosol para vesículas sinápticas (DUERR et al., 1999) e DAT-1 (transportador de DA), o homólogo do transportador pré-sináptico de DA (JAYANTHI et al., 1998). Devido às semelhanças na homeostase dopaminérgica entre *C. elegans* e mamíferos, o nematódeo revelou-se um valioso modelo para a compreensão de doenças humanas que implicam anormalidades na função dopaminérgica (AITLHADJ et al., 2011; HARDAWAY et al., 2012).

O verme hermafrodita possui 8 neurônios dopaminérgicos. Dois pares estão localizados na região cefálica e são denominados de acordo com sua posição em CEPDL/R (cefálico dorsal esquerdo/ direito), CEPVL/R (cefálico ventral esquerdo/ direito) (Figura 6). Estes neurônios projetam dendritos para a região anterior (nariz) do verme, onde terminam em contato com células especializadas, *sheath* e *socket*,

formando uma terminação sensorial chamada *Cephalic*. Seus axônios são projetados para o anel nervoso, onde fazem contato entre eles e com outros neurônios. Entre os neurônios que fazem sinapse com o grupo CEP, estão incluídos neurônios importantes para a locomoção e motricidade do verme. Também estão presentes um par de terminações nervosas denominadas *deirids* anteriores (ADE L/R) e um par de *deirids* posteriores (PDE L/R) (SULSTON et al., 1975; MCDONALD et al., 2006).

A DA possui papel importante para as respostas às mudanças no ambiente ao redor do verme. Quando sua fonte de alimento se esgota, o verme necessita buscar por alimento em outra região. A DA faz parte deste processo modulando a locomoção do verme. Por exemplo, ao entrar em contato com bactérias, os neurônios mecanossensoriais, que são dopaminérgicos, reconhecem o estímulo e conseqüentemente o verme desacelera sua movimentação. Esta resposta conhecida como *basal slowing* depende da presença da DA e da integridade dos neurônios dopaminérgicos. Como demonstrado anteriormente, vermes *knockout* (KO) para *cat-2* ou vermes que tiveram ablação dos neurônios dopaminérgicos não apresentam essa resposta (SAWIN et al., 2000; CHASE e KOELLE, 2007).

Outro comportamento observado nos vermes é a busca em área restrita. Quando percebe o esgotamento do alimento, o verme necessita buscá-lo em uma região próxima. Isso pode ser observado pelo aumento da frequência das curvas fechadas que o verme realiza na sua movimentação. Caso não encontre nova fonte de alimento na região próxima, o verme diminui a frequência das curvas fechadas e passa a expandir sua área de busca. Este comportamento evoluiu para manter o organismo próximo da área onde anteriormente o alimento esteve disponível, o que estaria associado à maior probabilidade de encontrar outra fonte alimentar próxima. Consistente com o papel da sinalização de DA neste comportamento, os animais expostos à DA exógena mostram um aumento da frequência das curvas fechadas enquanto animais expostos a racloprida, um antagonista da DA, apresentam uma diminuição da frequência de curvas fechadas (HILLS et al., 2004; CHASE e KOELLE, 2007).

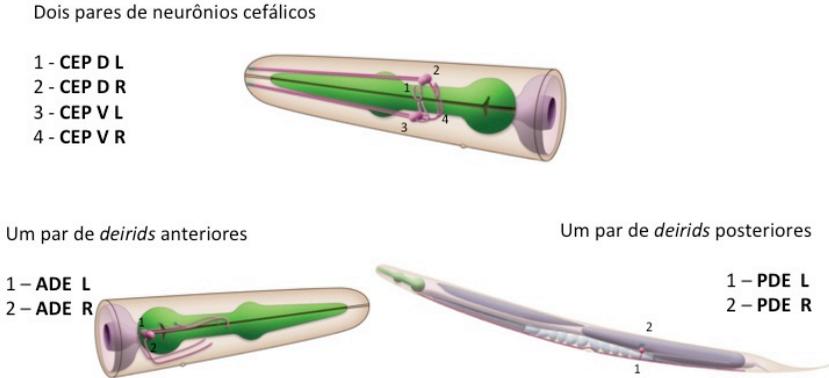


Figura 6: Neurônios dopaminérgicos em *C. elegans*. D: dorsal; V: ventral; L: esquerdo; R: direito. Adaptado de *WormAtlas*.

### 1.5.3 Via de sinalização das MAPKs e AKT em *C. elegans*

A avaliação da ação de diversos metais em *C. elegans* tem contribuído para a elucidação de seus mecanismos de toxicidade (AITLHADJ et al., 2011). Foi demonstrado que a via das MAPKs está envolvida na resposta à intoxicação por metais pesados neste modelo (KOGA et al., 2000; MIZUNO et al., 2004). Na Figura 7 estão relacionados algumas das proteínas que constituem a via das MAPKs em mamíferos e seus homólogos identificados em *C. elegans*.

Em um estudo realizado no modelo de *C. elegans*, a deleção do gene responsável pela proteína MEK-1 (uma MAPKK, similar às proteínas MKK7 de mamíferos, que atuam sobre JNK) resultou em hipersensibilidade do nematódeo a metais pesados, incluindo o cádmio (Cd) (KOGA et al., 2000).

Diversas vias de sinalização intracelular relevantes para a morte de células neuronais encontram-se conservadas no nematódeo, tais como a  $p38^{MAPK}$ , a cascata de sinalização de AKT, a via da ubiquitina-proteassoma e as respostas ao estresse oxidativo (AITLHADJ et al., 2011). Todos os três tipos de MAPKs (ERK,  $p38^{MAPK}$  e JNK) possuem papel na resposta a diferentes agentes estressores em *C. elegans*. Já foi identificado que durante o estresse oxidativo, a proteína PMK-1, homóloga à  $p38^{MAPK}$  de mamíferos, é necessária para a translocação do fator de transcrição SKN-1 (homólogo ao Nrf-2), o qual regula positivamente a transcrição de genes com função de proteção (INOUE et al., 2005). Desta forma, *C. elegans* é um modelo animal bem reconhecido por sua utilidade para determinar mecanismos de morte celular (AITLHADJ et al., 2011).

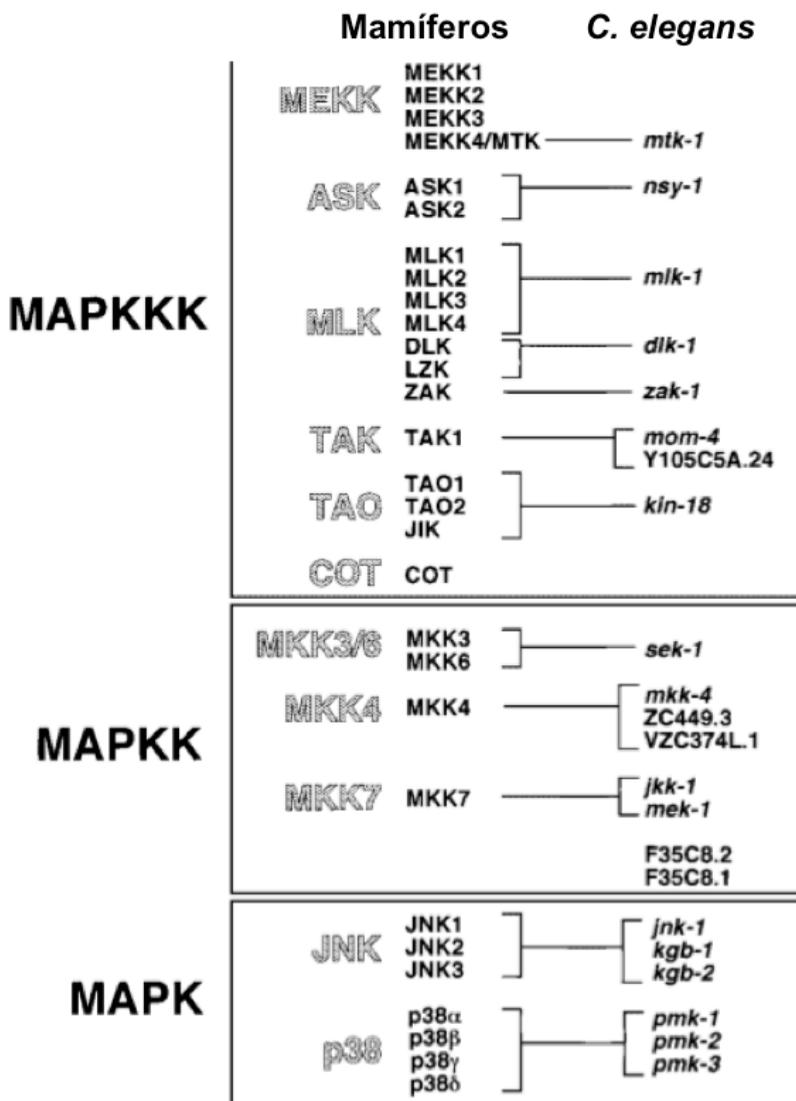


Figura 7: Proteínas que constituem a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), MAPK cinase (MAPKK) e MAPK cinase cinase (MAPKKK) em mamíferos e seus homólogos em *C. elegans*. Adaptado de Sakaguchi et al. (2004).

A análise do genoma do *C. elegans* sugere que este possui várias proteínas que constituem a via das MAPKs. Proteínas do grupo STE, que atuam sobre as MAPKs estão presentes em seu genoma. Nos vermes, este grupo inclui dez STE7 cinases (representando as MAPKK), duas STE11 cinases (representando as MAPKKK) e doze STE20 cinases (representando as MAP4K) (PLOWMAN et al., 1999). Existem três homólogos de JNK em *C. elegans*: JNK-1, KGB-1 e KGB-2. O *C. elegans* contém três homólogos de p38<sup>MAPK</sup>, PMK-1, PMK-2 e PMK-3. Sendo os genes *pmk* contíguos no cromossomo IV, compreendendo um operon (BERMAN et al., 2001). A cascata da ERK é constituída por LIN-45 (ortólogo de RAF1 de mamíferos), MEK-2 (ortólogo em *C. elegans* de MEK1/2) e MPK-1(ERK1/2). Esta via é requerida para vários processos durante o desenvolvimento e possui também um papel na longevidade nos vermes. Os mutantes KO para esta via são inviáveis (OKUYAMA et al., 2010).

Foi demonstrado que JNK-1, assim como sua ativadora direta, JKK-1, são expressas na maioria dos neurônios e seus processos, incluindo o anel nervoso, gânglio da cabeça, cordão dorsal e ventral e gânglio da cauda (KAWASAKI et al., 1999). Villanueva e colaboradores (2001) investigaram o papel fisiológico de JNK-1 em *C. elegans* utilizando mutantes com defeito na sua expressão e demonstraram que estes possuem defeito em respostas mecanossensoriais e locomoção descoordenada. Além disso, os mutantes apresentaram hipersensibilidade ao cobre e Cd. A via de sinalização da JNK-1 também possui papel na neurotoxicidade do Mn em *C. elegans* conforme demonstrado por *knockdown* de *jnk-1*, resultando no aumento da viabilidade dos neurônios dopaminérgicos após exposição ao Mn, consistente com o papel de JNK em vias de sinalização que conduzem à apoptose (SETTIVARI et al., 2013).

Usando a proteína verde fluorescente (GFP) como marcador, foi demonstrado que o promotor de *pmk-3* é ativo ao longo de todo o intestino do verme, especificamente nos núcleos de células intestinais (BERMAN et al., 2001). O papel fisiológico de p38<sup>MAPK</sup> em *C. elegans* está relacionado com a resposta ao estresse oxidativo. Foi demonstrado que a translocação do fator de transcrição DAF-16 (homólogo ao FOXO de mamíferos) para o núcleo mediada pelo estresse oxidativo foi bloqueada como consequência da mutação em *sek-1* (homóloga à MKK4, a MAPKK que ativa a p38<sup>MAPK</sup>). Desta forma, mutantes *sek-1* são hipersensíveis ao estresse oxidativo produzido por paraquat (KONDO et al., 2005). A via da p38<sup>MAPK</sup> também esta envolvida na resposta imune inata em *C. elegans* (HOEVEN et al., 2011).

A via de sinalização tipo receptor de insulina (ILS, Figura 8) regula o metabolismo, desenvolvimento e longevidade do *C. elegans* (KIMURA et al., 1997). A via é composta pelo receptor homólogo ao da insulina/IGF-1, denominado DAF-2 e pelas proteínas homólogas a PI3K, cinase dependente de fosfatidil-inositol (PDK), proteína cinase B (também conhecida como AKT) e cinase regulada por soro e glicocorticóide (SGK) (AGE-1, PDK-1, AKT-1, AKT-2 e SGK-1, respectivamente). Esta via é necessária para o crescimento, para a reprodução e para o metabolismo do verme (PARADIS e RUVKUN, 1998). Mutações no receptor DAF-2 (KIMURA et al., 1997) ou em AGE-1 (MORRIS et al., 1996) causam nos vermes retenção no estágio dauer, armazenamento de gordura e maior longevidade (DAF se refere a fenótipo formador de dauer) (KIMURA et al., 1997). Esta regulação do metabolismo em *C. elegans* é semelhante ao papel fisiológico da insulina nos mamíferos. A insulina controla a homeostase da glicose, alterando a atividade de reguladores metabólicos chave, tais como transportadores de glicose e enzimas metabólicas. Mutações no fator de transcrição da família *Forkhead*, DAF-16, inibem a retenção no estágio dauer, a mudança no perfil metabólico e os fenótipos de longevidade observados nos mutantes com perda de função em *daf-2* e *age-1*. Isto indica que DAF-16 é um alvo da sinalização ILS em *C. elegans* e que a ação de DAF-16 é antagonizada por esta via de sinalização (OGG et al., 1997). Além de DAF-16, também foi demonstrado que a ILS pode antagonizar o fator de transcrição SKN-1 (TULLET et al., 2008; GATSI et al., 2014).

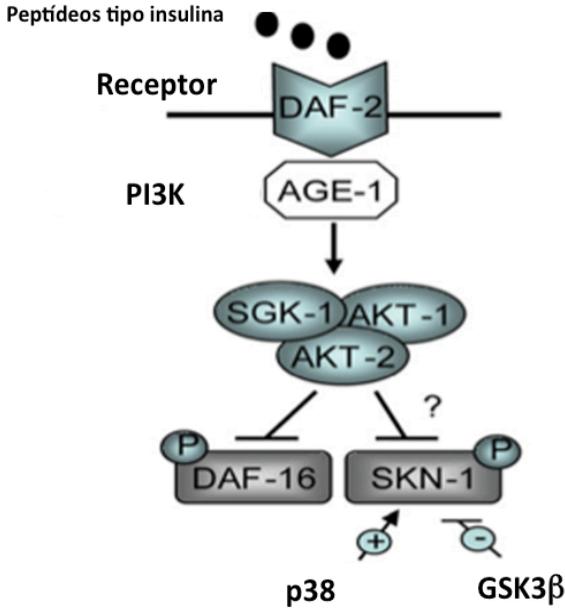


Figura 8: A via de sinalização tipo insulina em *C. elegans*. Esta via é ativada por ligantes tipo insulina que ativam o receptor DAF-2, AGE-1 (PI3K), PDK-1 (não demonstrado) e seus alvos AKT1/2 e SGK, de maneira a modular o fator de transcrição DAF-16. Esta via regula o metabolismo e longevidade em *C. elegans*. Também foi demonstrado que esta via de sinalização pode antagonizar o fator de transcrição SKN-1, homólogo ao Nrf-2 de mamíferos. Adaptado de Tullet et al. (2008).

A resposta de detoxificação fase 2 fornece uma conservada defesa contra o estresse oxidativo (MCMAHON et al., 2001). Em *C. elegans* as enzimas participantes da fase 2 têm sua expressão controlada pelo fator de transcrição SKN-1. SKN-1 é importante para o desenvolvimento do sistema digestório durante os primeiros estágios embrionários e posteriormente é necessário para a regulação do tempo de vida normal e resistência ao estresse. Em resposta ao estresse oxidativo ocorre a translocação de SKN-1 para o núcleo das células intestinais, onde ele ativa a transcrição de  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase cadeia pesada [GCS(h)], glutationa sintetase e quatro isoformas de glutationa S-transferase (GST) (BOWERMAN et al., 1992; AN e BLACKWELL, 2003). DAF-16 ativa a transcrição de *sod-3*, entre outros genes da resposta antioxidante. SOD-3 é homóloga à Mn-SOD e localiza-se na mitocôndria (OGG et al., 1997; HONDA e HONDA,

1999). Assim, pode parecer uma desvantagem para a via ILS diminuir a resistência ao estresse oxidativo por antagonizar DAF-16 e SKN-1. Porém isso pode ser explicado pelo fato de que muitas vias de sinalização são influenciadas pelo estado redox. Assim, através da inibição de DAF-16/FOXO e SKN-1/Nrf, a ILS poderia suprimir as defesas antioxidantes criando um micro-ambiente mais redutor, e que por sua vez, pode diminuir a eficácia da ILS. Isto é consistente com a evidência de que a insulina induz a produção de ROS em células na ausência de nutrientes, e que a ILS funciona mais eficazmente em condições pró-oxidantes (TULLET et al., 2008).

Já foi demonstrado que o Mn induz estresse oxidativo e redução da longevidade em *C. elegans* (AU et al., 2009). Além disso, graças ao modelo do nematódeo, foi demonstrado o papel da DA e geração de EROs na neurodegeneração dopaminérgica induzida pelo Mn (BENEDETTO et al., 2010). O estresse oxidativo é uma das principais características da toxicidade induzida por Mn em mamíferos e o modelo de *C. elegans* reproduz esta propriedade, bem como a especificidade do metal por neurônios dopaminérgicos, com redução da viabilidade e alterações morfológicas nestes neurônios. Assim, *C. elegans* é um modelo bastante útil para o estudo do papel de vias de sinalização como MAPKs e AKT na toxicidade induzida pelo Mn.

Os mecanismos moleculares da ação do Mn não são totalmente conhecidos. Foi demonstrado que Mn pode causar morte celular devido ao estresse oxidativo, levando à ativação de proteínas cinases ativadas por estresse (TAKEDA, 2003; POSSER et al., 2009). Roth e colaboradores (2002a) demonstraram que o metal causa danos mitocondriais com consequente queda na produção de ATP levando à ativação de vias de apoptose e necrose em células PC12. O efeito do Mn durante períodos críticos do desenvolvimento é um aspecto pouco estudado da neurotoxicidade deste metal. Apesar disso alguns estudos sugerem que o Mn poderia prejudicar a função neurológica em fases posteriores da vida (MORENO et al., 2009a, 2009b). Tem sido proposto que a exposição ambiental durante períodos iniciais do desenvolvimento neural podem aumentar a susceptibilidade do SNC para exposições adicionais ou aumentar o risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e transtornos psiquiátricos, tais como a doença de Parkinson e esquizofrenia (CORY-SLECHTA et al., 2005; GUILARTE et al., 2012). Portanto, torna-se importante avaliar os efeitos do Mn em fases iniciais do desenvolvimento do SNC bem como verificar a possível permanência de alterações mais tardias na vida adulta ou na velhice.

Estudos realizados pelo nosso grupo utilizando um modelo de exposição de ratos durante o desenvolvimento (PND 8-12) mostraram que o Mn pode induzir a ativação de proteínas cinases como ERK1/2 e AKT. Além disso, aumento de marcadores de estresse oxidativo como isoprostanos e inibição de complexos da cadeia respiratória foram observados. No mesmo protocolo experimental, o Mn debilitou a coordenação motora na 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semana de vida. O tratamento com Trolox, um composto antioxidante derivado da vitamina E, preveniu estas alterações (CORDOVA et al., 2012). No protocolo de exposição mais longa (PND 8-27) a exposição ao Mn (20 mg/kg) induziu aumento da fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> e AKT no PND 29. Lipoperoxidação e danos motores também encontravam-se presentes. Estes efeitos foram prevenidos pelo Trolox (CORDOVA et al., 2013). Dando continuidade a este trabalho, avaliamos os animais na fase adulta para estabelecer se os danos causados pelo Mn neste modelo são permanentes e/ou possuem consequências persistentes na coordenação motora, memória e resposta antioxidante dos animais.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar as ações neurotóxicas do Mn durante o desenvolvimento e possíveis efeitos persistentes que possam representar prejuízos comportamentais na fase adulta. Investigamos a participação de algumas vias de transdução de sinal e do estresse oxidativo na neurotoxicidade do metal. Utilizamos o modelo de ratos imaturos expostos ao Mn durante o desenvolvimento e avaliados na fase adulta como um modelo de mamíferos. Utilizamos o modelo do nematódeo *C. elegans* exposto ao metal na fase larval como um modelo mais simples para a avaliação de vias de sinalização e morfologia de neurônios.

### 2.1 Objetivos específicos:

No modelo de ratos expostos ao  $MnCl_2$  (5, 10 ou 20 mg/kg) do PND 8 ao 12 pela via intraperitoneal:

- 1) Estabelecer se há alterações comportamentais persistentes induzidas pela exposição perinatal ao Mn. Para isso foram avaliadas as funções motora, cognitiva e olfatória na fase adulta dos animais. Os testes comportamentais foram escolhidos para demonstrar as consequências que a exposição perinatal ao Mn podem ter na fase adulta;
- 2) Avaliar alterações no sistema de defesa antioxidante no hipocampo e no estriado dos ratos no PND 14 e também no PND 70 para estabelecer se tais alterações podem ser persistentes. Para isso foi analisada a atividade de enzimas antioxidantes (catalase, SOD, GR, GPx) e os níveis de tiois não-proteicos (NPSH). Estes parâmetros foram avaliados para estabelecer a importância do estresse oxidativo gerado pelo metal na resposta antioxidante na fase adulta;
- 3) Avaliar parâmetros de sinalização intracelular no PND 70 no hipocampo e no estriado que podem ser alterados pela exposição ao Mn. Para isso foi avaliada a modulação por fosforilação de MAPKs, AKT e alvos de PKA e PKC. As alterações na sinalização intracelular durante o desenvolvimento podem impactar de forma negativa o desenvolvimento do SNC;
- 4) Determinar no hipocampo e no estriado no PND 70 uma possível ativação astrocitária duradoura através da detecção dos níveis de

GFAP. Os astrócitos são um importante alvo de acúmulo do Mn, podendo afetar suas funções neurotróficas e induzir a morte neuronal;

- 5) Determinar a ação do Mn sobre a enzima TH no estriado no PND 14 e no PND 70. Para isso foi analisada a modulação por fosforilação da TH, bem como seus níveis totais. Devido à ação do Mn sobre o sistema dopaminérgico, é importante avaliar a enzima TH, que é limitante na síntese de DA.

No modelo do nematódeo *C. elegans* expostos ao Mn (2,5 a 100 mM) na fase larval L1:

- 1) Expor ao Mn os vermes selvagens (N2) e os mutantes com perda de função nos genes das proteínas que constituem a via de sinalização das MAPKs ou AKT. Avaliar sua viabilidade e estabelecer se há diferenças na susceptibilidade ao Mn nos mutantes para determinar se as vias de sinalização podem participar da toxicidade do metal;
- 2) Avaliar em *C. elegans* selvagens e mutantes os efeitos da exposição ao Mn sobre o sistema dopaminérgico. Empregamos o teste que avalia a resposta *basal slowing*, dependente da integridade do sistema dopaminérgico. Avaliamos também a morfologia dos neurônios dopaminérgicos marcados com GFP. Estes testes foram empregados para avaliar possíveis diferenças na susceptibilidade dos neurônios ao Mn e se as vias de sinalização intracelular participam deste efeito;
- 3) Caracterizar a resposta antioxidante nos vermes selvagens e mutantes para proteínas da via da AKT. Para isso foram determinados os níveis de GSH total e os níveis relativos da expressão de genes alvos dos fatores de transcrição SKN-1 (*gcs-1* e *gst-4*) e DAF-16 (*sod-3*) bem como a expressão de *skn-1*. Desta forma caracterizamos a participação do estresse oxidativo e a participação da via da AKT na toxicidade do Mn em *C. elegans*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Experimentos utilizando ratos Wistar

##### 3.1.1 Reagentes

Cloreto de manganês ( $MnCl_2$ ), nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato (NADPH), glutationa reduzida, peróxido de *terc*-butila, 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoato (DTNB), Tween-20 e o coquetel inibidor de proteases foram adquiridos da empresa Sigma (St. Louis, MO, EUA). Tris e  $\beta$ -mercaptoetanol foram obtidos da Amresco (Solon, OH, EUA). SDS e bis-acrilamida foram da USB (Cleveland, OH, EUA). O marcador de massa molecular para proteínas foi adquirido da New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA). HEPES, Triton X-100, acrilamida e as membranas de nitrocelulose (Hybond ECL) foram obtidos da empresa GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, EUA). O reagente para quimiluminescência LumiGLO foi obtido da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

##### 3.1.2 Animais

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar fornecidos pelo Biotério Central (UFSC). Os ratos foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Bioquímica, em ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de  $21 \pm 1^\circ C$ , com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados obedecendo ao código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo PP00772 e PP8830/2012 CEUA-UFSC).

##### 3.1.3 Tratamento *in vivo* com manganês

No momento do nascimento, os filhotes foram separados em ninhadas contendo 8 filhotes, sendo dois grupos de 4 ratos machos irmãos. Utilizamos caneta de tinta atóxica para identificar os animais do mesmo grupo e marcação das orelhas para identificar cada tratamento. Este procedimento foi realizado para reproduzir as condições utilizadas no trabalho de Cordova et al. (2012). Os animais foram tratados via intraperitoneal (i.p.) com salina (NaCl a 0,9%; controles) ou  $MnCl_2$  5, 10 ou 20 mg/kg/dia, durante cinco dias consecutivos. Os tratamentos foram realizados no período de desenvolvimento entre o 8º e 12º dia pós-natal (PND 8-12), conforme descrito por Cordova et al. (2004) e Cordova et al. (2012). Após os desmame (PND 21), foram mantidos 4

animais por caixa, formando um grupo experimental composto por um animal controle e três tratados com o metal.

### 3.1.4 Testes comportamentais

Todos os testes foram conduzidos entre 8:00h da manhã e 12:00h, afim de evitar a influência do ciclo circadiano. Os animais foram aclimatados na sala de comportamento por no mínimo 1 h antes do início dos procedimentos experimentais. Os animais foram manipulados pelo mesmo experimentador. Uma bateria de testes comportamentais foi realizada nos mesmos grupos de animais (n= 8-10 animais em cada grupo), começando com o menos estressante, a discriminação olfatória (PND 30 e PND 60), seguido de habituação no campo aberto (PND 61-62), então reconhecimento de objeto (PND 63), reconhecimento social (PND 64) e finalmente rotarod (PND 65), esquematizado na Figura 9. Esta ordem foi escolhida de modo a minimizar a possível influência do teste anterior sobre os resultados (MCILWAIN et al., 2001).

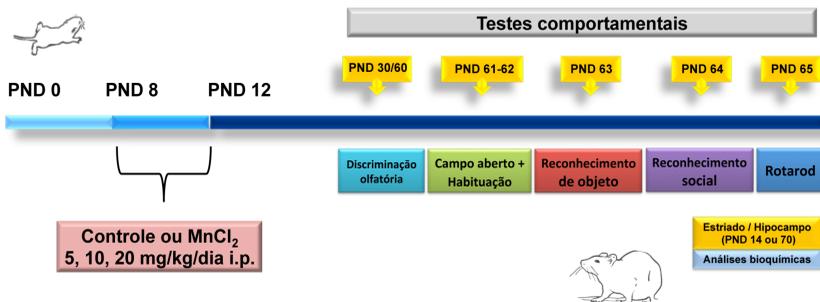


Figura 9: Modelo utilizado para avaliação da neurotoxicidade do Mn para o SNC em desenvolvimento. Ratos Wistar machos foram tratados com salina 0,9% (controles) ou MnCl<sub>2</sub> nas dose de 5, 10 ou 20 mg/kg via intraperitoneal (i.p.). Os tratamentos ocorreram dos dias 8 a 12 pós-natal (PND 8-12). Os testes comportamentais foram realizados na fase adulta. Análises bioquímicas para parâmetros de estresse oxidativo foram realizadas em amostras de estriado e hipocampo dissecados no PND 14 ou PND 70. *Western blotting* para avaliação de vias de sinalização intracelular foi realizado no hipocampo e estriado dos ratos no PND 14 ou PND 70.

#### 3.1.4.1 Discriminação olfatória

Este teste foi realizado numa caixa contendo dois compartimentos (30 cm × 30 cm × 20 cm) separados por uma parede com uma abertura no centro. Em um dos compartimentos, o piso foi coberto com a maravalha da gaiola onde o animal permaneceu durante 48 h antes do

teste (compartimento familiar). O compartimento não-familiar era forrado por maravilha nova (Figura 10). O teste consiste em colocar o animal no centro do compartimento não-familiar e observar durante 5 min a porcentagem de tempo gasto em cada compartimento (PREDIGER et al., 2005a). Ratos com a capacidade de discriminação olfatória intacta demonstram uma preferência pelo compartimento familiar (CARR et al., 1976).

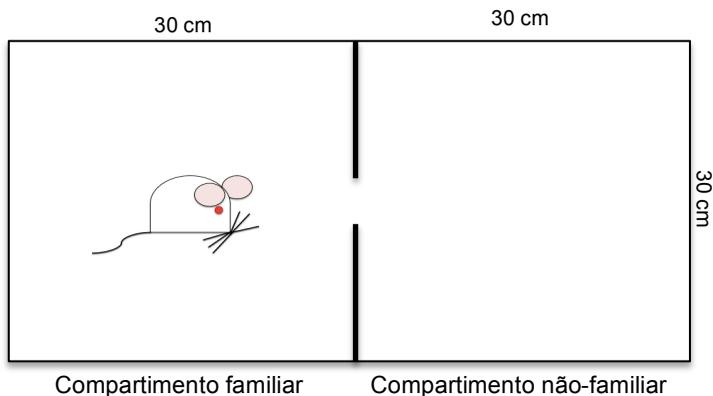


Figura 10: Representação esquemática do teste de discriminação olfatória.

### 3.1.4.2 Campo aberto

Foram avaliados os efeitos do tratamento com Mn sobre a atividade locomotora de acordo com o desempenho dos animais no campo aberto. O aparelho, feito de madeira coberto com fórmica impermeável tinha um piso cinza de 100 cm × 100 cm e paredes cinzas com 40 cm de altura. Cada rato foi colocado no centro do campo aberto e um sistema de câmara de vídeo gravou seus movimentos por um período de 10 min (Figura 11). Os vídeos foram analisados utilizando o programa ANY-maze (Stoelting, IL, EUA). A distância total percorrida (em metros) e a velocidade média (metros/segundo), foram usadas para avaliar a atividade locomotora dos ratos. O tempo gasto na periferia ou no centro do campo aberto é um parâmetro que indica ansiedade (AGUIAR JR et al., 2009).

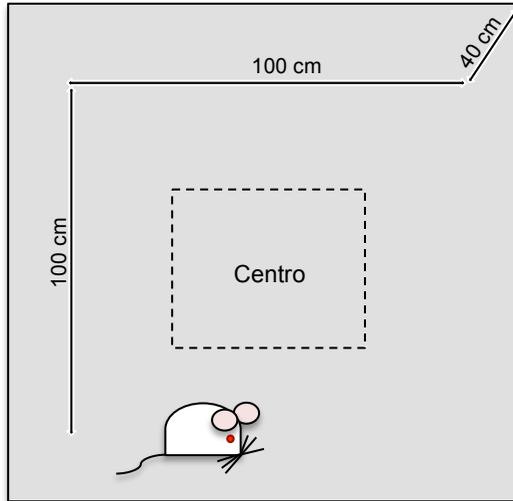


Figura 11: Representação esquemática do teste do campo aberto.

### 3.1.4.3 Reconhecimento de objeto

O teste de reconhecimento de objeto foi conduzido no campo aberto em três fases distintas: habituação, treino e discriminação. A fase de habituação consistiu na exploração do campo aberto por 1 h em dois dias consecutivos. A sessão de treino foi realizada 24 horas após a habituação e nesta fase dois objetos idênticos (A e B) foram colocados em cantos opostos do campo aberto para 5 min de exploração livre. A distância entre os dois objetos foi de 60 cm e eles foram posicionados a 20 cm da parede. A exploração é definida como dirigir o nariz a uma distância menor ou igual a 2 cm do objeto e/ou tocá-lo com o nariz (ENNACEUR e DELACOUR, 1988). Em seguida, os ratos permaneceram em sua gaiola durante 30 min antes do início da fase de discriminação. Nesta fase, o objeto B foi substituído pelo novo objeto (C), que tinha a forma e o tamanho semelhantes e a cor diferente. O objeto A permaneceu o mesmo (e agora é referido como A2, Figura 12). As posições dos objetos permaneceram as mesmas, porém em cada sessão foi alternado qual seria o objeto A ou B, para assegurar que não houve preferência por um dos lados do campo aberto ou por um dos objetos. Os ratos foram deixados por um tempo de exploração de 5 min. Foram consideradas as seguintes medidas: tempo total de exploração (A

+ B) na fase de teste e índice de discriminação ( $C * 100 / C + A2$ ) na fase de discriminação (PAMPLONA et al., 2009).

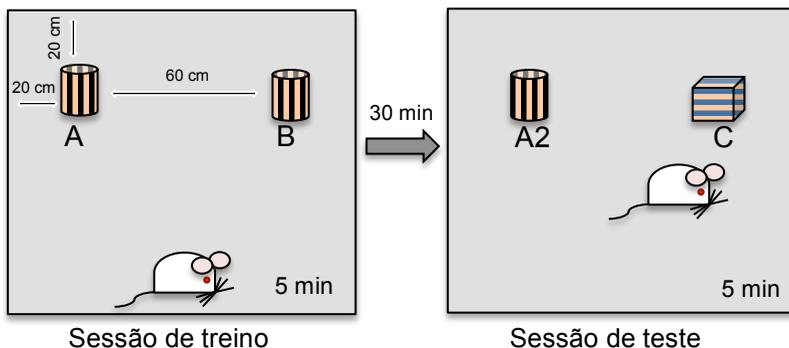


Figura 12: Representação esquemática do teste de reconhecimento de objeto.

### 3.1.4.4 Reconhecimento social

Este teste foi descrito por Dantzer et al. (1987). Os animais foram isolados numa gaiola durante 1 h antes do teste, após o que um rato jovem (30 dias de idade, o qual também tinha sido isolado durante 1 h) foi colocado na gaiola. O tempo gasto investigando o rato juvenil (cheirar, tocar com o nariz ou patas, lambe, limpeza social) foi registrado por 5 min. O animal jovem foi retirado da gaiola e após um intervalo de 30 min foi reintroduzido (Figura 13). Durante intervalos inferiores a 40 minutos, os ratos machos adultos geralmente exibem reconhecimento do juvenil, indicado por uma redução significativa no tempo de investigação social durante a segunda apresentação. O tempo gasto em investigação social pelo rato adulto foi expresso para cada animal como uma razão da segunda exposição em relação à primeira (razão de duração da investigação, RID). Uma redução na RID reflete uma diminuição no comportamento de investigação durante o segundo encontro, demonstrando a capacidade de reconhecimento do animal. Aumento no valor da RID indica mais tempo investigando o juvenil na segunda apresentação, o que pode ser interpretado como prejuízo na memória de reconhecimento social. Esta medida foi escolhida a fim de minimizar variações do desempenho basal e para equalizar variações entre os diferentes grupos testados (DANTZER et al., 1987; PREDIGER et al., 2005b; CASTRO et al., 2012).

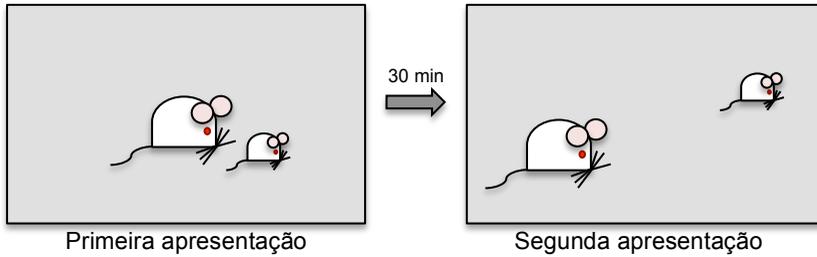


Figura 13: Representação esquemática do teste de reconhecimento social.

### 3.1.4.5 Avaliação da coordenação motora utilizando rotarod

O rotarod foi utilizado para avaliar os efeitos do tratamento com Mn sobre a coordenação motora. O aparelho rotarod (Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil), consiste em um cilindro de metal com 6 cm de diâmetro, elevado a uma altura de 16 cm e separado por compartimentos com largura de 9 cm. Primeiro foi realizada uma sessão de habituação, em que cada um dos ratos permaneceu sobre o aparelho (sem rotação) durante 30 s. Foram permitidas tantas tentativas quanto necessário para atingir este critério. Em seguida, uma sessão de treinamento foi realizada, em que os animais tiveram 3 tentativas para permanecer por 90 s sobre o aparelho em rotação (5 rpm). Somente os animais que foram capazes de executar por 90 s durante a sessão de treino foram escolhidos para o teste. O teste foi realizado 30 minutos após o treino. Cada animal foi posicionado no aparelho em movimento e seu tempo de latência para cair do cilindro foi contabilizado. A velocidade de partida foi de 5 rpm e foi aumentada em 0,1 rotações por segundo ao longo de um período máximo de 300 s (AGUIAR JR et al., 2009).

### 3.1.5 Análise dos níveis de Fe e Mn no tecido hipocampo e no estriado

Este experimento foi realizado no Institute of Nutritional Sciences, University of Potsdam, Nuthetal, Alemanha. Para determinar os níveis de Mn e Fe, as estruturas do hemisfério esquerdo de 40 animais (10 animais por grupo) foram isoladas e processadas para *espectrometria de massa* por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês *inductively coupled plasma-mass spectrometry*) usando o aparelho 8800 ICP-QQQ (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Os tecidos foram pesados e digeridos em microondas (CEM, Kamp-Lintfort,

Germany) com ácido clorídrico 10% e ácido nítrico 10% ultrapuros (VWR, Radnor, PA, USA). Os resultados foram comparados com curvas-padrão e estão expressos como ng do metal/g de tecido (BORNHORST et al., 2014).

### **3.1.6 Preparação tecidual para as análises bioquímicas**

Após o final do tratamento e/ou testes comportamentais (PND 14 ou PND 70) os animais foram mortos por decapitação e o hipocampo e estriado foram removidos e homogeneizados em 10 volumes de tampão HEPES 20 mM, pH 7,4. Os homogeneizados foram centrifugados a  $16000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 min e o sobrenadante gerado foi utilizado nas análises (COLLE et al., 2013). Após a retirada de uma alíquota para dosagem de proteínas, foram realizados ensaios para medir os níveis de tiois não-proteicos (NPSH) e foi determinada a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase (SOD), glutationa redutase (GR) e glutationa peroxidase (GPx). Todas as atividades enzimáticas foram medidas utilizando-se o multileitor Infinite M 200 (Tecan®, Suíça) instalado no Laboratório Multiusuário de Estudo em Biologia (LAMEB), CCB, UFSC. O conteúdo de proteínas nas amostras foi quantificado pelo método de Lowry (1951), usando albumina de soro bovino (BSA) para a curva padrão.

### **3.1.7 Determinação dos níveis de tiois não-proteicos (NPSH)**

Os níveis de glutationa (GSH) foram medidos como tiois não proteicos (NPSH) com base no protocolo desenvolvido por Ellman (1959). Os homogeneizados obtidos do estriado e hipocampo foram precipitados em ácido tricloroacético a 10% resfriado e centrifugados a  $5000 \times g$  durante 10 min. O sobrenadante foi incubado com DTNB em tampão fosfato 1 M, pH 7,0. A absorbância foi medida a 412 nm. O conteúdo de GSH foi calculado utilizando curvas padrão que foram executadas concomitantemente. Os resultados estão expressos em nmol GSH/mg proteína.

### **3.1.8 Atividade da catalase**

A atividade da catalase foi medida pelo método de Aebi (1974). A reação foi iniciada pela adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 mM e a taxa de consumo do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi medida a 240 nm. Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

### 3.1.9 Atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi determinada no sobrenadante dos homogeneizados pelo método descrito por Misra e Fridowich (1972) em 480 nm. Foram adicionados 5, 10 ou 20  $\mu\text{L}$  de amostra a uma solução contendo epinefrina em placa de 96 poços. A presença de SOD inibe a auto-oxidação da epinefrina. A taxa de inibição foi monitorada por 180 segundos. A quantidade de SOD necessária para produzir 50% de inibição foi definida como uma unidade de SOD. Os resultados foram expressos como unidades de SOD/ mg de proteína.

### 3.1.10 Atividade da glutatona redutase

A atividade da GR foi determinada através do método descrito por Carlberg e Mannervik (1985). A taxa de redução da glutatona oxidada (GSSG) foi determinada indiretamente através do monitoramento do consumo (oxidação) do NADPH a 340 nm. A atividade da GR foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína. Os resultados foram baseados num coeficiente de extinção molar do NADPH de  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.1.11 Atividade da glutatona peroxidase

A atividade da GPx foi determinada através do método de Wendel, utilizando peróxido de *tert*-butila como substrato (WENDEL, 1981). A GPx catalisa a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bem como outros peróxidos orgânicos, utilizando a glutatona reduzida (GSH) como co-substrato e GSSG. A GSSG é reduzida pela GR com o consumo de NADPH, que foi mensurado através da leitura em espectrofotômetro em 340 nm. A atividade da GPx foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína. Os resultados foram baseados num coeficiente de extinção molar do NADPH de  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.1.12 Western blotting

#### 3.1.12.1 Preparo das amostras para eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE)

As amostras de hipocampo e estriado coletados no PND 14 ou PND 70 foram solubilizadas em 400  $\mu\text{L}$  tampão de amostra (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10%, coquetel inibidor de proteases). Os lisados foram centrifugados ( $10000 \times g$  por 10 min, a  $4^\circ\text{C}$ ) para eliminar *debris* celulares. Os sobrenadantes foram diluídos 1:1 (v/v) em Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4 mM, SDS 8% e incubados por 5 minutos a  $100^\circ\text{C}$ . Após homogeneização uma alíquota foi retirada para a

dosagem de proteínas. Em seguida adicionou-se numa proporção de 25:100 (v/v) a solução de diluição de amostra (glicerol 40%, Tris 100mM e azul de bromofenol, pH 6,8) e  $\beta$ -mercaptoetanol (concentração final de 8%). As proteínas totais das amostras foram dosadas pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977).

### **3.1.12.2 Separação de proteínas por eletroforese (SDS-PAGE)**

As proteínas foram isoladas através de SDS-PAGE unidimensional. O gel de empilhamento continha 4% acrilamida e o gel de separação 10% acrilamida. Para preparo dos géis foi utilizado um sistema de eletroforese em mini-gel com espaçadores de 1 mm de espessura (miniVE Vertical Electrophoresis System™, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). A eletroforese foi realizada com corrente de 15 mA por placa e voltagem máxima de 150 V durante aproximadamente 2 horas à temperatura ambiente (TA), utilizando os tampões superior (glicina 190 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%) e inferior (Tris 50 mM; pH 8,3). Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência (CORDOVA et al., 2004).

### **3.1.12.3 Eletrotransferência**

Após a eletroforese o gel foi incubado com tampão de equilíbrio (Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 5% e SDS 0,1%) por 30 minutos. As proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose através de um sistema *semi-dry* (TE 70 SemiPhor™ Unit, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) utilizando tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 5%) com uma corrente de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de gel durante 1 h 30 min. Por fim as membranas foram coradas com solução de Ponceau (Ponceau 0,5% em ácido acético 1%) para verificar a eficiência da eletrotransferência (CORDOVA et al., 2004).

### **3.1.12.4 Imunodeteccção**

As membranas de nitrocelulose foram cortadas nas posições correspondentes às massas moleculares adequadas para o uso de anticorpos específicos contra formas fosforiladas ou totais das proteínas listadas na Tabela 1. Primeiramente as membranas foram lavadas com solução salina tamponada com Tris (TBS, Tris 10 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5) para retirar a marcação com Ponceau, e a seguir foram bloqueadas por 1 hora com leite desnatado 5% em TBS, TA. Então as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS-T (Tween-20 0,05%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5) e incubadas com os

anticorpos de interesse (Tabela 1) *overnight* a 4°C em agitação constante. Após 3 lavagens de 5 min com TBS-T incubaram-se as membranas por 1 hora à TA com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado à peroxidase. Por fim as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e 2 vezes com TBS, e reveladas por quimioluminescência. Para a detecção do conteúdo total das MAPKs, TH ou  $\beta$ -actina foi realizado *stripping* das membranas utilizadas anteriormente. O *stripping* foi realizado com NaOH 0,2N por 5 minutos. Após esse procedimento as membranas foram lavadas em água e TBS-T (CORDOVA et al., 2004). A densitometria das bandas foi determinada utilizando o programa Scion Image® versão Beta 3 (Frederick, MD, EUA) e os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle. Observa-se que a expressão de fosforilação é dada como uma razão da DO da banda fosforilada pela DO da banda total, das respectivas MAPKs e AKT. A expressão de TH, GFAP (proteína glial fibrilar ácida) e dos substratos de PKA e PKC foi normalizada pela  $\beta$ -actina. Os anticorpos para TH total e suas diferentes formas fosforiladas foram produzidos na Universidade de Newcastle, Austrália (GORDON et al., 2009) e foram usados porque possuem maior especificidade para a proteína de interesse do que os anticorpos disponíveis comercialmente. Os dados foram expressos como aumento em relação à média dos controles (ratos injetados apenas com NaCl 0,9%).

### 3.1.13 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e os gráficos e análises estatísticas foram feitos utilizando o GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). A análise estatística dos dados de rotarod, campo aberto, sessão de treino do reconhecimento de objeto e reconhecimento social foi feita por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey quando apropriado. Os dados da sessão de discriminação do reconhecimento de objeto foram analisados pelo teste t não-pareado. Os dados da discriminação olfatória foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Os dados das análises bioquímicas foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. N se refere ao número de ratos incluído em cada análise. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

Tabela 1: Dados dos anticorpos utilizados para *western blotting*.

<b>Anticorpo</b>	<b>Massa molecular da proteína alvo</b>	<b>Fabricante (Nº Cat.)</b>	<b>Diluição</b>
<i>Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/ Tyr204)</i>	44-42 kDa	Cell Signalling Technology (#4370)	1:2000
<i>Anti-Mitogen Activated protein kinase (ERK1 &amp; ERK2)</i>	44-42 kDa	Sigma (M5670)	1:40000
<i>Anti-phospho-p38 (pThr<sup>180</sup>/pTyr<sup>182</sup>)</i>	~38 kDa	Sigma (P1491)	1:1000
<i>Anti-p38 MAP kinase</i>	~38 kDa	Sigma (M 0800)	1:10000
<i>Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)</i>	46-54 kDa	Cell Signalling Technology (#9251)	1:1000
<i>Anti-c-Jun N-Terminal Kinase (JNK1, JNK2)</i>	46-54 kDa	Sigma (J4500)	1:5000
<i>Anti-phospho PKB (Ser473)</i>	60kDa	Sigma (P4112)	1:2000
<i>Akt</i>	60kDa	Cell Signalling Technology (#9272)	1:1000
Tirosina hidroxilase (TH)	60kDa	Gordon et al. (2009)	1:1000
<i>pTH Ser40</i>	60kDa	Gordon et al. (2009)	1:1000
<i>pTH Ser31</i>	60kDa	Gordon et al. (2009)	1:500
<i>pTHSer19</i>	60kDa	Gordon et al. (2009)	1:2000
<i>GFAP</i>	50kDa	Cell Signalling Technology (#3670)	1:1000
<i>PKA substrates</i>	30 a 80kDa	Cell Signalling Technology (#9624)	1:1000
<i>PKC substrates</i>	30 a 80kDa	Cell Signalling Technology (#2261)	1:1000
<i>β-actina</i>	43kDa	Santa Cruz Biotechnology (sc-47778)	1:20000
<i>Goat anti-Mouse IgG, Peroxidase Conjugated secondary antibody</i>	-	Millipore (AP308P)	1:2500
<i>Goat anti-Rabbit IgG, Peroxidase Conjugated secondary antibody</i>	-	Millipore (AP132P)	1:5000

## 3.2 Experimentos utilizando vermes *C. elegans*

### 3.2.1 Reagentes

Cloreto de manganês ( $MnCl_2$ ), colesterol, NADPH, GSH, GR, DTNB, inibidor de proteases e os *primers* foram adquiridos da empresa Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os *primers* TaqMan utilizados para as análises de qRT-PCR foram obtidos da Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Ágar, peptona e agarose foram adquiridos da BD (Franklin Lakes, NJ, EUA). Trizol e marcador de massa molecular para DNA foram adquiridos da Thermo Scientific (San Jose, CA, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 3.2.2 Cultura de *C. elegans*

Foram utilizados *C. elegans* da linhagem Bristol N2 (selvagens) e mutantes BY200 [ $P_{dat-1}::GFP(vtIs1)$ ], que expressam a proteína verde fluorescente (GFP) sob o controle do promotor do transportador de dopamina. Além disso, foram utilizados os mutantes listados na Tabela 2. Os vermes foram adquiridos do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC – University of Minnesota, Twin Cities, MN, EUA). A cepa mutantes VC204 foi cruzada com BY200 machos para avaliação de neurônios dopaminérgicos. Todas as cepas foram checadas para a mutação de interesse através de PCR nos laboratórios de origem.

Os vermes foram mantidos em condições padrão de cultura a 20°C, em placas de petri de plástico de 100 ou 150 mm de diâmetro contendo meio ágar 8P (3 g/L NaCl; 25 g/L ágar; 20 g/L peptona; 1 mM  $CaCl_2$ ; 5 mg/L colesterol; 1 mM  $MgSO_4$ ; 25 mM  $KPO_4^{-2}$ ) para manutenção das culturas contendo a linhagem NA22 de *Escherichia coli* (como alimento). Durante os experimentos os vermes foram mantidos em placas contendo meio para crescimento de nematódeos (NGM: 3 g/L NaCl; 17 g/L ágar; 2,5 g/L peptona; 1 mM  $CaCl_2$ ; 5 mg/L colesterol; 1 mM  $MgSO_4$ ; 25 mM  $KPO_4^{-2}$ ; 1,25mL nistatina; 50mg/L sulfato de estreptomicina). Utilizou-se como alimento a bactéria *E.coli* cepa OP50 como descrito previamente (BRENNER, 1974).

As populações sincronizadas na fase larval L1 foram obtidas pelo isolamento de embriões dos hermafroditas grávidos, usando solução de extração (1% NaOCl; 0,25M NaOH). Os ovos foram isolados dos *debris* celulares por um gradiente de sacarose 30% (ÁVILA et al., 2012b).

Tabela 2: Cepas mutantes de *C. elegans* utilizadas.

Nome	Gene	Alelo	Tipo de mutação	Proteína homóloga em mamíferos	Referência
AU3	<i>nsy-1</i>	ag3	Substituição (perda de função)	ASK-1	Kim et al. (2002)
BS3383	<i>pmk-3</i>	ok169	Inserção/deleção (perda de função)	p38 <sup>MAPK</sup>	Berman et al. (2001)
VC8	<i>jnk-1</i>	gk7	Substituição (perda de função)	JNK	Villanueva et al. (2001)
VC204	<i>akt-2</i>	ok393	Deleção (perda de função)	AKT	Paradis e Ruvkun (1998)
VC345	<i>sgk-1</i>	ok538	Inserção/deleção (perda de função)	SGK	Hertweck et al. (2004)
RB759	<i>akt-1</i>	ok525	Deleção (perda de função)	AKT	Paradis e Ruvkun (1998)
GR1310	<i>akt-1</i>	mg144	- (Superexpressão)	AKT	Paradis e Ruvkun (1998)

### 3.2.3 Exposição de *C. elegans* ao Mn e avaliação da sobrevivência

Os tratamentos agudos com MnCl<sub>2</sub> foram realizados em populações de 2500 vermes na fase L1. Os vermes foram expostos a concentrações de 2,5 a 100 mM MnCl<sub>2</sub> diluído em solução de NaCl a 85mM por 1 hora em tubos siliconizados sob agitação constante a 20°C. Os vermes foram então sedimentados por centrifugação a 7000 rpm durante 2 min e lavados 3 vezes em NaCl 85 mM. No dia 0, imediatamente após a exposição ao Mn, 40 a 60 vermes foram colocados em placas de 60 mm de diâmetro contendo NGM e semeadas com *E. coli* OP50. Cada condição foi realizada em triplicata. Os vermes sobreviventes foram contados 48 h após o tratamento. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao dia 0. A curva de concentração-resposta da sobrevivência foi obtida por regressão não-linear com um limite máximo de 100% e possibilitou o cálculo da concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>) (AU et al., 2009; BENEDETTO et al., 2010; ÁVILA et al., 2012b; BORNHORST et al., 2014).

### 3.2.4 Análise comportamental da resposta “basal slowing”

Este teste comportamental avalia a integridade do sistema

dopaminérgico dos vermes. O teste foi realizado 48 h após a exposição ao Mn e consiste em lavar os vermes 3 vezes com tampão S-basal (NaCl 100 mM, 5mg/L colesterol,  $KPO_4^{-2}$  50 mM, pH 6,0) para retirar qualquer resíduo de bactéria. Cinco vermes foram colocados no centro da placa de 60 mm de diâmetro contendo NGM e bactéria OP50 espalhada em forma de anel. O anel possui um diâmetro exterior de aproximadamente 3,5 cm e interior de 1 cm. Outros cinco vermes foram colocados no centro de uma placa contendo NGM sem bactéria (Figura 14). As placas foram preparadas no dia anterior e incubadas *overnight* a 37°C. Foram utilizadas duas placas com bactéria e uma sem para cada grupo experimental. Após um período de habituação de 5 minutos, foi contado o número de curvaturas corporais que cada verme realizava na região anterior de seu corpo por um período de 20 s para determinar sua taxa de locomoção. Os resultados foram expressos como a diferença ( $\Delta$ ) entre os número de curvaturas corporais da placa sem bactéria pela placa com bactéria. Ao atingir seu alimento (bactérias) o verme possui uma resposta mecanossensorial que o faz reduzir sua locomoção. Esta resposta é conhecida como *basal slowing* e é dependente da sinalização dopaminérgica. As três classes de neurônios dopaminérgicos (CEP, ADE e PDE) participam desta resposta, mediando o controle do sistema motor. Um valor baixo significa maior locomoção sobre o alimento, indicando déficit na função dopaminérgica. A cepa mutante *cat-2* foi utilizada como controle positivo neste teste. Esta cepa é deficiente para a enzima homóloga à tirosina hidroxilase (CAT-2) e possui níveis reduzidos de dopamina (SAWIN et al., 2000; MARTINEZ-FINLEY et al., 2013).

### 3.2.5 Obtenção de vermes machos para cruzamento

BY200 [ $P_{dat-1}::GFP(vtIs1)$ ] machos foram obtidos por choque térmico a 30°C por 4 h. Os machos foram então cruzados com hermafroditas (8 a 12 machos para 3 hermafroditas) para obtenção de um número maior de machos (ANDERSON et al., 2010). De 9 a 12 vermes BY200 machos foram cruzados com 3 VC204 hermafroditas. Foram coletados 10 vermes da geração F1 que expressavam GFP. Os vermes da geração F2 que expressavam GFP foram isolados em placas individuais e após sua postura de ovos, foram analisados por PCR para a presença da deleção de interesse. A progênie do verme que expressava tanto GFP quanto a deleção de interesse foi selecionada para os experimentos.

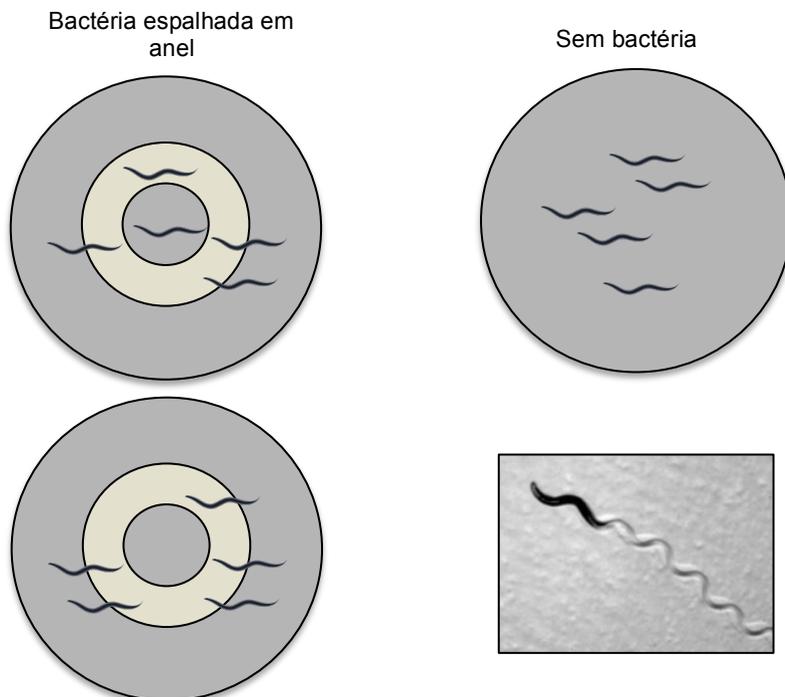


Figura 14: Representação esquemática do teste que avalia a resposta *basal slowing*.

### 3.2.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose

O DNA genômico de cada verme foi isolado utilizando o tampão Phusion HF Reaction e proteinase K (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). Após o congelamento em nitrogênio líquido, a amostra foi submetida a um ciclo de 60°C por 1 h, 99°C por 15 min (para inibir a atividade da proteinase K) e 4°C por 5 min. O DNA (1 µL) foi incubado com Platinum PCR supermix (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) que contém a enzima Taq polimerase, MgCl<sub>2</sub> e desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs). Os *primers* utilizados (0,5 µM) foram: 5' CAGAGTGTGATAATGCTGGC 3' (senso) e 5' CGTAACGTACTCTGTCAAAG 3' (anti-senso) para detecção da região contendo o gene para AKT-2. Os *primers* foram obtidos utilizando o programa *Serial cloner 2.6* baseando-se na sequência disponível em *Wormbase*. A PCR foi conduzida nas seguintes condições utilizando *BioRad T100 Thermal cycler*:

- (1) 95°C por 3 min
- (2) 94°C por 30 s (abertura da fita dupla de DNA)
- (3) 55°C por 30 s (anelamento dos *primers* aos DNA)
- (4) 72°C por 1 h 30 min (alongamento e amplificação)
- (5) Repetir os passos 2-4 30 vezes
- (6) Manter a 4°C

O mutante VC204 possui uma deleção de 719 pares de bases (bp), que pode ser detectada por PCR seguido de eletroforese em gel de agarose. Foi utilizado gel composto por 0,8% agarose em tampão Tris-ácido acético e o reagente Gel red (Biotium, Hayward, CA, EUA), um corante para DNA que pode ser observado em transiluminador a 300 nm. O produto da PCR foi corado e submetido a eletroforese juntamente com um marcador de massa molecular por 1 h a 90 V e o gel foi avaliado através de um transiluminador.

### 3.2.7 Avaliação da viabilidade de neurônios dopaminérgicos

A viabilidade dos neurônios dopaminérgicos foi avaliada em *C. elegans* da cepa mutante VC204 cruzados com a linhagem BY200. A visualização de marcação descontínua da GFP é um indicativo de degeneração dos neurônios. Para a microscopia, 30 vermes foram anestesiados com 30 µM cloridrato de levamisol e montados em lâminas contendo agarose a 4%. Os vermes foram observados 2 h após a exposição ao Mn utilizando um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i, Nikon Corporation, Tóquio, Japão) equipado com uma lâmpada Xenon LS Lambda (Sutter Instrument Company) e objetivas *Nikon Plan Fluor 20x dry* e *Nikon Plan Apo 60x1.3 oil* (BENEDETTO et al., 2010). Cada verme foi marcado para a ausência (considerados normais), ou a presença de qualquer uma das seguintes alterações morfológicas: formação de *puncta* ao longo dos processos dendríticos, soma encolhido e/ou perda do soma e/ou perda dos dendritos (considerados degenerados) conforme exemplificado na Figura 15. As imagens ilustrativas foram feitas por microscopia de fluorescência confocal (Zeiss LSM5 Live Duo Scan, Zeiss, Alemanha) e analisadas com o programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem de vermes degenerados em relação ao número total de vermes analisados por grupo (BORNHORST et al., 2014).

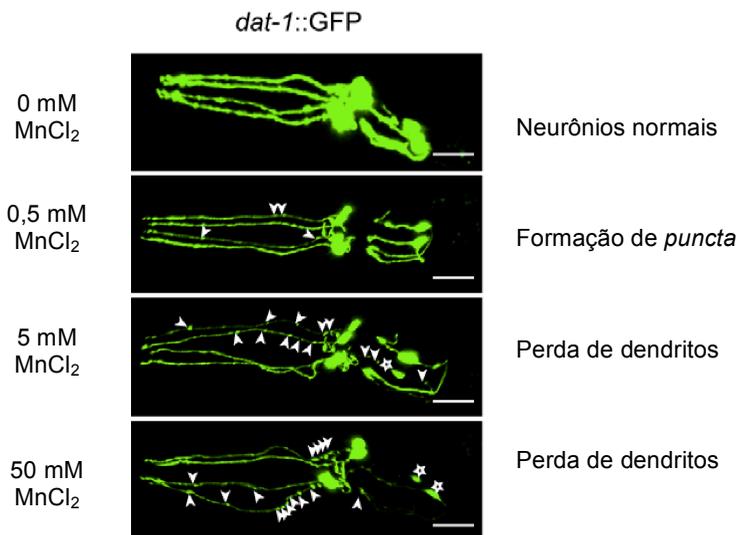


Figura 15: Microscopia de fluorescência de *C. elegans* da cepa BY200 [*P<sub>dat-1</sub>::GFP(vtIs1)*] demonstrando a degeneração dos neurônios dopaminérgicos CEP e ADE da cabeça após exposição a diferentes concentrações de MnCl<sub>2</sub>. Adaptado de Benedetto et al. (2010).

### 3.2.8 Quantificação dos níveis de glutatona

Cerca de 50000 vermes foram tratados com solução controle (NaCl 85 mM) ou MnCl<sub>2</sub> 10 ou 50 mM na fase L1 durante 1 h. Os vermes foram lavados com tampão M9 e sonicados em 100 μL tampão de extração (1% Triton X-100, 0,6% ácido sulfossalicílico, 1% inibidor de protease, EDTA 5 mM em PBS). O homogeneizado resultante foi centrifugado (10000 rpm, 10 min, 4°C) e o sobrenadante foi recolhido, descartando os restos celulares e vermes intactos. A dosagem de proteínas procedeu com o método do ácido bicinonínico, utilizando BSA como padrão (SMITH et al., 1985). Para medir os níveis de GSH totais (oxidada e reduzida) seguiu-se o método descrito por Rahman et al. (2006). Este método baseia-se na reação de grupos tióis com o DTNB formando o ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) que pode ser medido a 412 nm. As amostras foram incubadas na presença de DTNB, GR e NADPH e a formação de TNB foi medida por 2 min. A concentração de GSH total foi determinada através da curva padrão de GSH. Todas as concentrações foram obtidas em nM GSH/mg de proteína.

### 3.2.9 PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)

Os ácidos ribonucléicos necessários para os estudos foram extraídos dos nematódeos utilizando o reagente Trizol. Após o término da exposição ao Mn, 1 mL de Trizol foi adicionado ao pellet de 40000 vermes. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas a 37°C 3 vezes para quebra da cutícula que reveste o verme. As amostras foram centrifugada (14000 rpm, 10 min, 4°C) e adicionou-se 200 µL de clorofórmio para uma completa extração de proteínas e outras substâncias não desejáveis. Após nova centrifugação, a fase aquosa superior foi transferida para um tubo de propileno livre de RNase. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de 500 µL de isopropanol resfriado e 2 µL de glicogênio e o tubo foi invertido várias vezes e incubado *overnight* a -20°C. Após nova centrifugação o precipitado foi lavado pela adição de 300 µL de etanol 75% e então ressuspenso em 25 µL de água pura estéril, livre de RNase (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). A quantificação, a determinação da pureza e a integridade do material foram verificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), sendo considerado adequadas uma razão de 260/280nm de 1,8 a 2,0 e a concentração de 200 ng/µL. **Síntese do cDNA:** A síntese de cDNA foi realizada através de uma reação de transcrição reversa utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) composto por tampão de transcrição reversa 10X, dNTPs 25X (100 mM), *primers* randômicos 10X, transcriptase reversa e água estéril livre de RNase. Alíquotas volumétricas diferentes foram utilizadas para obtenção de uma quantidade padronizada de 1 µg de RNA total para cada amostra do estudo. As amostras foram submetidas ao termociclador (BioRad, Hercules, CA, EUA) sob as seguintes condições: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min e então 4°C. **qRT-PCR:** As análises quantitativas da expressão dos genes previamente selecionados foram realizadas pelo método TaqMan. Os *primers*/sondas pré-estabelecidos foram obtidos da Life Technologies e estão listados na tabela 3. O gene *afd-1* (homólogo da β-actina) foi utilizado para normalização. As reações foram realizadas com 3 µL do cDNA de cada amostra. Além dos ácidos nucleicos, a reação foi composta de *primers* específicos (7 µL cada) e 10 µL de TaqMan Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), com volume final de 20 µL. A reação de amplificação foi realizada através de desnaturação inicial a 50°C por 2 min seguida de 95°C por 10 min e 40 ciclos térmicos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. O monitoramento em tempo real da PCR foi realizado em um

termociclador CFX96 Real-time system com o programa BioRad CFX manager (BioRad, Hercules, CA, EUA) através da detecção dos níveis de fluorescência do reagente TaqMan. Todas as reações, tanto dos genes alvo quanto do controle endógeno, foram realizadas em triplicatas (BORNHORST et al., 2014). Os *Cycle threshold* (Ct) utilizados para as análises foram a média aritmética entre as triplicatas dos genes alvo e controles endógenos. Os valores de  $\Delta Ct$  foram obtidos pela subtração do Ct dos genes alvos pelo Ct do gene constitutivo.  $\Delta\Delta Ct$  representa a subtração dos valores de  $\Delta Ct$  dos grupos tratados pelo  $\Delta Ct$  do grupo selvagem controle. A obtenção da expressão relativa de cada gene foi realizada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 3: *Primers* utilizados para qRT-PCR

Gene alvo	Identificação
<i>gst-4</i>	Ce02458730 g1
<i>gcs-1</i>	Ce02436726 g1
<i>skn-1</i>	Ce02407447 g1
<i>sod-3</i>	Ce02404515 g1
<i>afd-1</i>	Ce02414573 m1

### 3.2.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. e os gráficos e análises estatísticas foram feitos utilizando o GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). As diferentes curvas de sobrevivência obtidas para cada mutante foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. Os resultados da resposta *basal slowing*, integridade dos neurônios dopaminérgicos, o conteúdo de GSH e os dados de qRT-PCR foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .



## 4. RESULTADOS

Os resultados e discussão derivados dos estudos realizados durante o doutorado deram origem a três manuscritos a serem enviados para publicação em periódico na área de Neuroquímica:

Manuscrito 1: *Developmental exposure to manganese induces lasting motor and cognitive impairment in rats.*

Manuscrito 2: *Effects of developmental manganese exposure on tyrosine hydroxylase phosphorylation in rat striatum.*

Manuscrito 3: *Effects of manganese exposure on the dopaminergic system and antioxidant enzymes in Caenorhabditis elegans with mutations in AKT/PKB signaling pathway.*

### 4.1 Exposição ao manganês durante o desenvolvimento induz danos motores e cognitivos e alterações neuroquímicas que persistem até a fase adulta

Apesar de ser um metal essencial, níveis elevados de Mn podem prejudicar o desenvolvimento do SNC. Os indivíduos jovens acumulam mais Mn no SNC e são mais suscetíveis à sua toxicidade que os adultos. Entretanto, os mecanismos mediando a neurotoxicidade do Mn durante o desenvolvimento não são completamente conhecidos (DOBSON et al., 2004; ASCHNER et al., 2009). Recentemente foi demonstrado pelo nosso grupo que a exposição ao Mn entre os dias pós-natal 8 e 12 (PND 8 e 12), um período crítico para o desenvolvimento do SNC em mamíferos, induziu alterações em vias de sinalização no estriado no PND 14, bem como prejuízo motor (CORDOVA et al., 2012). No presente trabalho, o mesmo modelo de exposição ao Mn foi utilizado (Figura 9) e avaliações comportamentais foram feitas no PND 70. As avaliações bioquímicas no hipocampo e estriado foram feitas no PND 14 e PND 70.

#### 4.1.1 Dosagem dos níveis de Mn no estriado e hipocampo

No PND 70, o hipocampo e o estriado dos ratos expostos ao Mn (PND 8-12) foram coletados para análise por ICP-MS dos níveis de Mn (Figura 16 A, B) e Fe (Figura 16 C, D). Os níveis destes metais não encontravam-se alterados em relação aos respectivos controles. Isto indica que a homeostase dos níveis de Mn e Fe foi reestabelecida após o final do tratamento com Mn, considerando que estudos anteriores com

esse mesmo protocolo de tratamento mostravam alteração dos níveis desses metais no PND 14 (CORDOVA et al., 2012).

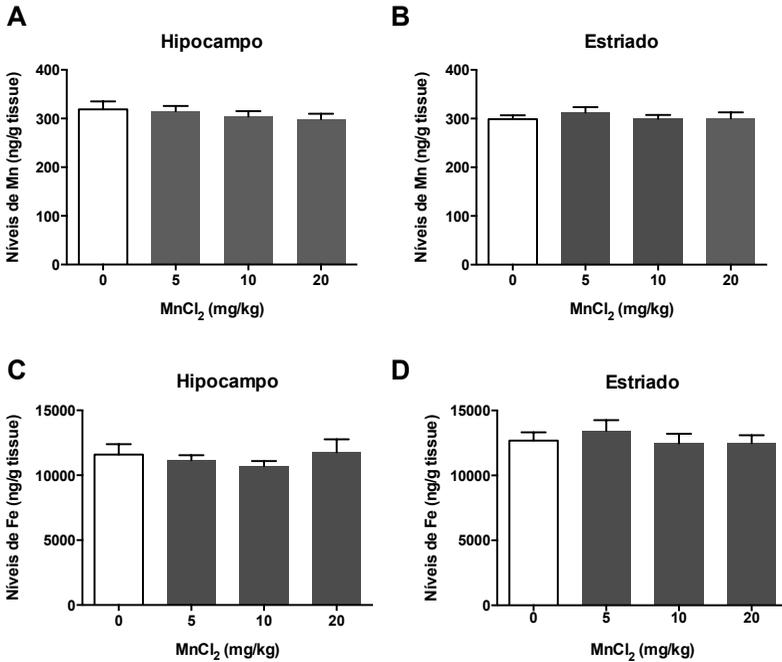


Figura 16: Os níveis de Mn no hipocampo (A) e corpo estriado (B) e os níveis de Fe, no hipocampo (C) e corpo estriado (D), determinados por espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). MnCl<sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) foi administrado durante o desenvolvimento (PND 8-12) e amostras de tecido foram coletadas no PND 70. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. de 10 experimentos. A análise estatística foi feita por ANOVA de uma via.

#### **4.1.2 Testes comportamentais para avaliação da função motora e cognitiva nos ratos adultos**

O bulbo olfatório é uma região suscetível ao acúmulo de Mn (SEN et al., 2011). A função olfatória dos ratos foi avaliada no PND 30 e PND 60 no teste de discriminação olfatória. A porcentagem de tempo gasto no compartimento familiar (Figura 17 A) foi maior em todos os grupos [F 3, 144 = 57,66;  $p < 0,001$ ]. Não houve diferenças em relação à dose de Mn ou idade em que o teste foi realizado [F 3, 144 = 2.590e-014;  $p > 0,9$ ]. Isso evidencia uma preferência pelo compartimento familiar, o que pode ser interpretado como função olfatória normal. O número de cruzamentos de um compartimento para o outro (Figura 17 B) foi semelhante entre os grupos ( $p > 0,05$ ) excluindo a possibilidade de alterações motoras que pudessem limitar o deslocamento entre os compartimentos.

A avaliação dos animais no teste do campo aberto demonstrou que a distância total percorrida e a velocidade média durante 10 min de teste foram estatisticamente indistinguíveis entre os animais expostos ao Mn e os controles, indicando atividade locomotora normal (Figura 18 A e B). O tempo gasto no centro ou periferia do campo aberto, um parâmetro que indica ansiedade, também não foi significativamente diferente no grupo tratado ou controle (Figura 18 D, E).

O teste do reconhecimento de objeto foi realizado apenas com os grupos controle e 20 mg/kg Mn. Devido ao longo período de habituação no campo aberto (1 h por animal) apenas 16 animais foram testados. Na sessão de treino, dois objetos foram apresentados aos ratos. Não houve preferência por qualquer um dos objetos, com tempo semelhante gasto para investigar cada um (Figura 19 A). Trinta minutos depois, na sessão de teste, os ratos expostos à dose mais elevada de Mn (20 mg/kg) não conseguiram reconhecer quando um objeto familiar foi substituído por um novo (Figura 19 B), considerando que o comportamento esperado para ratos machos adultos é de preferência pelo novo objeto introduzido na sessão de teste (PREDIGER et al., 2005b). O índice de reconhecimento indica que os ratos tratados com Mn gastaram uma quantidade semelhante de tempo a explorar o objeto novo e o familiar ( $51,6 \pm 3,3\%$ ), enquanto os animais controle mostraram uma preferência pelo novo objeto e o investigaram por mais tempo ( $71,5 \pm 2,1\%$ ;  $p < 0,05$ ). O tempo de investigação dos ratos controle foi em média 16 s para o objeto familiar e 42 s para o objeto novo. Os ratos expostos ao Mn passaram 34 s investigando o objeto familiar e 37 s investigando o novo.

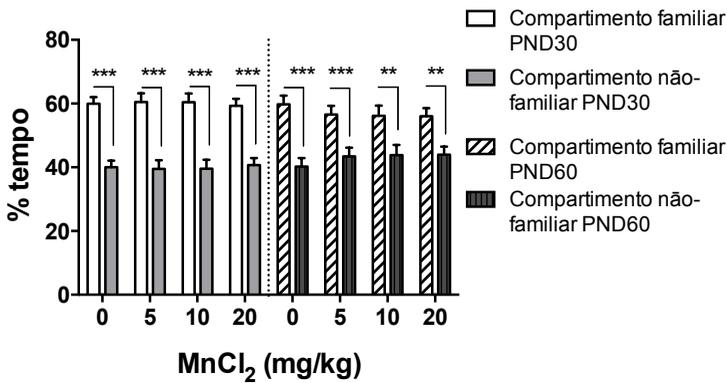
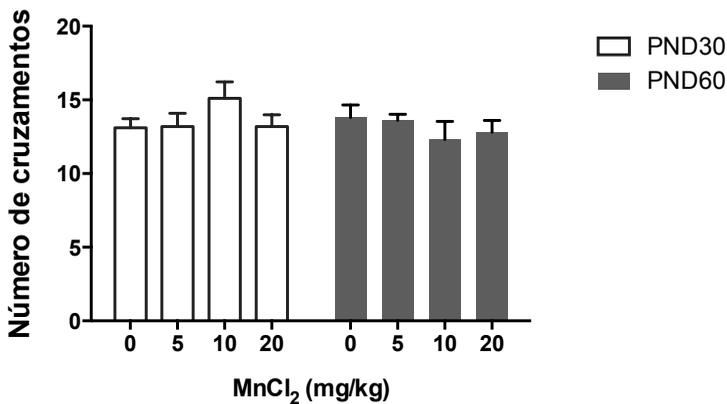
**A****B**

Figura 17: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao  $MnCl_2$  (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a função olfatória (teste de discriminação olfatória) em ratos machos adultos jovens (PND 30) e adultos (PND 60). Os animais controle foram injetados com NaCl 0,9%. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de tempo gasto no compartimento com o odor familiar ou com maravalha limpa (não-familiar). (B) Número de cruzamentos de um compartimento para o outro. \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05 em comparação com a porcentagem de tempo gasto no compartimento familiar (ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey). N = 10.

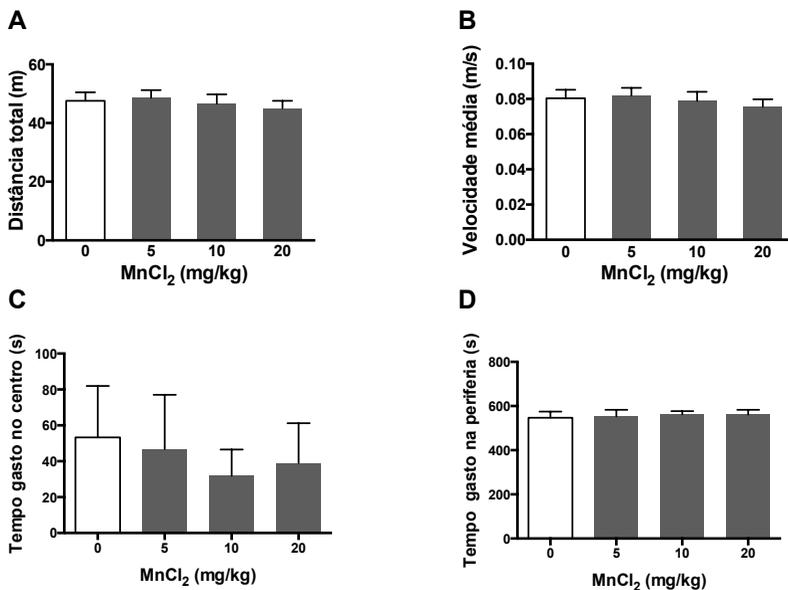


Figura 18: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao MnCl<sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a atividade locomotora (teste do campo aberto) em ratos machos adultos (PND 61). Os animais controle foram injetados com NaCl 0,9%. A distância percorrida (A), a velocidade média (B) e o número de cruzamentos de linhas (C), o tempo que os animais permaneceram no centro (D) ou periferia (E) do campo aberto em um período de 10 minutos foram registrados. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. N = 10. A análise estatística foi feita por ANOVA de uma via.

Para os roedores, as informações de natureza olfatória são importantes para reconhecer indivíduos da mesma espécie e para a capacidade de memória social (PERIO et al., 1989). Esta capacidade foi avaliada no teste de reconhecimento social. Os mesmo rato jovem (PND 30) foi apresentado por 5 min aos ratos controle ou tratados com Mn em duas ocasiões, separadas por um intervalo de 30 min. O comportamento social típico do rato residente é investigar vigorosamente o intruso durante o primeiro encontro e, no caso da formação de uma memória de reconhecimento social, há redução da investigação durante o segundo encontro. Os controles e os ratos expostos à dose mais baixa de Mn apresentaram este comportamento. Entretanto, foi observado que os ratos expostos ao Mn (10 e 20 mg/kg) investigaram o rato jovem por um

período de tempo semelhante no primeiro e no segundo encontro. Dessa forma foi observado um valor de RID mais alto (isto é, a razão do tempo de investigação na segunda exposição sobre a primeira exposição) nos ratos tratados com 10 mg/kg de Mn ( $0,93 \pm 0,13$ ) e 20 mg/kg de Mn ( $0,97 \pm 0,08$ ), em comparação com o controle ( $0,59 \pm 0,06$ ) [ $F_{3, 28} = 4,12$ ;  $p < 0,05$ ] (Figura 20). Este resultado sugere uma incapacidade dos ratos expostos ao Mn de reter a memória de curto prazo de reconhecimento social.

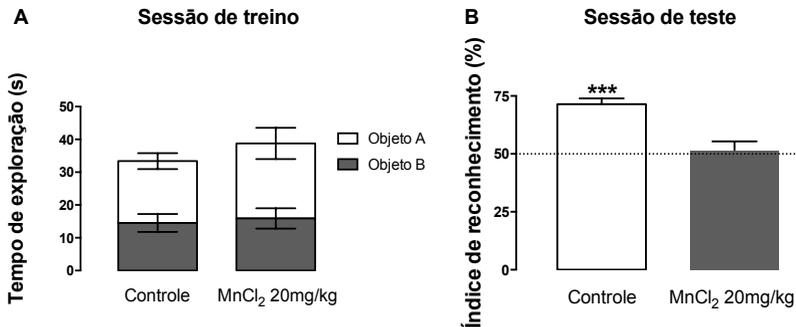


Figura 19: Efeito da administração i.p. de MnCl<sub>2</sub> (20 mg/kg) durante o desenvolvimento (PND 8-12) sobre a memória espacial de curto prazo (teste de reconhecimento de objeto) em ratos machos adultos (PND 63). Os animais controle foram injetados com NaCl 0,9%. (A) sessão de treino, realizada no campo aberto 24 h após a habituação. O tempo gasto explorando dois objetos idênticos A e B foi contabilizado durante a sessão de 5 min. ANOVA de uma via. (B) Sessão de teste realizada 30 min após o treino. Um novo objeto C substituiu o objeto B, enquanto o objeto A permaneceu e é referido como A2. A porcentagem de tempo gasto explorando o objeto novo relacionada com o tempo total de exploração foi calculada usando a fórmula do índice de reconhecimento ( $C * 100 / C + A2$ ). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\*\*  $p < 0,001$  vs o valor de 50%, o qual indica ausência de preferência (teste t não-pareado bicaudal). N = 8.

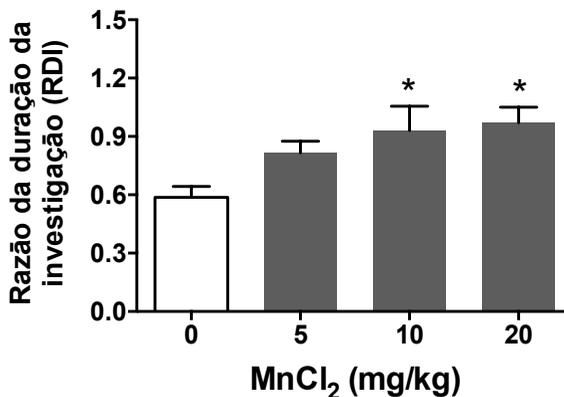


Figura 20: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao  $\text{MnCl}_2$  (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a memória social dos animais (teste de reconhecimento social) em ratos machos adultos (PND 64). Os dados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. da RDI (isto é, a razão do tempo de investigação na segunda exposição sobre a primeira exposição) quando o mesmo rato jovem foi apresentado durante 5 min com um intervalo de 30 min entre os dois encontros. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey).  $N = 8$ .

Para determinar o dano motor induzido por Mn, os ratos foram avaliados no rotarod. A exposição ao Mn durante o desenvolvimento causou comprometimento motor que persistiu até a fase adulta dos ratos. Como mostrado na Figura 21, os ratos expostos a 20 mg/kg de Mn mostraram um prejuízo significativo no desempenho no rotarod, com uma latência para cair do aparelho de  $13,9 \pm 2,5$  s em comparação com o controle ( $49,6 \pm 2,2$  s) [ $F_{3, 27} = 10,40$ ;  $p < 0,001$ ].

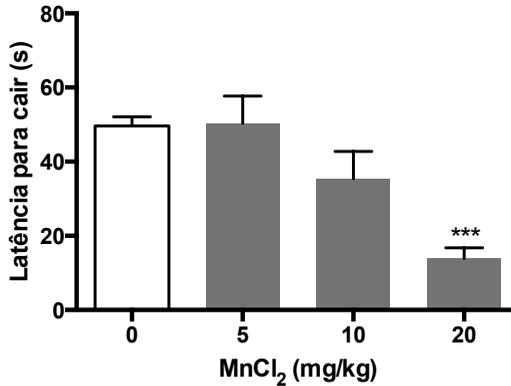


Figura 21: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao  $\text{MnCl}_2$  (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a coordenação motora (teste do rotarod) em ratos machos adultos (PND 65). Os animais controle foram injetados com NaCl 0,9%. Os animais foram colocados em um cilindro em rotação e o tempo de latência para a primeira queda do aparelho (em segundos) foi registrado. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\*\*  $P < 0,001$  vs grupo de controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey).  $N = 8$ .

#### 4.1.3 Avaliação dos níveis de tióis não-proteicos e da atividade de enzimas antioxidantes no hipocampo e estriado dos ratos em diferentes idades após a exposição ao Mn

O estresse oxidativo é uma característica importante da toxicidade do Mn (MILATOVIC et al., 2009). O estriado e o hipocampo foram coletados no PND 14 e PND 70 após a exposição ao Mn para análise bioquímica de parâmetros antioxidantes. Os níveis de NPSH podem ser interpretados como uma medida da glutatona, um importante agente antioxidante. No estriado de ratos no PND 70 expostos a Mn 20 mg/kg, foi observado uma redução nos níveis de NPSH ( $12,46 \pm 1,15$  nmol/mg de proteína) em relação ao grupo controle ( $19,12 \pm 1,17$  nmol/mg de proteína, Figura 22 D) [ $F_{3, 31} = 3,672$ ;  $p < 0,05$ ]. Os níveis de NPSH não sofreram alteração no PND 14 em nenhuma das estruturas, nem no hipocampo no PND 70 (Figura 17 A-C).

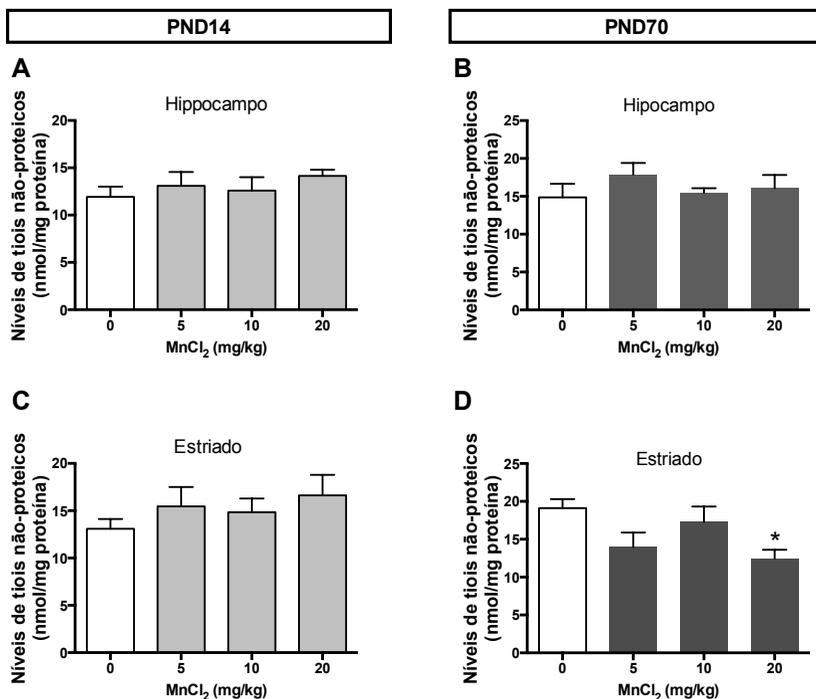


Figura 22: Os níveis de tiois não proteicos (NPSH) em homogeneizados obtidos a partir do corpo estriado ou hipocampo de ratos machos no PND 14 (A, C) ou PND 70 (B, D) expostos ao MnCl<sub>2</sub> (5, 10, 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12). Os animais controle foram injetados com NaCl 0,9%. Os níveis de NPSH foram avaliados como uma estimativa do nível de glutatona (GSH), utilizando uma curva padrão de GSH. Os dados estão expressos com média  $\pm$  E.P.M. \*  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). N = 10 para PND 70 e n = 8 para PND 14.

A catalase é uma enzima que detoxifica o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Como mostrado na Figura 23 C, a atividade da catalase no PND 14 foi significativamente mais alta no estriado do grupo exposto a Mn 20 mg/kg ( $0,32 \pm 0,04$   $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{min/mg de proteína}$ ) em comparação com os controles ( $0,12 \pm 0,04$   $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{min/mg de proteína}$ ) [F3, 26 = 6,15,  $p < 0,05$ ]. No entanto, este efeito sobre a catalase estriatal estava ausente na fase adulta (Figura 23 D). Em relação ao hipocampo foi observado aumento significativo na

atividade da catalase no PND 70 nos tratamentos com 5 ou 20 mg/kg de Mn ( $0,54 \pm 0,05$  e  $0,51 \pm 0,06$   $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, respectivamente) em comparação com o controle ( $0,25 \pm 0,06$   $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  de proteína) [F3, 31 = 5,56,  $p < 0,05$ ]. Na mesma estrutura, apenas uma tendência para o aumento da atividade da catalase foi observada no PND 14 ( $p = 0,065$ ).

A enzima SOD não apresentou alteração da sua atividade em nenhuma das doses de Mn ou idades testadas (Figura 24).

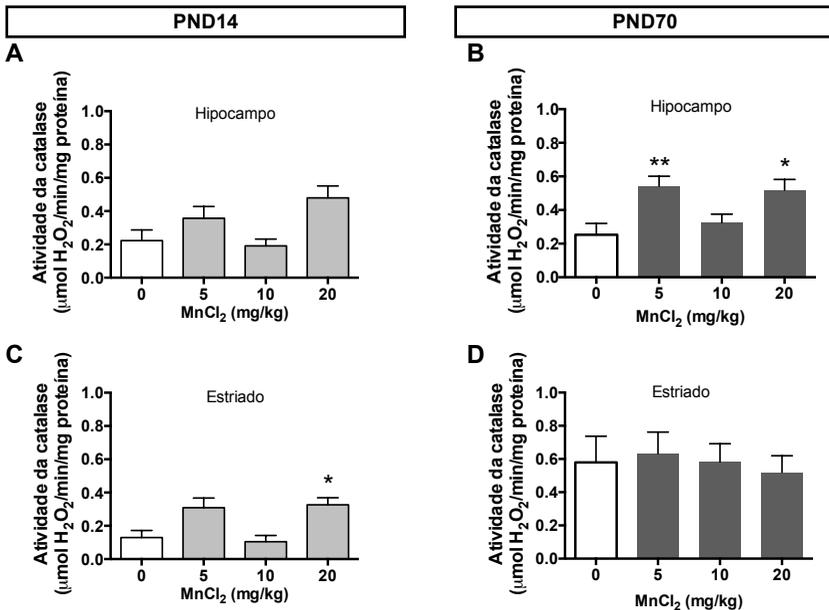


Figura 23: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao MnCl<sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a atividade da catalase em homogeneizados obtidos do hipocampo ou estriado dos ratos no PND 14 (A, C) ou PND 70 (B, D). Os animais controle foram injetados com NaCl 0,9%. A atividade da catalase foi medida por espectrofotometria como a taxa de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 8 ou 10 experimentos. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

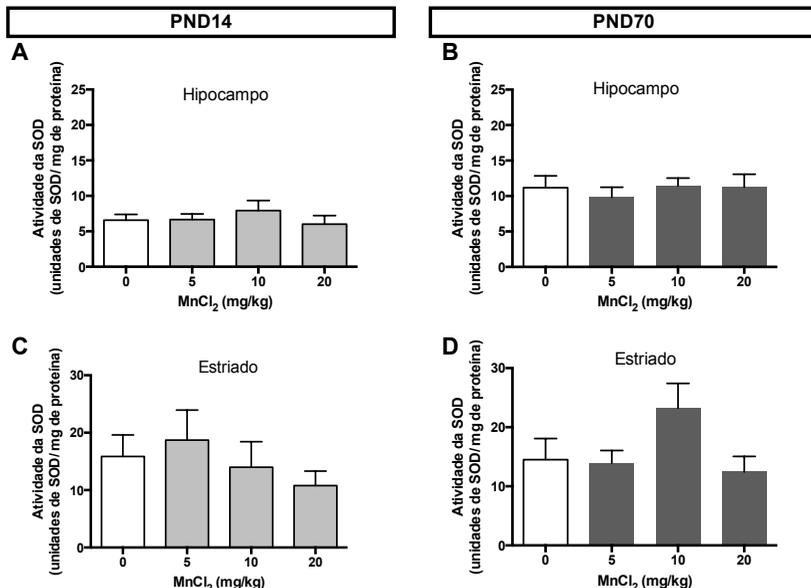


Figura 24: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao MnCl<sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em homogeneizados obtidos do hipocampo ou estriado dos ratos no PND 14 (A, C) ou PND 70 (B, D). Os animais controle foram injetados com NaCl 0,9%. A atividade de SOD foi medida através da taxa de inibição da auto-oxidação da epinefrina, monitorada por 180 segundos. A quantidade de SOD necessária para produzir 50% de inibição foi definida como uma unidade de SOD. Os resultados foram expressos como unidades de SOD/ mg de proteína. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 8 ou 10 experimentos. ANOVA de uma via.

A glutatona redutase (GR) não apresentou diferenças de atividade em qualquer das doses de Mn ou idades testadas (Figura 25). Já a glutatona peroxidase (GPx) apresentou um aumento de atividade no hipocampo no PND 14 de ratos tratados com a dose mais elevada de Mn ( $3,13 \pm 0,11$  nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína) comparado ao controle ( $2,54 \pm 0,08$  nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína) [F3, 26 = 3,79;  $p < 0,05$ ] (Figura 26 A). Notavelmente, este efeito também estava presente no PND 70 ( $11,25 \pm 1,29$  nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína vs  $7,07 \pm 0,47$  nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína no controle) [F3, 34 = 3,73;  $p < 0,05$ ] (Figura 26 B). No estriado não foi observada nenhuma alteração na atividade da GPx (Figura 26 C, D).

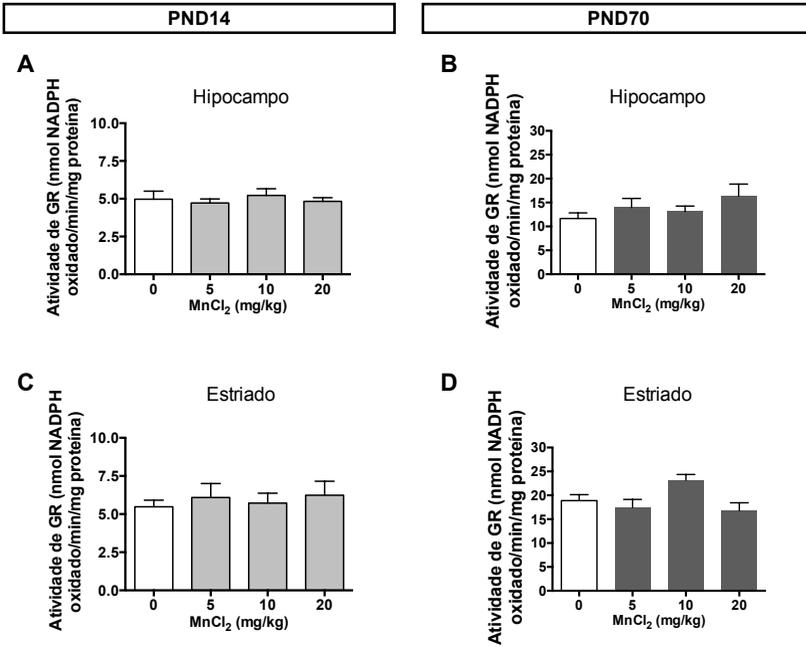


Figura 25: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao  $MnCl_2$  (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a atividade de glutatona redutase (GR) em homogeneizados obtidos do hipocampo ou estriado dos ratos no PND 14 (A, C) ou PND 70 (B, D). Os animais controle foram injetados com NaCl 0,9%. A GR catalisa a redução de GSSG a GSH utilizando NADPH como cofator. Sua atividade foi medida como a taxa de consumo do NADPH. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 8 ou 10 experimentos. ANOVA de uma via seguida.

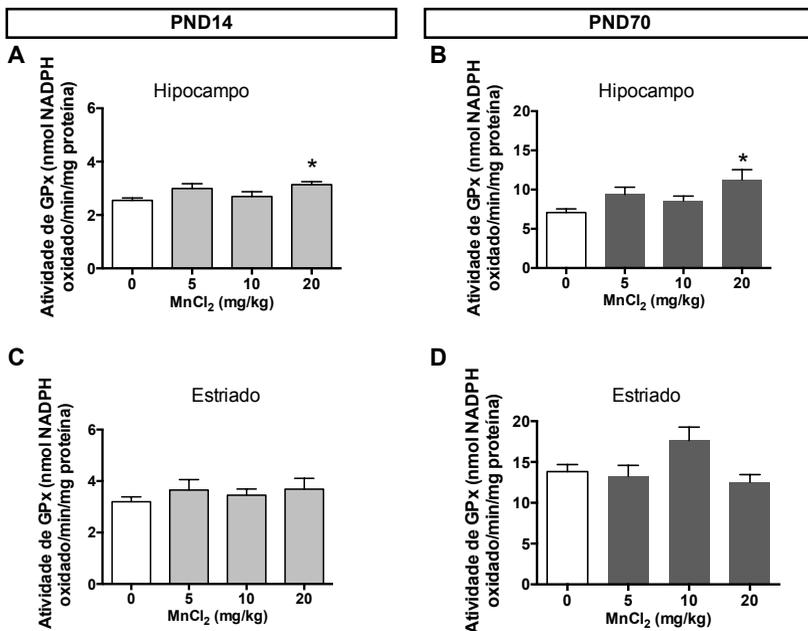


Figura 26: Efeito da exposição durante o desenvolvimento (PND 8-12) ao MnCl<sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) sobre a atividade de glutatona peroxidase (GPx) em homogeneizados obtidos do hipocampo ou estriado dos ratos no PND 14 (A, C) ou PND 70 (B, D). A GPx catalisa a redução de peróxidos orgânicos utilizando GSH como um co-substrato e produzindo GSSG, o qual é reduzido pela GR, consumindo NADPH. A taxa de consumo do NADPH foi medida para estimar a atividade de GPx. Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. de 8 ou 10 experimentos. \*p<0,05, vs grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

#### 4.1.4 Efeitos da exposição ao Mn durante o desenvolvimento sobre GFAP, MAPKs, AKT, PKA e PKC no estriado e hipocampo dos ratos adultos

O hipocampo e o estriado (coletados no PND 70) foram analisados por *western blotting* para o conteúdo de GFAP, um marcador da ativação de astrócitos (ENG et al., 2000). Os níveis de GFAP no hipocampo não foram alterados pela exposição ao Mn (Figura 27 A). No estriado (Figura 27 B), um aumento significativo no conteúdo de GFAP foi observado em ratos tratados com Mn 10 mg/kg ( $1,10 \pm 0,01$  vs  $1,00 \pm 0,03$ ;  $p < 0,05$ ) e 20 mg/kg ( $1,09 \pm 0,01$  vs  $1,00 \pm 0,03$ ;  $p < 0,05$ ) comparado ao controle [ $F_{3, 18} = 3,84$ ].

Os níveis de fosforilação de proteínas da família das MAPKs (ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup> e JNK1/2/3) e AKT não sofreram alteração significativa em nenhuma das estruturas avaliadas (blots representativos na Figura 28). Da mesma forma, não foram observadas alterações significativas nos níveis de substratos fosforilados de PKA ou PKC (blots representativos na Figura 29).

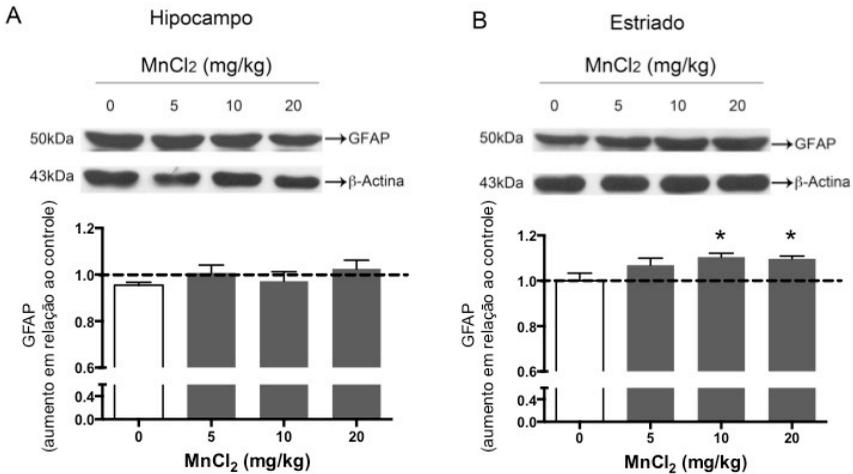


Figura 27: Expressão de GFAP no hipocampo (A) e estriado (B) de ratos no PND 70 expostos ao MnCl<sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12). A revelação dos *western blottings* foi feita por quimiluminescência. A quantificação das bandas foi feita por densitometria e os dados de expressão de GFAP foram normalizados em relação à expressão de  $\beta$ -actina. Os dados representam o aumento em relação ao controle (linha tracejada) e expressam a média  $\pm$ E.P.M. de 6 experimentos. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey).

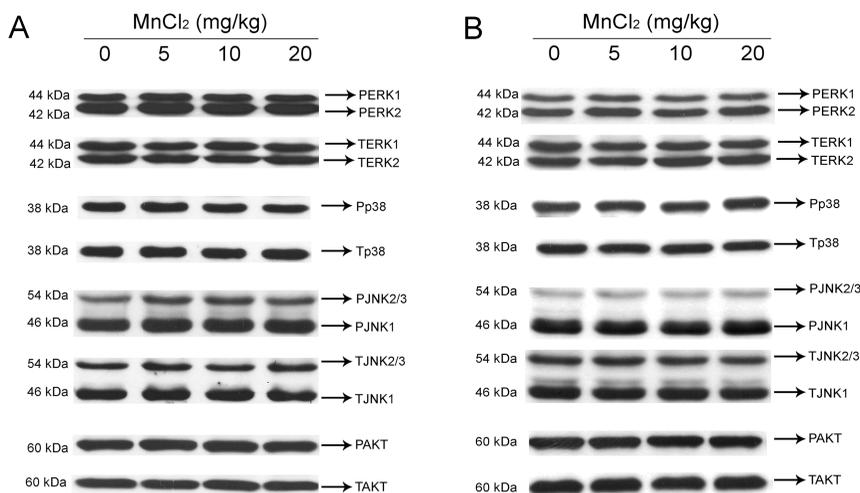


Figura 28: Fosforilação e conteúdo total de ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup>, JNK1/2/3 e AKT no hipocampo (A) e estriado (B) de ratos no PND 70 expostos ao MnCl<sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12). A revelação dos *western blottings* foi feita por quimiluminescência. A quantificação das bandas foi feita por densitometria e os dados foram normalizados em relação à expressão da proteína total. ANOVA não revelou diferenças significativas. N=8.

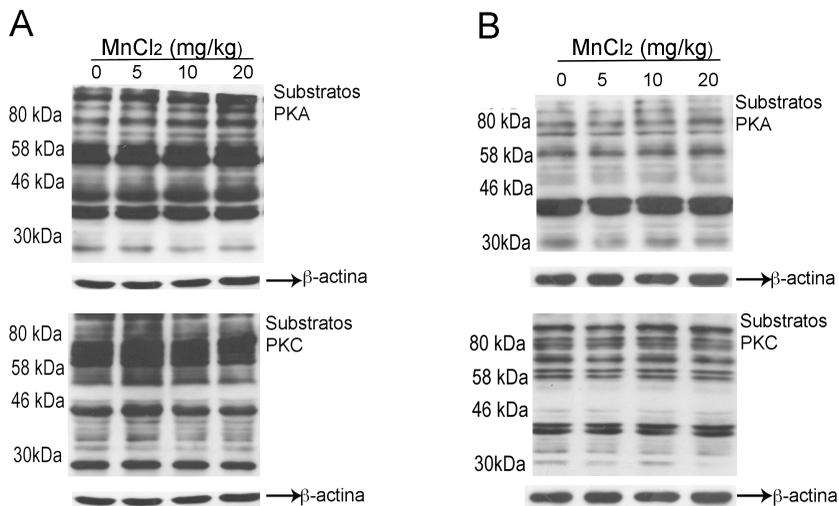


Figura 29: Substratos fosforilados de PKA ou PKC no hipocampo (A) e estriado (B) de ratos no PND 70 expostos ao MnCl<sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12). A revelação dos *western blottings* foi feita por quimiluminescência. A quantificação das bandas foi feita por densitometria e os dados foram normalizados em relação à  $\beta$ -actina. ANOVA não revelou diferenças significativas. N=8.

#### 4.1.5 Efeitos da exposição ao Mn sobre o estado de fosforilação e conteúdo total da tirosina hidroxilase

No estriado dos ratos no PND 14, os níveis de TH total (tTH) normalizado em relação à  $\beta$ -actina se encontram aumentados nos ratos expostos a 20 mg/kg MnCl<sub>2</sub> comparado ao controle (1,31 vs 0,96 vezes) [F 3, 34 = 3,54; p<0,05]. Os níveis de fosforilação nos sítios Ser40, Ser31 e Ser19 em relação ao conteúdo total de TH (pSer40/tTH, pSer31/tTH e pSer19/tTH) não foram alterados pelo tratamento com o Mn (Figura 30).

No PND 70, os níveis de tTH normalizado em relação à  $\beta$ -actina se encontram reduzidos nos ratos expostos a 20 mg/kg MnCl<sub>2</sub> comparado ao controle (0,81 vs 1,07 vezes) [F 3, 24 = 5,69; p<0,01]. Neste mesmo período pós-natal os níveis de pSer40/tTH e pSer19/tTH não foram alterados pelo tratamento com o Mn (Figura 31). Entretanto, os níveis de pSer31/tTH se encontram aumentados nos ratos expostos a

20 mg/kg comparado ao controle (1,48 vs 0,99 vezes,  $p < 0,001$ ; Figura 31 C).

Como houve alteração nos níveis de TH total, os dados de fosforilação de TH foram analisados de uma maneira alternativa, normalizando-os em relação à  $\beta$ -actina e analisando-os por regressão linear e correlação de Pearson. No PND 14, observamos uma correlação positiva ( $r = 0,52$ ;  $p < 0,01$ ) entre os níveis de tTH e a concentração de Mn (Figura 32 A). No PND 70 a correlação entre tTH e a concentração de Mn foi negativa ( $r = -0,60$ ;  $p < 0,001$ ; Figura 32 B).

No PND 14 observou-se uma correlação positiva entre os níveis de tTH e os níveis de pSer40 ( $r = 0,72$ ;  $p < 0,001$ ), pSer31 ( $r = 0,52$ ;  $p = 0,01$ ) e pSer19 ( $r = 0,63$ ;  $p = 0,001$ ) quando estes foram normalizados em relação à  $\beta$ -actina (Figura 33).

No PND 70 observou-se uma correlação positiva entre os níveis de tTH e os níveis de pSer40 ( $r = 0,44$ ;  $p < 0,05$ ) e pSer19 ( $r = 0,57$ ;  $p = 0,01$ ) quando estes foram normalizados em relação à  $\beta$ -actina. Entretanto, não houve correlação significativa entre pSer31/  $\beta$ -actina vs tTH/  $\beta$ -actina (Figura 34).

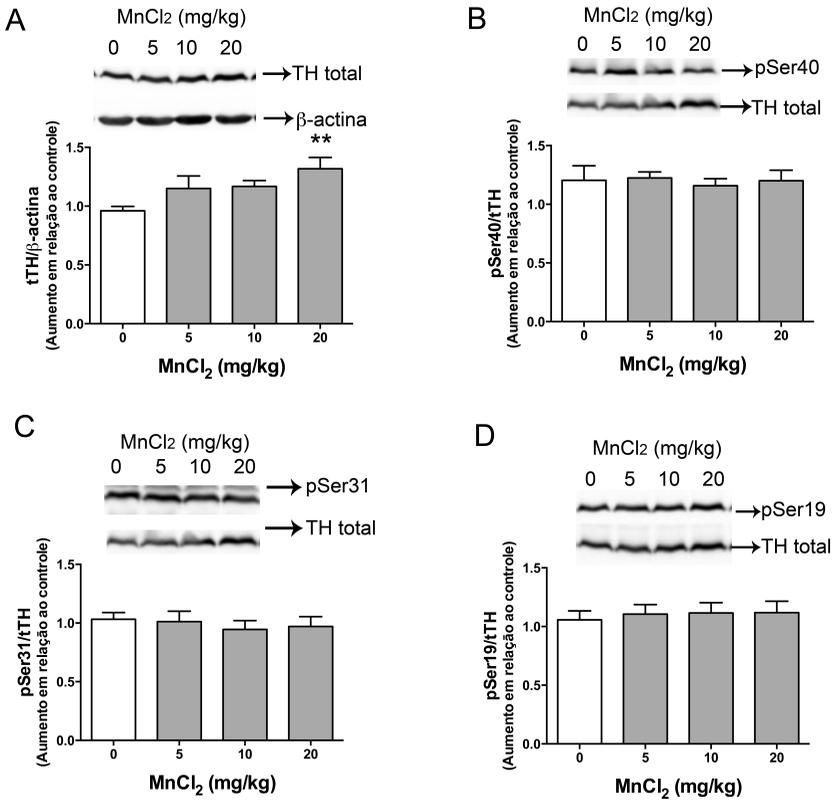


Figura 30: Níveis de tirosina hidroxilase (TH) no estriado de ratos no PND 14 expostos ao MnCl<sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12). A revelação foi feita por quimiluminescência. A quantificação das bandas foi feita por densitometria. (A) Os dados de conteúdo de TH foram normalizados em relação ao conteúdo de β-actina. Os dados de TH fosforilada na Ser40 (pSer40) (B), pSer31 (C) e pSer19 (D) foram normalizados em relação à TH total. Os dados representam o aumento em relação ao controle e expressam a média ± E.P.M. de 7 experimentos. \*\* $p < 0,01$  em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey).

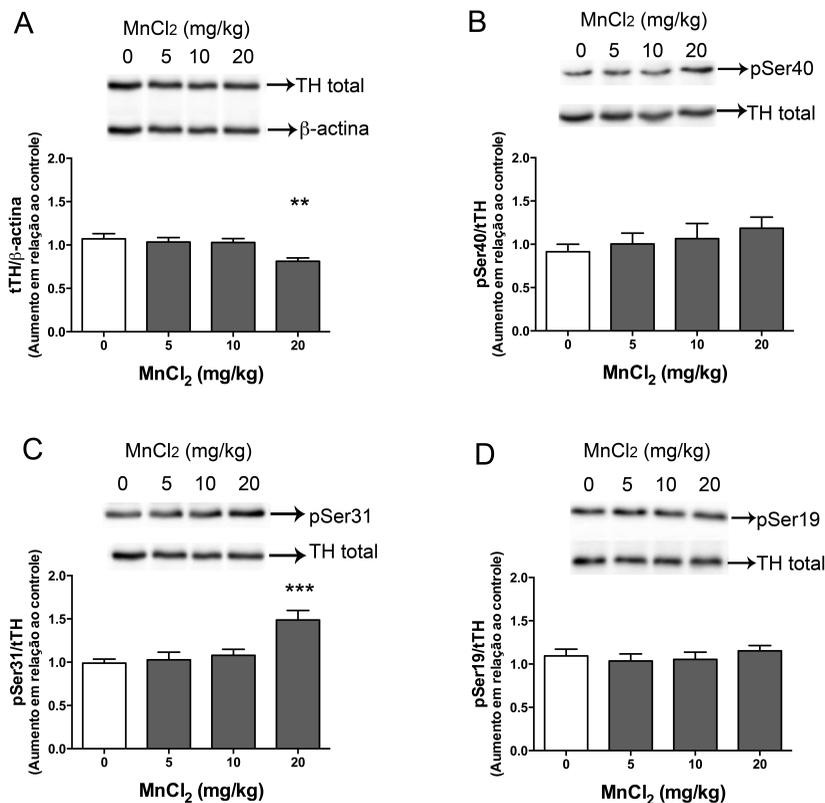


Figura 31: Níveis de tirosina hidroxilase (TH) no estriado de ratos no PND 70 expostos ao MnCl<sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12). A revelação foi feita por quimiluminescência. A quantificação das bandas foi feita por densitometria. (A) Os dados de conteúdo de TH foram normalizados em relação ao conteúdo de β-actina. Os dados de TH fosforilada na Ser 40 (pSer40) (B), pSer31 (C) e pSer19 (D) foram normalizados em relação à TH total. Os dados representam o aumento em relação ao controle e expressam a média ± E.P.M. de 7 experimentos. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey).

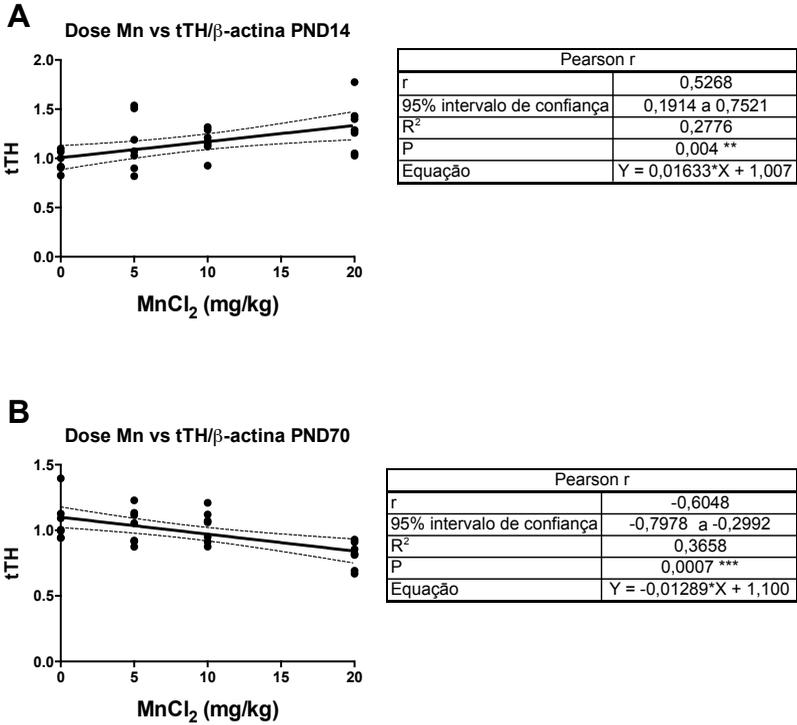


Figura 32: O conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) foi medido por *western blotting* no estriado de ratos no PND 14 ou 70 expostos ao MnCl<sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12). A correlação de Pearson foi calculada entre a dose de MnCl<sub>2</sub> e os níveis de TH normalizados em relação aos níveis de  $\beta$ -actina (tTH/  $\beta$ -actina) no PND 14 (A) ou PND 70 (B). As linhas representam a regressão linear. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 (teste t bicaudal).

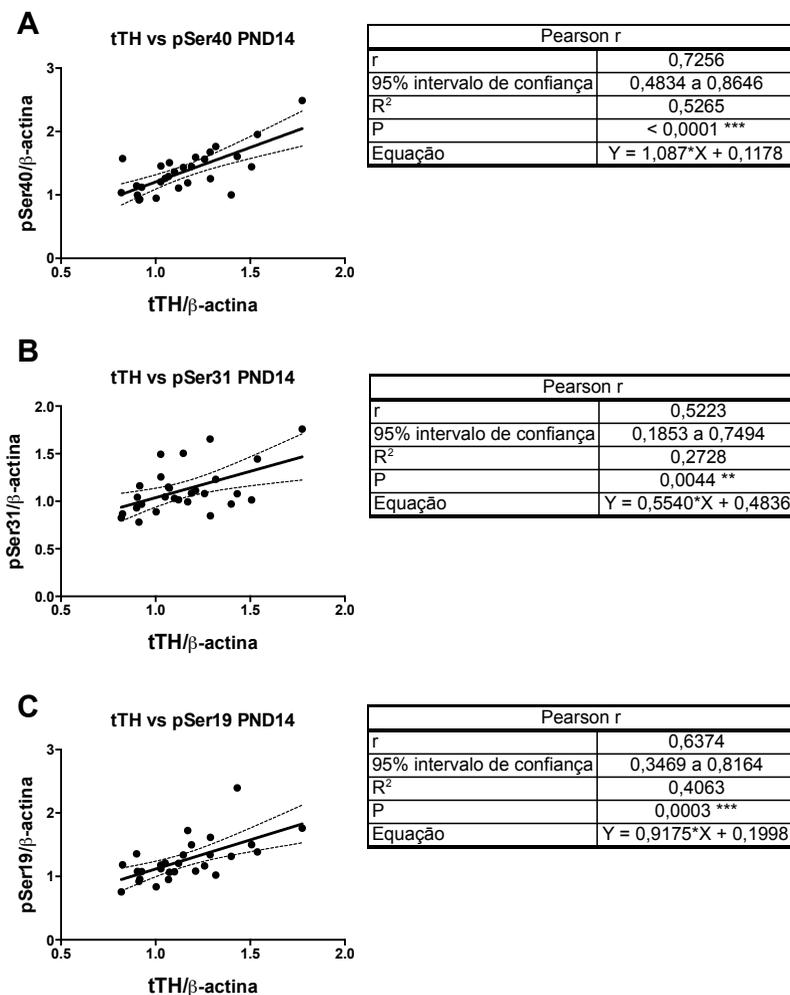


Figura 33: O conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) foi medido por *western blotting* no estriado de ratos no PND 14 expostos ao  $MnCl_2$  (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12). A correlação de Pearson foi calculada entre os níveis de TH total (tTH) e os níveis de TH fosforilada na serina 40 (pSer40) (A) pSer31 (B) ou pSer19 (C) normalizados em relação aos níveis de  $\beta$ -actina ( $\beta$ -actina). As linhas representam a regressão linear. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  (teste t bicaudal).

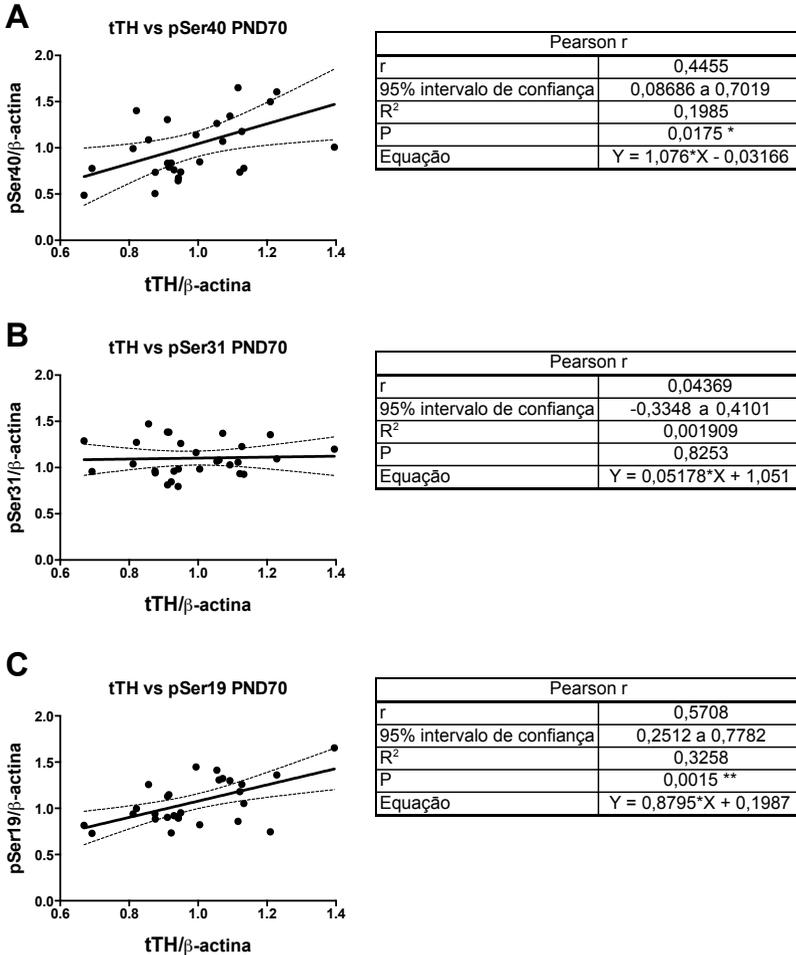


Figura 34: O conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) foi medido por *western blotting* no estriado de ratos no PND 70 expostos ao MnCl<sub>2</sub> (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante o desenvolvimento (PND 8-12). Correlação de Pearson foi calculada entre os níveis de TH total (tTH) e os níveis de TH fosforilada na serina 40 (pSer40) (A) pSer31 (B) ou pSer19 (C) normalizados em relação aos níveis de β-actina (/β-actina). As linhas representam a regressão linear. \*p<0,05, \*\*p<0,01 (teste t bicaudal).

## **4.2 Toxicidade do manganês em *Caenorhabditis elegans* mutantes para proteínas das vias de sinalização de MAPKs e AKT**

No modelo de *C. elegans*, a toxicidade do Mn envolvendo o sistema dopaminérgico e o estresse oxidativo já foi demonstrada (BENEDETTO et al., 2010). Não estava claro, porém, o papel que vias de sinalização homólogas a MAPKs e AKT de mamíferos poderiam desempenhar no mecanismo de toxicidade do metal. Desta forma, utilizando vermes mutantes para proteínas que compõem estas vias avaliamos a sobrevivência, integridade do sistema dopaminérgico e alterações na expressão gênica em resposta à exposição ao Mn. Estes experimentos foram realizados durante o período de doutorado sanduíche no Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, EUA sob orientação do Prof. Dr. Michael Aschner.

### **4.2.1 Sobrevivência de *C. elegans* selvagem ou mutantes frente à exposição ao Mn**

A letalidade do Mn (2,5 a 100 mM MnCl<sub>2</sub> por 1 h) foi testada em *C. elegans* selvagens (N2) e nos mutantes com perda de função nos genes das proteínas que constituem a via de sinalização das MAPKs *nsy-1(ag3)*, *pmk-3(ok169)* ou *jnk-1(gk7)* ou a via da AKT *akt-2(ok393)*, *sgk-1(ok538)*, *akt-1(ok525)* e com ganho de função em *akt-1(mg144)*. A partir dos valores referentes à porcentagem de vermes que sobreviveram 48 h após a exposição ao Mn obtiveram-se curvas de viabilidade para cada cepa (Figura 35). Não observamos diferenças significativas entre a viabilidade dos vermes N2 e as cepas mutantes para MAPKs (Figura 35 A). Observou-se um deslocamento da curva de viabilidade para a direita nas cepas *akt-1(ok525)*, *akt-2(ok393)* e *sgk-1(ok538)* em relação à cepa N2 [F 44, 142 = 9,05; p<0,001], indicando maior CL<sub>50</sub>, ou resistência à exposição ao Mn (Figura 35 B).

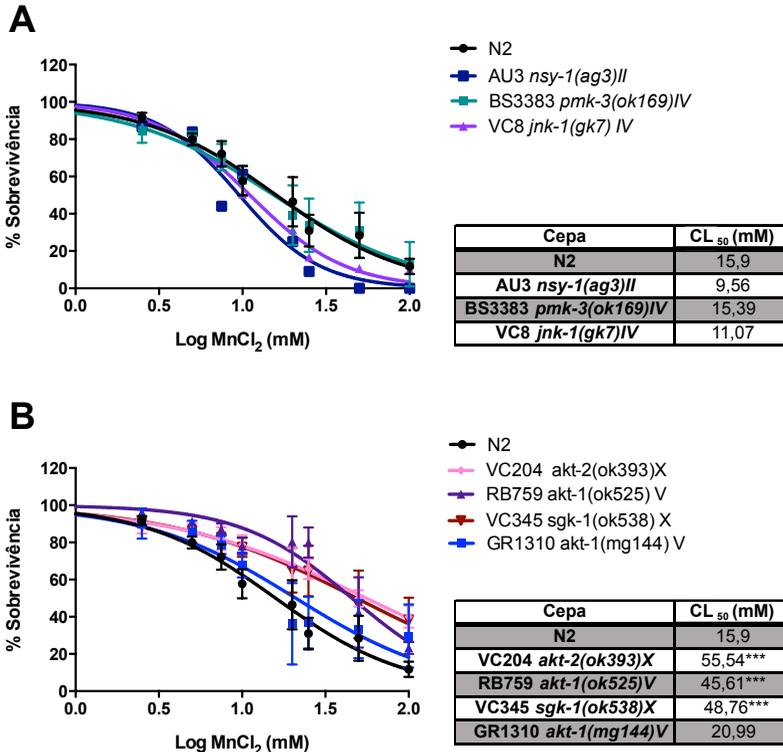


Figura 35: Sobrevivência de *C. elegans* após exposição ao Mn (0-100 mM) por 1 hora. Os controles foram incubados com NaCl 85 mM. O número de vermes sobreviventes foi determinado 48 h após o tratamento. (A) Vermes selvagens (N2) ou com perda de função nos genes *pmk-3* (BS3383), *jnk-1* (VC8) e *nsy-1* (AU3) da família das MAPKs. (B) Vermes N2 ou com perda de função nos genes *akt-1* (RB759), *akt-2* (VC204) ou *sgk-1* (VC345) ou ganho de função de *akt-1* (GR1310). Os dados representam a porcentagem de vermes sobreviventes em relação ao dia 0 e estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 3 a 6 experimentos. A concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>) foi calculada por regressão não-linear. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação com o grupo N2 (selvagem), ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

#### 4.2.2 Avaliação da integridade do sistema dopaminérgico de *C. elegans* selvagem ou mutantes frente à exposição ao Mn

A integridade do sistema dopaminérgico foi avaliada através da resposta *basal slowing* em *C. elegans* selvagens e mutantes 48 h após a

exposição ao Mn. As concentrações de Mn foram escolhidas baseado nas  $CL_{50}$  para cada cepa (5, 10 ou 50 mM  $MnCl_2$  por 1 h). Vermes deficientes em CAT-2, a proteína homóloga à TH em nematódeos, foram utilizados como controle positivo, pois apresentam resposta *basal slowing* deficiente. O número de curvaturas corporais num período de 20 s nas placas sem bactéria foi utilizado para a avaliação da locomoção dos vermes. O  $\Delta$  entre este número e o número de curvaturas corporais sobre a bactéria caracteriza a resposta *basal slowing*, sendo esperado uma diminuição das curvaturas corporais sobre a bactéria nos vermes com sinalização dopaminérgica normal (SAWIN et al., 2000). Observou-se que o mutante *jnk-1(gk7)*, tanto controles quanto expostos a Mn 5 e 10 mM, apresenta menor número de curvaturas corporais na placa sem bactéria (10,37±0,73, 9,62±0,57 e 10,14±0,80 curvaturas corporais por 20 s, respectivamente) comparado aos vermes selvagens (16,28±1,10, 16,25±1,45 e 14,40±1,71 curvaturas corporais por 20 s, respectivamente) com efeito significativo da cepa [F 3, 62 = 14,84;  $p < 0,001$ ] (Figura 36 A). Isto se reflete na resposta *basal slowing* do mutante *jnk-1(gk7)* exposto a 5 ou 10 mM Mn ( $\Delta = 7,9 \pm 0,8$  e  $7,7 \pm 1,1$ , respectivamente) comparado ao selvagem ( $\Delta = 12,74 \pm 1,18$ ) com efeito significativo da cepa [F 3, 62 = 9,35;  $p < 0,001$ ] (Figura 36 B).

Os vermes selvagens e os mutantes *akt-1(ok525)*, *akt-1(mg144)*, *akt-2(ok393)* e *sgk-1(ok538)* não apresentaram dano na função locomotora (Figura 37 A). A resposta *basal slowing* foi prejudicada nos vermes selvagens ( $\Delta = 7,72 \pm 0,72$ ;  $p < 0,05$ ), *akt-1(ok525)* ( $\Delta = 6,36 \pm 1,58$ ;  $p < 0,01$ ), *akt-1(mg144)* ( $\Delta = 4,98 \pm 1,27$ ;  $p < 0,001$ ) e *akt-2(ok393)* ( $\Delta = 6,12 \pm 0,83$ ;  $p < 0,01$ ) expostos à concentração mais alta de Mn (50 mM) comparado ao grupo controle selvagem ( $\Delta = 11,53 \pm 0,15$ ) com efeito significativo da concentração [F 2, 40 = 9,60;  $p < 0,001$ ] sem haver diferença entre as cepas ( $p > 0,05$ ) (Figura 37 B).

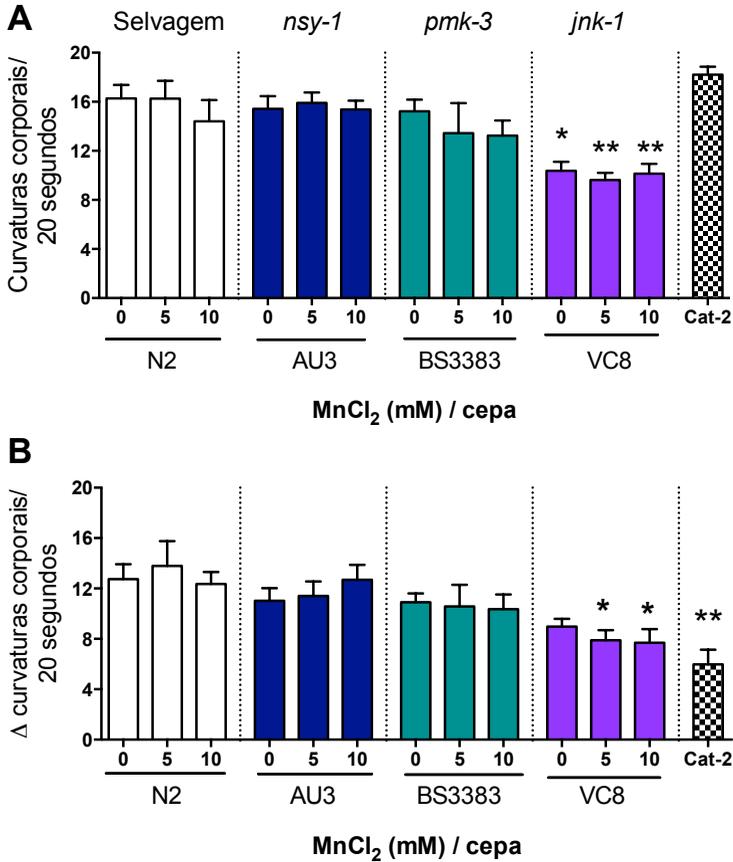


Figura 36: A resposta *basal slowing* mediada pela dopamina foi avaliada nos vermes selvagens (N2) e mutantes com perda de função em *nsy-1* (AU3), *pmk-3* (BS3383) ou *jnk-1* (VC8) expostos ao Mn por 1 h (5 ou 10 mM). Os controles foram incubados com NaCl 85 mM. O teste foi realizado 48 h após a exposição ao Mn. (A) Atividade locomotora, medida como curvaturas corporais realizadas num intervalo de 20 s. (B) Resposta *basal slowing*, avaliada como a subtração ( $\Delta$ ) do número de curvaturas corporais fora da bactéria do número de curvaturas corporais sobre a bactéria. O mutante *cat-2*, com deficiência da tirosina hidroxilase, foi usado como controle positivo. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 3 a 5 experimentos. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , em relação ao grupo controle N2. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

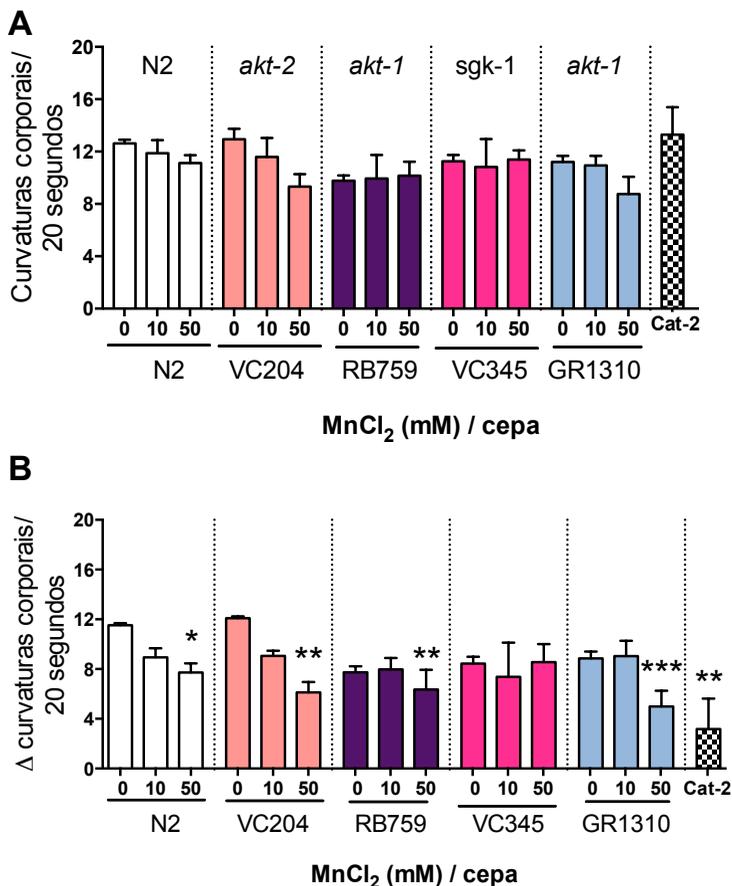


Figura 37: A resposta *basal slowing* foi avaliada nos vermes selvagens (N2) e mutantes com ganho de função em *akt-1* (GR1310) ou perda de função em *akt-1* (RB759), *akt-2* (VC204) ou *sgk-1* (VC345) expostos ao Mn por 1 h (10 ou 50 mM). Os controles foram incubados com NaCl 85 mM. O teste foi realizado 48 h após a exposição ao Mn. (A) atividade locomotora, medida como curvaturas corporais realizadas num intervalo de 20 s. (B) resposta *basal slowing*, avaliada como a subtração ( $\Delta$ ) do número de curvaturas corporais fora da bactéria do número de curvaturas corporais sobre a bactéria. O mutante *cat-2*, com deficiência da tirosina hidroxilase, foi usado como controle positivo. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 3 a 6 experimento. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle N2. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

A integridade dos neurônios dopaminérgicos dos vermes expostos ao Mn foi avaliada por microscopia de fluorescência utilizando o mutante BY200, que expressa GFP sob o promotor do transportador de dopamina DAT-1, presente em neurônios dopaminérgicos. BY200 não apresenta diferença na sensibilidade ao Mn em relação ao verme N2 (SETTIVARI et al., 2013), portanto foi considerado o verme selvagem para este experimento. Este mutante foi cruzado com o mutante *akt-2(ok393)* para possibilitar a avaliação dos neurônios dopaminérgicos na cepa KO para *akt-2*. Na Figura 38 está demonstrada a eficiência do cruzamento entre BY200 e *akt-2(ok393)*, obtendo uma cepa que expressa GFP e o alelo KO para AKT-2. *Akt-2(ok393)* possui uma deleção de 719 pares de bases (bp), que pode ser detectada por PCR seguido de eletroforese em gel de agarose (Figura 38A). Esta cepa foi exposta ao Mn (5 ou 50 mM) por 1 h e após 2 horas, os vermes foram anestesiados e transferidos para lâminas contendo agarose 4% para observação em microscópio de fluorescência. Foi então quantificada a porcentagem de vermes que apresentavam neurodegeneração, caracterizada por marcação descontínua dos dendritos, encolhimento ou perda do soma e/ou perda de dendritos (Figura 39 A, B e C). Degeneração significativa foi observada tanto nos vermes BY200 quanto KO para *akt-2* somente na concentração mais alta de Mn (Figura 39 D). ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo da concentração [F 4, 48 = 14,37;  $p < 0,001$ ], sem haver diferença entre as cepas ( $p > 0,05$ ).

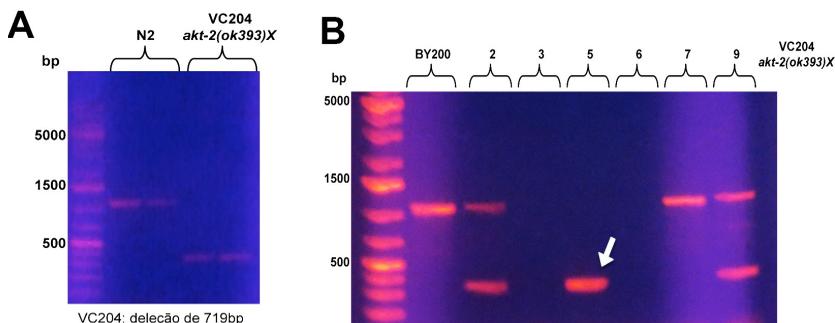


Figura 38: Cruzamento entre os vermes BY200 e VC204. A cepa BY200, que expressa a proteína verde fluorescente (GFP) nos neurônios dopaminérgicos foi cruzada com VC204, que possui uma deleção de 719 pares de bases (bp). A região do genoma que contém o gene *akt-2* foi amplificada por PCR usando os *primers* específicos. (A) O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose e o DNA proveniente dos vermes mutantes forma uma banda em posição inferior em relação à banda formada pelo DNA dos vermes selvagens N2. (B) Foram coletados 10 vermes da geração F1 que expressavam fluorescência e os vermes da geração F2 que expressavam fluorescência foram isolados em placas individuais e analisados por PCR para a presença da deleção de interesse. A progênie do verme de número 5 (seta) foi selecionada para originar a cultura que foi utilizada nos experimentos de avaliação dos neurônios dopaminérgicos.

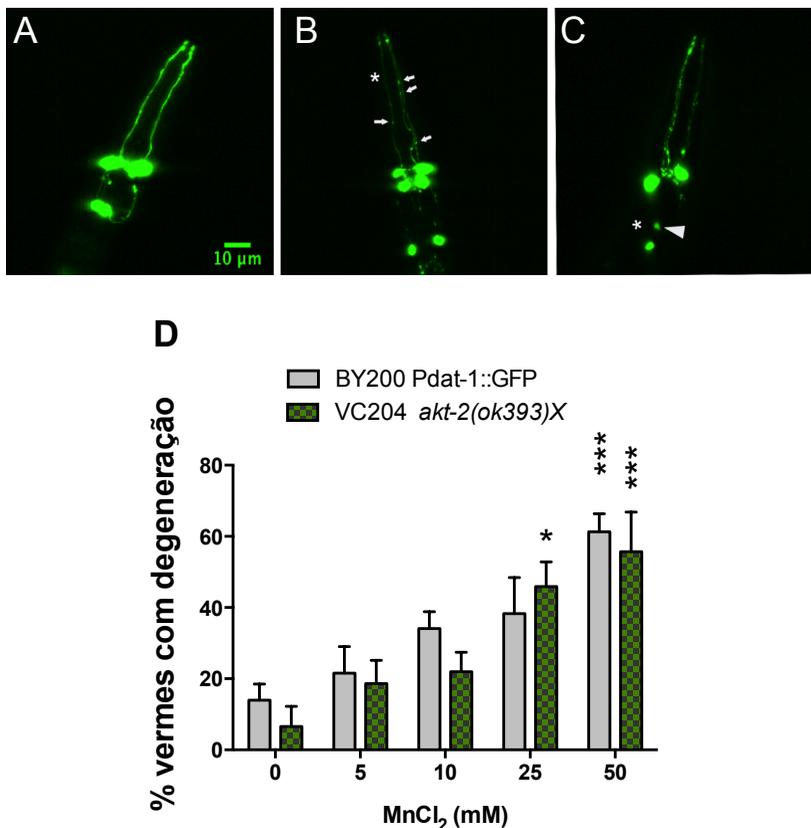


Figura 39: Morfologia dos CEPs e ADEs de pelo menos 20 vermes por grupo de BY200 (selvagens) ou da cepa obtida pelo cruzamento de BY200 com VC204 *akt-2(ok393)X*. Os vermes foram avaliados 2 h após o tratamento agudo de 1 h com  $MnCl_2$  (5, 10, 25 ou 50 mM) por microscopia de fluorescência (aumento de 40X). Os controles foram incubados com NaCl 85 mM. Vermes com neurônios saudáveis foram quantificados como normais (A). Vermes que demonstravam qualquer uma das seguintes alterações em seus neurônios dopaminérgicos foram quantificados como contendo degeneração: (B) *puncta* (marcação descontínua do dendrito, setas), (C) perda ou encolhimento do corpo celular (cabeça de seta), perda de dendritos (asteriscos), exemplificados nas imagens de microscopia confocal. (D) Os dados representam a porcentagem de vermes com degeneração. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 6 experimentos. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

### 4.2.3 Efeito do Mn sobre o conteúdo de GSH e o conteúdo relativo de mRNA de proteínas envolvidas na resposta antioxidante em *C. elegans*

Devido à importância do estresse oxidativo para a toxicidade do Mn em *C. elegans* e ao envolvimento da via de sinalização tipo insulina/IGF-1 para a resposta antioxidante no verme, testamos os níveis de GSH total e o conteúdo relativo de mRNA de *skn-1*, *gst-4*, *gcs-1* e *sod-3* para determinar possíveis diferenças na resposta antioxidante entre os vermes mutantes e selvagens.

A quantificação dos níveis de GSH revelou que os vermes selvagens apresentam uma queda nos níveis de GSH quando expostos a 50 mM Mn por 1 h ( $p < 0,05$ ). Os vermes KO para *akt-1* e *akt-2* não apresentam esta queda nos níveis de GSH, com efeito significativo da cepa sobre este resultado [F 4, 30 = 4,05;  $p < 0,01$ ], sem efeito da concentração ou interação ( $p > 0,05$ ; Figura 40).

Conforme descrito anteriormente, a via de sinalização PI3K/AKT antagoniza a ação dos fatores de transcrição SKN-1 e DAF-16. Portanto testamos por qRT-PCR nos vermes selvagens (N2) e mutantes os níveis relativos da expressão do fator de transcrição *skn-1* e de seus genes alvo, *gst-4* e *gcs-1*. *sod-3* é alvo do fator de transcrição DAF-16 e sua expressão relativa também foi medida. Os vermes foram expostos ao Mn (10 ou 50 mM) por 1 h e então o RNAm foi extraído. Os vermes KO para *akt-2* apresentaram aumento na expressão relativa de *skn-1* (Figura 40 A) com efeito significativo da concentração [F 2, 43 = 4,18;  $p < 0,05$ ] e cepa sobre este resultado [F 4, 43 = 3,15;  $p < 0,05$ ] e sem interação ( $p > 0,05$ ). Os vermes KO para *akt-1* apresentaram aumento na expressão relativa de *gcs-1* (Figura 41 B) com efeito significativo da concentração [F 2, 35 = 4,39;  $p < 0,05$ ] e cepa sobre este resultado [F 4, 35 = 5,98;  $p < 0,001$ ] e sem interação ( $p > 0,05$ ). Não houve diferença significativa na expressão de *gst-4* ( $p > 0,05$ ; Figura 41 C). Os vermes KO para *akt-1* apresentaram aumento na expressão relativa de *sod-3* (Figura 41 D) com efeito significativo da cepa [F 4, 40 = 19,62;  $p < 0,001$ ] e não da concentração ( $p > 0,05$ ) sobre este resultado e sem interação ( $p > 0,05$ ).

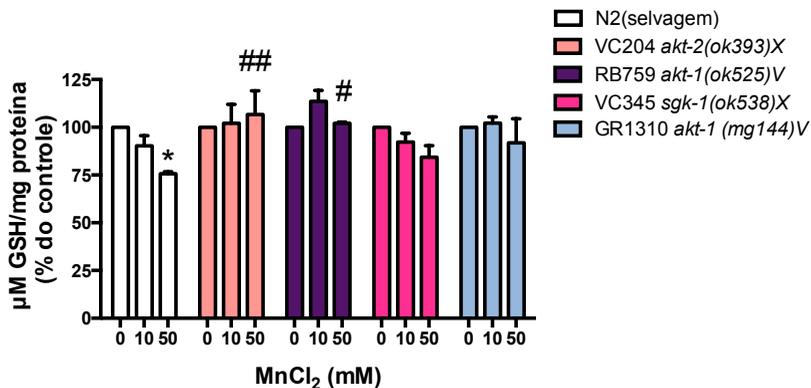


Figura 40: Níveis de GSH. Os vermes N2 (selvagens) e mutantes com ganho de função em *akt-1* (GR1310) ou perda de função em *akt-1* (RB759), *akt-2* (VC204) ou *sgk-1* (VC345) foram expostos ao Mn por 1 h (10 ou 50 mM). Os controles foram incubados com NaCl 85 mM. Os vermes foram homogeneizados ao final do tratamento para a quantificação de GSH utilizando uma curva padrão ( $\mu\text{M}$  de GSH/mg de proteína). Os resultados estão expressos como porcentagem do controle da mesma cepa e média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos. \* $p < 0,05$  em relação ao controle N2. # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  em relação ao grupo 50 mM N2. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

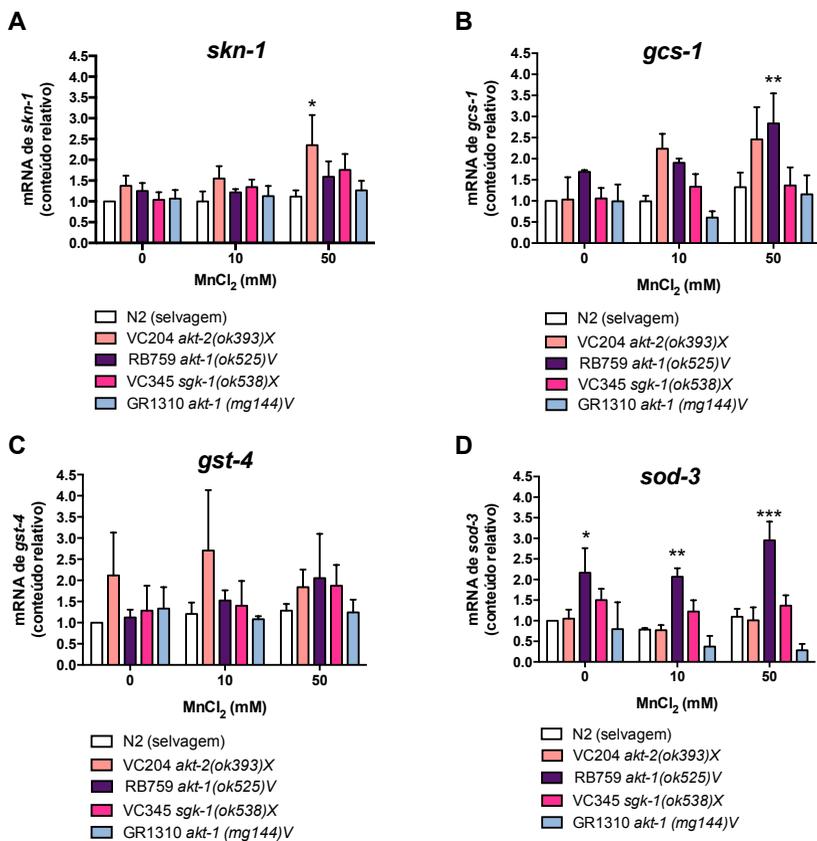


Figura 41: Expressão relativa de genes da resposta antioxidante. Os vermes N2 (selvagens) e mutantes com ganho de função em *akt-1* (GR1310) ou perda de função em *akt-1* (RB759), *akt-2* (VC204) ou *sgk-1* (VC345) foram expostos ao Mn por 1 h (10 ou 50 mM). Os controles foram incubados com NaCl 85 mM. O RNA foi extraído ao final do tratamento. O conteúdo do RNAm de *skn-1* (A), *gcs-1* (B), *gst-4* (C) e *sod-3* (D) em relação ao gene constitutivo *afd-1* ( $\beta$ -actina) foi normalizado ao grupo N2 controle. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 4 experimentos. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle N2. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey.



## 5. DISCUSSÃO

O cérebro em desenvolvimento é reconhecidamente mais suscetível aos danos causados por agentes tóxicos em comparação com o cérebro adulto (GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2006, 2014). O período de desenvolvimento do SNC de roedores do PND 7 ao 27 é fundamental para a migração neuronal, o crescimento glial, sinaptogênese e mielinização. Logo, a exposição a agentes tóxicos que podem interromper estes processos resulta em déficits neurológicos (RICE e BARONE, 2000). Anteriormente nosso grupo demonstrou que o protocolo de exposição de ratos neonatos ao Mn utilizado no presente trabalho resulta em acúmulo de níveis elevados do metal no estriado, hipocampo e córtex no PND 14, em todas as doses utilizadas. Além disso, acúmulo de Fe foi observado no estriado após o tratamento com as doses de 10 e 20 mg/kg Mn e no córtex com a dose de 20 mg/kg. A exposição via i.p. foi utilizada por se assemelhar à exposição ao Mn via nutrição parenteral (CORDOVA et al., 2012). Publicações recentes indicam que algumas semanas após o fim da exposição ao Mn, os níveis deste metal retornam aos valores basais em várias estruturas cerebrais (KERN e SMITH, 2011; BALASZ et al., 2015). Consistente com estas observações, o presente estudo mostra que no PND 70 os níveis de Fe e Mn nos animais tratados encontram-se semelhantes aos controles. No entanto, os danos bioquímicos e funcionais, causados pela exposição ao Mn durante o desenvolvimento, podem persistir até a idade adulta dos animais.

### **Alterações motoras induzidos pelo Mn**

O Mn se acumula preferencialmente nas estruturas dos gânglios basais. Os gânglios basais são compostos por estriado (núcleo caudado, putamen e núcleo accumbens), globo pálido (GP), núcleo subtalâmico (STN) e *substantia nigra* (SN). Funcionalmente, os gânglios basais possuem papel importante na realização de processos sensorio-motores e no aprendizado de programas motores (GROENEWEGEN, 2003). Assim, o dano motor é um sintoma clássico da intoxicação por Mn (GUILARTE, 2010). Já havia sido demonstrado que a exposição ao Mn durante o desenvolvimento prejudica a função motora na fase jovem (KERN et al., 2010; CORDOVA et al., 2012). Porém, não havia sido determinado se os danos observados no modelo de exposição i.p. ao Mn no PND 8-12 são persistentes. Como demonstrado no presente trabalho, a avaliação de ratos adultos no teste do rotarod confirma que o dano

motor persiste na fase adulta, ou seja, 8 semanas depois da interrupção da exposição ao Mn.

No teste do campo aberto, não foram observadas alterações em nenhum dos parâmetros analisados, corroborando resultados anteriores por Kern e Smith (2011). Estes resultados indicam que a presença de níveis excessivos de Mn na fase de desenvolvimento induziu danos na coordenação motora e equilíbrio, enquanto a locomoção no campo aberto não foi afetada de forma persistente. Beaudin e colaboradores (2013) enfatizaram a importância de empregar um teste motor mais sensível do que o campo aberto, como é o caso do rotarod. Para avaliar diferenças sutis no controle fino da função motora nos membros anteriores de ratos, eles empregaram a escada de Montoya (MONTROYA et al., 1991). Após exposição oral ao Mn no PND 1-21, a análise comportamental no PND 107 revelou que danos sutis na função motora ainda persistem (BEAUDIN et al., 2013).

O desempenho no rotarod está relacionado com a integridade dos gânglios basais. Em camundongos injetados com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), as alterações da atividade motora avaliadas no rotarod deveram-se à depleção da dopamina (DA) estriatal (ROZAS et al., 1998). Neste sentido, várias observações indicam que as alterações neuroquímicas do sistema dopaminérgico poderiam estar na origem das disfunções comportamentais induzidas pelo Mn. Foi demonstrado que a exposição precoce ao Mn provoca um aumento a longo prazo do número de receptores de DA do tipo D1 e D2 no estriado e no córtex (KERN e SMITH, 2011; MCDUGALL et al., 2011). Além disso, foi relatado redução dos níveis de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT), e aumento do metabolismo da DA no estriado de ratos Sprague-Dawley adultos expostos ao  $MnCl_2$ , os quais foram acompanhados por disfunção motora (BOUABID et al., 2014). A deficiência motora observada no teste do rotarod indica que o acúmulo de Mn no estriado no PND 14 pode ter interferido com o desenvolvimento desta região. O estresse oxidativo, as alterações nas vias de sinalização intracelular e a ativação de caspase 3 nesta região no PND 14 (CORDOVA et al., 2012) podem ter contribuído para o dano motor persistente.

Os níveis de NPSH no estriado são reduzidos em animais expostos ao Mn (5 e 20 mg/kg). Este parâmetro serve como uma medida do conteúdo do tripeptídeo  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina, ou glutathione (GSH). A GSH é um importante agente antioxidante em células de mamíferos e constitui 90% dos tiois não proteicos. Sob condições fisiológicas a GSH se encontra no estado reduzido (ANDERSON e

MEISTER, 1983). Os níveis mais baixos de NPSH no estriado de ratos adultos indicam que a GSH pode ser oxidada devido à presença de estresse oxidativo, ou, alternativamente, a sua produção está comprometida. Não foram observadas no estriado alterações em GPx e GR, as enzimas responsáveis pela conversão entre o estado reduzido e oxidado de GSH. É possível que os níveis destas e outras enzimas antioxidantes ou os fatores de transcrição que ativam a sua produção possam ser afetados pelo Mn. Portanto, não pode ser determinado se a redução nos níveis de NPSH é devido ao consumo de GSH na detoxificação de espécies reativas ou se deve à alteração dos níveis de enzimas que mantêm o equilíbrio dos níveis de GSH. Foi observado um aumento dos níveis de isoprostanos no PND 14 no estriado de animais expostos ao Mn nas mesmas condições aqui empregadas (CORDOVA et al., 2012). Além disso, nossos resultados mostraram aumento da atividade de catalase no estriado no PND 14, o qual não persistiu até o PND 70. Assim, o dano oxidativo parece ocorrer no corpo estriado em fase precoce, mas não está claro se ele persiste. Entretanto, deve ser salientado que o estresse oxidativo pode estar relacionado com o dano motor, uma vez que o co-tratamento com Mn e o antioxidante Trolox previne o prejuízo motor observado no rotarod (CORDOVA et al., 2012; CORDOVA et al., 2013).

A expressão de GFAP encontra-se aumentada no corpo estriado dos ratos no PND 70. Embora sutil, este aumento foi estatisticamente significativo. O aumento no conteúdo de GFAP em animais expostos ao Mn pode refletir ativação astrocitária (ENG et al., 2000). Uma ativação astrocitária crônica foi relatada anteriormente, após a exposição oral ao Mn durante o desenvolvimento (KERN e SMITH, 2011). Várias doenças neurodegenerativas são acompanhadas por astrogliose. Os astrócitos são afetados precocemente no manganismo, com mudanças na expressão de GFAP precedendo a morte neuronal (HENRIKSSON e TJALVE, 2000). Uma vez que os astrócitos são essenciais para a manutenção da atividade neuronal, perturbações da sua função podem contribuir para a lesão neuronal no manganismo (GONZALEZ et al., 2008). Da mesma forma, células microgliais também são afetadas pelo Mn com o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (FILIPOV e DODD, 2012), podendo ativar os astrócitos a liberar mediadores inflamatórios, como a prostaglandina E2 e óxido nítrico (CHEN et al., 2006).

### **Alterações cognitivas induzidas pelo Mn**

O Mn também pode causar danos a outras estruturas além dos gânglios basais, tais como o hipocampo e o córtex cerebral, o que é consistente com sintomas não motores (GUILARTE et al., 2008b; ASCHNER et al., 2009; GUILARTE, 2013). Além disso, nosso trabalho anterior mostrou elevados níveis de Mn no hipocampo e no córtex cerebral de ratos expostos ao Mn no PND 8 ao 12 (CORDOVA et al., 2012). Ainda, em primatas não-humanos foram descritas alterações neuropatológicas no córtex frontal como uma consequência da exposição ao Mn (VERINA et al., 2013). Observa-se também prejuízo cognitivo em crianças que consumiram água contaminada com altos níveis de Mn (WASSERMAN et al., 2006). Dessa forma, considerando a possível susceptibilidade do córtex cerebral e do hipocampo ao Mn, investigamos possíveis danos cognitivos nos ratos expostos precocemente (PND 8-12) ao Mn. O teste do reconhecimento de objeto, que avalia principalmente a memória dependente do córtex pré-frontal e hipocampo (PAMPLONA et al., 2009), revelou que os animais expostos à concentração mais elevada (20 mg/kg Mn) não foram capazes de reconhecer a presença de um objeto familiar, quando o segundo objeto foi substituído por um novo. Isso sugere que a exposição precoce ao Mn causou prejuízo cognitivo que persiste na fase adulta.

O bulbo olfatório é uma região suscetível ao acúmulo de Mn (SEN et al., 2011) e a mudanças morfológicas induzidas pelo metal (COLIN-BARENQUE et al., 2011). Além disso, a deficiência da função olfatória tem sido descrita como um sintoma precoce de doença de Parkinson, bem como de outras patologias neurodegenerativas (DOTY, 2008). Portanto, considerando todos esses aspectos foi avaliada a função olfatória dos ratos expostos ao Mn em fase precoce do desenvolvimento. Os resultados do teste de discriminação olfatória não demonstraram alteração da preferência pelo compartimento familiar nos ratos tratados com Mn comparado aos controles. Normalmente os ratos possuem preferência pelo compartimento que tem seu odor familiar, e tratamentos que prejudicam a função olfatória como a rotenona, por exemplo, provocam perda dessa preferência, possivelmente devido à diminuição dos níveis de DA no bulbo olfatório e estriado (RODRIGUES et al., 2014).

Embora a discriminação olfatória estivesse intacta, a capacidade de reconhecimento social foi comprometida em ratos tratados com as doses mais elevadas de Mn. Este resultado sugere comprometimento da memória de curto prazo, uma vez que a disfunção olfatória não parece ser responsável pelo reconhecimento social prejudicado. A capacidade

de memória social exige pistas olfativas e pode ser facilitada por vários agentes farmacológicos que melhoram a cognição (PERIO et al., 1989). O uso de cafeína ou um antagonista específico do receptor de adenosina A2A revelou que as alterações funcionais na neurotransmissão adenosinérgica facilitam a memória social em ratos idosos (PREDIGER et al., 2005a). Por outro lado, a depleção de NA induzida por infusões de 6-hidroxidopamina no bulbo olfatório de ratos não causou alteração no reconhecimento social (DLUZEN et al., 1998). O mecanismo responsável pelo declínio no reconhecimento social em modelos de exposição ao Mn ainda necessita ser completamente elucidado. No entanto, as observações do teste de reconhecimento social corroboram o comprometimento cognitivo induzido pelo Mn.

Ambas as enzimas catalase e GPx participam na detoxificação de  $H_2O_2$  e as atividades de ambas foram aumentadas no hipocampo de ratos tratados com a concentração mais elevada de Mn. A atividade da catalase se encontrava aumentada também no hipocampo dos ratos que foram tratados com 5 mg/kg Mn, porém não 10 mg/kg. Assim, o Mn parece agir de forma dose-independente neste parâmetro. A SOD também foi avaliada e não foram observadas alterações. O estresse oxidativo está implicado no mecanismo de neurotoxicidade do Mn (MILATOVIC et al., 2009; STEPHENSON et al., 2013) e foi relatado que o Mn induz a produção de  $H_2O_2$  *in vitro* (POSSER et al., 2009) e a produção do radical hidroxil *in vivo* (BAŁASZ et al., 2015). Em ratos adultos, a exposição crônica ao Mn resultou no aumento da atividade da SOD e da catalase no hipocampo (MARTINS et al., 2012). Em ratos expostos na fase perinatal e avaliados na fase adulta, a atividade da GPx se encontrava aumentada no hipocampo (BAŁASZ et al., 2015). Portanto, demonstramos que a exposição perinatal ao Mn induz alterações na atividade de enzimas antioxidantes, que podem estar relacionadas com estresse oxidativo no hipocampo. Os efeitos de níveis excessivos de Mn nesta região têm consequências para o sistema de defesa antioxidante dos ratos que persistem na fase adulta (PND 70). Apesar da relevância dos nossos achados não foi determinado, no presente estudo, se as alterações dos sistemas antioxidantes no hipocampo estão correlacionadas com os déficits cognitivos observados. Portanto, estudos futuros (utilizando antioxidantes, por exemplo) serão necessários para elucidar essa possível correlação.

## **Alterações no estado de fosforilação de TH induzidas pelo Mn**

A atividade da TH pode ser regulada agudamente pela fosforilação em diferentes resíduos de serina, principalmente fosforilação na Ser40 (pSer40), pSer31 e pSer19. A regulação crônica da atividade de TH se dá pelo aumento da síntese da enzima (KUMER e VRANA, 1996). As alterações na atividade de TH estão relacionadas com variações nos níveis de catecolaminas, sendo o aumento da atividade da enzima fundamental para restaurar os níveis destes neurotransmissores nas células catecolaminérgicas após a sua liberação (DUNKLEY et al., 2004).

O aumento na expressão da forma total de TH (tTH) no estriado no PND 14 pode significar uma resposta inicial ao estresse induzido pelos elevados níveis de Mn. O tecido estriatal foi coletado 48 h após o término da exposição ao Mn, quando os níveis do metal ainda se encontram elevados nesta estrutura, segundo Cordova et al. (2012). Portanto este efeito sobre TH caracteriza a regulação crônica da sua atividade. Um efeito semelhante sobre TH foi observado na glândula adrenal de ratos imaturos expostos ao lipopolissacarídeo (LPS), 48 h após a exposição. No mesmo trabalho, foi observado também elevação da fosforilação na Ser40 e Ser31 24 h após a exposição ao LPS, com aumento da atividade enzimática, sem alterações nos níveis de TH (no tempo de 24 h), evidenciado a fase sustentada de fosforilação de TH *in vivo* (ONG et al., 2012). Desta forma, a elevação nos níveis de TH induzida pela exposição ao Mn pode representar um mecanismo para aumentar a síntese de catecolaminas e manter os níveis estáveis destes neurotransmissores.

No manganismo, diferentemente da doença de Parkinson, a produção de DA não é afetada, e sim a capacidade dos terminais sinápticos de liberá-la por um mecanismo desconhecido, mas possivelmente pela interação com proteínas pré-sinápticas envolvidas na liberação de neurotransmissores. Por isso a levodopa não é eficiente para tratar os sintomas do manganismo (GUILARTE et al., 2008a). Já no modelo de ratos expostos ao Mn por via oral durante o desenvolvimento (PND 1-21), o transportador de DA (DAT) teve seus níveis reduzidos, bem como o efluxo de [<sup>3</sup>H]DA no estriado e no núcleo accumbens no PND 90, indicando que o Mn afeta a transmissão dopaminérgica nigro-estriatal e consistente com o presente trabalho, esses efeitos são persistentes (MCDUGALL et al., 2008).

O efeito do Mn sobre o estado de fosforilação de TH foi estudado anteriormente em modelos *in vitro*. Em cultura de células

PC12 a exposição ao Mn estimulou a fosforilação sobre Ser40 e a atividade de TH, sendo este efeito aparentemente, independente do estresse oxidativo ou mesmo da ativação de PKA ou PKC, como demonstrado pelo uso de compostos antioxidantes e inibidores seletivos das cinases, respectivamente. Porém, foi observado que esse efeito do Mn sobre o aumento da fosforilação de TH em células PC12 foi dependente do período de exposição e da concentração de metal aplicado (POSSER et al., 2009). Em fatias do corpo estriado de ratos no PND 14 expostas ao Mn (10-1000  $\mu$ M) durante curtos períodos (3-6 h), não foi observada fosforilação na Ser40 de TH nem alterações nos níveis da enzima (PERES et al., 2013). Por fim foi demonstrado em células dopaminérgicas da linhagem N27 que o Mn em baixas concentrações induz inibição da atividade de TH de maneira dependente da PKC $\delta$  e PP2A, mas sem alteração significativa da fosforilação de TH sobre o sítio Ser40 (ZHANG et al., 2011). Dessa forma, a modulação de TH pelo Mn parece bem complexa e necessita de mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos.

A redução nos níveis de TH observada no PND 70 no grupo Mn 20 mg/kg pode ser um indicativo de perda de neurônios dopaminérgicos no estriado. Já foi demonstrado anteriormente no modelo de *zebrafish* exposto ao Mn uma diminuição da imunomarcagem para TH nos neurônios catecolaminérgicos e alterações motoras, as quais foram revertidas pela suplementação com DA (BAKTHAVATSALAM et al., 2014). Nossos resultados demonstraram que a fosforilação dos sítios Ser40 e Ser19 no estriado dos animais no PND 70 acompanharam os níveis de TH, com uma correlação positiva. A fosforilação de Ser31 se manteve elevada, apesar da diminuição dos níveis de TH, esse resultado sugere uma resposta de compensação, para aumentar a síntese de DA, tendo em vista que a fosforilação de Ser31 poderia conduzir a um aumento de até 2 vezes na atividade de TH, segundo alguns estudos (HAYCOCK, 1990; HAYCOCK, 1993; DUNKLEY et al., 2004). Entretanto um ponto que não fica claro é que a atividade de MAPKs, AKT, PKA ou PKC não foi alterada no PND 70. A ERK1/2 foi a única cinase identificada que fosforila a Ser31 de TH. Por outro lado, PP2A é a fosfatase que age sobre a Ser31 e sua atividade também pode influenciar o nível de fosforilação de TH (DUNKLEY et al., 2004). Dessa forma, considerando as ações do Mn e essa intrincada rede de sinalização, seria interessante dosar os níveis de DA no estriado bem como medir a atividade de TH para esclarecer as consequências funcionais das alterações observadas neste estudo.

### Vias de sinalização que podem participar da toxicidade do Mn em *C. elegans*

O modelo de *C. elegans* vem sendo bastante utilizado em pesquisas toxicológicas não só pelas vantagens práticas que oferece, como também pela conservação das vias de resposta ao estresse e disponibilidade de diversos mutantes. Os testes comportamentais e as avaliações bioquímicas possíveis de se fazer nos vermes têm contribuído para a elucidação dos mecanismos de ação de diversos fármacos e xenobióticos, como por exemplo reserpina (RECKZIEGEL et al., 2015), pesticidas (CAITO et al., 2013), metilmercúrio (MARTINEZ-FINLEY et al., 2013), manganês (BENEDETTO et al., 2010; SETTIVARI et al., 2013; BORNHORST et al., 2014), cádmio (WANG et al., 2008; HALL et al., 2012), organocalcogênicos (ÁVILA et al., 2012b; WOLLENHAUPT et al., 2014), entre outros. No presente estudo, exploramos o uso de vermes mutantes para proteínas das vias de sinalização MAPKs e AKT buscando um melhor entendimento do papel destas vias para a toxicidade do Mn. Os vermes foram tratados no estágio larval L1, o primeiro estágio do desenvolvimento pós-embriônico e um período de neurogênese (ALTUN e HALL, 2011). Observamos que a via de sinalização semelhante à insulina/IGF-1 (ILS), da qual AKT faz parte, que conhecidamente antagoniza a ação dos fatores de transcrição DAF-16 e SKN-1, possui também um papel na toxicidade induzida por Mn em *C. elegans*.

O fator de transcrição de *C. elegans* SKN-1 é distantemente relacionado às proteínas Nrf de mamíferos e induz a transcrição de genes da resposta ao estresse oxidativo. Nesse sentido tem sido reconhecido que em resposta ao estresse oxidativo ocorre a translocação de SKN-1 para o núcleo das células intestinais. Nesse local SKN-1 ativa a transcrição de  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase de cadeia pesada [GCS(h)], glutationa sintetase e quatro isoformas de glutationa S-transferase (GST) (AN e BLACKWELL, 2003). A sinalização dependente de  $p38^{\text{MAPK}}$  (PMK 1-3 em *C. elegans*) é importante para a ativação de SKN-1. SKN-1 é fosforilado por PMK-1 nas Ser74 e Ser340 e então pode ser translocado para o núcleo (AN et al., 2005). No teste de viabilidade e no teste comportamental *basal slowing*, não observamos diferenças entre os mutantes KO para *pmk-3* e os vermes N2 (selvagens). Isso não exclui o papel de  $p38^{\text{MAPK}}$  na resposta ao estresse oxidativo induzido pelo Mn neste modelo, pois o *C. elegans* possui 3 ortólogos para  $p38^{\text{MAPK}}$ . No presente estudo foi selecionado o mutante *pmk-3(ok169)* para os experimentos porque a isoforma PMK-3 é mais ricamente expressa nas células intestinais (BERMAN et al., 2001), onde há maior acúmulo de

Mn nos vermes (BRINKHAUS et al., 2014). Dessa forma, deve ser considerada a possibilidade de que o mutante deficiente apenas em PMK-3 poderia ter uma compensação na expressão das outras duas isoformas. O mutante *nsy-1(ag3)* é deficiente na expressão de uma MAPKKK denominada NSY-1, a qual age sobre SEK-1 (classificada como uma MAPKK). SEK-1 por sua vez age ativando as isoformas de PMK. O mutante *nsy-1* também não mostrou diferenças na viabilidade ou resposta *basal slowing* em relação aos selvagens. Isto sugere a participação de outra MAPKKK na sinalização que ativa PMK/p38<sup>MAPK</sup> através de SEK-1. SEK-1 por sua vez demonstrou ser essencial para a ativação de PMK-1 em resposta ao estresse oxidativo induzido por arsenito, peróxido de terc-butila e paraquat (INOUE et al., 2005), enquanto NSY-1 possui papel essencial na resposta imune (KIM et al., 2002). O emprego de outros mutantes para as isoformas de PMK e também da MAPKK SEK-1 será importante para esclarecer o papel de p38<sup>MAPK</sup> na toxicidade do Mn em *C. elegans*.

O mutante *jnk-1(gk-7)* possui defeito locomotor e prejuízo mecanossensorial (VILLANUEVA et al., 2001). Por esta razão apresentou um número menor de curvaturas corporais no teste *basal slowing* e este efeito pode ter sido exacerbado pela presença de Mn nas concentrações de 5 e 10 mM. Além disso, já foi demonstrado que este mutante apresenta hipersensibilidade ao cádmio e ao cobre (VILLANUEVA et al., 2001), porém o silenciamento de *jnk-1* por RNAi protegeu contra a morte de neurônios dopaminérgicos induzida pelo Mn (SETTIVARI et al., 2013). Contrastante com nossas observações, Settivari e colaboradores (2009) relatam que a viabilidade dos neurônios dopaminérgicos em *C. elegans* expostos ao Mn é dependente de SKN-1 e GST-1 e que JNK-1 participa da via de apoptose nos neurônios dopaminérgicos. Porém os autores não avaliaram a viabilidade dos vermes expostos ao Mn, apenas dos seus neurônios dopaminérgicos. Como não observamos diferenças entre *jnk-1(gk7)* e N2 no teste de viabilidade, mais experimentos serão necessários para identificar quais via de sinalização fazem parte da neurodegeneração dopaminérgica e da sobrevivência em resposta à exposição ao Mn no modelo de *C. elegans*.

Neste estudo usamos os mutantes *akt-1(ok525)*, *akt-1(mg144)*, *akt-2(ok393)* e *sgk-1(ok538)*. Com o ensaio de viabilidade foi revelado que os vermes com deficiência na expressão de AKT-1, AKT-2 e SGK-1 possuem maior resistência ao Mn em relação ao grupo selvagem. Isto indica que as proteínas que fazem parte da via de sinalização tipo insulina são importantes no mecanismo de toxicidade do Mn nos

vermes. Em *C. elegans*, a via de sinalização composta por DAF-2 (o único receptor semelhante ao IGF-1 de mamíferos), participa das respostas antioxidantes e é bastante estudada pelo seu papel na longevidade (KIMURA et al., 1997). Esta via responde à sinalização por peptídeos semelhantes à insulina e ativa alvos incluindo AKT-1, AKT-2 e SGK-1 através de AGE-1 (homólogo da PI3K) e PDK-1. Esta via de sinalização tem como alvos os fatores de transcrição SKN-1 e DAF-16, que são fosforilados por AKT 1/2 e SGK-1 em vários sítios (TULLET et al., 2008). DAF-16 ativa a transcrição de *sod-3*, entre outros genes da resposta antioxidante. A enzima SOD-3 é homóloga à Mn-SOD de mamíferos e localiza-se na mitocôndria (OGG et al., 1997; HONDA e HONDA, 1999). A sinalização via insulina nos mamíferos pode contribuir com a geração de estresse oxidativo pelo seu papel na regulação do transporte de glicose e geração de ATP na cadeia transportadora de elétrons. A via de sinalização tipo insulina em *C. elegans* antagoniza a ação de DAF-16 (OGG et al., 1997; PARADIS e RUVKUN, 1998) e posteriormente foi demonstrado que antagoniza também SKN-1 (TULLET et al., 2008), pois quando fosforilados nos sítios específicos os fatores de transcrição permanecem no citoplasma. A vantagem biológica de antagonizar esses fatores de transcrição parece ser manter um estado redox ótimo para o funcionamento de certas vias de sinalização intracelular (TULLET et al., 2008).

Apesar dos mutantes *akt-2* apresentarem maior resistência ao Mn na curva de viabilidade, a neurodegeneração dopaminérgica nestes vermes foi semelhante aos selvagens, conforme os testes *basal slowing* e a análise dos neurônios dopaminérgicos expressando GFP. Os mutantes *akt-1* também apresentaram perfil semelhante na resposta *basal slowing*. O *C. elegans* é capaz de sobreviver até mesmo com a sua função neuronal severamente (mas não totalmente) comprometida (RAND e NONET, 1997). Isto indica que o mecanismo que leva à morte de neurônios dopaminérgicos induzida por Mn não envolve a via de sinalização de AKT. AKT-1 e AKT-2 são expressas na maioria dos neurônios da região da cabeça, faringe, hipoderme e intestino e AKT-1 parece ser mais abundante que AKT-2 (PARADIS e RUVKUN, 1998). A maior resistência dos vermes pode ser devida à resposta antioxidante presente no intestino, garantindo a sobrevivência do verme, mas sem proteger os neurônios dopaminérgicos, onde o Mn pode se acumular através dos transportadores SMF (homólogos ao DMT-1) e gerar estresse oxidativo pela interação com a DA, conforme descrito anteriormente por Benedetto e colaboradores (2010). Já foi descrito anteriormente que o Mn induz aumento de expressão de AKT, com

redução dos níveis de SOD-3 e DAF-16 em *C. elegans* (ÁVILA et al., 2012a). Além disso, o composto antioxidante dietil-2-fenil-2-telurofenil vinil fosfonato (DPTVP) protege contra o estresse oxidativo causado pelo Mn por um mecanismo que envolve a translocação de DAF-16 para o núcleo (ÁVILA et al., 2012b). Um efeito semelhante foi obtido com o composto seleno-xilofuranosídeo e o seu análogo de telúrio, com incremento dos níveis de SOD-3 em *C. elegans* e redução dos efeitos tóxicos do Mn nos vermes (WOLLENHAUPT et al., 2014). Portanto, a ausência de AKT-1 ou AKT-2 pode aliviar a inibição de DAF-16 e com isso aumentar a resistência dos vermes ao Mn.

Os mutantes *sgk-1* expostos a 10 e 50 mM Mn não apresentaram dano na resposta *basal slowing*. A enzima SGK-1 atua paralelamente a AKT1/2 porém seu papel se distingue das outras duas cinases. A SGK-1 está envolvida no desenvolvimento pós-embriônico, na resistência ao estresse e na longevidade de maneira mais crítica do que AKT1/2 (HERTWECK et al., 2004; GATSI et al., 2014). Portanto, futuros experimentos devem se dirigir a investigar a viabilidade dos neurônios dopaminérgicos na cepa mutante *sgk-1* para confirmar se realmente permanecem saudáveis após a exposição ao Mn e esclarecer o papel de SGK-1 neste efeito.

Para verificar o perfil de resposta antioxidante nos vermes N2 e mutantes, determinamos por qRT-PCR os níveis relativos da expressão do gene que codifica o fator de transcrição *skn-1* e de seus genes alvo, *gst-4* e *gcs-1*. Como alvo do fator de transcrição DAF-16, a expressão relativa de *sod-3* também foi medida. A expressão do gene *skn-1* se encontra elevada nos vermes deficientes em *akt-2* expostos a 50 mM Mn. Efeito semelhante foi observado após a exposição ao arsenito, aumentando o conteúdo de SKN-1 (INOUE et al., 2005) e além disso, a superexpressão de SKN-1 tem efeito protetor nos vermes expostos ao Mn (BENEDETTO et al., 2010). Por outro lado, os níveis dos genes alvos de SKN-1 não foram alterados significativamente no mutante *akt-2*. A maior resistência observada neste mutante pode ser devida a outro tipo de resposta que não envolva *gcs-1*, *gst-4* e *sod-3*. Mesmo com uma produção aumentada de SKN-1 e na ausência de sinalização por AKT-2, não podemos comprovar que o fator de transcrição tenha de fato maior translocação para o núcleo, pois existem também mecanismos de exportação deste fator de transcrição para fora do núcleo e além disso, a ausência de AKT-2 pode ser compensada por AKT-1 e SGK-1, que atuam paralelamente (PARADIS e RUVKUN, 1998; HERTWECK et al., 2004; GATSI et al., 2014). Para esclarecer se há maior translocação de SKN-1 e DAF-16 para o núcleo nos mutantes *akt-1*, *akt-2* e *sgk-1*,

seria necessário cruzá-los com mutantes que contenham GFP ligada a estes fatores de transcrição, possibilitando a visualização do local e intensidade destas proteínas por microscopia de fluorescência. Os vermes N2 não apresentaram diferença na expressão de *skn-1* em nenhuma das concentrações de Mn testadas, corroborando dados publicados previamente (BORNHORST et al., 2014).

*Gcs-1* codifica uma enzima limitante para a síntese de GSH, tendo sua produção aumentada em condições de estresse oxidativo (AN e BLACKWELL, 2003). Não observamos aumento de sua expressão nos vermes N2 expostos ao Mn. Isso pode ocorrer porque o RNA foi extraído logo após o tratamento com o Mn e esta resposta pode levar mais tempo para ser ativada. Observamos, no entanto, uma queda dos níveis de GSH totais nos vermes N2 expostos a 50 mM Mn, sugerindo presença de estresse oxidativo e consumo de GSH na detoxificação de ROS. Os vermes KO para *akt-1*, por outro lado apresentaram conteúdo mais elevado de *gcs-1* quando expostos à concentração de 50 mM Mn. Neste mutante, o fator SKN-1 pode ter sua atividade aumentada em relação ao selvagem, gerando desta forma um fenótipo de resistência ao estresse oxidativo e isso pode levar à maior resistência deste mutante frente à exposição ao Mn. Mesmo com aumento da expressão de *gcs-1*, não observamos maiores níveis de GSH nos mutantes *akt-1*. Isso pode ser explicado pelo fato de que a extração de RNA e o preparo dos homogeneizados para medir GSH foram feitos imediatamente após o final do tratamento de 1 h com o Mn. A síntese de GSH poderia estar aumentada algum tempo depois da produção da enzima GCS-1.

Os vermes mutantes para *daf-2* possuem maiores níveis de mRNA de *sod-3* comparado aos selvagens, mesmo na ausência de um estímulo estressor, um fenótipo associado com maior resistência ao estresse oxidativo e longevidade (HONDA e HONDA, 1999). Nossos resultados indicam que o mutante com deficiência em AKT-1, que é um alvo de DAF-2, possui fenótipo semelhante e isso poderia explicar sua maior resistência ao Mn. Isto é corroborado pela maior expressão relativa de *sod-3* observada por qRT-PCR comparado aos vermes N2, mesmo na ausência de Mn. Quando comparado aos mutantes *akt-2* e *sgk-1*, os mutantes *akt-1* parecem apresentar maior expressão de enzimas antioxidantes. Isso sugere que AKT-1 atua de maneira mais crítica na sinalização tipo insulina antagonizando SKN-1 e DAF-16. Por outro lado, os mutantes com ganho de função em *akt-1* (alelo *mg144*) apresentaram uma resposta ao Mn semelhante aos vermes N2, tanto na viabilidade quanto no teste comportamental e na avaliação da expressão relativa de genes antioxidantes. Isto sugere que uma maior expressão de

AKT-1 não altera sua ação sobre os fatores de transcrição SKN-1 e DAF-16, podendo haver uma saturação da atividade de AKT-1.

Diversos estudos demonstram ativação de AKT em resposta ao Mn, porém não foi elucidado o papel que esta proteína desempenha no mecanismo de toxicidade induzida pelo metal. Nesse sentido, nosso grupo demonstrou ativação de AKT via fosforilação na Ser473 em resposta à exposição de ratos imaturos ao Mn (CORDOVA et al., 2012; CORDOVA et al., 2013) sem no entanto determinar o papel desse evento na neurotoxicidade do metal. Foi observada também ativação de AKT *in vitro* em células estriatais STHdh expostas ao Mn, sem ficar claro seu papel na toxicidade do metal (WILLIAMS et al., 2010). Além disso, a exposição ao Mn induziu aumento dos níveis de AKT em *C. elegans* (ÁVILA et al., 2012a). A ativação de AKT tem sido classicamente relacionada com neuroproteção, revisado por Brunet et al. (2001). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo utilizando o modelo de *C. elegans* sugerem que AKT poderia participar pelo menos em parte da morte celular induzida por Mn. Esta participação pode não ser diretamente relacionada com a ativação de vias de morte celular, mas pode ocorrer pela antagonização da ação de DAF-16 e SKN-1 e dessa forma contribuir para o estresse oxidativo.

Este estudo demonstra em conjunto que a exposição aguda ao Mn durante um período crítico do desenvolvimento neural (PND 8-12) induz disfunções motoras que persistem até a idade adulta dos ratos. Além disso, dano cognitivo duradouro também foi descrito. Estas disfunções podem estar relacionadas com o estresse oxidativo induzido pelo metal. A expressão de GFAP é persistentemente aumentada no estriado, o que pode ser interpretado como ativação astrocitária. Os níveis de TH no estriado encontram-se inicialmente elevados no PND 14, porém no PND 70 estão reduzidos, o que pode representar perda de neurônios dopaminérgicos. Alterações na fosforilação de TH também foram observadas, indicando a ação de mecanismos compensatórios que modulam os níveis de catecolaminas após exposição ao Mn. Os efeitos sobre TH, bem como as alterações na atividade de catalase, GPx, os níveis reduzidos de NPSH, a elevação dos níveis de GFAP e os danos motores e cognitivos observados no PND 70 são fortes indicativos de que a exposição ao Mn durante o desenvolvimento causa danos persistentes no SNC. Estes efeitos estão presentes mesmo após a exposição ao Mn cessar e os níveis de metais voltarem aos valores basais no hipocampo e no estriado. Além disso, os resultados obtidos no modelo de *C. elegans* confirmam a participação do estresse oxidativo e a ativação de SKN-1 e DAF-16 na toxicidade induzida pelo Mn nos

vermes. Não foi esclarecido, porém, o papel desta via de sinalização na neurodegeneração dopaminérgica induzida pelo Mn. Dessa forma, em conjunto observa-se que o estudo abre importantes pontos de investigação em relação ao papel de AKT nas respostas ao Mn.

## 6. CONCLUSÕES

### **A exposição aguda ao Mn (5, 10 ou 20 mg/kg/dia, i.p.) durante um período crítico do desenvolvimento neural (PND 8-12) induziu:**

- Dano motor persistente.
- Dano persistente na memória de curto prazo dos ratos adultos.
- Ausência de disfunção olfatória.
- Alterações em parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo e no estriado que incluíram redução dos níveis de NPSH, aumento da atividade de catalase e GPx. Dessa forma, pode ser sugerido que as alterações comportamentais observadas estão relacionadas com o estresse oxidativo induzido pelo metal na fase inicial da vida.
- Aumento persistente na expressão de GFAP no estriado no PND 70, o que pode ser interpretado como uma ativação astrocitária em resposta à exposição precoce ao metal.
- Inicialmente um aumento nos níveis de TH no estriado no PND 14, porém no PND 70 estes níveis encontram-se reduzidos, o que pode representar perda de neurônios dopaminérgicos. Alteração na fosforilação da Ser31 de TH também foi observada, indicando a ação de mecanismos compensatórios que modulam os níveis de catecolaminas após a exposição ao Mn.

### **No modelo do nematódeo *C. elegans* expostos ao Mn (2,5 a 100 mM) na fase larval L1:**

- Os vermes *C. elegans* com perda de função em *akt-1*, *akt-2* e *sgk-1* apresentam maior resistência ao Mn em comparação com o grupo selvagem (N2) no teste de viabilidade. Os vermes com perda de função em MAPKs não apresentaram diferença em relação ao grupo N2. Isto sugere um papel deletério da atividade de AKT-1, AKT-2 e SGK-1 na resposta ao Mn.
- Os vermes N2, *akt-1*, *akt-2* e os mutantes com ganho de função em *akt-1* expostos a 50 mM Mn apresentam resposta *basal slowing* prejudicada, indicando dano no sistema dopaminérgico. Este dano foi semelhante entre os vermes N2 e os mutantes.
- A avaliação dos neurônios dopaminérgicos marcados com GFP indicou que apesar da maior sobrevivência no teste de viabilidade, os neurônios dopaminérgicos sofrem degeneração semelhante entre os vermes N2 e mutantes *akt-2* após a exposição ao Mn. Isto sugere que a ação de AKT-2 em resposta ao Mn não se estenda aos neurônios dopaminérgicos.
- Os vermes N2 apresentam queda dos níveis de GSH após a

exposição ao Mn, o que não ocorre nos mutantes para proteínas da via da AKT. Estes mutantes apresentam maior expressão de enzimas antioxidantes, o que pode explicar a maior resistência ao Mn.

Este estudo documenta que a exposição aguda ao Mn durante um período crítico do desenvolvimento neural induz disfunções cognitivas e motoras que duram até a idade adulta em ratos. Estas disfunções foram acompanhadas por alterações no sistema de defesa antioxidante, tanto no hipocampo quanto no estriado e alteração no conteúdo e fosforilação de TH. Todas as alterações bioquímicas e comportamentais foram observadas mesmo após os níveis de Mn retornarem aos valores basais no hipocampo e estriado dos ratos no PND 70. Isso indica que a exposição aguda e precoce (PND 8-12) ao Mn induz alterações neuroquímicas persistentes. Este estudo demonstra a importância das vias de sinalização intracelular para a resposta antioxidante induzida pelo metal e caracteriza AKT como um importante ponto de investigação dentro dos mecanismos de toxicidade induzida pelo Mn.

## 7. REFERÊNCIAS

AEBI, H.; WYSS, S. R.; SCHERZ, B.; SKVARIL, F. Heterogeneity of erythrocyte catalase II. **European Journal of Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 137-145, 1974.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for Manganese. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2012.

AGUIAR JR, A. S.; ARAÚJO, A. L.; DA-CUNHA, T. R.; SPECK, A. E.; IGNÁCIO, Z. M.; DE-MELLO, N.; PREDIGER, R. D. S. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 452-457, 2009.

AITLHADJ, L.; SILVA DE ÁVILA, D.; BENEDETTO, A.; ASCHNER, M.; STÜRZENBAUM, S. R.; AITLHADJ, L.; SILVA DE ÁVILA, D.; BENEDETTO, A.; ASCHNER, M.; STÜRZENBAUM, S. R. Environmental exposure, obesity and Parkinson's disease: lessons from fat and old worms. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 1, p. 20-28, 2011.

ALTUN, Z.F.; HALL, D.H. Nervous system, general description. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.18, 2011

AN, J. H.; BLACKWELL, T. K. SKN-1 links *C. elegans* mesodermal specification to a conserved oxidative stress response. **Genes & Development**, v. 17, n. 15, p. 1882-1893, 2003.

AN, J. H.; VRANAS, K.; LUCKE, M.; INOUE, H.; HISAMOTO, N.; MATSUMOTO, K.; BLACKWELL, T. K. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 45, p. 16275-16280, 2005.

ANDERSON, J. L.; MORRAN, L. T.; PHILLIPS, P. C. Outcrossing and the Maintenance of Males within *C. elegans* Populations. **Journal of Heredity**, v. 101, n. Suppl 1, p. S62-S74, 2010.

ANDERSON, M. E.; MEISTER, A. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 3, p. 707-711, 1983.

ASCHNER, M.; ASCHNER, J. L. Manganese transport across the blood-brain barrier: Relationship to iron homeostasis. **Brain Research Bulletin**, v. 24, n. 6, p. 857-860, 1990.

ASCHNER, J. L.; ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4-5, p. 353-362, 2005.

ASCHNER, M.; ERIKSON, K.; HERNÁNDEZ, E.; TJALKENS, R. Manganese and its Role in Parkinson's Disease: From Transport to Neuropathology. **NeuroMolecular Medicine**, v. 11, n. 4, p. 252-266, 2009.

AU, C.; BENEDETTO, A.; ANDERSON, J.; LABROUSSE, A.; ERIKSON, K.; EWBANK, J. J.; ASCHNER, M. SMF-1, SMF-2 and SMF-3 DMT1 orthologues regulate and are regulated differentially by manganese levels in *C. elegans*. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7792, 2009.

ÁVILA, D. S.; SOMLYAI, G.; SOMLYAI, I.; ASCHNER, M. Anti-aging effects of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a *C. elegans* model. **Toxicology Letters**, v. 211, n. 3, p. 319-24, 2012a.

ÁVILA, D. S.; BENEDETTO, A.; AU, C.; MANARIN, F.; ERIKSON, K.; SOARES, F. A.; ROCHA, J. B. T.; ASCHNER, M. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1903-1910, 2012b.

BADER, A. G.; KANG, S.; ZHAO, L.; VOGT, P. K. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 12, p. 921-9, 2005.

BAE, J.-H.; JANG, B.-C.; SUH, S.-I.; HA, E.; BAIK, H. H.; KIM, S.-S.; LEE, M.-Y.; SHIN, D.-H. Manganese induces inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via activation of both MAP kinase and PI3K/Akt pathways in BV2 microglial cells. **Neuroscience Letters**, v. 398, n. 1-2, p. 151-154, 2006.

BAKTHAVATSALAM, S.; DAS SHARMA, S.; SONAWANE, M.; THIRUMALAI, V.; DATTA, A. A zebrafish model of manganese reveals reversible and treatable symptoms that are independent of neurotoxicity. **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 11, p. 1239-1251, 2014.

BALAŚZ, M.; SZKILNIK, R.; BRUS, R.; MALINOWSKA-BOROWSKA, J.; KASPERCZYK, S.; NOWAK, D.; KOSTRZEWA, R.; NOWAK, P. Perinatal manganese exposure and hydroxyl radical formation in rat brain. **Neurotoxicity Research**, v. 27, n. 1, p. 1-14, 2015.

BARGMANN, C. I. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* Genome. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2028-2033, 1998.

BEAUDIN, S. A.; NISAM, S.; SMITH, D. R. Early life versus lifelong oral manganese exposure differently impairs skilled forelimb performance in adult rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 38, n. 0, p. 36-45, 2013.

BENEDETTO, A.; AU, C.; ÁVILA, D. S.; MILATOVIC, D.; ASCHNER, M. Extracellular dopamine potentiates Mn-induced oxidative stress, lifespan reduction, and dopaminergic neurodegeneration in a BLI-3-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Genetics**, v. 6 (8), n. e1001084, 2010.

BERMAN, K.; MCKAY, J.; AVERY, L.; COBB, M. Isolation and Characterization of pmk-(1-3): Three p38 homologs in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular Cell Biology Research Communications**, v. 4, n. 6, p. 337-344, 2001.

BLECHARZ-KLIN, K.; PIECHAL, A.; JONIEC-MACIEJAK, I.; PYRZANOWSKA, J.; WIDY-TYSZKIEWICZ, E. Effect of intranasal manganese administration on neurotransmission and spatial learning in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 265, n. 1, p. 1-9, 2012.

BOBROVSKAYA, L.; GELAIN, D. P.; GILLIGAN, C.; DICKSON, P. W.; DUNKLEY, P. R. PACAP stimulates the sustained phosphorylation

of tyrosine hydroxylase at serine 40. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 6, p. 1141-1149, 2007a.

BOBROVSKAYA, L.; GILLIGAN, C.; BOLSTER, E. K.; FLAHERTY, J. J.; DICKSON, P. W.; DUNKLEY, P. R. Sustained phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 40: a novel mechanism for maintenance of catecholamine synthesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, n. 2, p. 479-489, 2007b.

BOGGIO BERTINET, D.; TINIVELLA, M.; ALESSANDRO BALZOLA, F.; DE FRANCESCO, A.; DAVINI, O.; RIZZO, L.; MASSARENTI, P.; ANTONIETTA LEONARDI, M.; BALZOLA, F. Brain manganese deposition and blood levels in patients undergoing home parenteral nutrition. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 223-227, 2000.

BORNHORST, J.; CHAKRABORTY, S.; MEYER, S.; LOHREN, H.; GRO; KNIGHT, A. L.; CALDWELL, K. A.; CALDWELL, G. A.; KARST, U.; SCHWERDTLE, T.; BOWMAN, A.; ASCHNER, M. The effects of *pdr1*, *djr1.1* and *pink1* loss in manganese-induced toxicity and the role of  $\alpha$ -synuclein in *C. elegans*. **Metallomics**, v. 6, n. 3, p. 476-490, 2014.

BOUABID, S.; DELAVILLE, C.; DE DEURWAERDÈRE, P.; LAKHDAR-GHAZAL, N.; BENAZZOUZ, A. Manganese-Induced Atypical Parkinsonism Is Associated with Altered Basal Ganglia Activity and Changes in Tissue Levels of Monoamines in the Rat. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e98952, 2014.

BOUCHARD, M.; MERGLER, D.; BALDWIN, M.; PANISSET, M.; BOWLER, R.; ROELS, H. A. Neurobehavioral functioning after cessation of manganese exposure: A follow-up after 14 years. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 50, n. 11, p. 831-840, 2007.

BOWERMAN, B.; EATON, B. A.; PRIESS, J. R. *skn-1*, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. **Cell**, v. 68, n. 6, p. 1061-75, 1992.

BOWLER, R. M.; KOLLER, W.; SCHULZ, P. E. Parkinsonism due to manganism in a welder: Neurological and neuropsychological sequelae. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 3, p. 327-332, 2006.

BRADSHAW, R. A.; DENNIS, E. A. **Transmembrane receptor receptors and their signaling properties. In: Functioning of transmembrane receptors in cell signaling.** Elsevier, 2011. 456 ISBN 978-0-12-382211-6.

BRAZIL, D. P.; YANG, Z. Z.; HEMMINGS, B. A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 5, p. 233-42, 2004.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

BRINKHAUS, S. G.; BORNHORST, J.; CHAKRABORTY, S.; WEHE, C. A.; NIEHAUS, R.; REIFSCHNEIDER, O.; ASCHNER, M.; KARST, U. Elemental bioimaging of manganese uptake in *C. elegans*. **Metalomics**, v. 6, n. 3, p. 617-621, 2014.

BRUNET, A.; DATTA, S. R.; GREENBERG, M. E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 3, p. 297-305, 2001.

BURDO, J. R.; MENZIES, S. L.; SIMPSON, I. A.; GARRICK, L. M.; GARRICK, M. D.; DOLAN, K. G.; HAILE, D. J.; BEARD, J. L.; CONNOR, J. R. 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, 2001.

CAITO, S.; FRETAM, S.; MARTINEZ-FINLEY, E.; CHAKRABORTY, S.; ÁVILA, D.; CHEN, P.; ASCHNER, M. Genome-wide analyses of metal responsive genes in *Caenorhabditis elegans*. **Frontiers in Genetics**, v. 3, p. 52, 2012.

CAITO, S. W.; VALENTINE, W. M.; ASCHNER, M. Dopaminergic neurotoxicity of S-ethyl N,N-dipropylthiocarbamate (EPTC), molinate, and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate (MeDETC) in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Neurochemistry**, v. 127, n. 6, p. 837-851, 2013.

CALABRESI, P.; AMMASSARI-TEULE, M.; GUBELLINI, P.; SANCESARIO, G.; MORELLO, M.; CENTONZE, D.; MARFIA, G. A.; SAULLE, E.; PASSINO, E.; PICCONI, B.; BERNARDI, G. A synaptic mechanism underlying the behavioral abnormalities induced by manganese intoxication. **Neurobiology of Disease**, v. 8, n. 3, p. 419-432, 2001.

CANONNE-HERGAUX, F.; FLEMING, M. D.; LEVY, J. E.; GAUTHIER, S.; RALPH, T.; PICARD, V.; ANDREWS, N. C.; GROS, P. The Nramp2/DMT1 iron transporter is induced in the duodenum of microcytic anemia mk mice but is not properly targeted to the intestinal brush border. **Blood**, v.96, n. 12, p. 3964-3970, 2000.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. [59] Glutathione reductase. In: ALTON, M. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 113, 1985. p.484-490. ISBN 0076-6879.

CARR, W. J.; YEE, L.; GABLE, D.; MARASCO, E. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 90, n. 9, p. 821-8, 1976.

CARVALHO, C. F.; MENEZES-FILHO, J. A.; MATOS, V. P.; BESSA, J. R.; COELHO-SANTOS, J.; VIANA, G. F.; ARGOLLO, N.; ABREU, N. Elevated airborne manganese and low executive function in school-aged children in Brazil. **NeuroToxicology**, 2013.

CASTRO, A. A.; GHISONI, K.; LATINI, A.; QUEVEDO, J.; TASCA, C. I.; PREDIGER, R. D. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 229, n. 1, p. 208-15, 2012.

CERSOSIMO, M. G.; KOLLER, W. C. The diagnosis of manganese-induced parkinsonism. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 3, p. 340-346, 2006.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 37-40, 2001.

CHASE, D.; KOELLE, M. **Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans***. In: WormBook: The online review of *C. elegans* biology [Internet]. Pasadena (CA): WormBook; 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19678/> Acesso em: 20 de novembro de 2014.

CHATTERJEE, N.; SINHA, S. Understanding the mind of a worm: hierarchical network structure underlying nervous system function in *C. elegans*. **Progress in Brain Research**, v. 168, p. 145-53, 2008.

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

CHEN, Z.; GIBSON, T. B.; ROBINSON, F.; SILVESTRO, L.; PEARSON, G.; XU, B.-E.; WRIGHT, A.; VANDERBILT, C.; COBB, M. H. MAP Kinases. **Chemical Reviews (Washington, DC, United States)**, v. 101, n. 8, p. 2449-2476, 2001.

CHUA, A. C. G.; MORGAN, E. H. Manganese metabolism is impaired in the Belgrade laboratory rat. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 167, n. 5, p. 361-369, 1997.

CLAUS HENN, B.; KIM, J.; WESSLING-RESNICK, M.; TELLEZ-ROJO, M.; JAYAWARDENE, I.; ETTINGER, A.; HERNANDEZ-ÁVILA, M.; SCHWARTZ, J.; CHRISTIANI, D.; HU, H.; WRIGHT, R. Associations of iron metabolism genes with blood manganese levels: a population-based study with validation data from animal models. **Environmental Health**, v. 10, n. 1, p. 97, 2011.

COLIN-BARENQUE, L.; SOUZA-GALLARDO, L. M.; FORTOUL, T. I. Toxic effects of inhaled manganese on the olfactory bulb: an ultrastructural approach in mice. **Journal of Electron Microscopy (Tokyo)**, v. 60, n. 1, p. 73-8, 2011.

COLLE, D.; SANTOS, D. B.; MOREIRA, E. L.; HARTWIG, J. M.; DOS SANTOS, A. A.; ZIMMERMANN, L. T.; HORT, M. A.; FARINA, M. Probulcol increases striatal glutathione peroxidase activity and protects against 3-nitropropionic acid-induced pro-oxidative damage in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e67658, 2013.

CORDOVA, F. M.; RODRIGUES, A. L. S.; GIACOMELLI, M. B. O.; OLIVEIRA, C. S.; POSSER, T.; AMP; X; DUNKLEY, P. R.; LEAL, R. B. Lead stimulates ERK1/2 and p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain Research**, v. 998, n. 1, p. 65-72, 2004.

CORDOVA, F. M.; AGUIAR, A. S., JR.; PERES, T. V.; LOPES, M. W.; GONÇALVES, F. M.; REMOR, A. P.; LOPES, S. C.; PILATI, C.; LATINI, A. S.; PREDIGER, R. D. S.; ERIKSON, K. M.; ASCHNER, M.; LEAL, R. B. 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.

CORDOVA, F.; AGUIAR, A., JR.; PERES, T.; LOPES, M.; GONÇALVES, F.; PEDRO, D.; LOPES, S.; PILATI, C.; PREDIGER, R. S.; FARINA, M.; ERIKSON, K.; ASCHNER, M.; LEAL, R. Manganese-exposed developing rats display motor deficits and striatal oxidative stress that are reversed by Trolox. **Archives of Toxicology**, p. 1-14, 2013.

CORY-SLECHTA, D. A.; THIRUCHELVAM, M.; BARLOW, B. K.; RICHFIELD, E. K. Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 9, p. 1263-70, 2005.

COSTA, L. G.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. P. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 87-110, 2004.

COWAN, K. J.; STOREY, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. Pt 7, p. 1107-15, 2003.

CROSSGROVE, J. S.; ALLEN, D. D.; BUKAVECKAS, B. L.; RHINEHEIMER, S. S.; YOKEL, R. A. Manganese distribution across the blood-brain barrier: I. Evidence for carrier-mediated influx of manganese citrate as well as manganese and manganese transferrin. **NeuroToxicology**, v. 24, n. 1, p. 3-13, 2003.

CROSSGROVE, J. S.; YOKEL, R. A. Manganese distribution across the blood-brain barrier: IV. Evidence for brain influx through store-operated calcium channels. **NeuroToxicology**, v. 26, n. 3, p. 297-307, 2005.

DANTZER, R.; BLUTHE, R. M.; KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 91, n. 3, p. 363-8, 1987.

DLUZEN, D. E.; MURAOKA, S.; LANDGRAF, R. Olfactory bulb norepinephrine depletion abolishes vasopressin and oxytocin preservation of social recognition responses in rats. **Neuroscience Letters**, v. 254, n. 3, p. 161-4, 1998.

DOBSON, A. W.; ERIKSON, K. M.; ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, n. 1, p. 115-128, 2004.

DODD, C. A.; WARD, D. L.; KLEIN, B. G. Basal ganglia accumulation and motor assessment following manganese chloride exposure in the C57BL/6 mouse. **International Journal of Toxicology**, v. 24, n. 6, p. 389-397, 2005.

DOTY, R. L. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: Is it viable? **Annals of Neurology**, v. 63, n. 1, p. 7-15, 2008.

DUERR, J. S.; FRISBY, D. L.; GASKIN, J.; DUKE, A.; ASERMELY, K.; HUDDLESTON, D.; EIDEN, L. E.; RAND, J. B. The cat-1 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a vesicular monoamine transporter required for specific monoamine-dependent behaviors. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 72-84, 1999.

DUNKLEY, P. R.; BOBROVSKAYA, L.; GRAHAM, M. E.; VON NAGY-FELSOBOKI, E. I.; DICKSON, P. W. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. **Journal of Neurochemistry**, v. 91, n. 5, p. 1025-1043, 2004.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-7, 1959.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochemical Research**, v. 25, n. 9-10, p. 1439-51, 2000.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.

ERIKSON, K.; SHIHABI, Z.; ASCHNER, J.; ASCHNER, M. 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.; SYVERSEN, T.; STEINNES, E.; ASCHNER, M. Globus pallidus: a target brain region for divalent metal accumulation associated with dietary iron deficiency. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 6, p. 335-341, 2004.

ERIKSON, K. M.; THOMPSON, K.; ASCHNER, J.; ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity: A focus on the neonate. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, n. 2, p. 369-377, 2007.

EXIL, V.; PING, L.; YU, Y.; CHAKRABORTY, S.; CAITO, S. W.; WELLS, K. S.; KARKI, P.; LEE, E.; ASCHNER, M. Activation of MAPK and FoxO by manganese (Mn) in rat neonatal primary astrocyte cultures. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e94753, 2014.

FILIPOV, N. M.; DODD, C. A. Role of glial cells in manganese neurotoxicity. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 5, p. 310-317, 2012.

FITSANAKIS, V.; THOMPSON, K.; DEERY, S.; MILATOVIC, D.; SHIHABI, Z.; ERIKSON, K.; BROWN, R.; ASCHNER, M. A chronic iron-deficient/high-manganese diet in rodents results in increased brain oxidative stress and behavioral deficits in the morris water maze. **Neurotoxicity Research**, v. 15, n. 2, p. 167-178, 2009.

FITSANAKIS, V.; ZHANG, N.; GARCIA, S.; ASCHNER, M. Manganese (Mn) and iron (Fe): Interdependency of transport and regulation. **Neurotoxicity Research**, v. 18, n. 2, p. 124-131, 2010.

FLEMING, M. D.; ROMANO, M. A.; SU, M. A.; GARRICK, L. M.; GARRICK, M. D.; ANDREWS, N. C. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 3, p. 1148-1153, 1998.

FOX, D. A.; OPANASHUK, L.; ZHARKOVSKY, A.; WEISS, B. Gene-chemical interactions in the developing mammalian nervous system: Effects on proliferation, neurogenesis and differentiation. **NeuroToxicology**, v. 31, n. 5, p. 589-597, 2010.

FUJISAWA, H.; OKUNO, S. Regulatory mechanism of tyrosine hydroxylase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 271-276, 2005.

GARCIA, S. J.; GELLEIN, K.; SYVERSEN, T.; ASCHNER, M. Iron deficient and manganese supplemented diets alter metals and transporters in the developing rat brain. **Toxicological Sciences**, v. 95, n. 1, p. 205-214, 2007.

GARRICK, L. M.; DOLAN, K. G.; ROMANO, M. A.; GARRICK, M. D. Non-transferrin-bound iron uptake in Belgrade and normal rat erythroid cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 178, n. 3, p. 349-58, 1999.

GATSI, R.; SCHULZE, B.; RODRIGUEZ-PALERO, M. J.; HERNANDO-RODRIGUEZ, B.; BAUMEISTER, R.; ARTAL-SANZ, M. Prohibitin-Mediated Lifespan and Mitochondrial Stress Implicate SGK-1, Insulin/IGF and mTORC2 in *C. elegans*. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107671, 2014.

GELAIN, D. P.; MOREIRA, J. C. F.; BEVILAQUA, L. R. M.; DICKSON, P. W.; DUNKLEY, P. R. Retinol activates tyrosine hydroxylase acutely by increasing the phosphorylation of serine40 and then serine31 in bovine adrenal chromaffin cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 6, p. 2369-2379, 2007.

GONZALEZ, L. E.; JUKNAT, A. A.; VENOSA, A. J.; VERRENGIA, N.; KOTLER, M. L. Manganese activates the mitochondrial apoptotic pathway in rat astrocytes by modulating the expression of proteins of

the Bcl-2 family. **Neurochemistry International**, v. 53, n. 6–8, p. 408-415, 2008.

GORDON, S. L.; BOBROVSKAYA, L.; DUNKLEY, P. R.; DICKSON, P. W. Differential regulation of human tyrosine hydroxylase isoforms 1 and 2 in situ: Isoform 2 is not phosphorylated at Ser35. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 12, p. 1860-1867, 2009.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. **The Lancet**, v. 368, n. 9553, p. 2167-2178, 2006.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 3, p. 330-338, 2014.

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1024-1030, 2001.

GROENEWEGEN, H. J. The basal ganglia and motor control. **Neural Plasticity**, v. 10, n. 1-2, p. 107-120, 2003.

GUILARTE, T. R.; MCGLOTHAN, J. L.; DEGAONKAR, M.; CHEN, M.-K.; BARKER, P. B.; SYVERSEN, T.; SCHNEIDER, J. S. Evidence for cortical dysfunction and widespread manganese accumulation in the nonhuman primate brain following chronic manganese exposure: A IH-MRS and MRI study. **Toxicological Sciences**, v. 94, n. 2, p. 351-358, 2006.

GUILARTE, T. R.; BURTON, N. C.; MCGLOTHAN, J. L.; VERINA, T.; ZHOU, Y.; ALEXANDER, M.; PHAM, L.; GRISWOLD, M.; WONG, D. F.; SYVERSEN, T.; SCHNEIDER, J. S. Impairment of nigrostriatal dopamine neurotransmission by manganese is mediated by pre-synaptic mechanism(s): implications to manganese-induced parkinsonism. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 5, p. 1236-1247, 2008a.

GUILARTE, T. R.; BURTON, N. C.; VERINA, T.; PRABHU, V. V.; BECKER, K. G.; SYVERSEN, T.; SCHNEIDER, J. S. Increased APLP1 expression and neurodegeneration in the frontal cortex of

manganese-exposed non-human primates. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n. 5, p. 1948-1959, 2008b.

GUILARTE, T. R. Manganese and Parkinson's disease: a critical review and new findings. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 8, p. 1071-80, 2010.

GUILARTE, T. R.; OPLER, M.; PLETNIKOV, M. Is lead exposure in early life an environmental risk factor for Schizophrenia? Neurobiological connections and testable hypotheses. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 3, p. 560-574, 2012.

GUILARTE, T. R. Manganese neurotoxicity: new perspectives from behavioral, neuroimaging, and neuropathological studies in humans and non-human primates. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 5:23, 2013. doi: 10.3389/fnagi.2013.00023

GULSON, B.; MIZON, K.; TAYLOR, A.; KORSCH, M.; STAUBER, J.; DAVIS, J. M.; LOUIE, H.; WU, M.; SWAN, H. Changes in manganese and lead in the environment and young children associated with the introduction of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl in gasoline--preliminary results. **Environmental Research**, v. 100, n. 1, p. 100-14, 2006.

GUNSHIN, H.; MACKENZIE, B.; BERGER, U. V.; GUNSHIN, Y.; ROMERO, M. F.; BORON, W. F.; NUSSBERGER, S.; GOLLAN, J. L.; HEDIGER, M. A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature**, v. 388, n. 6641, p. 482-488, 1997.

GUNTER, T. E.; GAVIN, C. E.; ASCHNER, M.; GUNTER, K. K. Speciation of manganese in cells and mitochondria: A search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 5, p. 765-776, 2006.

GUNTER, T. E.; GERSTNER, B.; GUNTER, K. K.; MALECKI, J.; GELEIN, R.; VALENTINE, W. M.; ASCHNER, M.; YULE, D. I. Manganese transport via the transferrin mechanism. **NeuroToxicology**, v. 34, n. 0, p. 118-127, 2013.

GUNTER, T. E.; GERSTNER, B.; LESTER, T.; WOJTOVICH, A. P.; MALECKI, J.; SWARTS, S. G.; BROOKES, P. S.; GAVIN, C. E.; GUNTER, K. K. An analysis of the effects of Mn<sup>2+</sup> on oxidative phosphorylation in liver, brain, and heart mitochondria using state 3 oxidation rate assays. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 249, n. 1, p. 65-75, 2010.

HAAVIK, J.; SCHELLING, D. L.; CAMPBELL, D. G.; ANDERSSON, K. K.; FLATMARK, T.; COHEN, P. Identification of protein phosphatase 2A as the major tyrosine hydroxylase phosphatase in adrenal medulla and corpus striatum: evidence from the effects of okadaic acid. **FEBS Letters**, v. 251, n. 1-2, p. 36-42, 1989.

HALL, D. H.; LINTS, R.; ALTUN, Z. Nematode neurons: anatomy and anatomical methods in *Caenorhabditis elegans*. **International Review of Neurobiology**, v. 69, p. 1-35, 2006.

HALL, J.; HAAS, K. L.; FREEDMAN, J. H. Role of MTL-1, MTL-2, and CDR-1 in mediating cadmium sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. **Toxicological Sciences**, v. 128, n. 2, p. 418-426, 2012.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.

HARDAWAY, J. A.; HARDIE, S. L.; WHITAKER, S. M.; BAAS, S. R.; ZHANG, B.; BERMINGHAM, D. P.; LICHTENSTEIN, A. J.; BLAKELY, R. D. Forward genetic analysis to identify determinants of dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans* Using Swimming-Induced Paralysis. **G3: Genes|Genomes|Genetics**, v. 2, n. 8, p. 961-975, 2012.

HAYCOCK, J. Multiple signaling pathways in bovine chromaffin cells regulate tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser19, Ser31, and Ser40. **Neurochemical Research**, v. 18, n. 1, p. 15-26, 1993.

HAYCOCK, J. W. Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31, and 40. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 20, p. 11682-11691, 1990.

HELMCKE, K. J.; ÁVILA, D. S.; ASCHNER, M. Utility of *Caenorhabditis elegans* in high throughput neurotoxicological research. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, n. 1, p. 62-7, 2010.

HENRIKSSON, J.; TJALVE, H. Manganese taken up into the CNS via the olfactory pathway in rats affects astrocytes. **Toxicological Sciences**, v. 55, n. 2, p. 392-398, 2000.

HERTWECK, M.; GÖBEL, C.; BAUMEISTER, R. *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. **Developmental Cell**, v. 6, n. 4, p. 577-588, 2004.

HILLS, T.; BROCKIE, P. J.; MARICQ, A. V. Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 5, p. 1217-25, 2004.

HIRATA, Y.; FURUTA, K.; MIYAZAKI, S.; SUZUKI, M.; KIUCHI, K. Anti-apoptotic and pro-apoptotic effect of NEPP11 on manganese-induced apoptosis and JNK pathway activation in PC12 cells. **Brain Research**, v. 1021, n. 2, p. 241-7, 2004.

HOEVEN, R.; MCCALLUM, K. C.; CRUZ, M. R.; GARSIN, D. A. Ce-Duox1/BLI-3 generated reactive oxygen species trigger protective SKN-1 activity via p38 MAPK signaling during infection in *C. elegans*. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 12, p. e1002453, 2011.

HONDA, Y.; HONDA, S. The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 11, p. 1385-1393, 1999.

HUNTER, T. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. **Molecular Cell**, v. 28, n. 5, p. 730-738, 2007.

INOUE, H.; HISAMOTO, N.; AN, J. H.; OLIVEIRA, R. P.; NISHIDA, E.; BLACKWELL, T. K.; MATSUMOTO, K. The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. **Genes & Development**, v. 19, n. 19, p. 2278-2283, 2005.

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

JARRELL, T. A.; WANG, Y.; BLONJARZ, A. E.; BRITTIN, C. A.; XU, M.; THOMSON, J. N.; ALBERTSON, D. G.; HALL, D. H.; EMMONS, S. W. The connectome of a decision-making neural network. **Science**, v. 337, n. 6093, p. 437-44, 2012.

JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**, v. 68, n. 1, p. 167-182, 2003.

JAYANTHI, L. D.; APPARSUNDARAM, S.; MALONE, M. D.; WARD, E.; MILLER, D. M.; EPPLER, M.; BLAKELY, R. D. The *Caenorhabditis elegans* gene T23G5.5 encodes an antidepressant- and cocaine-sensitive dopamine transporter. **Molecular Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 601-609, 1998.

JOSEPHS, K. A.; AHLKOG, J. E.; KLOS, K. J.; KUMAR, N.; FEALEY, R. D.; TRENERRY, M. R.; COWL, C. T. Neurologic manifestations in welders with pallidal MRI T1 hyperintensity. **Neurology**, v. 64, n. 12, p. 2033-2039, 2005.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030-1038, 2001.

KAWASAKI, M.; HISAMOTO, N.; IINO, Y.; YAMAMOTO, M.; NINOMIYA-TSUJI, J.; MATSUMOTO, K. A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons. **EMBO Journal**, v. 18, n. 13, p. 3604-15, 1999.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway.

**Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 89-116, 2007.

KERN, C. H.; SMITH, D. R. Prewaning Mn exposure leads to prolonged astrocyte activation and lasting effects on the dopaminergic system in adult male rats. **Synapse**, v. 65, n. 6, p. 532-544, 2011.

KERN, C. H.; STANWOOD, G. D.; SMITH, D. R. Prewaning manganese exposure causes hyperactivity, disinhibition, and spatial learning and memory deficits associated with altered dopamine receptor and transporter levels. **Synapse**, v. 64, n. 5, p. 363-378, 2010.

KIM, D. H.; FEINBAUM, R.; ALLOING, G.; EMERSON, F. E.; GARSIN, D. A.; INOUE, H.; TANAKA-HINO, M.; HISAMOTO, N.; MATSUMOTO, K.; TAN, M.-W.; AUSUBEL, F. M. A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. **Science**, v. 297, n. 5581, p. 623-626, 2002.

KIM, E. K.; CHOI, E.-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 4, p. 396-405, 2010.

KIM, E.; CHOI, E.-J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. **Archives of Toxicology**, p. 1-16, 2015.

KIM, J.; BUCKETT, P. D.; WESSLING-RESNICK, M. Absorption of Manganese and Iron in a Mouse Model of Hemochromatosis. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. 8e64944, 2013.

KIMURA, K. D.; TISSENBAUM, H. A.; LIU, Y.; RUVKUN, G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 277, n. 5328, p. 942-946, 1997.

KOGA, M.; ZWAAL, R.; GUAN, K. L.; AVERY, L.; OHSHIMA, Y. A *Caenorhabditis elegans* MAP kinase kinase, MEK-1, is involved in stress responses. **EMBO Journal**, v. 19, n. 19, p. 5148-5156, 2000.

KOLB, B.; CIOE, J.; MUIRHEAD, D. Cerebral morphology and functional sparing after prenatal frontal cortex lesions in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 91, n. 1-2, p. 143-55, 1998.

KONDO, M.; YANASE, S.; ISHII, T.; HARTMAN, P. S.; MATSUMOTO, K.; ISHII, N. The p38 signal transduction pathway participates in the oxidative stress-mediated translocation of DAF-16 to *Caenorhabditis elegans* nuclei. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 6-7, p. 642-7, 2005.

KUMER, S. C.; VRANA, K. E. Intricate Regulation of Tyrosine Hydroxylase Activity and Gene Expression. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, n. 2, p. 443-462, 1996.

LI, G. J.; CHOI, B.-S.; WANG, X.; LIU, J.; WAALKES, M. P.; ZHENG, W. Molecular mechanism of distorted iron regulation in the blood-CSF barrier and regional blood-brain barrier following in vivo subchronic manganese exposure. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 5, p. 737-744, 2006.

LI, X.; XIE, J.; LU, L.; ZHANG, L.; ZHANG, L.; ZOU, Y.; WANG, Q.; LUO, X.; LI, S. Kinetics of manganese transport and gene expressions of manganese transport carriers in Caco-2 cell monolayers. **BioMetals**, v. 26, n. 6, p. 941-953, 2013.

LIAO, S. L.; OU, Y. C.; CHEN, S. Y.; CHIANG, A. N.; CHEN, C. J. Induction of cyclooxygenase-2 expression by manganese in cultured astrocytes. **Neurochemistry International**, v. 50, n. 7-8, p. 905-15, 2007.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1-2, p. 137-147, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

MADEJCZYK, M. S.; BALLATORI, N. The iron transporter ferroportin can also function as a manganese exporter. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1818, n. 3, p. 651-657, 2012.

MALECKI, E. A. Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 225-228, 2001.

MALECKI, E. A.; COOK, B. M.; DEVENYI, A. G.; BEARD, J. L.; CONNOR, J. R. Transferrin is required for normal distribution of <sup>59</sup>Fe and <sup>54</sup>Mn in mouse brain. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 170, n. 2, p. 112-118, 1999.

MARTINEZ-FINLEY, E. J.; ASCHNER, M. Revelations from the Nematode *Caenorhabditis elegans* on the complex interplay of metal toxicological mechanisms. **Journal of Toxicology**, v. 2011, p. 895236, 2011.

MARTINEZ-FINLEY, E.; CHAKRABORTY, S.; SLAUGHTER, J.; ASCHNER, M. Early-life exposure to methylmercury in wildtype and *pdr-1/parkin* knockout *C. elegans*. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 8, p. 1543-1552, 2013.

MARTINS, E. N.; PESSANO, N. T.; LEAL, L.; ROOS, D. H.; FOLMER, V.; PUNTEL, G. O.; ROCHA, J. B.; ASCHNER, M.; ÁVILA, D. S.; PUNTEL, R. L. Protective effect of *Melissa officinalis* aqueous extract against Mn-induced oxidative stress in chronically exposed mice. **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 1, p. 74-9, 2012.

MCCUBREY, J. A.; LAHAIR, M. M.; FRANKLIN, R. A. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1775-1789, 2006.

MCDONALD, P. W.; JESSEN, T.; FIELD, J. R.; BLAKELY, R. D. Dopamine signaling architecture in *Caenorhabditis elegans*. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 4-6, p. 593-618, 2006.

MCDUGALL, S. A.; DER-GHAZARIAN, T.; BRITT, C. E.; VARELA, F. A.; CRAWFORD, C. A. Postnatal manganese exposure

alters the expression of D2L and D2S receptor isoforms: Relationship to PKA activity and Akt levels. **Synapse**, v. 65, n. 7, p. 583-591, 2011.

MCDUGALL, S. A.; REICHEL, C. M.; FARLEY, C. M.; FLESHER, M. M.; DER-GHAZARIAN, T.; CORTEZ, A. M.; WACAN, J. J.; MARTINEZ, C. E.; VARELA, F. A.; BUTT, A. E.; CRAWFORD, C. A. Postnatal manganese exposure alters dopamine transporter function in adult rats: Potential impact on nonassociative and associative processes. **Neuroscience**, v. 154, n. 2, p. 848-860, 2008.

MCILWAIN, K. L.; MERRIWEATHER, M. Y.; YUVA-PAYLOR, L. A.; PAYLOR, R. The use of behavioral test batteries: Effects of training history. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 5, p. 705-717, 2001.

MCMAHON, M.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; CHANAS, S. A.; HENDERSON, C. J.; MCLELLAN, L. I.; WOLF, C. R.; CAVIN, C.; HAYES, J. D. The cap 'n' collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related Factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. **Cancer Research**, v. 61, n. 8, p. 3299-3307, 2001.

MIELKE, K.; HERDEGEN, T. JNK and p38 stress kinases — degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 61, n. 1, p. 45-60, 2000.

MILATOVIC, D.; ZAJA-MILATOVIC, S.; GUPTA, R. C.; YU, Y.; ASCHNER, M. Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 240, n. 2, p. 219-225, 2009.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

MIZUNO, T.; HISAMOTO, N.; TERADA, T.; KONDO, T.; ADACHI, M.; NISHIDA, E.; KIM, D. H.; AUSUBEL, F. M.; MATSUMOTO, K. The *Caenorhabditis elegans* MAPK phosphatase VHP-1 mediates a novel JNK-like signaling pathway in stress response. **EMBO Journal**, v. 23, n. 11, p. 2226-34, 2004.

MOLINA, R. M.; PHATTANARUDEE, S.; KIM, J.; THOMPSON, K.; WESSLING-RESNICK, M.; MAHER, T. J.; BRAIN, J. D. Ingestion of Mn and Pb by rats during and after pregnancy alters iron metabolism and behavior in offspring. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 4, p. 413-422, 2011.

MONTOYA, C. P.; CAMPBELL-HOPE, L. J.; PEMBERTON, K. D.; DUNNETT, S. B. The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 36, n. 2-3, p. 219-28, 1991.

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

MORENO, J. A.; STREIFEL, K. M.; SULLIVAN, K. A.; LEGARE, M. E.; TJALKENS, R. B. Developmental exposure to manganese increases adult susceptibility to inflammatory activation of glia and neuronal protein nitration. **Toxicological Sciences**, v. 112, n. 2, p. 405-15, 2009b.

MORENO, J. A.; STREIFEL, K. M.; SULLIVAN, K. A.; HANNEMAN, W. H.; TJALKENS, R. B. Manganese-induced NF- $\kappa$ B activation and nitrosative stress is decreased by estrogen in juvenile mice. **Toxicological Sciences**, v. 122, n. 1, p. 121-133, 2011.

MORRIS, J. Z.; TISSENBAUM, H. A.; RUVKUN, G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 382, n. 6591, p. 536-539, 1996.

MYCHASIUK, R.; HEHAR, H.; MA, I.; KOLB, B.; ESSER, M. J. The development of lasting impairments: A mild pediatric brain injury alters gene expression, dendritic morphology, and synaptic connectivity in the prefrontal cortex of rats. **Neuroscience**, n. 0, 2015.

NAM, J.; KIM, K. abnormal motor function and the expression of striatal dopamine D2 receptors in manganese-treated mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 10, p. 1894-1897, 2008.

NEAL, A. P.; GUILARTE, T. R. Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity. **Toxicology Research**, v. 2, n. 2, p. 99-114, 2013.

OGG, S.; PARADIS, S.; GOTTLIEB, S.; PATTERSON, G. I.; LEE, L.; TISSENBAUM, H. A.; RUVKUN, G. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 994-9, 1997.

OKUYAMA, T.; INOUE, H.; OOKUMA, S.; SATOH, T.; KANO, K.; HONJOH, S.; HISAMOTO, N.; MATSUMOTO, K.; NISHIDA, E. The ERK-MAPK pathway regulates longevity through SKN-1 and insulin-like signaling in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 39, p. 30274-30281, 2010.

ONG, L.; SOMINSKY, L.; DICKSON, P.; HODGSON, D.; DUNKLEY, P. The sustained phase of tyrosine hydroxylase activation in vivo. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 9, p. 1938-1943, 2012.

ONG, L. K.; GUAN, L.; DAMANHURI, H.; GOODCHILD, A. K.; BOBROVSKAYA, L.; DICKSON, P. W.; DUNKLEY, P. R. Neurobiological consequences of acute footshock stress: effects on tyrosine hydroxylase phosphorylation and activation in the rat brain and adrenal medulla. **Journal of Neurochemistry**, v. 128, n. 4, p. 547-560, 2014.

ORDOÑEZ-LIBRADO, J. L.; GUTIERREZ-VALDEZ, A. L.; COLÍN-BARENQUE, L.; ANAYA-MARTÍNEZ, V.; DÍAZ-BECH, P.; ÁVILA-COSTA, M. R. 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, 2008.

OULHOTE, Y.; MERGLER, D.; BARBEAU, B.; BELLINGER, D. C.; BOUFFARD, T.; BRODEUR, M. E.; SAINT-AMOUR, D.; LEGRAND, M.; SAUVE, S.; BOUCHARD, M. F. Neurobehavioral function in school-age children exposed to manganese in drinking water. **Environmental Health Perspectives**, 2014.

PAMPLONA, F. A.; PANDOLFO, P.; SAVOLDI, R.; PREDIGER, R. D. S.; TAKAHASHI, R. N. Environmental enrichment improves cognitive deficits in spontaneously hypertensive rats (SHR): Relevance for attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Progress in**

**Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 1153-1160, 2009.

PAPIN, J. A.; HUNTER, T.; PALSSON, B. O.; SUBRAMANIAM, S. Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 99-111, 2005.

PARADIS, S.; RUVKUN, G. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. **Genes & Development**, v. 12, n. 16, p. 2488-98, 1998.

PERES, T. V.; PEDRO, D. Z.; DE CORDOVA, F. M.; LOPES, M. W.; GONCALVES, F. M.; MENDES-DE-AGUIAR, C. B. N.; WALZ, R.; FARINA, M.; ASCHNER, M.; LEAL, R. B. In vitro manganese exposure disrupts MAPK signaling pathways in striatal and hippocampal slices from immature rats. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

PERIO, A.; TERRANOVA, J. P.; WORMS, P.; BLUTHE, R. M.; DANTZER, R.; BIZIERE, K. Specific modulation of social memory in rats by cholinomimetic and nootropic drugs, by benzodiazepine inverse agonists, but not by psychostimulants. **Psychopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 262-268, 1989.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.

PLOWMAN, G. D.; SUDARSANAM, S.; BINGHAM, J.; WHYTE, D.; HUNTER, T. The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: A model for signal transduction in multicellular organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 24, p. 13603-13610, 1999.

POSSER, T.; FRANCO, J. L.; BOBROVSKAYA, L.; LEAL, R. B.; DICKSON, P. W.; DUNKLEY, P. R. Manganese induces sustained Ser40 phosphorylation and activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, n. 3, p. 848-856, 2009.

PRABHAKARAN, K.; GHOSH, D.; CHAPMAN, G. D.; GUNASEKAR, P. G. Molecular mechanism of manganese exposure-induced dopaminergic toxicity. **Brain Research Bulletin**, v. 76, n. 4, p. 361-367, 2008.

PREDIGER, R. D.; 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. 957-64, 2005a.

PREDIGER, R. D.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R. N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research**, v. 159, n. 2, p. 197-205, 2005b.

QUADRI, M.; FEDERICO, A.; ZHAO, T.; BREEDVELD, GUIDO J.; BATTISTI, C.; DELNOOZ, C.; SEVERIJNEN, L.-A.; DI TORO MAMMARELLA, L.; MIGNARRI, A.; MONTI, L.; SANNA, A.; LU, P.; PUNZO, F.; COSSU, G.; WILLEMSSEN, R.; RASI, F.; OOSTRA, BEN A.; VAN DE WARRENBURG, BART P.; BONIFATI, V. Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease. **The American Journal of Human Genetics**, v. 90, n. 3, p. 467-477, 2012.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 3159-3165, 2007.

RAI, A.; MAURYA, S. K.; KHARE, P.; SRIVASTAVA, A.; BANDYOPADHYAY, S. Characterization of developmental neurotoxicity of As, Cd, and Pb mixture: Synergistic action of metal mixture in glial and neuronal functions. **Toxicological Sciences**, v. 118, n. 2, p. 586-601, 2010.

RAND, J. B.; NONET, M. L. Components Regulating Neurotransmitter Release in all Neurons. In: RIDDLE, D. L.; BLUMENTHAL, T., *et al* (Ed.). **C. elegans II**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1997. P. 611-644. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19991/>. Acesso em: 20 de novembro 2014.

RANKIN, C. H. From gene to identified neuron to behaviour in *Caenorhabditis elegans*. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 8, p. 622-30, 2002.

RECKZIEGEL, P.; CHEN, P.; CAITO, S.; GUBERT, P.; SOARES, F.; FACHINETTO, R.; ASCHNER, M. Extracellular dopamine and alterations on dopamine transporter are related to reserpine toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Archives of Toxicology**, p. 1-13, 2015.

RICE, D.; BARONE, S., JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108 Suppl 3, p. 511-33, 2000.

ROBISON, G.; SULLIVAN, B.; CANNON, J. R.; PUSHKAR, Y. Identification of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta as a target of manganese accumulation. **Metallomics**, 2015.

RODRIGUES, L. S.; TARGA, A.; NOSEDA, A. C. D.; AURICH, M. F.; DA CUNHA, C.; LIMA, M. M. S. Olfactory impairment in the rotenone model of Parkinson's disease is associated with bulbar dopaminergic D2 activity after REM sleep deprivation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, 2014.

ROSEN, G. D.; GALABURDA, A. M. Single cause, polymorphic neuronal migration disorders: an animal model. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 42, n. 10, p. 652-62, 2000.

ROTH, J. A.; HORBINSKI, C.; HIGGINS, D.; LEIN, P.; GARRICK, M. D. Mechanisms of manganese-induced rat pheochromocytoma (PC12) cell death and cell differentiation. **NeuroToxicology**, v. 23, n. 2, p. 147-157, 2002a.

ROTH, J. A.; FENG, L.; DOLAN, K. G.; LIS, A.; GARRICK, M. D. Effect of the iron chelator desferrioxamine on manganese-induced toxicity of rat pheochromocytoma (PC12) cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 68, n. 1, p. 76-83, 2002b.

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, 2003.

ROTH, J. A. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. **Biological Research**, v. 39, p. 45-57, 2006.

ROZAS, G.; LOPEZ-MARTIN, E.; GUERRA, M. J.; LABANDEIRA-GARCIA, J. L. The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 83, n. 2, p. 165-175, 1998.

SAKAGUCHI, A.; MATSUMOTO, K.; HISAMOTO, N. Roles of MAP kinase cascades in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan)**, v. 136, n. 1, p. 7-11, 2004.

SALAZAR, M.; ROJO, A. I.; VELASCO, D.; DE SAGARRA, R. M.; CUADRADO, A. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 21, p. 14841-14851, 2006.

SANTAMARIA, A. B. Manganese exposure, essentiality & toxicity. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 4, p. 484-500, 2008.

SANTOS, D.; BATOREU, C. M.; TAVARES DE ALMEIDA, I.; DAVIS RANDALL, L.; MATEUS, L. M.; ANDRADE, V.; RAMOS, R.; TORRES, E.; ASCHNER, M.; MARREILHA DOS SANTOS, A. P. Evaluation of neurobehavioral and neuroinflammatory end-points in the post-exposure period in rats sub-acute exposed to manganese. **Toxicology**, v. 314, n. 1, p. 95-99, 2013.

SAWIN, E. R.; RANGANATHAN, R.; HORVITZ, H. R. *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. **Neuron**, v. 26, n. 3, p. 619-631, 2000.

SCHMITZ, A.; DE OLIVEIRA, P.; DE SOUZA, L.; DA SILVA, D.; DANIELSKI, S.; SANTOS, D.; DE ALMEIDA, E.; PREDIGER, R.; FISHER, A.; FARINA, M.; DAFRE, A. Interaction of curcumin with manganese may compromise metal and neurotransmitter homeostasis in the hippocampus of young mice. **Biological Trace Element Research**, v. 158, n. 3, p. 399-409, 2014.

SEN, S.; FLYNN, M. R.; DU, G.; TROSTER, A. I.; AN, H.; HUANG, X. Manganese accumulation in the olfactory bulbs and other brain regions of "asymptomatic" welders. **Toxicological Sciences**, v. 121, n. 1, p. 160-7, 2011.

SETTIVARI, R.; VANDUYN, N.; LEVORA, J.; NASS, R. The Nrf2/SKN-1-dependent glutathione S-transferase  $\pi$  homologue GST-1 inhibits dopamine neuron degeneration in a *Caenorhabditis elegans* model of manganism. **NeuroToxicology**, v. 38, n. 0, p. 51-60, 2013.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SON, Y.; CHEONG, Y.-K.; KIM, N.-H.; CHUNG, H.-T.; KANG, D. G.; PAE, H.-O. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways? **Journal of Signal Transduction**, v. 2011, p. 792639, 2011.

SREEDHARAN, S.; STEPHANSSON, O.; SCHIÖTH, H. B.; FREDRIKSSON, R. Long evolutionary conservation and considerable tissue specificity of several atypical solute carrier transporters. **Gene**, v. 478, n. 1-2, p. 11-18, 2011.

SRIRAM, K.; LIN, G. X.; JEFFERSON, A. M.; STONE, S.; AFSHARI, A.; KEANE, M. J.; MCKINNEY, W.; JACKSON, M.; CHEN, B. T.; SCHWEGLER-BERRY, D.; CUMPSTON, A.; CUMPSTON, J. L.; ROBERTS, J. R.; FRAZER, D. G.; ANTONINI, J. M. Modifying welding process parameters can reduce the neurotoxic potential of manganese-containing welding fumes. **Toxicology**, v. 328, n. 0, p. 168-178, 2015.

STEPENS, A.; LOGINA, I.; LIGUTS, V.; ALDIŅŠ, P.; EKŠTEINA, I.; PLATKĀJIS, A.; MĀRTIŅSONE, I.; TĒRAUDS, E.; ROZENTĀLE, B.; DONAGHY, M. A parkinsonian syndrome in methcathinone users and the role of manganese. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 10, p. 1009-1017, 2008.

STEPHENSON, A. P.; SCHNEIDER, J. A.; NELSON, B. C.; ATHA, D. H.; JAIN, A.; SOLIMAN, K. F.; ASCHNER, M.; MAZZIO, E.; RENEE REAMS, R. Manganese-induced oxidative DNA damage in neuronal SH-SY5Y cells: attenuation of thymine base lesions by glutathione and N-acetylcysteine. **Toxicology Letters**, v. 218, n. 3, p. 299-307, 2013.

SULSTON, J.; DEW, M.; BRENNER, S. Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 163, n. 2, p. 215-26, 1975.

SUN, Z.; HUANG, Z.; ZHANG, D.D. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. **PLoS ONE**, 4(8): e6588. doi: 10.1371/journal.pone.0006588, 2009.

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

THOMAS, G. M.; HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 173-183, 2004.

THOMPSON, K.; MOLINA, R. M.; DONAGHEY, T.; SCHWOB, J. E.; BRAIN, J. D.; WESSLING-RESNICK, M. Olfactory uptake of manganese requires DMT1 and is enhanced by anemia. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 1, p. 223-230, 2007.

TULLET, J. M.; HERTWECK, M.; AN, J. H.; BAKER, J.; HWANG, J. Y.; LIU, S.; OLIVEIRA, R. P.; BAUMEISTER, R.; BLACKWELL, T. K. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. **Cell**, v. 132, n. 6, p. 1025-38, 2008.

TUSCHL, K.; CLAYTON, PETER T.; GOSPE JR, SIDNEY M.; GULAB, S.; IBRAHIM, S.; SINGHI, P.; AULAKH, R.; RIBEIRO, REINALDO T.; BARSOTTINI, ORLANDO G.; ZAKI, MAHA S.; DEL ROSARIO, MARIA L.; DYACK, S.; PRICE, V.; RIDEOUT, A.; GORDON, K.; WEVERS, RON A.; "KLING" CHONG, W. K.; MILLS, PHILIPPA B. Syndrome of hepatic cirrhosis, dystonia, polycythemia, and hypermanganesemia caused by mutations in

SLC30A10, a manganese transporter in man. **The American Journal of Human Genetics**, v. 90, n. 3, p. 457-466, 2012.

TUSCHL, K.; MILLS, P. B.; CLAYTON, P. T. Chapter Twelve - Manganese and the brain. In: KAILASH, P. B. e SUSANNE, A. S. (Ed.). **International Review of Neurobiology**: Academic Press, v. Volume 110, 2013. p.277-312. ISBN 0074-7742.

VAN DER HEIDE, L. P.; RAMAKERS, G. M.; SMIDT, M. P. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. **Progress in Neurobiology**, v. 79, n. 4, p. 205-21, 2006.

VARSHNEY, L. R.; CHEN, B. L.; PANIAGUA, E.; HALL, D. H.; CHKLOVSKII, D. B. Structural properties of the *Caenorhabditis elegans* neuronal network. **PLoS Computational Biology**, v. 7, n. 2, p. e1001066, 2011.

VERINA, T.; SCHNEIDER, J. S.; GUILARTE, T. R. Manganese exposure induces alpha-synuclein aggregation in the frontal cortex of non-human primates. **Toxicology Letters**, v. 217, n. 3, p. 177-83, 2013.

VILLANUEVA, A.; LOZANO, J.; MORALES, A.; LIN, X.; DENG, X.; HENGARTNER, M. O.; KOLESNICK, R. N. jkk-1 and mek-1 regulate body movement coordination and response to heavy metals through jnk-1 in *Caenorhabditis elegans*. **EMBO Journal**, v. 20, n. 18, p. 5114-5128, 2001.

WAETZIG, V.; HERDEGEN, T. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. **Neuroscience Letters**, v. 361, n. 1-3, p. 64-67, 2004.

WAETZIG, V.; ZHAO, Y.; HERDEGEN, T. The bright side of JNKs- Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2006.

WANG, S.; TANG, M.; PEI, B.; XIAO, X.; WANG, J.; HANG, H.; WU, L. Cadmium-induced germline apoptosis in *Caenorhabditis elegans*: the roles of HUS1, p53, and MAPK signaling pathways. **Toxicological Sciences**, v. 102, n. 2, p. 345-51, 2008.

WANG, Y.; ZHOU, Y.; GRAVES, D. T. FOXO Transcription factors: their clinical significance and regulation. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 925350, 2014.

WASSERMAN, G. A.; LIU, X.; PARVEZ, F.; AHSAN, H.; LEVY, D.; FACTOR-LITVAK, P.; KLINE, J.; VAN GEEN, A.; SLAVKOVICH, V.; LOIACONO, N. J.; CHENG, Z.; ZHENG, Y.; GRAZIANO, J. H. Water manganese exposure and children's intellectual function in Araihasar, Bangladesh. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 1, p. 124-9, 2006.

WEISS, B. Lead, Manganese, and methylmercury as risk factors for neurobehavioral impairment in advanced age. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2011, 2011.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. In: WILLIAM, B. J. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 77, 1981. p.325-333. ISBN 0076-6879.

WHITE, J. G.; SOUTHGATE, E.; THOMSON, J. N.; BRENNER, S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 314, n. 1165, p. 1-340, 1986.

WILLIAMS, B. B.; LI, D.; WEGRZYNOWICZ, M.; VADODARIA, B. K.; ANDERSON, J. G.; KWAKYE, G. F.; ASCHNER, M.; ERIKSON, K. M.; BOWMAN, A. B. Disease-toxicant screen reveals a neuroprotective interaction between Huntington's disease and manganese exposure. **Journal of Neurochemistry**, v. 112, n. 1, p. 227-237, 2010.

WOLLENHAUPT, S. G. N.; SOARES, A. T.; SALGUEIRO, W. G.; NOREMBERG, S.; REIS, G.; VIANA, C.; GUBERT, P.; SOARES, F. A.; AFFELDT, R. F.; LÜDTKE, D. S.; SANTOS, F. W.; DENARDIN, C. C.; ASCHNER, M.; ÁVILA, D. S. Seleno- and Telluroxylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, n. 0, p. 192-199, 2014.

WormAtlas, ALTUN, Z.F.; HERNDON, L.A.; CROCKER, C.; LINTS, R.; HALL, D.H. (ed.s) 2002-2015. <http://www.wormatlas.org> [Acesso em: 20 de outubro de 2014].

Wormbase: [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org) [Acesso em: 20 de outubro de 2014].

YAMAGUCHI, T.; ONODERA, A.; YASUDA, K.; NISHIO, Y.; ARAI, M.; TSUDA, M.; MIYAZAWA, M.; HARTMAN, P. S.; ISHII, N. A low cost and quick assay system using the freeliving nematode *Caenorhabditis elegans* to determine the effects of Kampo medicines on life span. **Alternatives to Animal Testing and Experimentation**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2008.

YIN, Z.; ASCHNER, J. L.; DOS SANTOS, A. P.; ASCHNER, M. Mitochondrial-dependent manganese neurotoxicity in rat primary astrocyte cultures. **Brain Research**, v. 1203, n. 0, p. 1-11, 2008.

YOKEL, R. Manganese flux across the blood–brain barrier. **NeuroMolecular Medicine**, v. 11, n. 4, p. 297-310, 2009.

YOKEL, R. A.; CROSSGROVE, J. S.; BUKAVECKAS, B. L. Manganese Distribution Across the Blood–Brain Barrier: II. Manganese efflux from the brain does not appear to be carrier mediated. **NeuroToxicology**, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2003.

YOSHII, A.; CONSTANTINE-PATON, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. **Developmental Neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 304-322, 2010.

ZHANG, D.; KANTHASAMY, A.; YANG, Y.; ANANTHARAM, V.; KANTHASAMY, A. Protein kinase C $\delta$  negatively regulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis by enhancing protein Phosphatase-2A activity in dopaminergic neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 20, p. 5349-5362, 2007.

ZHANG, D.; KANTHASAMY, A.; ANANTHARAM, V.; KANTHASAMY, A. 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, 2011.