

**Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências**

**Fabiano Mendes de Cordova**

**MECANISMOS MOLECULARES DA  
NEUROTOXICIDADE DO ZINCO E MANGANÊS SOBRE  
O SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS EM  
DESENVOLVIMENTO**

**Florianópolis  
Março/2012**



**Fabiano Mendes de Cordova**

**MECANISMOS MOLECULARES DA  
NEUROTOXICIDADE DO ZINCO E MANGANÊS SOBRE  
O SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS EM  
DESENVOLVIMENTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Neurociências na Área de Concentração de Neurobiologia Celular e Molecular.

Orientador: Rodrigo Bainy Leal

**Florianópolis  
Março/2012**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

C796m Cordova, Fabiano Mendes de  
Mecanismos moleculares da neurotoxicidade do zinco e  
manganês sobre o sistema nervoso central de ratos em  
desenvolvimento [tese] / Fabiano Mendes de Cordova ;  
orientador, Rodrigo Bainy Leal. - Florianópolis, SC, 2012.  
230 p.: il., tabs.

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

Inclui referências

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

CDU 612.82

**FABIANO MENDES DE CORDOVA**

**“Mecanismos Moleculares da Neurotoxicidade do Zinco e Manganês Sobre o Sistema Nervoso Central de Ratos em Desenvolvimento”**

Esta tese foi julgada e aprovada para 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, 07 de março de 2012.

---

Ana Lúcia Severo Rodrigues  
Coordenadora do Curso

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Rodrigo Bainy Leal  
Doutor em Bioquímica  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Presidente

---

Christianne Gazzana Salbego  
Doutora em Bioquímica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Membro Externo

---

Daniel Pens Gelain  
Doutor em Bioquímica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Membro Externo

---

Ana Lúcia Severo Rodrigues  
Doutora em Bioquímica  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Membro

---

Marcelo Farina  
Doutor em Bioquímica  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Membro

---

Nelson Horácio Gabilan  
Doutor em Bioquímica  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Membro



*Dedico este trabalho à esposa  
Clarissa e aos filhos Pedro  
Henrique e Arthur Bernardo.*



## AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Maurício e Juracy Maria, meus irmãos Caio Maurício e Eduardo e minha cunhada Simone, por estarem sempre presentes me apoiando.

À minha esposa Clarissa, pelo amor, amizade e companheirismo e por todo o apoio e paciência principalmente nos momentos mais difíceis da realização deste trabalho.

Aos meus filhos Pedro Henrique e Arthur Bernardo, por apesar de tão pequenos terem conseguido compreender, por muitas vezes, a necessidade de dividir a atenção.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Bairy Leal, pela amizade e exemplo de dedicação. E, principalmente, por ter me apresentado para a pesquisa, sendo a pessoa mais importante no desenvolvimento da minha vida acadêmica e científica.

Ao grupo do Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, do Departamento de Farmacologia/CCB/UFSC, pela colaboração nos testes comportamentais utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Ao grupo do Profa. Dra. Alexandra Latini, do Departamento de Bioquímica/CCB/UFSC, pela colaboração nos testes da atividade mitocondrial utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Célso Pilati, do Departamento de Medicina Veterinária/CAV/UDESC, pela amizade, pelos ensinamentos desde a época da minha graduação e pelo auxílio na avaliação histopatológica realizada neste trabalho.

Ao grupo do Prof. Dr. Michael Aschner, do *Department of Pediatrics, Vanderbilt University Medical Center*, Nashville, EUA, pela colaboração nas avaliações dos níveis teciduais de metais e F<sub>2</sub>-isoprostranos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação em Neurociências/CCB/UFSC pela oportunidade de aprimorar os meus conhecimentos e pela dedicação nas disciplinas ministradas.

Ao Nivaldo, secretário da Pós-Graduação em Neurociências, pela dedicação no trabalho que realiza.

Aos professores Ana Lúcia Severo Rodrigues, Marcelo Farina, Nelson Horácio Gabilan e Carla Inês Tasca pelos exemplos de personalidade e profissionalismo.

Aos meus grandes companheiros de bancada: Mark Willian, Tanara, Débora, Ana Paula, Felipe, Daniela, Amanda pela amizade boa convivência e pela capacidade de trabalhar em grupo.

À CAPES, pela bolsa que financiou pelo menos parte do período do curso.

À Universidade Federal do Tocantins, por ter me concedido afastamento integral remunerado para a realização do curso de Doutorado.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O zinco (Zn) e o manganês (Mn) são metais essenciais para o desenvolvimento e metabolismo do sistema nervoso central (SNC). O Zn participa da estrutura de enzimas e fatores de transcrição além de exercer atividades modulatórias sobre receptores quando liberado em sinapses excitatórias do córtex cerebral e hipocampo. Entretanto, a liberação excessiva de Zn, que ocorre em condições patológicas como epilepsia ou isquemia, pode causar neurotoxicidade pela ativação de vias de morte celular. O Mn participa, no SNC, da estrutura de enzimas envolvidas no metabolismo antioxidante. Entretanto, em excesso esse metal também pode ser tóxico ao SNC. A exposição ao Mn é comumente relacionada a processos industriais e pela contaminação ambiental. O Mn acumula-se nos núcleos da base podendo induzir morte neuronal dopaminérgica, produzindo distúrbio semelhante à doença de Parkinson. Indivíduos jovens são mais susceptíveis à neurotoxicidade de metais pela maior absorção, menor capacidade de excreção e pela imaturidade da barreira hemato-encefálica. Diversos estudos relacionam a exposição de indivíduos jovens aos metais com doenças neurodegenerativas que podem ocorrer tardiamente na vida adulta. Dessa forma, o presente trabalho objetivou: 1) avaliar as ações *in vitro* do Zn sobre a viabilidade celular e modulação das vias das MAPKs e AKT em fatias hipocámpais de ratos em um período específico do desenvolvimento (14º dia pós-natal, PN14); 2) investigar a neurotoxicidade do Mn sobre ratos imaturos expostos *in vivo*, durante cinco dias (PN8-12) ou 20 dias (PN8-27). Nesse sentido foram avaliadas alterações comportamentais motoras e a modulação de vias de sinalização celular e produção de estresse oxidativo no corpo estriado. Nos ensaios *in vitro* com Zn (100 µM), foram observadas reduções significativas na viabilidade celular, e aumento na fosforilação de ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup> e AKT nas fatias hipocámpais. Adicionalmente, foi observado que a inibição de p38<sup>MAPK</sup> agrava o prejuízo sobre a viabilidade ocasionado pelo Zn. Nos estudos dos efeitos do Mn, observou-se que animais expostos por cinco dias (PN8-12 e avaliados no PN14), apresentaram aumento da fosforilação de DARPP-32-Thr-34 (MnCl<sub>2</sub> 5 e 10 mg/kg), ERK1/2 e AKT (MnCl<sub>2</sub> 20 mg/kg) no corpo estriado. Nos animais expostos por 20 dias (PN8-27 e avaliados no PN29) foi observado redução da fosforilação de DARPP-32-Thr-34 e aumento da

fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> e AKT na dose de 20 mg/kg. Além disso, em ambos os regimes de exposição foi observado aumento da atividade de caspases, da produção de EROs e de isoprostanos (F<sub>2</sub>-IsoPs), bem como alterações na atividade de complexos mitocondriais e dano comportamental motor avaliado no rotarod, nos animais tratados com 20 mg/kg. Notavelmente, o antioxidante Trolox<sup>TM</sup> (1 mg/kg) reduziu a fosforilação de ERK1/2 nos animais PN14 e de p38<sup>MAPK</sup> nos animais PN29. Além disso, Trolox<sup>TM</sup> reduziu a atividade de caspases e a produção de F<sub>2</sub>-IsoPs. Nesse aspecto, o mecanismo de neurotoxicidade do Mn sobre o corpo estriado em desenvolvimento parece envolver alteração da sinalização celular e indução de estresse oxidativo. Em conjunto, os dados indicam que a exposição do SNC imaturo ao Zn e Mn induz importantes alterações neuroquímicas e metabólicas, que podem alterar o curso do desenvolvimento neural e predispor a distúrbios neurodegenerativos no indivíduo adulto.

Palavras-chave: zinco, manganês, MAPKs, DARPP-32, desenvolvimento, hipocampo, estriado.

## ABSTRACT

### **Molecular Mechanisms of Zinc and Manganese Neurotoxicity on Developing CNS of Rats**

Zinc (Zn) and manganese (Mn) are essential metals for the central nervous system (CNS) development and metabolism. Zn participates in the protein structure of enzymes and transcription factors. Moreover, Zn can modulate a diversity of receptors when released in the excitatory synapses of cerebral cortex and hippocampus. However, it can be neurotoxic under pathological conditions like epilepsy and ischemia via activation of cell death pathways. Mn is a constituent of glutamine synthetase and enzymes involved in the antioxidant metabolism. Conversely, in excess Mn is neurotoxic. Mn exposure is commonly related to industrial processes and environmental contamination. Mn accumulates in the basal ganglia and may induce dopaminergic neuronal death, producing a Parkinson like disease. Immature individuals are more susceptible to metal neurotoxicity, since the blood-brain barrier is more permeable and they absorb more metal and display a poor ability for excretion. Additionally, some studies have linked early exposure to metals by young individuals with neurodegenerative diseases occurrence later in adulthood. The present study was designed aiming: 1) to investigate the *in vitro* effects of Zn on cell viability and modulation of MAPKs and AKT in hippocampal slices obtained from rats, in the specific developmental period corresponding the 14<sup>th</sup> postnatal day (PN14); 2) to study the molecular mechanisms of Mn neurotoxicity in developing rats exposed to Mn *in vivo* for five days (PN8-12) or 20 days (PN8-27). In these models, Mn-dependent changes in the motor behavior, signaling pathways and oxidative stress parameters in the striatum were evaluated. The role of oxidative stress in the process was investigated by administration of the antioxidant Trolox<sup>TM</sup>. The results showed that Zn (100  $\mu$ M) reduced cell viability and increased ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup> and AKT phosphorylation. Moreover, it was observed that inhibition of p38<sup>MAPK</sup> aggravated the hippocampal cell injury. In the Mn studies, the animals exposed to Mn for five days (PN8-12 and evaluated at PN14) exhibited an increase of DARPP-32-Thr-34 (MnCl<sub>2</sub> 5 and 10 mg/kg), ERK1/2 and AKT phosphorylation (MnCl<sub>2</sub> 20 mg/kg). Animals exposed for 20 days (PN8-27 and evaluated at PN29; 20 mg/kg), showed a decrease on

DARPP-32-Thr-34 phosphorylation and an increase on p38<sup>MAPK</sup> and AKT phosphorylation. Notably, in both developmental exposure models was observed: 1) increment of caspase activity; 2) improved production of ROS and F<sub>2</sub>-IsoPs; 3) changes in the activity of mitochondrial respiratory complexes; 4) deficits in the motor behavior. Trolox<sup>TM</sup> (1 mg/kg), an antioxidant, reverses some parameters altered by Mn including ERK1/2 activation at PN14 and p38<sup>MAPK</sup> activation at PN29 animals. Moreover, Trolox<sup>TM</sup> mitigates the Mn-dependent activation of caspases and the production of F<sub>2</sub>-IsoPs. Therefore, the mechanism of Mn neurotoxicity on the developing striatum involves oxidative stress and changes in fundamental cell signaling pathways. In conclusion, it is possible to postulate that early neurodevelopmental exposure to Zn or Mn may induce important neurochemical and metabolic changes, which may provide modifications in the physiological neuroplasticity and might have implications later in life causing neurological deficits or neurodegenerative disorders.

Keywords: zinc, manganese, MAPKs, DARPP-32, development, hippocampus, striatum.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO:

<b>Figura 1.</b> Mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do zinco. .32	32
<b>Figura 2.</b> Possíveis mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do manganês.....39	39
<b>Figura 3.</b> Principais vias de sinalização celular no SNC. ....40	40
<b>Figura 4.</b> Vias de sinalização das MAPKs. ....41	41
<b>Figura 5.</b> Via de sinalização da PI3K/AKT.....42	42
<b>Figura 6.</b> Regulação de DARPP-32 por fosforilação e suas ações.....44	44
<b>Figura 7.</b> Delineamento do protocolo de exposição <i>in vivo</i> ao manganês.....53	53
<b>Figura 8.</b> Delineamento do tratamento <i>in vivo</i> com manganês e Trolox® .....54	54
<b>Figura 9.</b> Delineamento dos períodos de tratamento e testes comportamentais. ....59	59
<b>Figura 10.</b> Mecanismos de neurotoxicidade <i>in vivo</i> do Mn no corpo estriado de ratos em desenvolvimento expostos por cinco dias. ....195	195
<b>Figura 11.</b> Mecanismos de neurotoxicidade <i>in vivo</i> do Mn no corpo estriado de ratos em desenvolvimento expostos por 20 dias. ....196	196

### ARTIGO CIENTÍFICO 1:

<b>Figure 1.</b> Effect of Zn <sup>2+</sup> exposure on immature rat hippocampal slice viability.....87	87
<b>Figure 2.</b> Modulation of ERK1/2 phosphorylation in response to Zn <sup>2+</sup> treatment of immature rat hippocampal slices after 2 hours... ..88	88
<b>Figure 3.</b> Modulation of p38 <sup>MAPK</sup> phosphorylation in response to Zn <sup>2+</sup> treatment of immature rat hippocampal slices after 2 hours....89	89
<b>Figure 4.</b> Modulation of JNK1/2 phosphorylation in response to Zn <sup>2+</sup> treatment of immature rat hippocampal slices after 2 hours... ..90	90
<b>Figure 5.</b> Modulation of AKT phosphorylation in response to Zn <sup>2+</sup> treatment of immature rat hippocampal slices after 2 hours.....91	91

<b>Figure 6.</b> Effects of Zn <sup>2+</sup> exposure and the p38 <sup>MAPK</sup> inhibitor SB203580 on immature rat hippocampal slice viability.....	92
<b>Figure 7.</b> Modulation of p38 <sup>MAPK</sup> , ERK1/2 and AKT phosphorylation by Zn <sup>2+</sup> and the specific inhibitors SB203580, U0126 and LY294002 on immature rat hippocampal slices.....	93
<b>Figure 8.</b> Schematic view of Zn <sup>2+</sup> effects on cell signaling in immature hippocampal slices.....	94

## ARTIGO CIENTÍFICO 2:

<b>Figure 1.</b> Effects of short-term Mn exposure on metal accumulation in the hippocampus, striatum and cerebral cortex of immature rats. ....	131
<b>Figure 2.</b> Histological evaluation of the brain of immature rats exposed to Mn <i>in vivo</i> .....	132
<b>Figure 3.</b> Effects of <i>in vivo</i> exposure to Mn for five days on the phosphorylation of MAPKs, AKT, CREB and DARPP-32 in the striatum of immature rats.....	133
<b>Figure 4.</b> Mn induces oxidative stress in the striatum.. ....	134
<b>Figure 5.</b> Mn induces F <sub>2</sub> -IsoPs production. Striatum from immature rats (PN14) exposed <i>in vivo</i> to Mn (PN8-12) were evaluated for F <sub>2</sub> -IsoPs levels expressed as ng/g tissue. ....	135
<b>Figure 6.</b> Effects of Mn on striatal activity of mitochondrial respiratory chain complexes in immature rats.. ....	136
<b>Figure 7.</b> Mn treatment stimulates caspase activity in the striatum of immature rats.....	137
<b>Figure 8.</b> Mn exposure on PN8-12 causes later life onset motor deficits in rats.....	138
<b>Figure 9.</b> Trolox <sup>TM</sup> blocked the Mn-induced striatal oxidative stress.....	139
<b>Figure 10.</b> Effects of Trolox <sup>TM</sup> on the phosphorylation of ERK1/2 and AKT in the striatum of immature rats exposed to Mn.. ....	140
<b>Figure 11.</b> Effects of Trolox <sup>TM</sup> on the motor coordination in immature rats exposed to Mn.. ....	141
<b>Figure 12.</b> Motor behavioral effects in rats exposed to manganese and Trolox <sup>TM</sup> .....	142

### ARTIGO CIENTÍFICO 3

<b>Figure 1.</b> Effects of Mn exposure on metal accumulation in the hippocampus, striatum and cerebral cortex of immature rats.....	171
<b>Figure 2.</b> Effects of <i>in vivo</i> exposure to Mn for twenty days on the phosphorylation of MAPK, AKT, CREB and DARPP-32 in the striatum of immature rats. ....	172
<b>Figure 3.</b> Caspases activity analysis measured by DEVD cleavage test in the striatum from young rats exposed <i>in vivo</i> to Mn for twenty days.....	173
<b>Figure 4.</b> Oxidative stress parameters analyzed by F <sub>2</sub> -IsoPs production test in the striatum from young rats exposed <i>in vivo</i> to Mn for twenty days.. ....	174
<b>Figure 5.</b> Mn exposure on PN8-27 causes later life onset motor deficits in rats.. ....	175
<b>Figure 6.</b> Effects of Trolox <sup>TM</sup> in <i>in vivo</i> exposure to Mn for twenty days on the phosphorylation of p38 <sup>MAPK</sup> and AKT in the striatum of immature rats.....	176
<b>Figure 7.</b> Effects of Trolox <sup>TM</sup> on caspases activity measured by DEVD cleavage test in the striatum from young rats exposed <i>in vivo</i> to Mn for twenty days.. ....	178
<b>Figure 8.</b> Oxidative stress parameters analyzed by F <sub>2</sub> -IsoPs production test in the striatum from young rats exposed <i>in vivo</i> to Mn and Trolox <sup>TM</sup> for twenty days.. ....	179
<b>Figure 9.</b> Effects of Trolox <sup>TM</sup> on the motor coordination in immature rats exposed to Mn.. ....	180
<b>Figure 10.</b> The animals were tested in the circular open field to evaluate possible involvement of oxidative stress on motor changes induced by Mn.....	181



## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO CIENTÍFICO 2:

- Table 1.** Immature rats' weight gain exposed to Mn *in vivo*....143  
**Table 2.** Protective effect of antioxidant Trolox<sup>TM</sup> on body weight gain in immature rats exposed to Mn *in vivo*. ..... 143

### ARTIGO CIENTÍFICO 3:

- Table 1.** Immature rats weight gain exposed to Mn *in vivo*. .....182  
**Table 2.** Effects of Mn and/or antioxidant Trolox<sup>TM</sup> on body weight gain in immature rats exposed to Mn *in vivo*..... 182



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### Abreviatura/Sigla Significado

<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
<b>AMPc</b>	adenosina monofosfato cíclico
<b>ANOVA</b>	análise de variância
<b>ATF2</b>	fator ativador de transcrição 2
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>BAD</b>	promotor de morte associado à Bcl2
<b>Bax</b>	proteína X associada à Bcl2
<b>Bcl2</b>	proteínas de células B linfoma-2
<b>BDNF</b>	fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>BSA</b>	soroalbumina bovina
<b>CaMKs</b>	proteínas cinases dependentes de cálcio e calmodulina
<b>Cdk5</b>	cinase 5 dependente de ciclina
<b>CHAPS</b>	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato hidrato
<b>COX-2</b>	ciclooxigenase 2
<b>CREB</b>	proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc
<b>DARPP-32</b>	fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de 32 kDa
<b>DAT</b>	transportador de dopamina
<b>DCFH2-DA</b>	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
<b>DL<sub>50</sub></b>	dose letal mediana
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido
<b>DMT-1</b>	transportador de metal divalente 1
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>E.P.M.</b>	erro padrão da média
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiaminotetracético
<b>EGTA</b>	ácido etilenoglicol tetracético
<b>ELISA</b>	teste imunoabsorbente ligado à enzima
<b>Elk-1</b>	fator de transcrição tipo E 1
<b>ERK</b>	proteína cinase ativada por sinal extracelular
<b>EROs</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>F<sub>2</sub>-IsoPs</b>	F <sub>2</sub> -isoprostranos

<b>Fe</b>	ferro
<b>GABA</b>	ácido gama aminobutírico
<b>GLAST</b>	transportador de glutamato/aspartato
<b>GSH</b>	glutathiona
<b>HEPES</b>	ácido N-(2-hidroxiethyl) piperazina-N'-(2-etanosulfônico
<b>iNOS</b>	óxido nítrico sintase induzível
<b>JNK</b>	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal cinase
<b>MAPK</b>	proteína cinase ativada por mitógeno
<b>MAPKAPK1/2</b>	proteínas cinases 1 e 2 ativadas por MAPK
<b>MEK1/2</b>	cinase da proteína cinase ativada por mitógeno 1/2
<b>MMT</b>	manganês tricarbonil metilciclopentadienil
<b>Mn</b>	manganês
<b>MOPS</b>	ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfônico
<b>MSK1</b>	proteína cinase ativada por mitógeno e estresse 1
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>NADH</b>	nicotinamida dinucleotídeo
<b>NMDA</b>	n-metil-d-aspartato
<b>p38<sup>MAPK</sup></b>	proteína cinase ativada por mitógeno de 38 kDa
<b>PI3K/AKT</b>	fosfoinositídeo 3 cinase/AKT
<b>PKA</b>	proteína cinase A
<b>PKB/AKT</b>	proteína cinase B/AKT
<b>PKC</b>	proteína cinase C
<b>PKG</b>	proteína cinase G
<b>PN</b>	pós-natal
<b>PP1</b>	proteína fosfatase 1
<b>PP2B</b>	proteína fosfatase 2B
<b>PRAK</b>	cinase ativada/regulada por p38
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b>SAPKs</b>	proteínas cinases ativadas por estresse
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
<b>SNC</b>	sistema nervoso central
<b>TBS</b>	tampão tris salino
<b>Tf</b>	transferrina

<b>TfR</b>	receptor de transferrina
<b>Tris</b>	tris (hidroximetil)aminometano
<b>Trolox</b>	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
<b>ZIP</b>	importador de zinco
<b>Zn</b>	zinco
<b>ZnR</b>	receptor metabotrópico sensível ao zinco
<b>ZnT</b>	transportador de zinco



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
1.1 METAIS: ESSENCIALIDADE E TOXICIDADE.....	25
<b>1.1.1 Zinco .....</b>	<b>28</b>
1.1.1.1 Aspectos Biológicos.....	28
1.1.1.2 Toxicidade.....	30
<b>1.1.2 Manganês.....</b>	<b>32</b>
1.1.2.1 Aspectos Biológicos.....	32
1.1.2.2 Toxicidade.....	35
1.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR .....	39
<b>1.2.1 As Vias das MAPKs e PI3K/AKT .....</b>	<b>40</b>
<b>1.2.2 A Sinalização de DARPP-32 .....</b>	<b>43</b>
1.3 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO E TOXICIDADE .....	45
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
<b>2.2.1 Neurotoxicidade do Zinco sobre o hipocampo em um protocolo de exposição <i>in vitro</i> (artigo 1).....</b>	<b>47</b>
<b>2.2.2 Neurotoxicidade do Manganês sobre o corpo estriado e parâmetros comportamentais em protocolos de exposição <i>in vivo</i> durante o período pós-natal 8-12 (PN8-12) (artigo 2) e PN8-27 (artigo 3).....</b>	<b>47</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
3.1 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> COM ZINCO .....	49
<b>3.1.1 Reagentes.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.2 Animais.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.3 Preparação de Fatias Hipocampais e Tratamentos <i>in vitro</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.4 Teste de Viabilidade Celular.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1.5 Western Blot.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1.6 Análise Estatística.....</b>	<b>51</b>

3.2 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> COM MANGANÊS.....	51
3.2.1 Reagentes .....	51
3.2.2 Animais .....	52
3.2.3 Tratamentos <i>in vivo</i> com Manganês .....	52
3.2.4 Dosagem de Metais no Encéfalo .....	54
3.2.5 Western Blot.....	54
3.2.6 Histopatologia.....	55
3.2.7 Atividade de Complexos da Cadeia Respiratória.....	56
3.2.8 Determinação de EROs e F <sub>2</sub> -IsoPs .....	56
3.2.9 Atividade de Caspase.....	57
3.2.10 Avaliação do Desempenho de Coordenação Motora .....	58
3.2.10.1 Teste do Rotarod.....	59
3.2.10.2 Teste do Campo Aberto .....	60
3.2.11 Análise Estatística .....	60
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
4.1 ARTIGO 1.....	63
4.2 ARTIGO 2.....	95
4.3 ARTIGO 3.....	145
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>183</b>
5.1 NEUROTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DO ZINCO .....	183
5.2 NEUROTOXICIDADE <i>IN VIVO</i> DO MANGANÊS .....	186
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>197</b>
6.1 NEUROTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DO ZINCO .....	197
6.2 NEUROTOXICIDADE <i>IN VIVO</i> DO MANGANÊS .....	197
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>201</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 METAIS: ESSENCIALIDADE E TOXICIDADE

Elementos metálicos são encontrados em todos os seres vivos e desempenham uma grande variedade de funções. Os metais podem ser elementos estruturais, estabilizadores de estruturas biológicas, componentes de mecanismos de controle (em nervos e músculos) e em particular, são ativadores ou componentes de sistemas de oxidação e redução (redox) (NORDBERG et al., 2007). Diversos metais, como zinco, ferro, magnésio, manganês, cobre, molibdênio, cromo e cobalto são essenciais para humanos e animais, integrando a estrutura de diversas enzimas e sendo requeridos para sua atividade (TAKEDA, 2000; TAKEDA, 2003; SANTAMARIA, 2008; SENSI et al., 2009; SINICROPI et al., 2010). Os efeitos biológicos dos metais estão ligados às suas propriedades químicas, e os metais de transição como o cobre, o ferro e o manganês são particularmente envolvidos na catálise de reações redox nos sistemas biológicos (WRIGHT; BACCARELLI, 2007). Por outro lado, metais pesados como o chumbo, o mercúrio e o cádmio não possuem função biológica conhecida, podendo induzir toxicidade (JADHAV et al., 2007; WRIGHT; BACCARELLI, 2007). Os critérios para determinação de essencialidade biológica dos metais são baseados na sua exclusão da dieta, com conseqüente produção de anormalidades funcionais ou estruturais relacionadas a alterações bioquímicas específicas que podem ser revertidas pela sua administração (NORDBERG et al., 2007; BRADHAM; WENTSEL, 2010). Além disso, uma característica associada com metais essenciais é que o organismo dispõe de mecanismos homeostáticos que aumentam ou diminuem sua absorção e excreção, de forma a manter os níveis necessários no organismo (BRADHAM; WENTSEL, 2010). As quantidades adequadas são particularmente importantes durante a gravidez, para lactentes e para as crianças durante os períodos de crescimento rápido (TAROHDA; YAMAMOTO; AMANO, 2004; WRIGHT; BACCARELLI, 2007; SANTAMARIA, 2008; WASSERMAN et al., 2008).

A classificação dos metais geralmente aceita é baseada em seu papel no organismo vivo. Assim, “os metais essenciais” são aqueles indispensáveis para vários processos biológicos, atuando como cofatores enzimáticos ou como grupos funcionais de proteínas e

requeridos em pequenas quantidades (BOWEN, 1976; SANTAMARIA; SULSKI, 2010). Em contraste, “metais não essenciais”, sem funções fisiológicas conhecidas, são considerados tóxicos (DUFFUS 2002). No entanto, essa classificação não é absolutamente correta, uma vez que ambas as classes de metais potencialmente podem perturbar funções biológicas normais, sendo a sua toxicidade dependente da concentração (NORDBERG et al., 2007). Na verdade, a falta de metais essenciais pode afetar o funcionamento adequado de muitos tecidos e órgãos (SANTAMARIA, 2008; SANTAMARIA; SULSKI, 2010; BRADHAM; WENTSEL, 2010), enquanto um excesso pode fornecer toxicidade através de mecanismos semelhantes aos atribuídos a elementos não essenciais (YAMADA et al., 1986; HAFEMAN et al., 2007; WRIGHT; BACCARELLI, 2007; SINICROPI et al., 2010).

Metais e semimetals (metalóides) associados com contaminação e toxicidade são freqüentemente definidos como “metais pesados”. Esta designação refere-se a um grupo extremamente heterogêneo de elementos que muitas vezes não têm semelhanças em suas características químicas e toxicológicas. Assim, o termo “metais pesados”, tem sido questionado por muitos anos e os esforços para substituí-lo por uma terminologia química falharam até o momento (DUFFUS, 2002; NORDBERG et al., 2007). Em geral, a literatura científica considera como metais pesados, os seguintes elementos: alumínio, ferro, prata, bário, berílio, cádmio, cobalto, manganês, mercúrio, molibdênio, níquel, chumbo, cobre, estanho, titânio, tálio, vanádio, zinco e alguns metalóides, como bismuto, arsênico e selênio, com propriedades semelhantes aos metais pesados (SINICROPI et al., 2010). A maioria dos metais pesados é caracterizada por possuir: densidade superior a  $5,0 \text{ g/cm}^3$ ; número atômico acima de 20; baixa solubilidade em água de seus hidratos; alta tendência para formar compostos complexos (JARUP, 2003). Vários metais tóxicos possuem alta afinidade por grupos tiólicos, amínicos, fosfato e carboxílicos de compostos orgânicos, mostrando uma alta tendência para combinar com sítios reativos das moléculas biológicas, incluindo proteínas e ácidos nucleicos (SINICROPI et al., 2010).

A exposição a metais potencialmente tóxicos representa um problema generalizado na maioria dos países industrializados. Embora os metais ocorram naturalmente no ecossistema, fontes antropogênicas (poluição) contribuem para seu aumento no

ecossistema (JARUP, 2003; GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2006; HAFEMAN et al., 2007; JONES; MILLER, 2008; MENEZES-FILHO et al., 2009; GRASS et al., 2010; NAITO et al., 2010). No século passado, a sua mobilização, devido ao progresso tecnológico ligado às atividades humanas (agricultura, indústria, processos de combustão) e sua introdução conseqüente ao ambiente como resíduos poluentes têm promovido seu acúmulo crescente na biosfera e sua introdução na cadeia alimentar, com conseqüentes riscos para a saúde dos seres humanos, animais e plantas (NAITO et al., 2010; SINICROPI et al., 2010). Dessa forma, os metais podem ser encontrados em alimentos, água, ar e em grandes quantidades podem alterar as funções biológicas, causando danos aos humanos e animais (JARUP, 2003). A toxicidade de metais geralmente interfere com processos fisiológicos de vários órgãos e tecidos, incluindo o sistema nervoso central (SNC), sistema hematopoiético, fígado e rim. Seres humanos e animais podem ser expostos a múltiplos metais através de diversas vias, provenientes de diferentes fontes ambientais e ocupacionais, sendo que a exposição excessiva aos metais pode ser uma fonte comum de neurotoxicidade em várias populações ao redor do mundo (PERL; OLANOW, 2007; WRIGHT; BACCARELLI, 2007; HAFEMAN et al., 2007; COSTELLO et al., 2009; LUCCHINI; ZIMMERMAN, 2009; GRASS et al., 2010). Embora se conheça diversos efeitos adversos dos metais à saúde, a exposição continua e até mesmo aumenta em algumas regiões do mundo, particularmente nos países menos desenvolvidos e em crianças (JARUP, 2003; LUCCHINI; ZIMMERMAN, 2009; MORENO et al., 2009a,b; GRASS et al., 2010).

Em geral, crianças e idosos são mais suscetíveis que os adultos aos efeitos deletérios dos metais (MOCCHEGIANI et al., 2005; GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2006; HAFEMAN et al., 2007; SANTAMARIA et al., 2007; MORENO et al., 2009b; SANTAMARIA; SULSKI, 2010). Crianças correm maior risco de exposição a metais através dos alimentos, uma vez que precisam de mais calorias por quilo de peso corporal e possuem uma maior absorção gastrointestinal de metais quando comparados aos adultos (HEATH et al., 2003). Para alguns metais, a exposição a uma quantidade excessiva é bem tolerada, uma vez que a absorção é limitada ao montante exigido pelo indivíduo, enquanto outros possuem uma forte tendência a se acumular (como o mercúrio) (SINICROPI et al., 2010).

### 1.1.1 Zinco

#### 1.1.1.1 Aspectos Biológicos

Na tabela periódica dos elementos, o zinco (Zn) pode ser encontrado no grupo IIb, juntamente com os metais tóxicos cádmio e mercúrio. No entanto, é considerado relativamente não tóxico para os seres humanos (FOSMIRE, 1990). O Zn é um elemento essencial para todos os organismos. É um componente de mais de 300 enzimas e mais de 2.000 fatores de transcrição, que regulam a expressão de genes e requerem Zn para manter a sua integridade estrutural e capacidade de ligação ao DNA (BROWN et al., 2002; PLUM; RINK; HAASE, 2010). O Zn é requerido para o metabolismo dos ácidos nucleicos e proteínas, para o crescimento, divisão e funções celulares (VALLEE; FALCHUK, 1993).

Nas células, 30-40% do Zn está localizado no núcleo, 50% no citosol e o restante associado com membranas (VALLEE; FALCHUK, 1993). O Zn celular está sob um eficiente controle homeostático, que evita seu acúmulo excessivo (SENSI et al., 2009; PLUM; RINK; HAASE, 2010). Grandes aumentos do Zn livre intracelular são tóxicos para muitas células, principalmente neurônios (MANEV et al., 1997; SENSI; JENG, 2004). A homeostase do Zn é mediada principalmente por duas famílias de proteínas, os importadores de Zn (ZIP) contendo 14 proteínas que transportam o Zn para o citosol, e os transportadores de Zn (ZnT), família composta por 10 proteínas que transportam o Zn para fora do citosol (LICHTEN; COUSINS, 2009). Além disso, estas famílias de transportadores também regulam a distribuição intracelular de Zn para o retículo endoplasmático, mitocôndrias e Golgi (HAASE; MARET, 2003). Adicionalmente, estudos sugerem a participação de um trocador de Na, Ca/Zn de membrana plasmática para remoção do Zn livre citoplasmático em neurônios (QIN et al., 2008). Muitos tipos de células de mamíferos também contêm estruturas vesiculares ligadas à membrana, chamados zincossomas, que sequestram grandes quantidades de Zn e o liberam sob estimulação (HAASE; MARET, 2003; TAYLOR et al., 2008). Adicionalmente, as metalotioneínas ligam até 20% do Zn intracelular, desempenhando um papel significativo na homeostase do metal (CHIMIANTI et al., 2003; TAPIERO; TEW, 2003).

No cérebro dos mamíferos, o Zn é encontrado em várias estruturas como o hipocampo, em determinadas camadas

neocorticais e estriado (FREDERICKSON et al., 2000). O Zn está presente em grandes quantidades na maioria dos terminais nervosos glutamatérgicos, concentrado em vesículas sinápticas (FREDERICKSON, 1989; SENSI et al., 2009). Com a excitação neuronal, o Zn das vesículas é liberado na fenda sináptica, podendo modular a atividade de vários canais iônicos e modular a transmissão sináptica e a plasticidade neuronal (KETTERMAN; LI, 2008; SENSI et al., 2009; TIAN; YANG; ZHANG, 2010).

O Zn vesicular (co-localizado com glutamato) provavelmente desempenha o papel de um neuromodulador endógeno (BUDDE et al., 1997; KRESSE et al., 2005; SENSI et al., 2009). O Zn liberado no espaço extracelular modula a atividade de receptores glutamatérgicos, GABAérgicos e glicinérgicos, bem como de canais de cálcio dependentes de voltagem (PAOLETTI; ASCHER; NEYTON, 1997; HARVEY et al., 1999; JAN; WU; TSENG, 1999; CHOI; CHEN; LIPTON, 2001; HORNING; TROMBLEY, 2001; MAGISTRETTI et al., 2003; TAKEDA et al., 2004). Diversos estudos demonstram a capacidade do Zn em modular a atividade de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, inibindo os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e potencializando a atividade de receptores AMPA (SMART; XIE; KRISHEK, 1994). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que o Zn pode ativar ZnR, um receptor metabotrópico sensível ao Zn (BESSER et al., 2009). Dessa forma, o Zn pode ser o primeiro metal liberado como um neurotransmissor durante a transmissão sináptica (FREDERICKSON; KOH; BUSH, 2005). Adicionalmente, estudos também sugerem que o Zn pode agir como segundo mensageiro, liberado do retículo endoplasmático a partir de um estímulo extracelular, inibindo a atividade de proteínas fosfatases e modulando positivamente a atividade de proteínas cinases, de forma a alterar a expressão gênica (YAMASAKI et al., 2007). Entretanto, a despeito de suas funções fisiológicas, Zn em excesso na fenda sináptica ou citosol, o que pode ocorrer em condições de convulsão prolongada, isquemia, trauma cerebral e na doença de Alzheimer, pode causar neurotoxicidade, induzindo morte neuronal e glial (STORK; LI, 2009; SENSI et al., 2009; TIAN; YANG; ZHANG, 2010).

### 1.1.1.2 Toxicidade

Seres humanos e animais são susceptíveis à toxicidade do Zn através de condições ambientais ou individuais, determinadas por condições patológicas (convulsão, isquemia, trauma encefálico). São consideradas duas rotas principais de entrada para o Zn no organismo: por inalação e por ingestão (NAITO et al., 2010; PLUM; RINK; HAASE, 2010). A inalação de Zn geralmente se origina de fumaça proveniente de processos industriais, como galvanização, afetando principalmente os trabalhadores. Além disso, artefatos militares explosivos (bombas) contêm ZnO ou ZnCl<sub>2</sub>, sendo descritos vários casos de dispersão ambiental do metal (HOMMA, et al., 1992).

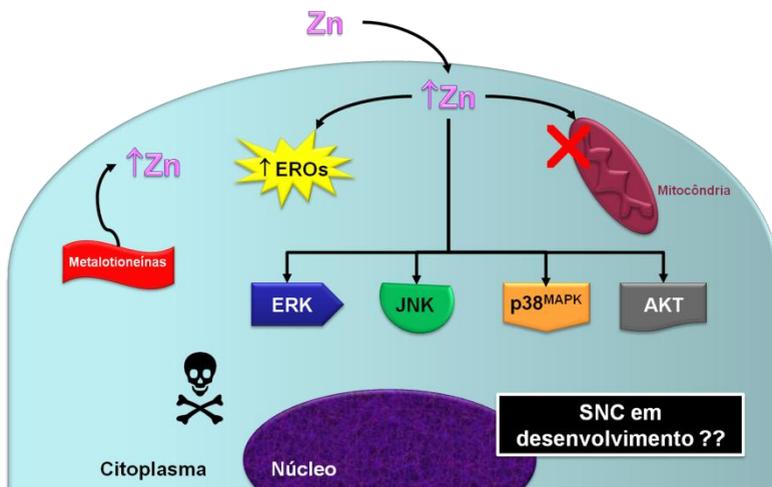
Devido à sua característica de metal essencial, a ingestão de pequenas quantidades de Zn é essencial para a sobrevivência. A ingestão diária recomendada de Zn é de 11 mg/dia para homens, 8 mg/dia para mulheres, 2-3 mg/dia para lactentes e de 5-9 mg/dia para crianças não-lactentes (TRUMBO et al., 2001). Entretanto, estas doses são significativamente inferiores ao valor de DL<sub>50</sub>, estimado em 27 g de Zn/humanos/dia, baseado na comparação com estudos em ratos e camundongos. Dessa forma, intoxicação oral por Zn é considerada rara, pois quantidades entre 225 e 400 mg são eméticas. Entretanto, relatos fatais são descritos (PLUM; RINK; HAASE, 2010) e a contaminação de águas pelo Zn é considerada de alto impacto toxicológico (NAITO et al., 2010).

Apesar dos possíveis efeitos sistêmicos do Zn (anemia, distúrbios gastrointestinais), o mais importante efeito tóxico do metal é a sua participação na regulação de morte celular. Um número crescente de estudos relaciona alterações na quantidade de Zn livre intracelular com processos patológicos, principalmente no SNC (DINELEY; VOTYAKOVA; REYNOLDS, 2003). Elevação de Zn têm sido relacionada com isquemia, convulsões e excitotoxicidade (STORK; LI, 2009; SENSI et al., 2009; TIAN; YANG; ZHANG, 2010). O papel do Zn na doença de Alzheimer é controverso, mas estudos apontam a associação da elevação cortical do Zn com o diagnóstico da doença e severidade da demência (CUAJUNGCO; FAGET, 2003, RELIGA et al., 2006).

Nas condições patológicas como isquemia e convulsão, ocorre um acúmulo de Zn livre intracelular, que pode ser desencadeada pela liberação de Zn pré-sináptico seguido de translocação para os neurônios pós-sinápticos ou pelo deslocamento de Zn intracelular a

partir de metalotioneínas (CHOI; YOKOYAMA; KOH, 1988; FREDERICKSON, 1989; KIM et al., 1999a,b; LEE et al., 2000; LEE et al., 2003). Além disso, condições como hipóxia neonatal ou convulsões prolongadas no início da vida, também podem envolver a liberação sináptica de Zn com conseqüente morte neuronal. A quantidade de Zn sináptico hipocampal apresenta uma variação durante o desenvolvimento. Tem sido demonstrado que é muito baixa em filhotes de ratos (16 dias de idade), aumentando dramaticamente com a maturidade (FREDERICKSON et al., 2006). O cérebro imaturo é extremamente vulnerável aos danos por metais, pois um grande número de processos celulares cruciais está ocorrendo, incluindo a migração e proliferação celular. Além disso, a barreira hemato-encefálica é mais permeável nas fases precoces do desenvolvimento. O excesso de metais durante o neurodesenvolvimento tem sido associado com distúrbios tardios, ou seja, que aparecem na vida adulta ou na senilidade (COSTA et al., 2004).

O acúmulo de Zn nos neurônios se correlaciona com o dano neuronal *in vivo* e *in vitro* em algumas regiões do cérebro, tais como o hipocampo, sugerindo um papel para o Zn na lesão celular (FREDERICKSON; KOH; BUSH, 2005). O mecanismo pelo qual a sobrecarga de Zn intracelular promove a morte celular não é bem compreendido. Entretanto, têm sido postulado que a neurotoxicidade do Zn envolve prejuízo do metabolismo energético, aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), diminuição de defesas antioxidantes e alteração de mecanismos de sinalização celular (FIGURA 1) (KIM et al., 1999a,b; PARK; KOH, 1999; EOM et al., 2001; DINELEY; VOTYAKOVA; REYNOLDS, 2003; OTEIZA; MACKENZIE; VERSTRAETEN, 2004; BISHOP; DRINGEN; ROBINSON, 2007; FRANCO et al., 2008). O Zn pode modular a atividade das enzimas de sinalização intracelular em vários modelos de cultura celular, através da ativação de MAPKs (ERK1/2, JNK, p38<sup>MAPK</sup>) e PI3K/AKT (PARK; KOH, 1999; EOM et al., 2001; SEO et al., 2001; DANIELS et al., 2004; AN et al. 2005a,b; KLEIN et al., 2006; MIN; LEE; CHUNG, 2007). As conseqüências celulares da ativação de MAPKs e AKT por Zn podem depender do tipo celular e da concentração do metal, mas incluem tanto a indução de morte celular quanto efeitos anti-apoptóticos (PARK; KOH, 1999; SEO et al., 2001; WILLIAMS et al., 2004; AN et al. 2005a; KLEIN et al., 2006; MIN; LEE; CHUNG, 2007).



**Figura 1.** Mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do zinco.

Embora se reconheça que a perturbação da homeostase do Zn pode desencadear vários processos neurodegenerativos, ainda não é totalmente compreendido como altas concentrações de Zn extracelular modulam alvos moleculares que podem estar envolvidos em seus efeitos neurotóxicos no cérebro em desenvolvimento, particularmente no hipocampo. As vias de PI3K/AKT e MAPKs são fundamentais para o desenvolvimento neurológico normal, pois regulam uma variedade de respostas celulares envolvidas na neuroplasticidade, incluindo atividade sináptica, morte ou sobrevivência celular. Dessa forma, mudanças sutis da atividade dessas enzimas, induzidas pelo Zn, podem ter um significado fisiopatológico importante no mecanismo de neurotoxicidade do metal. No entanto, não há dados sobre os efeitos do Zn nestas vias de sinalização em períodos cruciais do desenvolvimento cerebral.

## 1.1.2 Manganês

### 1.1.2.1 Aspectos Biológicos

O manganês (Mn) é um elemento químico do grupo VIIb da tabela periódica, dos metais de transição. É o 12º elemento mais

abundante na crosta terrestre e está amplamente distribuído no ambiente, estando presente na água, solo e alimentos (PERL; OLANOW, 2007). O Mn é encontrado em todos os animais e participa de diversos processos fisiológicos, possuindo importantes papéis na resposta imune, na homeostase da glicose sanguínea, na regulação da síntese de adenosina trifosfato (ATP), na reprodução, na digestão, e no crescimento dos ossos (ASCHNER; ASCHNER, 2005). Um organismo humano adulto possui aproximadamente 10-12 mg de Mn incorporado no centro ativo de metaloenzimas (HARDY, 2009). O Mn é um cofator importante para uma variedade de enzimas, incluindo a enzima antioxidante superóxido dismutase, enzimas envolvidas na síntese de neurotransmissores (glutamina sintetase), no metabolismo de proteínas e carboidratos (arginase piruvato carboxilase) e na síntese de mucopolissacarídeos (glicosiltransferase) utilizados em cartilagens e ossos (ASCHNER et al., 2007; ERIKSON et al., 2007).

As necessidades diárias de Mn na dieta são de 2-5 mg/dia para adultos e de 1-3 mg/dia para crianças (MORENO et al., 2009b). Entretanto, em indivíduos saudáveis, menos de 5% do Mn ingerido oralmente é absorvido, processo que auxilia na homeostase do metal (HARDY; GILLANDERS; HARDY, 2008). A homeostase do Mn no organismo é bastante complexa e não completamente compreendida, e uma série de estudos tem mostrado que o influxo de Mn para o cérebro é mediado por transportadores, mas seu efluxo é controverso (CROSSGROVE et al., 2003; YOKEL; CROSSGROVE; BUKAVECKAS, 2003; ERIKSON et al., 2007; FITSANAKIS et al., 2010). Adicionalmente, estudos demonstram que os mecanismos de homeostase do Mn são semelhantes ao do Fe e ocorrem de forma competitiva (ERIKSON et al., 2007; ROTH, 2009; FITSANAKIS et al., 2010; RIVERA-MANCÍA; RÍOS; MONTES, 2011). Uma vez absorvido no intestino, o Mn é transportado para o fígado, com uma parte ligada à transferrina (Tf), mas também à  $\gamma$ -globulina e albumina (ERIKSON et al., 2007; HARDY, 2009). A Tf é a principal proteína de ligação para o transporte de ferro (Fe) no plasma, mas também é conhecida pela capacidade de ligar Mn (FITSANAKIS et al., 2010; RIVERA-MANCÍA; RÍOS; MONTES, 2011). Adicionalmente, na ausência de Fe os sítios de ligação da Tf podem ligar vários outros metais, levantando a possibilidade de que a Tf possui funções *in vivo* como agente de transporte para muitos metais (FITSANAKIS et al., 2010). Quando complexado com Tf, o Mn está exclusivamente presente no

estado de oxidação trivalente, com dois íons metálicos fortemente ligados a cada molécula de Tf. (AISEN; AASA; REDFIELD, 1969; RIVERA-MANCIÁ; RÍOS; MONTES, 2011). Devido ao fato de que receptores de Tf (TfR) estão presentes na superfície dos capilares cerebrais, tem sido sugerido que o Mn (no estado de oxidação trivalente) entra nas células endoteliais complexado à Tf. O Mn é então liberado do complexo no interior de células endoteliais por acidificação endossomal e o complexo apo-Tf retorna à superfície celular (MORRIS et al., 1992). O Mn então liberado dentro das células endoteliais é posteriormente transferido para a superfície celular, para a liberação no fluido extracelular, por um mecanismo dependente de Tf cerebral. A seguir o Mn é captado por neurônios que possuem tanto TfR quanto transportador de metal divalente 1 (DMT-1) (MOOS; MORGAN, 2002; FITSANAKIS et al., 2010).

Apesar da existência de diversos estudos mostrando os possíveis mecanismos de captação do Mn no SNC de adultos, pouco se conhece sobre os mecanismos de transporte desse metal durante o período de desenvolvimento cerebral (ERIKSON et al., 2007). Porém, a presença do DMT-1 e do TfR é detectada no córtex cerebral, no hipocampo e no estriado de rato a partir do quinto dia pós-natal (SIDDAPPA et al., 2002; GARCIA et al., 2006). Além disso, Siddappa et al. (2002) e Erikson et al. (2007) sugerem que a expressão de proteínas transportadoras pode até estar aumentada no indivíduo neonato quando comparada ao adulto, resultando na possibilidade de maior acúmulo de Mn no SNC em desenvolvimento. Além do DMT-1 e do sistema Tf-TfR, estudos demonstram que o Mn também pode utilizar ZIP-8 (um membro de uma família de carreadores de solutos) (HE et al., 2006), canais de cálcio dependentes de voltagem (LUCACIU et al., 1997; RICCIO et al., 2002), receptores glutamatérgicos ionotrópicos (KANNURPATTI; JOSHI; JOSHI, 2000) e pela utilização de sistemas de transporte específico, como o transportador de dopamina (DAT) (CHEN et al., 2006; ANDERSON; COONEY; ERIKSON, 2007; BURTON; GUILARTE, 2009).

A principal via de eliminação do Mn é através do sistema hepatobiliar, onde o metal é removido do sangue, conjugado e a seguir secretado no intestino. Uma pequena fração de Mn é reabsorvida e o restante é excretado nas fezes (mais de 90% é eliminado via biliar). Os níveis corporais de Mn são normalmente controlados de forma rígida por este sistema, embora a perda deste equilíbrio possa ocorrer em situações de exposição crônica a altos

níveis atmosféricos ou mesmo pela ingestão excessiva do metal (LJUNG; VAHTER, 2007; PERL; OLANOW, 2007). Ademais, este sistema é pouco eficiente em neonatos e pode contribuir para o aumento de Mn no sangue, e seu acúmulo no SNC e outros tecidos, principalmente pelos baixos níveis fisiológicos de Fe, alta expressão de proteínas transportadoras no encéfalo e imaturidade da barreira hematoencefálica (SIDDAPPA et al., 2002; ERIKSON et al., 2007; HARDY, 2009; ROTH, 2009, YOON et al, 2011). Ademais, no SNC o Mn encontra-se principalmente nas mitocôndrias, em sua forma divalente. O metal partilha o mecanismo de entrada na organela com o cálcio, no entanto, não é removido pelo mecanismo de efluxo do cálcio dependente do sódio. Por esta razão, a saída do Mn do tecido nervoso é muito lenta (MORELLO et al., 2008). Em indivíduos jovens, os baixos níveis de Fe facilitam a sua retenção, em detrimento da eliminação (ERIKSON et al., 2007).

#### 1.1.2.2 Toxicidade

A despeito das funções fisiológicas do Mn, a exposição excessiva ao Mn pode causar neurotoxicidade, em um processo degenerativo que afeta as estruturas corticais e os gânglios basais, especificamente, o globo pálido, o estriado, a substância negra parte reticulada e o núcleo subtalâmico (estruturas ricas em Fe) (YAMADA et al., 1986; DOBSON; ERIKSON; ASCHNER, 2004; PERL; OLANOW, 2007). De modo interessante, estudos demonstram alta concentração de TfR no núcleo acumbens e caudado putâmen, que fornecem fibras eferentes para áreas ricas em Mn (pálido ventral, globo pálido e substância negra) (DOBSON; ERIKSON; ASCHNER, 2004). Além disso, há evidências de transporte axonal de Mn, de uma região encefálica para outra (ERIKSON et al., 2007), o que caracteriza maior acúmulo do metal nestas estruturas. Assim, com o acúmulo de Mn nos núcleos da base, profundas manifestações citotóxicas podem ocorrer afetando várias funções neurológicas, sendo que as mais prevalentes estão associadas com déficits semelhantes aos movimentos distônicos comumente associados à doença de Parkinson (PERL; OLANOW, 2007; ROTH, 2009). Adicionalmente, o mau funcionamento das estruturas que compõem os gânglios basais tem sido associado com distúrbios como esquizofrenia e Huntington (GALVAN; WICHMANN, 2008; BOGER et al., 2010). Evidências também mostram que mulheres grávidas e neonatos retêm Mn em maior grau do que a população de

adultos não gestantes, favorecendo à ocorrência de distúrbios neurológicos nestes indivíduos (DOBSON; ERIKSON; ASCHNER, 2004; HAFEMAN et al., 2007). Ademais, a deposição de Mn no SNC de crianças tem implicações potencialmente importantes em longo prazo para o desenvolvimento neurológico (ERIKSON et al., 2007).

O distúrbio neurológico associado a níveis elevados de Mn é conhecido como “manganismo”, descrito pela primeira vez em humanos por Couper (1837). Os sinais clínicos iniciais são psiquiátricos, com comportamentos compulsivos ou violentos, instabilidade emocional e alucinações. Os indivíduos também podem apresentar fadiga, enxaqueca, câibras musculares, perda de apetite, apatia, insônia e diminuição da libido. As formas mais severas do manganismo se caracterizam por contrações musculares prolongadas (dystonia), diminuição dos movimentos musculares (hipocinesia), rigidez e tremores musculares (DOBSON; ERIKSON; ASCHNER, 2004). As características físicas se assemelham à Doença de Parkinson, mas há aspectos distintos (PAL; SAMI; CALNE, 1999; PERL; OLANOW, 2007). Em ambas as síndromes são encontradas bradicinesia e rigidez generalizada, mas a dystonia do manganismo é um sinal neurológico atribuído ao dano do globo pálido, que é minimamente observado em pacientes parkinsonianos (CALNE et al., 1994). Além disso, no manganismo os indivíduos apresentam tremores de repouso menos freqüentes, uma propensão a cair para trás, pouca ou nenhuma resposta à terapia com levodopa e captação normal de fluorodopa, observada em tomografias de emissão de pósitrons (PET) (CALNE et al., 1994; PAL; SAMI; CALNE, 1999; PERL; OLANOW, 2007)

A exposição ao Mn normalmente está associada a situações ocupacionais (industriais) (HAFEMAN et al., 2007; LUCCHINI et al., 2007; PERL; OLANOW, 2007; LUCCHINI; ZIMMERMAN, 2009; ROTH, 2009). O Mn é o quarto metal mais amplamente utilizado em produtos comerciais, com mais de oito milhões de toneladas extraídas (mineração) anualmente (PERL; OLANOW, 2007). Existem compostos inorgânicos e orgânicos de Mn, com as formas inorgânicas sendo as mais comuns no ambiente. O metal é utilizado comumente na produção de ferro e aço, na fabricação de pilhas secas, no tratamento de água (permanganato de potássio), como oxidante na produção de hidroquinona, na fabricação de vidro, no branqueamento têxtil, como agente oxidante para o revestimento de eletrodo nas hastes de solda; em fósforos de segurança e de

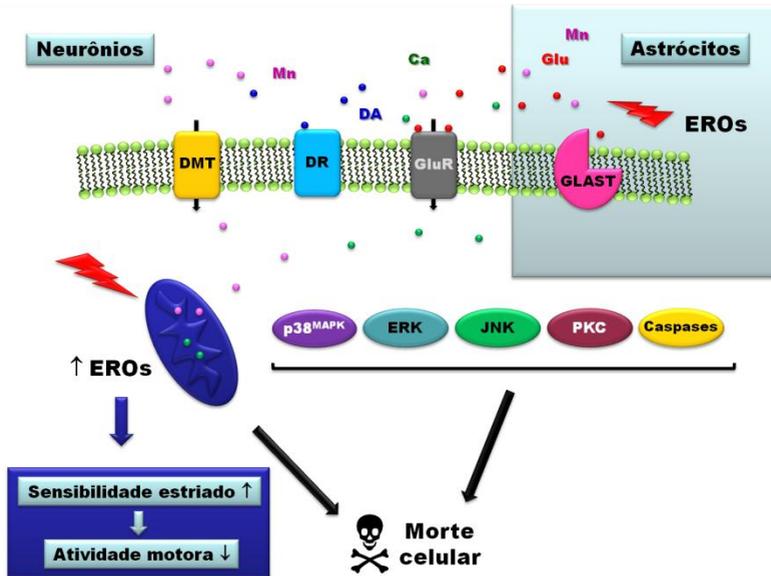
artifício, e no curtimento de couro. Compostos orgânicos de Mn estão presentes no aditivo de combustível manganês tricarbonil metilciclopentadienil (MMT), fungicidas (maneb e mancozeb) e agentes de contraste utilizados na ressonância magnética. O Mn também está presente naturalmente nos alimentos, com as maiores concentrações normalmente encontradas em nozes, cereais, legumes, frutas, grãos e chá (DOBSON; ERIKSON; ASCHNER, 2004; ERIKSON et al., 2007; SANTAMARIA, 2008; BURTON; GUILARTE, 2009; ESCHENKO et al., 2010). Além disso, um aspecto importante da neurotoxicidade do Mn está relacionado com os produtos utilizados na nutrição parenteral, pois estes geralmente contêm um excesso de Mn em suas fórmulas e podem predispor principalmente as crianças, a distúrbios neurológicos (SUZUKI et al., 2003; ERIKSON et al., 2007; HARDY; GILLANDERS; HARDY, 2008; HARDY, 2009; HARDY; MENENDEZ; MANZANARES, 2009).

Os mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do Mn são amplos e ainda não muito bem esclarecidos (TAKEDA, 2003; ERIKSON et al., 2007; HAFEMAN et al., 2007; BENEDETTO; AU; ASCHNER, 2009; ROTH, 2009). Entretanto, é comumente aceito que a toxicidade neuronal do Mn é mediada por alterações mitocondriais, iniciando tanto morte celular apoptótica quanto necrótica, através da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo e nitrosativo (ROTH; GARRICK, 2003; ZHANG; FU; ZHOU, 2004; GUNTER et al., 2006; TAMM; SABRI; CECCATELLI, 2008; ZHANG et al., 2008; MILATOVIC et al., 2009, MILATOVIC et al., 2011; MORENO et al., 2011). Tem sido demonstrado que muitas das vias de sinalização associadas à morte celular programada são ativadas após exposição ao metal, incluindo JNK, ERK, p38<sup>MAPK</sup>, PKC e caspases (HIRATA et al., 2004; LATCHOUMYCANDANE et al. 2005; ITO et al., 2006; GONZALEZ et al., 2008; YIN et al., 2008; JANG, 2009; CAI et al., 2010; CRITTENDEN; FILIPOV, 2010; LI et al., 2010; PARK; PARK, 2010; RAO et al., 2010; SHIN et al., 2010; CAI et al., 2011). Ademais, estudos relatam que o Mn induz a auto-oxidação da dopamina em neurônios dopaminérgicos, aumentando os níveis de quinonas tóxicas e resultando em depleção do neurotransmissor (TAKEDA, 2003; PRABHAKARAN et al., 2008). Estudos também relacionam uma maior sensibilidade do estriado ao estresse oxidativo induzido pelo Mn (ÁVILA et al., 2008), principalmente durante o desenvolvimento (ERIKSON et al., 2007). Notavelmente, foi

descrito uma associação entre estresse oxidativo no estriado e prejuízos na atividade motora em ratos (OLIVEIRA et al., 2007).

Tem sido demonstrado que as EROs também podem interferir com a remoção do glutamato da fenda sináptica, inibindo os transportadores de alta afinidade (ERIKSON et al., 2007). A captação de glutamato é ainda diminuída em astrócitos expostos ao Mn, pela redução significativa da expressão do gene transportador de glutamato/aspartato (GLAST) (ERIKSON; ASCHNER, 2002; ERIKSON; SUBER; ASCHNER, 2002; DENG et al., 2009). O conseqüente aumento dos níveis de glutamato extracelular é potencialmente excitotóxico para os neurônios, o que também pode representar uma causa de neurotoxicidade do Mn (FIGURA 2) (ERIKSON et al., 2007; XU; XU; DENG, 2010). O glutamato na fenda pode se ligar aos receptores ionotrópicos, levando a um aumento nos níveis intracelulares de cálcio que pode ser captado pelas mitocôndrias, resultando em mudanças na permeabilidade da membrana e geração de EROs e estresse oxidativo (ROTH, 2009). Adicionalmente, a excitotoxicidade glutamatérgica e o estresse oxidativo também podem ativar várias cinases, incluindo ERK1/2, JNK, e p38<sup>MAPK</sup> (GRANT et al. 2001; ZHANG et al. 2006; ZEPEDA et al. 2008; CHEN et al. 2009; RAO et al, 2010). Foi demonstrado que o Mn pode prejudicar o ciclo glutamato-glutamina, que potencialmente pode resultar em desregulação da homeostase do glutamato e prejudicar a transmissão glutamatérgica (DENG et al. 2009; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ et al, 2009).

Dessa forma, as conseqüências biológicas decorrentes da exposição do SNC ao Mn durante o desenvolvimento, podem ser extremamente graves e passíveis de aparecimento tardio, alterando neurogênese, aprendizado, memória e predispondo à processos neurodegenerativos tardios (ERIKSON et al., 2007; HAFEMAN et al., 2007; MORENO et al., 2009a,b; KERN; STANWOOD; SMITH, 2010; KERN; SMITH, 2011).



**Figura 2.** Possíveis mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do manganês.

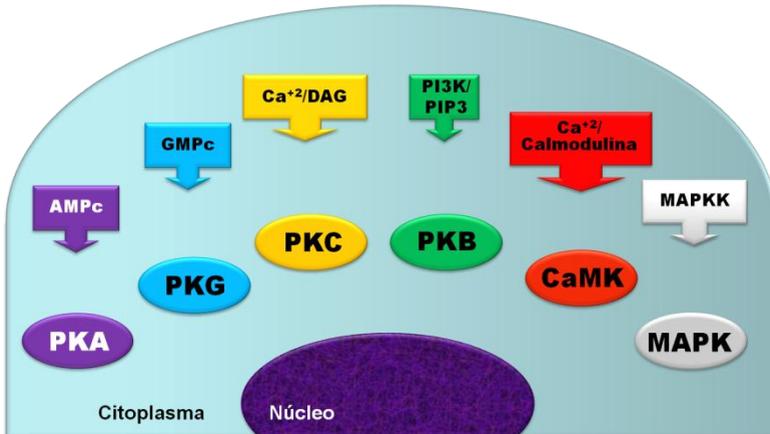
Ca: cálcio; DA: dopamina; DMT: transportador de metal divalente; DR: receptor dopaminérgico; GLAST: transportador glutamato/aspartato; Glu: glutamato; GluR: receptor glutamatérgico ionotrópico; Mn: manganês.

## 1.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

O funcionamento do SNC depende da comunicação celular. Os sistemas de sinalização intracelular se organizam, como módulos interdependentes (GREENGARD, 2001; WONG; SCOTT, 2004), que respondem aos sinais extracelulares através da modificação da atividade de proteínas cinases e proteínas fosfatases, regulando o estado de fosforilação de proteínas (GREENGARD, 2001; THOMAS; HUGANIR, 2004). Desta forma, a atividade de fatores de transcrição, enzimas, canais iônicos, receptores e proteínas sinápticas podem ser modificados por este mecanismo, resultando na modulação de processos como proliferação, diferenciação celular, morte celular, neurogênese, interações celulares, neurotransmissão e neuroplasticidade (memória, cognição) (CHANG; KARIN, 2001; GREENGARD, 2001; KANDEL, 2001; THOMAS; HUGANIR,

2004; WONG; SCOTT, 2004). Além disso, a alteração destes sistemas pode causar ou induzir distúrbios neurodegenerativos, psiquiátricos ou comportamentais (HADDAD, 2004; NAGAI et al., 2007; WANG; GRUNDKE-IQBAL; IQBAL, 2007).

No SNC, algumas das famílias de proteínas cinases mais estudadas incluem proteína cinase A (PKA), proteína cinase G (PKG), proteína cinase C (PKC), proteína cinase B (PKB/AKT), proteínas cinases  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina-dependentes (CaMKs) e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (FIGURA 3) (NESTLER; GREENGARD, 1984; HUNTER; SEFTON, 1991; NESTLER; GREENGARD, 1999; SWEATT, 2001; HANADA; FENG; HEMMING, 2004).

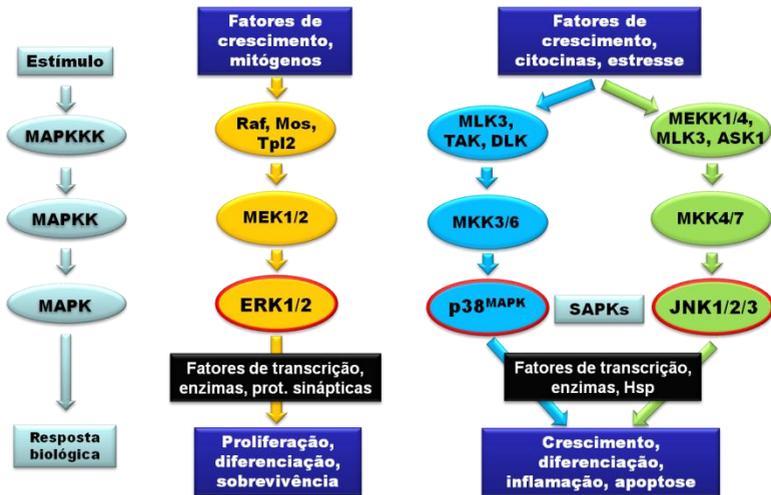


**Figura 3.** Principais vias de sinalização celular no SNC.

### 1.2.1 As Vias das MAPKs e PI3K/AKT

As principais MAPKs são as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal cinases (JNK1/2) e as proteínas cinases ativadas por mitógenos de 38 kDa (p38<sup>MAPK</sup>) (CHANG; KARIN, 2001; CHEN et al., 2001; THOMAS; HUGANIR, 2004; WAETZIG; HERDEGEN, 2004). A cascata da ERK1/2 é primariamente ativada por fatores de crescimento, regulando expressão gênica, embriogênese, proliferação,

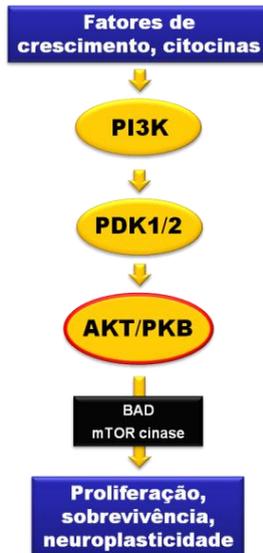
sobrevivência e morte celular e neuroplasticidade (CHEN et al., 2001; THOMAS; HUGANIR, 2004; SCHENK et al., 2005). As proteínas cinases JNK e  $p38^{MAPK}$ , também conhecidas como proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs), são ativadas por citocinas e insultos citotóxicos, estando frequentemente relacionadas a estresse e morte celular (MIELKE; HERDEGEN, 2000; COWAN; STOREY, 2003). Entretanto, JNK e  $p38^{MAPK}$  também regulam o desenvolvimento do SNC e a neuroplasticidade (FIGURA 4) (WAETZIG; HERDEGEN, 2004).



**Figura 4.** Vias de sinalização das MAPKs.

ASK1: cinase reguladora de sinal apoptótico 1; DLK: cinase zíper de dupla leucina; Hsp: proteína de choque térmico; MAPKKK: cinase da cinase da proteína cinase ativada por mitógeno; MAPKK: cinase da proteína cinase ativada por mitógeno; MLK3: cinase 3 de linhagem mista; Mos: Moloney sarcoma oncogene; Raf: proteínas cinases específicas para Ser/Thr; TAK: cinase ativada por TGF- $\beta$ ; Tpl2: progressão de tumor locus-2.

A via da fosfatidil-inositol 3-cinase (PI3K)/AKT (PKB) também pode ser ativada por fatores de crescimento, e sua ativação tem papel central no controle do crescimento, proliferação, metabolismo, sobrevivência celular e na neuroplasticidade (FIGURA 5) (HANADA; FENG; HEMING, 2004; BRAZIL; YANG; HEMMINGS, 2004; VAN DER HEIDE; RAMAKERS; SMIDT, 2006).



**Figura 5.** Via de sinalização da PI3K/AKT.

PDK1/2: proteína cinase dependente de 3-fosfoinositídeo 1/2; mTOR cinase: cinase Ser/Thr alvo de rapamicina.

Dessa forma, pelas atividades coordenadas das vias de sinalização intracelular, processos bioquímicos/funcionais relacionados ao desenvolvimento do SNC, à neuroplasticidade, à sobrevivência e morte celular e até mesmo processos patológicos como as doenças neurodegenerativas podem ser regulados (BRAZIL et al., 2004; HADDAD, 2004; THOMAS; HUGANIR, 2004; AOUDI et al., 2006; SUBRAMANIAM; UNSICKER, 2006;

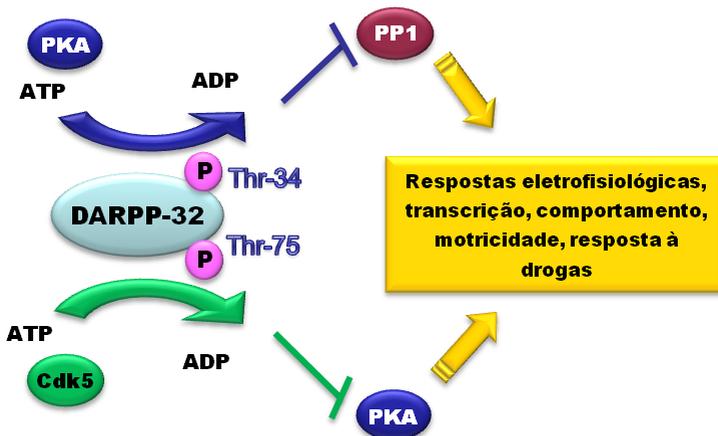
WAYMAN et al., 2006; NAGAI et al., 2007; WANG; GRUNDKE-IQBAL; IQBAL, 2007). Dentro desse contexto um aspecto importante nesse processo de sinalização diz respeito à modulação (via fosforilação e modificação de expressão) de diversas proteínas alvo, como fatores de transcrição (CREB, c-fos, c-jun, Elk1, ATF2), proteínas apoptóticas (Bcl2, BAD, Bax, caspases, calpaínas), fatores neurotróficos (BDNF), proteínas de choque térmico e proteínas sinápticas (MIELKE; HERDEGEN, 2000; SHAULIAN; KARIN, 2002; BRAZIL et al., 2004; THOMAS; HUGANIR, 2004; CARLEZON; DUMAN; NESTLER, 2005; HONG; WEST; GREENBERG, 2005; SCHENK et al., 2005; SUBRAMANIAM; UNSICKER, 2006).

Considerando que as proteínas cinases e seus alvos podem participar tanto de respostas citoprotetoras como de respostas relacionadas à morte celular (CHU et al., 2004; SUBRAMANIAM; UNSICKER, 2006; NAGAI et al., 2007; RAIVICH; BEHRENS, 2006; DELIVORIA-PAPADOPOULOS; ASHRAF; MISHRA, 2007) as implicações referentes à modulação de MAPKs e PI3K/AKT e seus alvos pelo Zn e Mn durante o desenvolvimento do SNC necessitam ser investigadas.

### **1.2.2 A Sinalização de DARPP-32**

Os gânglios da base recebem a maior parte de suas conexões através do estriado, que é constituído principalmente pelos neurônios médios espinhosos. Sistemas glutamatérgicos corticolímbico-talâmicos e dopaminérgicos mesencefálicos convergem nos neurônios GABAérgicos estriatais (GERFEN, 2004). Esses neurônios possuem uma proteína chamada fosfoproteína de 32 kDa regulada por dopamina e AMPc (DARPP-32), que é um mediador chave do processamento de sinais (WALAAS; ASWAD; GREENGARD, 1983; QI; MILLER; VOIT, 2010). Em resposta à dopamina, DARPP-32 medeia uma variedade de efeitos bioquímicos e fisiológicos (GREENGARD; ALLEN; NAIRN, 1999; SVENNINGSSON et al., 2004), incluindo atividade de canais iônicos de membrana, atividade de fatores de transcrição e regulação da expressão gênica (FIENBERG et al., 1998; FIENBERG; GREENGARD, 2000). Além disso, a DARPP-32 tem funções importantes no comportamento, como alterações na atividade motora (SANTINI et al., 2007; BOTSAKIS et al., 2010; LEBEL et al., 2010; POLISSIDIS et al., 2010). Além dos sinais dopaminérgicos,

DARPP-32 processa sinais excitatórios glutamatérgicos do córtex cerebral, que são igualmente cruciais para o estriado (NISHI et al., 2005). Quando a DARPP-32 é fosforilada no resíduo de Thr-34, pela PKA (via ativação de receptor dopaminérgico D1), inibe a proteína fosfatase-1 (PP1) e, quando fosforilada em Thr-75 pela Cdk5, inibe a PKA (FIGURA 6) (GREENGARD, 2001; SVENNINGSSON et al., 2004). Assim, DARPP-32 serve como um elemento centralizador para a recepção, integração e processamento de sinais a partir de diversos neurotransmissores e constitui um elemento-chave no circuito córtico-estriato-pálido-tálamo-cortical (SVENNINGSSON et al., 2004). Portanto, devido ao fato do estriado ser um importante alvo da neurotoxicidade do Mn (YAMADA et al., 1986; ERIKSON et al., 2007; ÁVILA et al., 2008; ROTH, 2009) e de que este metal interfere acentuadamente na transmissão dopaminérgica e glutamatérgica (ERIKSON; ASCHNER, 2002; ERIKSON; SUBER; ASCHNER, 2002; TAKEDA, 2003; ERIKSON et al., 2007; PRABHAKARAN et al., 2008; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ et al., 2009), a proteína DARPP-32 pode se caracterizar como um importante alvo da toxicidade do Mn.



**Figura 6.** Regulação de DARPP-32 por fosforilação e suas ações.

### 1.3 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO E TOXICIDADE

A capacidade de metais como chumbo, mercúrio, cádmio, zinco e manganês em produzir alterações do desenvolvimento e predispor ou causar processos neurodegenerativos como Parkinson e Alzheimer têm tido ampla relevância (OKUDA et al., 1997; COSTA et al., 2004; BASHA et al., 2005; BOLIN et al., 2006; COON et al., 2006; MONNET-TSCHUDI et al., 2006; ROOS; VESTERBERG; NORDBERG, 2006; YOKEL, 2006; ERIKSON et al., 2007; VERINA; ROHDE; GUILARTE, 2007). Apesar da neurotoxicidade de metais como o chumbo e o mercúrio estar bem estabelecida, os efeitos de outros metais no encéfalo, como o Zn e o Mn, tem despertado grande interesse, principalmente no SNC em desenvolvimento (GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2006; ERIKSON et al., 2007; HAFEMAN et al., 2007; WASSERMAN et al., 2008; MORENO et al., 2009a,b).

O encéfalo em desenvolvimento é caracteristicamente muito mais susceptível ao dano causado por agentes tóxicos, comparado ao encéfalo do adulto (RODIER, 1995; BONDY; CAMPBELL, 2005; GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2006). O SNC continua a se desenvolver no período pós-natal, e a alta vulnerabilidade permanece por muito tempo, da infância à adolescência. Embora muitos neurônios formam-se ao nascimento, uma substancial aceleração da síntese de DNA, RNA e proteínas, migração neuronal, crescimento de células gliais (particularmente da astroglia, o principal local de captação de glutamato e metais) e a mielinização de axônios continuam após o nascimento, em um rápido período de desenvolvimento (GOTTLIEB; KEYDAR; EPSTEIN, 1977; RODIER, 1995; RICE; BARONE, 2000; TKÁC et al., 2003). Os períodos fetais finais e o período neonatal revelam alterações regionais significantes na estrutura do encéfalo, na função e na neuroquímica dos tecidos (TKÁC et al., 2003). O cérebro do rato entre os dias pós-natal 7 e 28 (PN7-28) é um modelo estabelecido para estudos de desenvolvimento do encéfalo humano, onde o animal PN7 corresponde em neurodesenvolvimento com o feto humano em aproximadamente 34 semanas de gestação, e o animal PN28 corresponde à criança entre 2 e 3 anos de idade (DOBBING, 1990).

Os períodos pré-desmame e pós-desmame inicial coincidem com o desenvolvimento das vias dopaminérgicas em regiões encefálicas como o córtex pré-frontal, núcleo acumbens, e estriado

dorsal, que são fundamentais na regulação de comportamentos de funções executoras, que envolvem a aprendizagem, memória e atenção, bem como do funcionamento motor (BROADDUS; BENNETT, 1990a,b; PACKARD; KNOWLTON, 2002; LEO et al., 2003; GOTO; GRACE, 2005; ARNSTEN, 2006; LOZOFF; GEORGIEFF, 2006). Portanto, devido ao fato de que o sistema dopaminérgico é um alvo sensível ao Mn, a exposição precoce ao metal pode resultar em déficits de memória, aprendizado e atenção através de seus efeitos nas estruturas em desenvolvimento (KERN; STANWOOD; SMITH, 2010). De modo semelhante, o hipocampo também se desenvolve rapidamente durante a vida fetal final e neonatal inicial em roedores e em seres humanos. No momento do nascimento no ser humano, o hipocampo tem importantes conexões estabelecidas e há alto grau de dendritogênese e sinaptogênese (LOZOFF; GEORGIEFF, 2006). O hipocampo é essencial para o processamento da memória de reconhecimento. Em particular, o hipocampo dorsal, incluindo áreas da região CA1, é considerado importante nas alterações bioquímicas e estruturais de curta e longa duração, envolvidas na codificação de eventos de memória declarativa em seres humanos (LOZOFF; GEORGIEFF, 2006, BIRD; BURGESS, 2008). Dessa forma, a exposição do hipocampo em desenvolvimento ao Zn, principalmente em condições patológicas como isquemia e epilepsia neonatal, pode resultar em distúrbios neurológicos graves.

Assim, o presente trabalho buscou a compreensão das ações de metais (Zn e Mn) em períodos específicos importantes do desenvolvimento do SNC, sobre as proteínas cinases e alguns de seus alvos e sua participação nos mecanismos de viabilidade celular e estresse oxidativo, bem como de parâmetros metabólicos e comportamentais motores. Para tanto, foram utilizados ratos em desenvolvimento entre as idades PN8 e PN29. Muito pouco se sabe sobre os efeitos dos metais no SNC em desenvolvimento, particularmente no que diz respeito ao risco potencial, representado por exposições no início da vida, de predispor alterações neurológicas em períodos posteriores do desenvolvimento e na vida adulta (ERIKSON et al., 2007; HAFEMAN et al., 2007; MORENO et al., 2009a,b; KERN; STANWOOD; SMITH, 2010; KERN; SMITH, 2011).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho foi determinar o envolvimento das vias das MAPKs e AKT na neurotoxicidade *in vitro* do Zn no hipocampo de ratos em desenvolvimento, e determinar alterações neuroquímicas no corpo estriado de ratos em desenvolvimento provocadas pela exposição *in vivo* ao Mn. Nesse sentido, foram avaliados parâmetros da sinalização intracelular e aspectos metabólicos celulares (função mitocondrial, indução de estresse oxidativo). Adicionalmente, pretendeu investigar possíveis alterações comportamentais motoras nos animais expostos ao Mn.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 2.2.1 Neurotoxicidade do Zinco sobre o hipocampo em um protocolo de exposição *in vitro* (artigo 1)

a) Determinar os efeitos do Zn *in vitro* sobre parâmetros de viabilidade celular, em fatias hipocampais de ratos em desenvolvimento (14 dias de idade; PN14);

b) Investigar a capacidade de modulação da fosforilação de MAPKs e AKT em fatias hipocampais de ratos em desenvolvimento (PN14) expostas ao Zn *in vitro*;

c) Avaliar a possível participação das vias das MAPKs e AKT na modulação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos em desenvolvimento (PN14) expostas ao Zn *in vitro*.

#### 2.2.2 Neurotoxicidade do Manganês sobre o corpo estriado e parâmetros comportamentais em protocolos de exposição *in vivo* durante o período pós-natal 8-12 (PN8-12) (artigo 2) e PN8-27 (artigo 3)

a) Avaliar a modulação da fosforilação de MAPKs e AKT no corpo estriado de ratos expostos ao Mn *in vivo* (dia PN8-12 e PN8-27);

b) Determinar a modulação da expressão/fosforilação pelo Mn do fator de transcrição CREB no corpo estriado de ratos expostos *in vivo* (PN8-12 e PN8-27);

c) Determinar no corpo estriado de ratos em desenvolvimento (PN8-12 e PN8-27) a modulação *in vivo* pelo Mn da fosforilação de DARPP-32, nos sítios Thr-34 e Thr-75;

d) Avaliar possíveis alterações morfológicas degenerativas, que podem ocorrer no SNC, frente à exposição ao Mn (PN8-12 e PN8-27);

e) Avaliar uma possível ocorrência de apoptose, pelo aumento da atividade de caspases, no corpo estriado dos ratos expostos ao Mn (PN8-12 e PN8-27);

f) Determinar possíveis aumentos na produção de EROs e de F<sub>2</sub>-isoprostanos (F<sub>2</sub>-IsoPs) no corpo estriado de ratos expostos *in vivo* ao Mn (PN8-12 e PN8-27);

g) Caracterizar uma possível toxicidade *in vivo* do Mn sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial no corpo estriado dos ratos (PN8-12 e PN8-27);

h) Avaliar alterações comportamentais motoras (coordenação motora e locomoção) dos ratos expostos ao Mn (PN8-12 e PN8-27);

i) Determinar a participação do estresse oxidativo nos mecanismos de neurotoxicidade do Mn *in vivo*, através do uso do antioxidante ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox<sup>®</sup>), avaliando a modulação das vias de sinalização intracelular, produção de EROs e F<sub>2</sub>-IsoPs, ativação de caspases e desempenho dos ratos em atividades de coordenação motora e locomoção.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO* COM ZINCO

##### 3.1.1 Reagentes

Os anticorpos primários anti-JNK1/2, anti-ERK1/2 e anti-p38<sup>MAPK</sup>, os inibidores de cinases SB203580, SP600125 e LY294002 e o cloreto de zinco (ZnCl<sub>2</sub>) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os anticorpos primários anti-fosfo-ERK1/2, anti-fosfo-JNK1/2, anti-fosfo-p38<sup>MAPK</sup>, anti-AKT e anti-fosfo-AKT e o inibidor de cinase U0126 foram adquiridos da Cell Signaling (Beverly, MA, EUA). Acrilamida, bis-acrilamida, β-mercaptoetanol, Hybond<sup>®</sup> nitrocelulose, 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), Tris, anticorpo secundário (anti-coelho-IgG conjugado à peroxidase) e reagentes de detecção por quimiluminescência (ECL<sup>®</sup>) foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, EUA). Todos os outros reagentes utilizados eram de grau analítico.

##### 3.1.2 Animais

Ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar de ambos os sexos com 14 dias de idade pós-natal (PN14) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os ratos foram utilizados nos procedimentos experimentais imediatamente após o recebimento, sendo manipulados e mortos de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (PP 00345/CEUA-UFSC).

##### 3.1.3 Preparação de Fatias Hipocâmpais e Tratamentos *in vitro*

Os procedimentos de preparação de fatias hipocâmpais foram realizados conforme estudos anteriores (LEAL et al., 1997; GONG et al., 2001; CORDOVA et al., 2004). Os ratos foram mortos no dia PN14. Os cérebros foram removidos e os hipocâmpos dissecados em tampão HEPES-salina (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, glicose 12 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM e HEPES 25 mM, pH 7,4, 4 °C),

previamente oxigenado por 30 min. Fatias de hipocampo de 400  $\mu\text{m}$  de espessura foram confeccionados em um fatiador de tecidos (McIlwain Tissue Chopper, The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., Guildford, Surrey, Reino Unido). As fatias foram individualmente pré-incubadas em tampão HEPES-salina (300  $\mu\text{L}$ /fatia) por 30 min. em temperatura ambiente. O meio foi substituído por tampão fresco na ausência (controle) ou presença de  $\text{ZnCl}_2$  (1-100  $\mu\text{M}$ ) e incubadas (a 35 °C) por 1-3 h.

A modulação da fosforilação de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ , ERK1/2, JNK1/2 e AKT e seu papel nos efeitos do Zn foi estudada pela adição de 10  $\mu\text{M}$  de SB203580 (inibidor de  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ ), 25  $\mu\text{M}$  de U0126 (inibidor de MEK1/2), 30  $\mu\text{M}$  de SP600125 (inibidor de JNK1/2) e 20  $\mu\text{M}$  de LY294002 (inibidor de PI3K), durante os período de pré-incubação e incubação. Os níveis de proteína total foram estimados pelo método descrito por Peterson (1977).

### **3.1.4 Teste de Viabilidade Celular**

A viabilidade celular nas fatias hipocampais foi mensurada através do teste de redução do MTT. Após o período de tratamento, as fatias foram incubadas com MTT 0,05% em tampão HEPES-salina durante 30 min. (35 °C) em placas de 96 poços. O MTT é convertido em formazan púrpura após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais. O formazan é então dissolvido pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em um composto colorido com densidade óptica medida em leitor de ELISA ( $\lambda = 550 \text{ nm}$ ) (LIU et al., 1997;. MOLZ et al., 2005).

### **3.1.5 Western Blot**

Após os períodos de incubação, as fatias foram solubilizadas em Tampão de Amostra (SDS 4%, EDTA 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 8%, e Tris 50 mM, pH 6,8). As proteínas (60  $\mu\text{g}$  de proteína total/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) (miniVE Vertical Electrophoresis System<sup>®</sup>, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) utilizando gel 10% (CORDOVA et al., 2004). As proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (1,2  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ; 1,5 h) utilizando-se um aparelho de eletrotransferência “semidry” (TE 70 SemiPhor<sup>®</sup> Unit, GE Healthcare Life Sciences,

Piscataway, NJ, EUA), como descrito por Bjerrum e Heegaard (1988). As membranas foram bloqueadas 1 h com leite desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As formas fosforilada e total de ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup>, JNK1/2 e AKT, foram detectadas com o uso de anticorpos específicos diluídos em TBS-T contendo soroalbumina bovina (BSA) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, BSA 2,5%, pH 7,5) nas diluições, 1:1.000 (anti-fosfo-ERK1/2, anti-fosfo-p38<sup>MAPK</sup>, anti-fosfo-JNK1/2, anti-JNK1/2 anti-fosfo-AKT-Ser-473 e anti-AKT), 1:10.000 (anti-p38<sup>MAPK</sup>, anti-JNK1/2) e 1:40.000 (anti-ERK1/2). As reações foram desenvolvidas por quimiluminescência e reveladas com o uso de filme radiográfico específico (Amersham Hyperfilm<sup>®</sup>, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). Todas as etapas de bloqueio e de incubação foram seguidas por três lavagens (5 min. cada) das membranas com TBS-T. A densidade óptica das bandas foi quantificada com o programa Scion Image<sup>®</sup> (Frederick, MD, EUA) e os níveis de fosforilação foram obtidos pela relação das densidades ópticas das formas fosforilada/total (POSSER et al., 2007).

### **3.1.6 Análise Estatística**

Os dados são expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado 100%). Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do teste Duncan quando apropriado. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## **3.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO* COM MANGANÊS**

### **3.2.1 Reagentes**

Os anticorpos primários anti-ERK1/2, anti p38<sup>MAPK</sup>, anti-JNK1/2 e o cloreto de manganês (MnCl<sub>2</sub>) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os anticorpos anti-fosfo-CREB, anti-CREB, anti-fosfo-ERK1/2, anti-fosfo-p38<sup>MAPK</sup>, anti-fosfo-JNK1/2, anti-AKT, anti-fosfo-AKT, anti-DARPP-32, anti-fosfo-DARPP-32-Thr-34 e anti-fosfo-DARPP-32-Thr-75 foram adquiridos da Cell Signaling (Beverly, MA, EUA). Anti-β-actina foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). Acrilamida, bis-

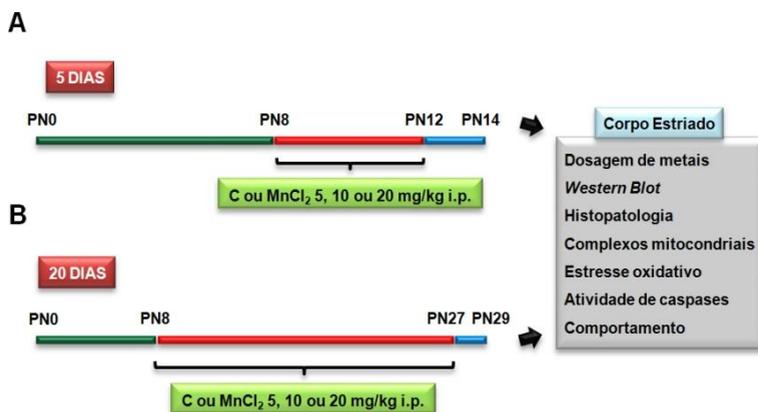
acrilamida,  $\beta$ -mercaptoetanol, Hybond<sup>®</sup> nitrocelulose, Amersham Hyperfilm ECL<sup>®</sup>, dodecil sulfato de sódio (SDS), Tris, anticorpo secundário (anti-coelho-IgG conjugado à peroxidase) e reagentes de detecção ECL<sup>®</sup> foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, EUA). Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox<sup>®</sup>) foi obtido da Calbiochem (La Jolla, CA, EUA). O substrato fluorescente N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina (DEVD-AMC) foi obtido da Biomol (Plymouth Meeting, PA, EUA). 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH2-DA) foi adquirido da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Todos os outros reagentes utilizados eram de grau analítico.

### 3.2.2 Animais

Nos protocolos experimentais *in vivo* foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar fornecidos pelo Biotério Central da UFSC, com idades entre oito e 29 dias pós-natal para o estudo das ações do Mn sobre o SNC. Os animais foram mantidos (sala climatizada,  $23 \pm 1$  °C, ciclo claro/escuro 12 h, ração comercial e água à vontade), manipulados e mortos de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (PP 00345/CEUA-UFSC).

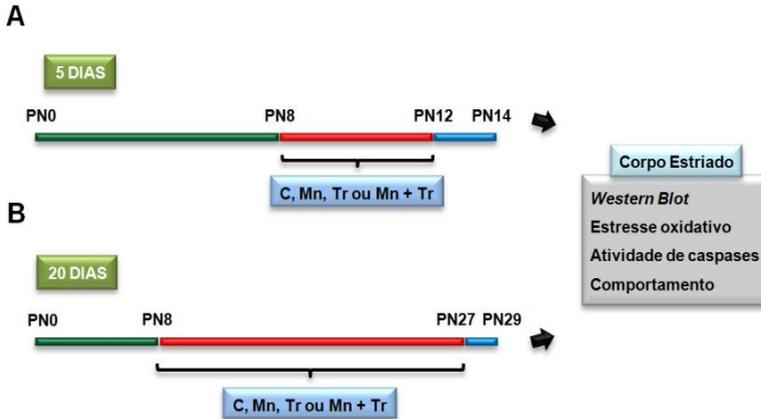
### 3.2.3 Tratamentos *in vivo* com Manganês

Para a realização dos experimentos *in vivo*, foram utilizadas ninhadas de oito animais (divididos em quatro grupos; dois filhotes para cada grupo). Os grupos foram tratados via intraperitoneal (i.p.) com salina (NaCl a 0,9%; grupo controle) ou MnCl<sub>2</sub> 5, 10 ou 20 mg/Kg, durante cinco ou 20 dias. Os tratamentos de cinco dias foram realizados no período de desenvolvimento entre o 8° e 12° dia pós-natal (PN8-12), conforme descrito por Rocha et al. (1995) e Cordova et al. (2004). Os animais foram mortos no 14° dia pós-natal (PN14), para realização das análises neuroquímicas (FIGURA 7A). Nos experimentos de exposição ao Mn por 20 dias, os animais foram tratados entre o 8° e o 27° dia pós-natal (PN8-27), e foram mortos com 29 dias de idade (PN29) (FIGURA 7B). Os pesos corporais dos animais foram monitorados diariamente.



**Figura 7.** Delineamento do protocolo de exposição *in vivo* ao manganês. (A) Tratamento de cinco dias. (B) Tratamento de 20 dias.

Com o objetivo de verificar o envolvimento do estresse oxidativo nos mecanismos de neurotoxicidade do Mn, foi utilizado o antioxidante Trolox<sup>®</sup> concomitantemente com o metal (PENN; TOLMAN; BULLARD, 1997; KUMAR; SUGENDRAN; VIJAYARAGHAVAN, 2001; USUKI et al., 2001; DORFMAN et al., 2006). Para isso, utilizaram-se ninhadas de oito animais, divididas em quatro tratamentos (dois filhotes para cada grupo): salina (NaCl 0,9% i.p., controle),  $MnCl_2$  20 mg/kg i.p., Trolox<sup>®</sup> 1 mg/kg i.p.,  $MnCl_2$  20 mg/kg mais Trolox<sup>®</sup> 1 mg/kg ip (injetado 10 min. antes do Mn) (FIGURA 8). Os tratamentos também foram realizados nos mesmos períodos de idade, como descrito acima. Para os experimentos comportamentais, os animais foram mantidos até os 37 dias de idade, objetivando uma padronização etária para análises das alterações e obtenção de um mínimo desenvolvimento corporal para os testes.



**Figura 8.** Delineamento do tratamento *in vivo* com manganês e Trolox<sup>®</sup>. (A) Tratamento de cinco dias. (B) Tratamento de 20 dias.

### 3.2.4 Dosagem de Metais no Encéfalo

As concentrações teciduais de Mn e Fe foram determinadas por espectroscopia de absorção atômica (Varian AA240<sup>®</sup>, Varian, Inc., Palo Alto, CA, EUA), de acordo com Fitsanakis et al. (2008) pela equipe do professor Michael Aschner, da Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, EUA. O estriado, o hipocampo e o córtex cerebral foram digeridos em ácido nítrico ultra puro (em diluição 1:10 peso/volume) por 48-72 h em banho-Maria (60 °C). Cem µL de tecido digerido foram elevados a 1 mL de volume total com ácido nítrico 2%. A mistura foi então centrifugada e o sobrenadante foi utilizado para análise. Fígado de bovino (10 µg de Mn/L) foi digerido em ácido nítrico ultra puro, e usado como um padrão interno para análise. Os dados são expressos em µg do metal/g de tecido e os valores são apresentados como média ± E.P.M.

### 3.2.5 Western Blot

Nos estudos da ação *in vivo* do Mn, ao final dos tratamentos o corpo estriado foi dissecado para análise. Para o preparo das amostras, a estrutura foi homogeneizada em Tampão de Amostra

(200 mM de Tris, 40 mM de EDTA, 4% de SDS, pH 6,8), relação p/v (0,25 g tecido/mL) e o homogenato foi fervido por 5 min. Sobre essa solução de amostra foi adicionado Tampão de Diluição na proporção de 1:4 (40% glicerol, 50 mM de Tris e azul de bromofenol) e  $\beta$ -mercaptoetanol na concentração final de 5% (v/v). As proteínas totais das amostras foram dosadas pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977) e foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE; miniVE Vertical Electrophoresis System<sup>®</sup>, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). As proteínas foram transferidas para nitrocelulose em sistema “semidry” (TE 70 SemiPhor<sup>®</sup> Unit, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) e as formas totais e fosforiladas foram identificadas através do uso de anticorpos específicos para ERK1/2, JNK1/2, p38<sup>MAPK</sup>, AKT, CREB e DARPP-32 (Thr-34 e Thr-75) (CORDOVA et al., 2004; LEAL et al., 2007). A revelação dos *immunoblottings* foi realizada através de quimiluminescência e a densitometria das bandas foi determinada com o uso do programa Scion<sup>®</sup> Image (Frederick, MD, EUA) e os níveis de fosforilação foram obtidos pela relação das densidades ópticas das formas fosforilada/total (POSSER et al., 2007). Os resultados estão expressos como porcentagem da razão fosforilada/total, em relação ao controle (100%)  $\pm$  E.P.M.

### **3.2.6 Histopatologia**

Para avaliação morfológica de possíveis alterações degenerativas e de morte celular no SNC foi utilizada a técnica de rotina para preparação de cortes histopatológicos do encéfalo dos ratos ao final dos tratamentos (PN14 e PN29). As amostras foram processadas pela equipe do professor Célio Pilati do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, Brasil, e avaliadas de forma independente por dois patologistas. O SNC dos animais tratados foi coletado e fixado em paraformaldeído 4% tamponado, durante uma semana. Após este período, os tecidos foram desidratados gradativamente em etanol e diafanizados em xilol. Posteriormente, foram incluídos em parafina para confecção dos blocos, de onde se obteve cortes com 5  $\mu$ m de espessura em micrótomo rotativo para parafina. Os cortes foram desparafinados, reidratados e corados com hematoxilina e eosina, sendo novamente desidratados e montados sobre lâmina e fixados

com lamínula e bálsamo do Canadá (GRIMALDI FILHO, 1981; TOLOSA et al., 2003). Todas as áreas do encéfalo foram analisadas e o córtex cerebral, estriado e hipocampo foram fotografados em magnificação de 40x.

### 3.2.7 Atividade de Complexos da Cadeia Respiratória

Frações mitocondriais foram preparadas a partir do corpo estriado dos ratos ao final dos tratamentos (PN14 e PN29), de acordo com Latini et al. (2005). As estruturas foram homogeneizadas em 10 volumes de tampão fosfato de potássio 5 mM, pH 7,4, contendo 0,3 M de sacarose, 5 mM de MOPS, 1 mM de EGTA e 0,1% de albumina de soro bovino. O homogeneizado foi centrifugado a 1.500 x g por 10 min. a 4 °C, e o *pellet* foi descartado. O sobrenadante foi então centrifugado por mais 10 min. a 15.000 x g, 4 °C, e o *pellet* foi resuspenso no mesmo tampão. Frações mitocondriais rompidas foram obtidas por congelamento/descongelamento triplo e armazenadas a -20 °C. As atividades de NADH desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II) e citocromo c oxidase (complexo IV) foram analisadas segundo métodos descritos por Schuck et al. (2007) com o uso do leitor de placas Infinite<sup>®</sup> M200 (TECAN, Männedorf, Suíça). As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram calculados como nmol min<sup>-1</sup>/mg de proteína<sup>-1</sup> ou mmol min<sup>-1</sup>/mg de proteína<sup>-1</sup> ± E.P.M.

### 3.2.8 Determinação de EROs e F<sub>2</sub>-IsoPs

Ao término dos períodos de tratamento com Mn e/ou Trolox<sup>®</sup> (ratos PN14 e PN29), os animais foram mortos e as estruturas de interesse dissecadas para análise da geração de EROs e de F<sub>2</sub>-isoprostanos (F<sub>2</sub>-IsoPs). Para avaliação da geração de EROs, o corpo estriado dos animais foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 0,1% de Triton X-100 e 150mM de NaCl na proporção de 1:5 (p/v). A homogeneização foi realizada a 4 °C, seguida de centrifugação a 10.000 x g durante 10 min. A determinação de EROs nos sobrenadantes dos homogenatos foi realizada em placas de 96 poços através da incubação de 0,01 mg de proteína da amostra diluída em PBS com 40 nM de DCFH2-DA, durante 30 minutos a 37 °C, ao abrigo da luz. A quantificação da fluorescência verde foi realizada em espectrofluorímetro (LS55,

Perkin-Elmer, Boston, MA, EUA) utilizando os comprimentos de onda de excitação/emissão de 480/520 nm (SAUER et al., 2003). Uma curva analítica de DCF (3 a 25.000 pM) foi construída para a análise dos resultados, os quais foram posteriormente normalizados para serem expressos em porcentual do controle (100%)  $\pm$  E.P.M.

Como a produção excessiva de EROs pode induzir a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados de membrana, resultando em muitos produtos de peroxidação lipídica, como os F<sub>2</sub>-IsoPs, foi avaliada a produção da substância no corpo estriado dos animais tratados. As amostras foram analisadas pela equipe do professor Michael Aschner, da Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, EUA. Os F<sub>2</sub>-IsoPs são considerados biomarcadores de estresse oxidativo em estudos *in vitro* e *in vivo* (MILATOVIC et al., 2009; MILATOVIC; MONTINE; ASCHNER, 2011). F<sub>2</sub>-IsoPs totais foram determinados pelo método de diluição de isótopos estáveis, com detecção por cromatografia gasosa/espectrometria de massa e monitoramento do íon seletivo, como descrito anteriormente (MORROW; ROBERTS, 1999; MILATOVIC; MONTINE; ASCHNER, 2011). F<sub>2</sub>-IsoPs totais foram medidos no estriado dissecado dos animais expostos *in vivo* a diferentes doses de Mn e/ou Trolox<sup>®</sup> e armazenadas a -80 °C até a análise. As estruturas cerebrais foram homogeneizadas em solução de Folch e a camada de lipídeos extraída por evaporação com clorofórmio (MILATOVIC; ASCHNER, 2009; MILATOVIC; MONTINE; ASCHNER, 2011) e, em seguida, submetidos à saponificação química utilizando KOH 15% para hidrolisar os F<sub>2</sub>-IsoPs ligados. Os homogeneizados foram ajustados para pH 3, seguido pela adição de 0,1 ng de 15-F<sub>2</sub> $\alpha$ -IsoP-d4 como padrão interno. Os F<sub>2</sub>-IsoPs foram posteriormente purificados por C18 e extração de sílica Sep-Pak e por cromatografia em camada delgada. Foram então analisados por éster pentafluorobenzil, um derivado do éter trimetilsilil, através de cromatografia em fase gasosa, espectrometria de massa com ionização química de íons negativos.

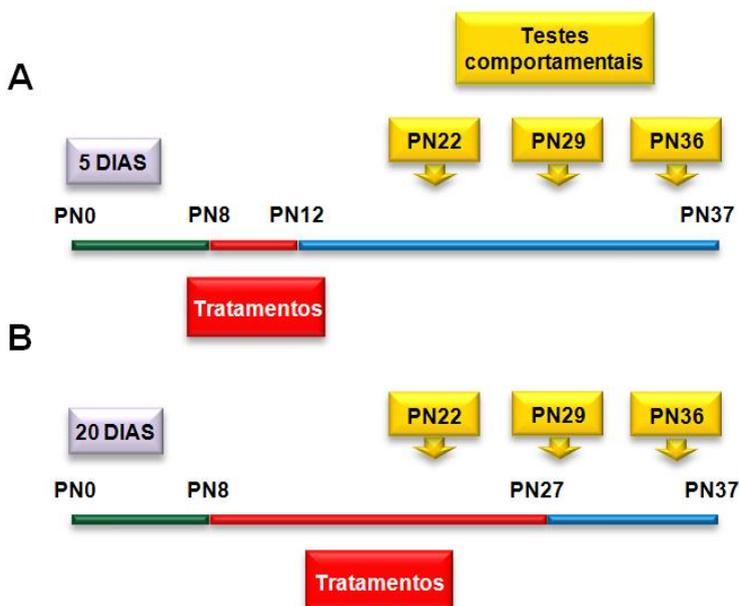
### 3.2.9 Atividade de Caspase

Para avaliação da atividade da caspase-3 os estriados foram homogeneizados a 4 °C na proporção 1:5 (p/v) em tampão contendo HEPES 10 mM (pH 7,4), KCl 42 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, PMSF 1 mM, EDTA 100  $\mu$ M, EGTA 100  $\mu$ M, pepstatina A 1  $\mu$ g/ml, leupeptina 1

µg/ml, aprotinina 5 µg/ml, CHAPS 0,5% e DTT. Posteriormente, 25 µl deste homogenato foram adicionados a 75 µl do meio de reação contendo HEPES 25 mM (pH 7,4), CHAPS 1%, EDTA 1 mM, sacarose 10% e DTT 3 mM e 10 µM do substrato fluorogênico para caspase-3 Ac-DEVD-AMC e incubados por 120 minutos a 37 °C. A atividade da caspase-3 foi avaliada através da produção do AMC fluorescente monitorada em fluorímetro (LS55, Perkin-Elmer, Boston, MA, EUA) utilizando o comprimento de onda para excitação/emissão de 380/465 nm. Os valores obtidos nas amostras foram subtraídos da fluorescência dos brancos correspondentes sem substrato (ZUSE et al., 2007). O resultado foi expresso em porcentual em relação ao controle (100%) ± E.P.M..

### **3.2.10 Avaliação do Desempenho de Coordenação Motora**

Para os testes de comportamento motor, os animais foram mantidos até o dia PN37, objetivando a obtenção de uma idade mínima para o desenvolvimento motor e fornecer avaliações precoces de efeitos tardios da exposição ao Mn. Todos os animais foram testados em rotarod com 22, 29 e 36 dias de idade (3, 4 e 5 semanas de idade) e no teste do campo aberto com 37 dias de idade (FIGURA 9). Os animais foram habituados à sala de ensaio durante 1 h antes de iniciar os testes comportamentais, que foram realizados durante a fase clara do ciclo circadiano (10:00-17:00 h).



**Figura 9.** Delineamento dos períodos de tratamento e testes comportamentais.

(A) Tratamentos de cinco dias. (B) Tratamentos de 20 dias.

### 3.2.10.1 Teste do Rotarod

O rotarod foi utilizado para avaliar os efeitos dos tratamentos com Mn e/ou Trolox<sup>®</sup> na coordenação motora dos animais (AGUIAR et al., 2009). O aparelho rotarod de aceleração (Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil) é composto de um cilindro de metal com ranhuras (seis cm de diâmetro) e separado em compartimentos com nove cm de largura, elevados a 16 cm.

A tarefa consistiu de duas etapas: condicionamento (treino) e teste (JIANG et al., 2004). Primeiramente, os animais foram condicionados no cilindro estacionário durante 30 s, seguido por um período de 90 s no cilindro com rotação estacionária em cinco RPM. Os animais que falhavam nesta primeira etapa ainda eram submetidos à no máximo duas sessões adicionais de condicionamento. A falha na terceira sessão de condicionamento foi critério de exclusão para as sessões de teste. Com este procedimento,

os animais apresentaram valores basais semelhantes para todos os grupos.

Trinta minutos após a última sessão de condicionamento, os animais foram testados no rotarod e o tempo de latência da queda foi gravado para determinar o grau de coordenação motora. O teste consistiu de duas sessões diárias do rotarod com duração máxima de 5 min, intervalos de 30 minutos entre as duas sessões, iniciando à velocidade de 5 RPM e com aumento de 0,1 RPM/s. Todos os animais foram testados com 22, 29 e 36 dias de idade (3, 4 e 5 semanas de idade).

### 3.2.10.2 Teste do Campo Aberto

Para avaliarmos possíveis alterações motoras induzidas pelos diferentes tratamentos utilizados (AGUIAR et al., 2009), os animais foram testados no campo aberto circular (50 cm altura x 60 cm diâmetro), confeccionado em acrílico transparente (Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil), posicionado dentro de uma sala com câmera de vídeo no teto. O experimento com duração de 10 min foi gravado e a distância percorrida, a velocidade média, o número de levantamentos (*rearing*) e de limpezas (*grooming*) foram avaliados com o software de análise comportamental ANY-maze<sup>®</sup> (Stoelting, Wood Dale, Illinois, EUA).

### 3.2.11 Análise Estatística

Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. e a significância estatística foi determinada pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste *post-hoc* de Duncan ou Newman-Keuls quando apropriado. O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Dunn *post-hoc* foi aplicado para a análise do rotarod. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

O presente trabalho resultou na confecção de três artigos científicos, aceitos ou submetidos à publicação em periódicos científicos de circulação internacional, listados abaixo:

1) Short-term exposure to zinc induces phosphorylation of MAPKs and AKT in immature hippocampal slices, submetido à “Archives of Toxicology”.

2) *In vivo* manganese exposure modulates ERK, AKT and DARPP-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function, aceito para publicação na “PLOS ONE”, fevereiro de 2012.

3) Oxidative stress is involved in striatal neurotoxicity of manganese-exposed developing rats, em revisão final para submissão.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 NEUROTOXICIDADE *IN VITRO* DO ZINCO

A neurotoxicidade do Zn no hipocampo imaturo não tem sido investigada. Os níveis sinápticos de Zn no hipocampo têm uma variação ao longo do desenvolvimento, sendo que na idade PN16 se aproxima de 10% do que se encontra em ratos adultos (FREDERICKSON et al., 2006). Assim, a exposição de neurônios hipocâmpais de indivíduos imaturos à níveis excessivos de Zn pode resultar em danos importantes.

O foco principal deste trabalho foi estudar as ações do Zn na viabilidade celular e na fosforilação de MAPKs e AKT no hipocampo de ratos imaturos (PN14). Para isso, utilizamos fatias de hipocampo, em um protocolo experimental em que a citoarquitetura tecidual, a matriz extracelular e as conexões intracelulares estão preservadas, com as interações entre células neuronais e gliais mantidas de modo similar a uma situação *in vivo* (GONG et al., 2001; CORDOVA et al., 2004; CORVOL et al., 2005; MOLZ et al., 2005; NISWANDER; DOKAS, 2006).

Nossos resultados demonstram que o Zn (100  $\mu\text{M}$ ) por 2 h é neurotóxico nas fatias hipocâmpais, uma vez que diminuiu a viabilidade celular. Além disso, nesta concentração o Zn estimulou a fosforilação de p38<sup>MAPK</sup>, ERK1/2 e AKT e provocou uma diminuição na fosforilação de JNK1/2.

A neurotoxicidade Zn (entre 80-150  $\mu\text{M}$ ) tem sido bem demonstrada em culturas de neurônios corticais, em que o metal, de forma dependente da concentração, causou a morte neuronal medida pela liberação de LDH (CHEN; LIAO, 2003a,b). Resultados similares também foram encontrados em culturas de astrócitos corticais (KIM; JOE; HAN, 2003). Além disso, em células PC12 e células embrionárias diferenciadas e imortalizadas do hipocampo, o Zn (por 12-24 h) provocou uma queda significativa na viabilidade celular, medidos pelo teste do MTT (SEO et al., 2001; MIN; LEE; CHUNG, 2007). Nosso estudo está de acordo com observações anteriores, mostrando que os efeitos do Zn em fatias de hipocampo imaturo, também resultam em neurotoxicidade. Além disso, os efeitos do Zn em fatias imaturas sobre a viabilidade celular ocorrem em um período de exposição relativamente curto (2 h).

O mecanismo de redução da viabilidade celular pelo Zn pode envolver muitos eventos, tais como a queda nos níveis de glutathiona (GSH) (CHEN; LIAO, 2003a,b; KIM; JOE; HAN, 2003), estresse oxidativo e diminuição na produção de energia pela célula, pela inibição de enzimas mitocondriais (DINELEY et al., 2003). Portanto, a queda da viabilidade celular nas fatias dos ratos em desenvolvimento, medido pelo teste do MTT, pode ser secundária a estes efeitos.

Estudos demonstram que Zn (100  $\mu$ M) pode modular as vias das MAPKs e PI3K/AKT em culturas de células (AN et al., 2005b). No entanto, não há demonstração sistemática destes eventos em fatias de cérebro, especialmente em um período crucial do desenvolvimento, como o 14<sup>o</sup> dia pós-natal (COSTA et al., 2004; FREDERICKSON; KOH; BUSH, 2005). Os estudos que mostram a ativação de ERK1/2 e AKT em fatias de cérebro adulto expostas *in vitro* ao Zn, foram realizados com uma concentração muito elevada do metal (1 mM) (AN et al., 2005b). No entanto, neste estudo demonstramos que Zn, numa faixa de concentração que pode ser alcançada nas sinapses do hipocampo em algumas situações patológicas (FREDERICKSON; KOH; BUSH, 2005), diminui a viabilidade das fatias hipocampais e ativa ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup> e AKT.

A p38<sup>MAPK</sup> tem sido classicamente implicada nos processos de morte celular em vários modelos experimentais. No entanto, no SNC a p38<sup>MAPK</sup> pode desempenhar funções importantes no desenvolvimento, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (MIELKE; HERDEGEN, 2000; HARPER; LOGRASSO, 2001; TAKEDA; ICHIJO, 2002; AOUADI et al., 2006). Em nosso estudo, o inibidor de p38<sup>MAPK</sup>, SB203580, aumentou a neurotoxicidade dependente de Zn, sugerindo que em fatias hipocampais de ratos em desenvolvimento a via da p38<sup>MAPK</sup> pode desempenhar um papel neuroprotetor. Curiosamente, observamos resultados semelhantes no mesmo protocolo em resposta à exposição ao cádmio (Cd) (RIGON et al., 2008). Por outro lado, a incubação de fatias com os inibidores de MEK1/2 e de PI3K não alterou a viabilidade celular (dados não mostrados), mas efetivamente inibiu os aumentos de fosforilação de ERK1/2 e AKT induzidos pelo Zn. Estes resultados sugerem que a ativação de ERK1/2 e AKT são eventos paralelos que não estão diretamente relacionados com a morte celular aguda observada nas fatias hipocampais expostas ao Zn.

Em culturas de neurônios corticais, células IIC9 (fibroblastos de embriões de hamster chinês) e células PC12, o Zn causou morte de forma dependente da ativação de ERK1/2 (PARK; KOH, 1999; SEO et al., 2001; KLEIN et al., 2006). Por outro lado, em células de neuroblastoma SH-SY5Y, a ativação de ERK1/2 pelo Zn foi relacionada a um efeito anti-apoptótico (AN et al., 2005a). Além disso, a ativação de p38<sup>MAPK</sup> em culturas de células corticais, PC12 e células de neuroblastoma não foi diretamente associada a alterações na viabilidade celular (EOM et al., 2001; DANIELS et al., 2004; AN et al., 2005b). A via da PI3K/AKT também pode ser ativada por Zn em células de neuroblastoma e células embrionárias hipocampais, sendo relacionada com a indução de morte celular (AN et al., 2005a,b; MIN; LEE; CHUNG, 2007).

Estudos demonstram que o Zn (100  $\mu$ M) pode ativar JNK1/2 via PI3K em culturas de células corticais (EOM et al., 2001). Por outro lado, encontramos uma inibição de JNK1/2 pelo Zn 100  $\mu$ M. Williams et al. (2004) demonstraram que o complexo Zn-histidina pode inibir a fosforilação de JNK1/2 pela diminuição do estresse oxidativo. Além disso, foi demonstrado que a ativação de PI3K/AKT pela insulina provoca a inibição da fosforilação de JNK1/2 (HUI et al., 2005). Portanto, como observamos uma forte ativação de AKT por Zn (100  $\mu$ M), é possível que em fatias de hipocampo imaturo a ativação de AKT poderia conduzir uma inibição da fosforilação JNK1/2.

É evidente que os efeitos do Zn em MAPKs e PI3K/AKT, bem como as suas conseqüências, podem depender do tipo celular, da concentração do metal e do período de incubação, resultando em indução de morte celular ou em efeitos anti-apoptóticos (PARK; KOH, 1999; SEO et al., 2001; WILLIAMS et al., 2004; AN et al., 2005a; KLEIN et al., 2006; MIN; LEE; CHUNG, 2007). Nossos resultados contribuem para o entendimento de que, em fatias de hipocampo imaturo, Zn de maneira tempo e concentração dependente pode causar diminuição da viabilidade celular, paralela à modulação de vias de sinalização importantes, envolvidas na regulação da neuroplasticidade hipocampal, desenvolvimento, sobrevivência ou vias de morte celular.

As concentrações de Zn utilizadas neste trabalho são muito semelhantes às encontradas nas sinapses durante eventos excitotóxicos graves. Além disso, estão de acordo com a concentração de metal utilizada em experimentos *in vitro* para

avaliação da neurotoxicidade do Zn. Por fim, entendemos que nossos achados são clinicamente relevantes, porque sugerem que uma sobrecarga de Zn, que pode ocorrer por hipóxia ou convulsões prolongadas no início da vida pós-natal ou em fase intrauterina, pode implicar em perdas celulares e alterações de vias de sinalização importantes para o desenvolvimento. Esses aspectos podem ter conseqüências importantes, pois poderiam alterar o curso do desenvolvimento fisiológico do hipocampo e provocar prejuízos funcionais ou predispor a processos degenerativos na vida adulta ou no período senil.

## 5.2 NEUROTOXICIDADE *IN VIVO* DO MANGANÊS

O Mn é necessário para os organismos vivos, como um elemento traço. Sua deficiência é incomum, pois está presente naturalmente nos alimentos. Entretanto, o excesso de Mn em conseqüência de uma exposição crônica, ou mesmo aguda, não é raro e resulta em processos patológicos de diferentes tipos e severidades, primariamente consistindo de danos irreversíveis ao SNC (LAZRISHVILI et al., 2009). A intoxicação de indivíduos adultos com o Mn produz desordens neurológicas com características sintomáticas da doença de Parkinson (ROTH, 2009). Evidências histológicas de encéfalos de animais experimentais e humanos mortos por envenenamento crônico por Mn têm demonstrado que as mais marcantes lesões com morte neuronal ocorrem em estruturas do sistema dopaminérgico nigro-estriatal (LAZRISHVILI et al., 2009). Entretanto, uma questão de grande relevância na neurotoxicidade do Mn é o entendimento dos efeitos do metal no organismo em desenvolvimento. Atualmente, diversos trabalhos têm enfatizado a quantidade excessiva de Mn em produtos comerciais para nutrição parenteral, fornecidos principalmente à crianças lactentes, e a ocorrência de distúrbios neurológicos (SUZUKI et al., 2003; ERIKSON et al., 2007; HARDY; GILLANDERS; HARDY, 2008; HARDY, 2009; HARDY; MENENDEZ; MANZANARES, 2009). A literatura mostra que não existem estudos considerando as influências da toxicidade do Mn no SNC em desenvolvimento, sobre a modulação de vias de sinalização intracelular e suas conseqüências. Os dados existentes relatam apenas distúrbios como estresse oxidativo, alterações em neurotransmissores e receptores e

anormalidades comportamentais (DORMAN et al., 2000; WEBER et al., 2002; ERIKSON et al., 2007; ÁVILA et al., 2008; McDOUGALL et al., 2008; WASSERMAN et al., 2008; LUCCHINI; ZIMMERMAN, 2009; MENEZES-FILHO et al., 2009; MORENO et al., 2009a,b). Nosso estudo mostra pela primeira vez no SNC em desenvolvimento a modulação *in vivo* pelo Mn de diversas vias de sinalização intracelular como MAPKs, AKT e DARPP-32.

Com o protocolo experimental utilizado no estudo, com exposição ao Mn entre os dias PN8-12 (cinco dias) ou PN8-27 (20 dias), foi observada uma grande acumulação de Mn no encéfalo dos ratos tratados com o metal. Estudos mostram que as estruturas encefálicas primariamente afetadas na intoxicação por Mn são os núcleos da base, como o corpo estriado, o globo pálido e a substância negra (YAMADA et al., 1986; NORMANDIN et al., 2002; ROTH, 2009). Entretanto, nós observamos aumentos significativos nos níveis de Mn também no hipocampo e no córtex cerebral, além do estriado, nos animais PN14 e PN29. Porém, nossos dados corroboram com estudos prévios, que demonstram que o Mn também pode acumular em outras áreas do SNC além dos núcleos da base, tanto em animais jovens quanto em adultos (DORMAN et al., 2000; NORMANDIN et al., 2002; MORELLO et al., 2008; MORENO et al., 2009a; SCHNEIDER et al., 2009). Diversos trabalhos relatam uma maior capacidade de acumulação do metal no SNC de humanos e animais em desenvolvimento (ERIKSON et al., 2007; HAFEMAN et al., 2007; HARDY, 2009; ROTH, 2009). Adicionalmente, estudos relacionam baixos níveis corporais de Fe com aumento da susceptibilidade à intoxicação pelo Mn, sugerindo que o metal compete com o Fe no transportador transferrina e atravessa a barreira hemato-encefálica imatura com facilidade (MENEZES-FILHO et al., 2009). Assim, indivíduos em período neonatal ou estados anêmicos são mais sensíveis à toxicidade do Mn, absorvendo e acumulando mais metal no SNC (ERIKSON et al., 2007). Em nosso trabalho, os tratamentos de ambos os grupos de ratos imaturos (expostos por 5 ou 20 dias) iniciaram com a mesma idade (PN8). Entretanto, nos animais mais jovens (PN14) observou-se um aumento significativo do acúmulo de Mn em todas as doses utilizadas, enquanto que nos animais PN29 houve acúmulo significativo do metal somente nas doses mais altas (10 e 20 mg/kg). Esta mudança no perfil dos níveis de Mn pode ocorrer devido à maturação da barreira hemato-encefálica e/ou aumento fisiológico gradativo dos níveis de Fe no

rato juvenil, possibilitando um efeito compensatório no acúmulo. O Mn possui várias características em comum com o Fe que incluem: ambos são metais de transição, com valências de +2 e +3 em condições fisiológicas e têm raios iônicos similares. Além disso, Fe e Mn se ligam fortemente à transferrina e se acumulam nas mitocôndrias. Baixos níveis de Fe estão associados a aumentos de captação de Mn e de retenção no sangue (ROTH, 2006).

Além do acúmulo de Mn, houve mudanças nos níveis encefálicos de Fe nos animais tratados com o metal. Observou-se aumento do Fe no corpo estriado dos animais PN14 e PN29, nas doses de 10 e 20 mg/kg e no córtex cerebral dos animais PN14 tratados com a dose mais alta de Mn (20 mg/kg). Curiosamente, vários estudos demonstram diminuição dos níveis de Fe no cérebro em animais expostos a níveis excessivos de Mn (GARCIA et al., 2006; GUILARTE et al., 2006; GUILARTE; CHEN, 2007; HANSEN et al., 2009; FITSANAKIS et al., 2010). Entretanto, estes animais apresentaram aumentos na expressão de Tf no plasma e do transportador DMT-1 e TfR no cerebelo, córtex, hipocampo, mesencéfalo e estriado, além de aumento na capacidade de ligação da Tf ao Fe (GARCIA et al., 2006), o que possivelmente poderia explicar os aumentos dos níveis de Fe observados no nosso estudo.

Estudos relacionam desequilíbrios em outros metais de transição (Fe, Cr, Cu, Zn, Co, Al) nos núcleos da base de animais expostos ao Mn, com alterações comportamentais (FITSANAKIS et al., 2008; MORENO et al., 2009b), devido principalmente a uma maior predisposição à ocorrência de estresse oxidativo e morte neuronal, ocasionados por favorecimento de reações de oxidação (MORENO et al., 2009b). Nesse aspecto, nos animais PN14 observou-se a ocorrência de aumento da produção de EROs, nas doses de 10 e 20 mg/kg, em parte, possivelmente, pelo aumento dos níveis de ferro. Diversos trabalhos demonstram o desencadeamento de estresse oxidativo pelo Mn, em diferentes protocolos *in vitro* e *in vivo* (ROTH; GARRICK, 2003; ZHANG; FU; ZHOU, 2004; GUNTER et al., 2006; TAMM; SABRI; CECCATELLI, 2008; ZHANG et al., 2008; BENEDETTO; AU; ASCHNER, 2009; MILATOVIC et al., 2009; MILATOVIC et al., 2011). Tem sido proposto que a indução da formação de EROs é o mecanismo principal de neurotoxicidade do Mn (ÁVILA et al., 2008; ROTH, 2009; PARK; PARK, 2010; MILATOVIC et al., 2011), desencadeada por prejuízos à função mitocondrial e resultando em morte celular, tanto apoptótica quanto necrótica (ROTH; GARRICK,

2003; ZHANG; FU; ZHOU, 2004; TAMM; SABRI; CECCATELLI, 2008; YIN et al., 2008; MILATOVIC et al., 2009). Nesse sentido, alguns estudos mostram que o Mn é rapidamente captado pelas mitocôndrias, onde promove a acumulação de cálcio pela inibição de exportadores dependentes ou não de sódio, ativação dos poros de permeabilidade de transição e interferência na fosforilação oxidativa, resultando em depleção de ATP (ROTH, 2009). Em nosso estudo, os animais PN14 expostos ao Mn na dose de 10 e 20 mg/kg apresentaram aumentos da atividade dos complexos mitocondriais I e II. Porém, nos animais PN29 não houve alterações significativas na atividade dos complexos mitocondriais (dados não mostrados).

Adicionalmente aos efeitos mitocondriais da neurotoxicidade do Mn, a produção aumentada de EROs pode induzir a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados de membrana, gerando uma ampla gama de produtos da peroxidação dos lipídios. Uma das famílias de produtos são os F<sub>2</sub>-IsoPs, moléculas tipo prostaglandina produzidas pela peroxidação do ácido aracdônico (MORROW; ROBERTS, 1999; MILATOVIC; ASCHNER, 2009; MILATOVIC; MONTINE; ASCHNER, 2011). Em nosso estudo, o Mn aumentou significativamente a produção de F<sub>2</sub>-IsoPs nos animais expostos por 5 e por 20 dias ao metal, sugerindo que além da produção de EROs e disfunção mitocondrial, há peroxidação dos lipídios de membrana (MILATOVIC et al., 2009; MILATOVIC et al., 2011). É interessante ressaltar que o Mn também induziu aumento na atividade de caspases nos ratos PN14 e PN29, sugerindo que a exposição *in vivo* de ratos imaturos ao Mn altera no corpo estriado a função mitocondrial, com produção de EROs, F<sub>2</sub>-IsoPs e subsequente indução de morte celular apoptótica.

Estudos demonstram que o Mn se acumula preferencialmente na matriz mitocondrial (GAVIN; GUNTER; GUNTER, 1990; TJALKENS et al., 2006; MORELLO et al., 2008). Quando um excesso de EROs é produzido na mitocôndria, os sistemas de defesa antioxidante são exauridos e um estado de estresse oxidativo se estabelece, podendo levar ao dano mitocondrial. A produção de EROs durante a toxicidade química muitas vezes leva à alterações das funções ligadas à energia (inibição da respiração induzida por peroxidação de lipídios, colapso do potencial de membrana, do transporte de íons). Essas mudanças podem prejudicar a capacidade da mitocôndria para manter diversas funções cruciais para a viabilidade celular. A diminuição da produção de energia mitocondrial, associada ao aumento do estresse oxidativo crônico

pode ativar poros de permeabilidade de transição mitocondrial e dar início à apoptose (ZHANG; FU; ZHOU, 2004). Fatores pró-apoptóticos dependentes da mitocôndria normalmente associados à neurotoxicidade do Mn incluem a liberação de citocromo *c*, ativação de caspase 3 e fragmentação do DNA (LATCHOUMYCANDE et al., 2005). A fim de investigar a participação do estresse oxidativo na neurotoxicidade do Mn sobre o corpo estriado dos ratos imaturos expostos ao metal, nós utilizamos o antioxidante Trolox<sup>®</sup> concomitantemente com o metal. Trolox<sup>®</sup> é um mimético sintético e solúvel da vitamina E, e pode agir como um seqüestrador de radicais (FRANKEL, 2005). Vários estudos têm demonstrado que o Trolox<sup>®</sup> age como um antioxidante melhor do que a vitamina E (SAGACH et al., 2002; RASPOR et al., 2005), devido à seu melhor acesso aos compartimentos hidrofílicos das células, bem como sua capacidade de prender dois radicais peróxil lipídicos de membrana por molécula (BARCLAY; VINQVIST, 1994). Dessa forma, em nossos estudos foi observado redução significativa na produção de EROs (PN8-12), F<sub>2</sub>-IsoPs e na atividade de caspases (PN8-27), sugerindo a participação do estresse oxidativo, pelo menos em parte, no processo de neurotoxicidade do Mn. Nossos resultados estão em acordo com estudos prévios que mostram a prevenção da produção de EROs por antioxidantes como N-acetilcisteína (NAC), glutatona (GSH) e vitamina C em preparações mitocondriais expostas ao Mn (ZHANG; FU; ZHOU, 2004). Além disso, tratamentos com antioxidantes como componentes organotelúricos e NAC são efetivos na proteção contra os efeitos tóxicos do Mn no encéfalo de ratos e em protocolos *in vitro* de astrócitos em cultura (HAZELL et al., 2006; ÁVILA et al., 2010).

Apesar da ocorrência de aumento da atividade de caspases no corpo estriado, observado no nosso estudo, não foram observadas alterações histopatológicas nos ratos. Diferente da morte celular por necrose, a apoptose caracteristicamente ocorre em células individuais ou em pequenos aglomerados de um tipo específico de células, possui um curso total de 12-24 horas e não induz resposta inflamatória (JONES; HUNT; KING, 1997; RUBIN; STRAYER, 2008). Adicionalmente, células apoptóticas são rapidamente engolfadas e digeridas por células vizinhas ou macrófagos. Isso torna difícil observar as alterações morfológicas *in vivo* (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; HÄCKER, 2000). Restos parcialmente degradados de corpos apoptóticos são difíceis de discernir histologicamente e a

microscopia eletrônica mostra que os corpos que podem ser detectadas ao microscópio de luz compõem apenas uma pequena fração do número total de restos celulares presentes (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972).

Muitas das vias clássicas de sinalização intracelular associadas com morte celular programada têm sido demonstradas após tratamentos com Mn. Entre elas observa-se a ativação *in vitro* de ERK, JNK e p38<sup>MAPK</sup> e de caspases (HIRATA et al., 2004; ITO et al., 2006; GONZALEZ et al., 2008; PRABHAKARAN et al., 2008; YIN et al., 2008; LI et al., 2010; PARK; PARK, 2010). Nós demonstramos a neurotoxicidade *in vivo* do Mn no corpo estriado dos ratos imaturos expostos nos períodos PN8-12 e PN8-27, com alterações na atividade de complexos mitocondriais, formação de EROs, produção de F<sub>2</sub>-IsoPs e ativação de caspases. Além disso, nos tratamentos utilizados o Mn aumentou a fosforilação de MAPKs e AKT. Tem sido demonstrado que o Mn modula as vias de sinalização intracelular em culturas de células. Entretanto, não há demonstração desses eventos *in vivo*, especialmente nos períodos cruciais de desenvolvimento pós-natal.

Nós observamos que o Mn estimulou a fosforilação de ERK1/2 e AKT nos animais PN14. As vias da ERK e AKT são envolvidas em processos importantes como proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (SWEATT, 2001; BRAZIL; YANG; HEMMING, 2004). Entretanto, a ERK também pode estar envolvida nos processos de morte celular (CHU et al., 2004; SUBRAMANIAM; UNSICKER, 2006). Estudos *in vitro* com Mn demonstram a participação de ERK1/2 e AKT na expressão de iNOS (BAE et al., 2006) e COX-2 (LIAO et al., 2007). Ito et al., (2006) e Yin et al. (2008) demonstraram que o Mn produziu morte celular apoptótica pela via de sinalização de ERK1/2, com ativação de caspase-3. Adicionalmente, em nosso estudo com o uso do Trolox<sup>®</sup> a fosforilação de ERK1/2 diminuiu para os níveis do controle, sugerindo que no corpo estriado dos ratos em desenvolvimento o Mn poderia ativar ERK1/2 e caspases via estresse oxidativo.

A via da p38<sup>MAPK</sup> é classicamente implicada em processos de morte celular em diversos modelos experimentais. Porém, no SNC a p38<sup>MAPK</sup> tem importantes funções no desenvolvimento, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (MIELKE; HERDEGEN, 2000; HARPER; LOGRASSO, 2001; TAKEDA; ICHIJO, 2002; AOUADI et al., 2006). No nosso estudo, foi observado aumento da fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> no corpo estriado somente nos animais

expostos no período PN8-27. Adicionalmente, ocorreu ativação de AKT nestes animais expostos por 20 dias ao Mn. Vários estudos *in vitro* têm demonstrado que a via da p38<sup>MAPK</sup> pode não ter participação em processos de morte celular induzida pelo Mn (HIRATA et al., 2004; ITO et al., 2006; TAMM; SABRI; CECCATELLI, 2008). Porém, num estudo utilizando linfócitos B humanos, o Mn induziu morte celular apoptótica com ativação de caspase-8 e disfunção mitocondrial, via ativação de p38<sup>MAPK</sup> (MCHICHI et al., 2007). O envolvimento de MAPKs na geração de respostas ao estresse, bem como na sinalização de várias citocinas e fatores de crescimento tem sido extensivamente estudada, resultando em efeitos tanto anti- quanto pró-apoptóticas. Uma variedade de estímulos de estresse, incluindo metais, parece envolver a família das MAPKs no processo de apoptose, com resultados muitas vezes controversos. O trióxido de arsênio, que é um conhecido potente indutor de apoptose, ativa a cascata da p38<sup>MAPK</sup> em linhagem de células leucêmicas, inibindo os processos de morte celular através da ativação *downstream* da proteína cinase ativada por estresse 1 (MSK1) (GIAFIS et al., 2006; DOLNIAK et al., 2008). Ainda, estudo em fatias hipocâmpais de ratos imaturos (PN14) expostas *in vitro* ao Cd, mostrou um efeito protetor da via da p38<sup>MAPK</sup> na viabilidade celular (RIGON et al., 2008). Por outro lado, outros estudos mostram que o estresse oxidativo em neurônios pode levar à ativação de p38<sup>MAPK</sup>, com indução de apoptose dependente das caspases 8 e 9 (CHOI et al., 2004). Nesse sentido, é interessante ressaltar que o uso do antioxidante Trolox<sup>®</sup> em nosso protocolo experimental de exposição *in vivo* ao Mn, reduziu a fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> ao nível do controle, corroborando com os resultados de Choi et al. (2004).

A fosfoproteína DARPP-32, altamente expressa em neurônios médios espinhosos do estriado (SVENNINGSSON et al., 2004), é considerada uma proteína integradora de sinais nestas células. DARPP-32 pode ser fosforilada no sítio Thr-34, via AMPc/PKA, em resposta a ativação dopaminérgica de receptores D1. Nessa condição DARPP-32 se torna um potente inibidor de PPI. Por outro lado, DARPP-32 pode ser fosforilada sobre o sítio Thr-75 via Cdk5 em resposta a ativação glutamatérgica. Nesse caso DARPP-32 se torna um inibidor da PKA. Portanto, esse processo permite alterações substanciais no estado de fosforilação de uma diversidade de alvos em função da modulação de PPI e PKA. DARPP-32 é implicada na geração de respostas motoras, como observado em estudos que

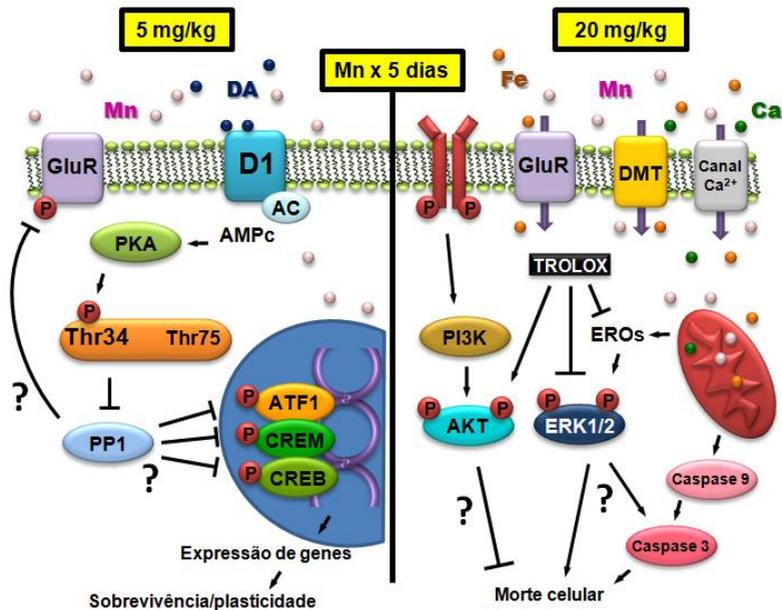
utilizaram psicoestimulantes que modulam a via AMPc/PKA (POLISSIDIS et al., 2010). Além disso, estudos demonstram que no estriado de camundongos a fosforilação PKA-dependente de DARPP-32 no sítio Thr-34 por canabinóides pode ter relação com os efeitos supressores da atividade motora produzido por estas substâncias (ANDERSSON et al., 2005; BORGKVIST; FISONE, 2007; BORGKVIST et al., 2008). Ainda, em modelos animais de doença de Parkinson e/ou submetidos a tratamento com L-DOPA, há demonstração de que aumentos na fosforilação de DARPP-32 em Thr-34 e ativação de ERK1/2 no estriado estão relacionados a distúrbios comportamentais motores (SANTINI et al., 2007; BOTSAKIS et al., 2010; LEBEL et al., 2010).

Apesar das evidências de participação da DARPP-32 no controle motor, não há nenhuma demonstração da relação entre distúrbios motores induzidos por Mn e modulação de DARPP-32 *in vivo*. Nesse aspecto, avaliamos a fosforilação de DARPP-32 nos sítios Thr-34 e Thr-75 no corpo estriado dos ratos em desenvolvimento expostos ao Mn. De modo interessante, observamos aumento da fosforilação de DARPP-32 no sítio Thr-34 nos ratos PN14 tratados com 5 e 10 mg/kg (no período PN8-12). De maneira diferente, nos animais expostos durante o período PN8-27, foi verificada uma pequena diminuição na fosforilação em Thr-34 e somente na dose mais elevada de Mn (20 mg/kg). Entretanto, os padrões de fosforilação de DARPP-32 induzidas pelo Mn observados no nosso estudo não se correlacionam com os prejuízos da atividade de coordenação motora observada nos animais PN14 e PN29, em comparação à literatura. Em ambos os períodos de tratamento, houve significativo declínio motor dos animais no teste do rotarod na dose de 20 mg/kg. Apesar dos animais PN29 tratados com 20 mg/kg apresentarem simultaneamente prejuízo motor e diminuição da fosforilação em Thr-34 de DARPP-32, a literatura mostra que alterações do movimento estão relacionadas ao aumento da fosforilação neste sítio (ANDERSSON et al., 2005; BORGKVIST; FISONE, 2007; SANTINI et al., 2007; BORGKVIST et al., 2008; BOTSAKIS et al., 2010; LEBEL et al., 2010). Ademais, um estudo *in vivo* realizado em primatas não humanos mostra uma correlação direta entre os níveis de acumulação de Mn nos núcleos caudado, putâmem e globo pálido com déficits comportamentais (SCHNEIDER et al., 2009). Dessa forma, os resultados demonstram que os prejuízos motores induzidos pelo Mn podem envolver outros fatores, além da modulação da sinalização de DARPP-32 no estriado.

Diversos estudos têm indicado decréscimo da atividade motora e deficiência motora do tipo Parkinson em ratos e primatas não humanos expostos ao Mn, associados a uma pronunciada diminuição da disponibilidade de dopamina no estriado e distúrbios da transmissão gabaérgica (DOBSON; ERIKSON; ASCHNER, 2004; PERL; OLANOW, 2007; JONES; MILLER, 2008; KHALID; AOUN; MATHEWS, 2011; YANG et al, 2011). Adicionalmente, estudos têm relacionado o estresse oxidativo estriatal, induzido pelo Mn, com prejuízos comportamentais motores (ÁVILA et al., 2008). Nesse sentido, ao utilizar o antioxidante Trolox<sup>®</sup> em nosso protocolo experimental de exposição ao Mn, observou-se significativa melhora no desempenho de coordenação motora no teste do rotarod, evidenciado nos animais expostos pelo período PN8-27, mas não nos animais expostos por 5 dias (PN8-12). Ademais, no teste comportamental do campo aberto, os animais expostos por 5 dias (PN8-12) simultaneamente ao Mn e Trolox<sup>®</sup> apresentaram melhora significativa na atividade de limpeza (grooming). Os animais expostos por 20 dias (PN8-27) apresentaram tendência de melhora das atividades comportamentais no teste do campo aberto.

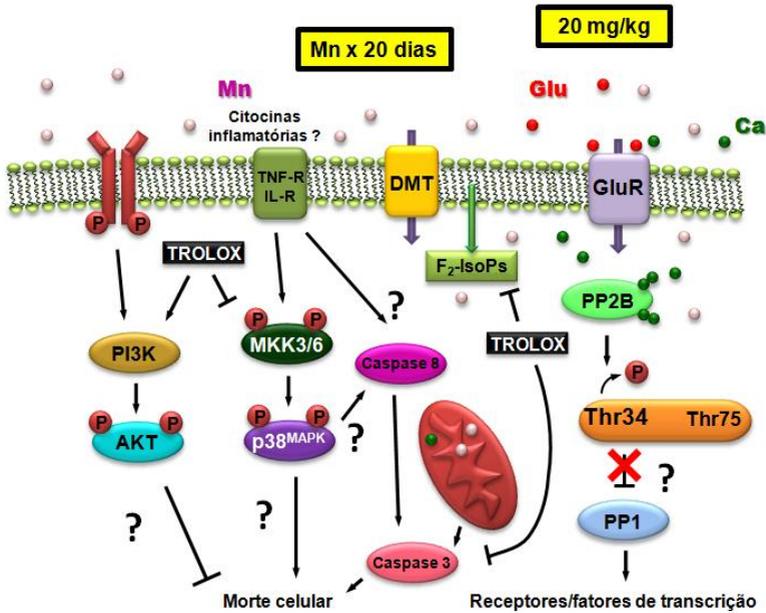
O Mn é caracterizado por possuir uma taxa de eliminação muito lenta do SNC, sendo considerado um elemento neurotóxico cumulativo de longa duração. Em casos de exposição de indivíduos imaturos a níveis que excedem a capacidade homeostática, uma condição de sobrecarga pode se estabelecer com possíveis efeitos tardios, resultando em aumento de risco de processos neurodegenerativos como a doença de Parkinson (LUCCHINI; ZIMMERMAN, 2009). Portanto, as alterações observadas em nosso estudo em importantes vias de sinalização intracelular em resposta a exposição ao Mn em baixas doses e em períodos cruciais do desenvolvimento cerebral neonatal, pode ser um aspecto importante no aparecimento de manifestações neurológicas tardias. Também deve ser considerado que as alterações neuroquímicas observadas no nosso estudo em resposta a baixas doses de Mn (5 e 10 mg/kg), que não foram acompanhadas por alterações comportamentais imediatas, podem contribuir no estabelecimento de alterações nos processos de proliferação, diferenciação e plasticidade neural e resultarem em déficits neurológicos no indivíduo maduro ou no envelhecimento (FIGURAS 10 e 11). Dessa forma, nosso estudo se torna muito relevante por indicar todos esses aspectos, especialmente a possibilidade de alterações de componentes de sinalização

intracelular sem alterações comportamentais contundentes, mas que representam elementos fundamentais de controle do desenvolvimento neural, sobrevivência celular e especialmente do processo complexo de neuroplasticidade, além de apontar para uma possível amenização do quadro de neurotoxicidade através do controle terapêutico do estresse oxidativo em indivíduos expostos ao Mn. Ainda, o reconhecimento dos efeitos protetores do Trolox<sup>®</sup> indica que as defesas antioxidantes dependentes da vitamina E podem representar fatores importantes para atenuar os efeitos neurotóxicos do Mn (MILATOVIC et al., 2011).



**Figura 10.** Mecanismos de neurotoxicidade *in vivo* do Mn no corpo estriado de ratos em desenvolvimento expostos por cinco dias.

As ações tóxicas do Mn em animais expostos por cinco dias (PN8-12) em baixas doses envolvem a fosforilação de DARPP-32 no sítio Thr-34, com possível inibição de PP1, o que levaria a alterações na expressão gênica, sobrevivência e plasticidade neuronal. Em doses mais elevadas, o Mn prejudica a função mitocondrial, resultando em aumento da produção de EROs e de F<sub>2</sub>-IsoPs com ativação de ERK1/2, AKT e caspases. O antioxidante Trolox<sup>®</sup> é capaz de reverter alguns dos parâmetros alterados pelo Mn incluindo a produção de EROs e ativação de ERK1/2.



**Figura 11.** Mecanismos de neurotoxicidade *in vivo* do Mn no corpo estriado de ratos em desenvolvimento expostos por 20 dias.

A neurotoxicidade do Mn em animais expostos por 20 dias (PN8-27) em doses mais elevadas envolve aumento da fosforilação de  $p38^{MAPK}$ , da produção de  $F_2$ -IsoPs e ativação de caspases, resultando possivelmente em morte celular. Diminuição na fosforilação de Thr-34 da DARPP-32 pode envolver a ativação de PP2B pelo influxo de cálcio, através da desregulação da transmissão glutamatérgica. Uma maior atividade de PP1 pode resultar em defosforilação de diversas proteínas incluindo fatores de transcrição. Dessa forma, através da expressão gênica alterada, poderiam surgir efeitos de morte celular e/ou alteração da plasticidade neuronal. O antioxidante Trolox<sup>®</sup> reduz a fosforilação de  $p38^{MAPK}$ , a ativação de caspase 3 e a produção de  $F_2$ -IsoPs. Em contrapartida a esses efeitos, observa-se também uma ativação de AKT nesse regime de intoxicação.

## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 NEUROTOXICIDADE *IN VITRO* DO ZINCO

a) No protocolo utilizado no presente trabalho, de exposição *in vitro* de fatias de hipocampo de ratos em desenvolvimento (14 dias de idade; PN14) ao Zn, observou-se que o metal na concentração de 100  $\mu\text{M}$  diminui significativamente a viabilidade celular nos tempos de 2 e 3 horas de incubação;

b) Foram observadas alterações da fosforilação de MAPKs e AKT em fatias hipocampais de ratos em desenvolvimento (PN14) expostas ao Zn *in vitro*. O Zn (100  $\mu\text{M}$ ) aumentou a fosforilação de p38<sup>MAPK</sup>, de ERK1/2 e de AKT, além de diminuir a fosforilação de JNK1/2 no tempo de 2 horas de incubação com o metal.

c) Através do uso de inibidores seletivos para as enzimas ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup>, JNK1/2 e AKT, foi avaliado a participação destas vias de sinalização intracelular na modulação da viabilidade das células em fatias de hipocampo de ratos em desenvolvimento (PN14) expostas ao Zn (100  $\mu\text{M}$ ) *in vitro*. Dessa forma, observou-se que a inibição de p38<sup>MAPK</sup> aumenta a queda de viabilidade celular induzida pela exposição ao Zn, sugerindo que a enzima está associada com mecanismos de sobrevivência celular no protocolo utilizado.

### 6.2 NEUROTOXICIDADE *IN VIVO* DO MANGANÊS

a) O Mn alterou de forma significativa a fosforilação de MAPKs e AKT no corpo estriado de ratos expostos *in vivo* por cinco ou 20 dias. Nos animais expostos no período entre o 8º e o 12º dia pós-natal (PN8-12; avaliado aos 14 dias de idade, PN14), o Mn aumentou a fosforilação de ERK1/2 e de AKT na dose de 20 mg/kg e, nos animais expostos entre o 8º e o 27º dia pós-natal (PN8-27; avaliado no dia pós-natal 29, PN29), o Mn aumentou a fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> e AKT na dose 20 mg/kg;

b) O Mn não alterou a expressão/fosforilação do fator de transcrição CREB no corpo estriado de ratos expostos *in vivo*, tanto

nos animais expostos pelo período PN8-12 quanto no período PN8-27;

c) A exposição *in vivo* ao Mn pelo período PN8-12 e período PN8-27 alterou a fosforilação de DARPP-32 no sítio Thr-34. Entretanto, nos animais expostos por cinco dias houve aumento da fosforilação no sítio Thr-34 nas doses de 5 e 10 mg/kg e nos animais expostos por 20 dias houve diminuição da fosforilação neste sítio na dose de 20 mg/kg. Além disso, não foi observada uma relação entre as alterações de fosforilação em DARPP-32-Thr-34 com as alterações comportamentais motoras em ambos os períodos de exposição;

d) Em ambos os protocolos de exposição ao Mn utilizados no presente trabalho (5 ou 20 dias de exposição), não foram observadas alterações anátomo-patológicas no SNC dos ratos, a despeito do aumento da atividade de caspases (evento que sugere a ocorrência de apoptose) no corpo estriado em ambos os regimes de exposição. Tal fato provavelmente se deve ao método de microscopia utilizado, que não favorece a identificação de morte celular apoptótica;

e) Nos animais PN14 (expostos por cinco dias) foi observado aumento significativo da produção de EROs e F<sub>2</sub>-isoprostanos (F<sub>2</sub>-IsoPs). Ademais, nos animais PN29 (expostos por 20 dias), houve aumento da produção de F<sub>2</sub>-IsoPs no corpo estriado, sugerindo indução de estresse oxidativo no corpo estriado dos ratos imaturos expostos ao Mn;

f) Adicionalmente à produção aumentada de EROs no corpo estriado dos animais PN14 (expostos entre PN8-12), os complexos da cadeia respiratória mitocondrial apresentaram alterações em suas atividades, sugerindo uma possível interligação entre produção de EROs, colapso mitocondrial, estresse oxidativo e ativação de caspases;

g) O Mn induziu prejuízos comportamentais motores nos ratos expostos durante os períodos PN8-12 e PN8-27. O Mn, na dose de 20 mg/kg diminuiu o tempo de latência para queda no teste do rotarod, em ambos os períodos de exposição. Além disso, nos animais expostos por 5 dias houve prejuízos no teste de campo aberto relativo a distância percorrida, velocidade e atividade de

limpeza. Nos animais expostos por 20 dias (PN8-27), o Mn diminuiu a distância e a velocidade de ambulação. Dessa forma, evidenciaram-se distúrbios funcionais dos núcleos da base;

h) Através do uso do antioxidante Trolox<sup>®</sup>, foi determinada a participação parcial do estresse oxidativo nos mecanismos de neurotoxicidade do Mn *in vivo*, nos aspectos neuroquímicos e comportamentais. O Trolox<sup>®</sup> foi capaz de atenuar os aumentos de fosforilação de ERK1/2 (animais exposto no PN8-12) e p38<sup>MAPK</sup> (animais expostos no PN8-27) induzidos pelo Mn. Além disso, o Trolox<sup>®</sup> atenuou a produção de EROs e de F<sub>2</sub>-IsoPs, além de reduzir a ativação de caspases nos ratos imaturos expostos *in vivo* ao Mn. Assim, fica evidenciado o envolvimento do estresse oxidativo em alguns dos danos causados pela toxicidade do Mn no encéfalo de ratos imaturos.



**REFERÊNCIAS**

- AGUIAR, A.S., et al. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Research Bulletin**. v. 79, p. 452-457, 2009.
- AISEN, P.; AASA, R.; REDFIELD, A.G. The chromium, manganese, and cobalt complexes of transferrin. **Journal of Biological Chemistry**. v. 244, p. 4628-4633, 1969.
- AN, W. L., et al. Mechanism of zinc-induced phosphorylation of p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase 3beta in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Journal of Neurochemistry**. v. 92, p. 1104-1115, 2005a.
- AN, W.L., et al. Zinc-induced anti-apoptotic effects in SH-SY5Y neuroblastoma cells via the extracellular signal-regulated kinase 1/2. **Molecular Brain Research**. v. 135, p. 40-47, 2005b.
- ANDERSON, J.G.; COONEY, P.T.; ERIKSON, K.M. Inhibition of DAT function attenuates manganese accumulation in the globus pallidus. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 23, p. 179-184, 2007.
- ANDERSSON, M., et al. Cannabinoid action depends on phosphorylation of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa at the protein kinase a site in striatal projection neurons. **Journal of Neuroscience**. v. 25, p. 8432-8438, 2005.
- AOUADI, M., et al. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. **Biochimie**. v. 88, p. 1091-1098, 2006.
- ARNSTEN, A.F. Fundamentals of attention-deficit/hyperactivity disorder: Circuits and pathways. **Journal of Clinical Psychiatry**. v. 67, p.7-12, 2006.
- ASCHNER, J.L.; ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 26, p. 353-362, 2005.

- ASCHNER, M., et al. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 221, p. 131-147, 2007.
- ÁVILA, D.S., et al. A possible neuroprotective action of a vinyllic telluride against Mn-induced neurotoxicity. **Toxicological Science**. v. 115, p. 194-201, 2010.
- ÁVILA, D.S., et al. Involvement of striatal lipid peroxidation and inhibition of calcium influx into brain slices in neurobehavioral alterations in a rat model of short-term oral exposure to manganese. **NeuroToxicology**. v. 29, p. 1062-1068, 2008.
- BAE, J.H., et al. 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, p. 151-154, 2006.
- BARCLAY, L.R.; VINQVIST, M.R. Membrane peroxidation: inhibiting effects of water-soluble antioxidants on phospholipids of different charge types. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 16, p. 779-788, 1994.
- BASHA, M.R., et al. The fetal basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and beta-amyloid in the aging brain. **Journal of Neuroscience**. v. 25, p. 823-829, 2005.
- BENEDETTO, A.; AU, C.; ASCHNER, M. Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease. **Chemical Reviews**. v. 109, p. 4862-4884, 2009.
- BESSER, L., et al. Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus. **Journal of Neuroscience**. v. 29, p. 2890-2901, 2009.
- BIRD, C.M.; BURGESS, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nature Neuroscience Reviews**. v. 9, p. 182-194, 2008.

BISHOP, G.M.; DRINGEN, R.; ROBINSON, S.R. Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 42, p. 1222-1230, 2007.

BOGER, H.A., et al. A dual-hit animal model for age-related parkinsonism. **Progress in Neurobiology**. v. 90, p. 217-229, 2010.

BOLIN, C.M., et al. Exposure to lead and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain. **FASEB Journal**. v. 20, p. 788-790, 2006.

BONDY, S.C.; CAMPBELL, A. Developmental neurotoxicology. **Journal of Neuroscience Research**. v. 81, p. 605-612, 2005.

BORGKVIST, A., et al. Regulation of DARPP-32 phosphorylation by delta9-tetrahydrocannabinol. **Neuropharmacology**. v. 54, p. 31-35, 2008.

BORGKVIST, A.; FISONE, G. Psychoactive drugs and regulation of the cAMP/PKA/DARPP-32 cascade in striatal medium spiny neurons. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 31, p. 79-88, 2007.

BOTSAKIS, K., et al. Blockade of adenosine A2A receptors downregulates DARPP-32 but increases ERK1/2 activity in striatum of dopamine deficient “weaver” mouse. **Neurochemistry International**. v. 56, p. 245-249, 2010.

BOWEN, H.J.M. Trace Elements in Biochemistry. 2<sup>a</sup> ed. Burlington, USA, **Academic Press**, 1976.

BRADHAM, K.; WENTSEL, R. Scientific issues in the U.S. EPA framework for metals risk assessment. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 73, n. 2-3, p. 108-113, 2010.

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, p. 233-242, 2004.

BROADDUS, W.C.; BENNETT, J.P. Jr. Postnatal development of striatal dopamine function. I. An examination of D1 and D2 receptors, adenylate cyclase regulation and presynaptic dopamine markers. **Developmental Brain Research**. v. 52, p. 265-271, 1990a.

BROADDUS, W.C.; BENNETT, J.P. Jr. Postnatal development of striatal dopamine function. II. Effects of neonatal 6-hydroxydopamine treatments on D1 and D2 receptors, adenylate cyclase activity and presynaptic dopamine function. **Developmental Brain Research**. v. 52, p. 273-277, 1990b.

BROWN, H., et al. Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of pre-pubertal children: a meta-analysis of randomized, controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 75, p. 1062-1071, 2002.

BUDDE, T., et al. Imaging free zinc in synaptic terminals in live hippocampal slices. **Neuroscience**. v. 79, p. 347-358, 1997.

BURTON, N.C.; GUILARTE, T.R. Manganese neurotoxicity: lessons learned from longitudinal studies in nonhuman primates. **Environmental Health Perspectives**. v. 117, p. 325-332, 2009.

CAI, T., et al. Manganese induces tau hyperphosphorylation through the activation of ERK MAPK pathway in PC12 cells. **Toxicological Sciences**. v. 119, p. 169-177, 2011.

CAI, T., et al. Manganese induces the overexpression of  $\alpha$ -synuclein in PC12 cells via ERK activation. **Brain Research**. v. 1359, p. 201-207, 2010.

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

CARLEZON, W.A.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. The many faces of CREB. **Trends in Neurosciences**. v. 28, p. 436-445, 2005.

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

CHEN, C.J.; LIAO, S.L. Neurotrophic and neurotoxic effects of zinc on neonatal cortical neurons. **Neurochemical International**. v. 42, p. 471-479, 2003a.

CHEN, C.J.; LIAO, S.L. Zinc toxicity on neonatal cortical neurons: involvement of glutathione chelation. **Journal of Neurochemistry**. v. 85, p. 443-453, 2003b.

CHEN, J., et al. GluR6-containing KA receptor mediates the activation of p38 MAP kinase in rat hippocampal CA1 region during brain ischemia injury. **Hippocampus**. v. 19, p. 79-89, 2009.

CHEN, M.K., et al. Acute manganese administration alters dopamine transporter levels in the non-human primate striatum. **Neurotoxicology**. v. 27, p. 229-236, 2006.

CHEN, Z., et al. MAP kinases. **Chemical Reviews**. v. 101, p. 2449-2476, 2001.

CHIMIANTI, F., et al. Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. **Current Drug Targets**. v. 4, p. 323-338, 2003.

CHOI, D.W., YOKOYAMA, M., KOH, J. Zinc neurotoxicity in cortical cell culture. **Neuroscience**. v. 24, p. 67-79, 1988.

CHOI, W.S., et al. Phosphorylation of p38 MAPK induced by oxidative stress is linked to activation of both caspase-8- and -9-mediated apoptotic pathways in dopaminergic neurons. **Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 20451-20460, 2004.

CHOI, Y.; CHEN, H.V.; LIPTON, S.A. Three pairs of cysteine residues mediate both redox and Zn<sup>2+</sup> modulation of the NMDA receptor. **Journal of Neuroscience**. v. 21, p. 392-400, 2001.

CHU, C.T., et al. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. **European Journal of Biochemistry**. v. 271, p. 2060-2066, 2004.

- COON, S., et al. Whole-body lifetime occupational lead exposure and risk of Parkinson's disease. **Environmental Health Perspectives**. v. 114, p. 1872-1876, 2006.
- CORDOVA, F.M., et al. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain Research**. v. 998, p. 65-72, 2004.
- CORVOL, J.C., et al. Depolarization activates ERK and proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) independently in different cellular compartments in hippocampal slices. **Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 660-668, 2005.
- COSTA, L.G., et al. Developmental neuropathology of environmental agents. **The Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 44, p. 87-110, 2004.
- COSTA, L.G., et al. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 44, p. 87-110, 2004.
- COSTELLO, S., et al. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. **American Journal of Epidemiology**. v. 169, p. 919-926, 2009.
- COUPER J. On the effect of black oxide of manganese when inhaled in the lungs. **British Annals of Medicine, Pharmacy, Vital Statistics, and General Science**. v.1, p. 41-42, 1837.
- COWAN, K.J.; STOREY, K.B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. **Journal of Experimental Biology**. v. 206, p. 1107-1115, 2003.
- CRITTENDEN, P.L.; FILIPOV, N.M. Manganese modulation of MAPK pathways: effects on upstream mitogen activated protein kinase kinases and mitogen activated kinase phosphatase-1 in microglial cells. **Journal of Applied Toxicology**. p. 1-10, 2010.

CROSSGROVE, J.S., et al. 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.

CUAJUNCO, M.P.; FAGÉT, K.Y. Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer's disease. **Brain Research Reviews**. v. 41, n. 1, p. 44-56, 2003.

DANIELS, W.M., et al. A mechanism for zinc toxicity in neuroblastoma cells. **Metabolic Brain Disease**. v. 19, p. 79-88, 2004.

DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.; ASHRAF, Q.M.; MISHRA, O.P. Differential expression of apoptotic proteins following hypoxia-induced CREB phosphorylation in the cerebral cortex of newborn piglets. **Neurochemical Research**. v. 32, p. 1256-1263, 2007.

DENG, Y., et al. The protective effect of riluzole on manganese caused disruption of glutamate-glutamine cycle in rats. **Brain Research**. v. 1289, p. 106-117, 2009.

DINELEY, K.E.; VOTYAKOVA, T.V.; REYNOLDS, I.J. Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**. v. 85, n. 3, p. 563-570, 2003.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: **Brain, behavior, and iron in the infant diet**. New York: Springer, 1990, p. 1-25.

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

DOLNIAK, B., et al. Regulation of arsenic trioxide-induced cellular responses by Mnk1 and Mnk2. **Journal of Biological Chemistry**. v. 283, p. 12034-12042, 2008.

DORFMAN, A.L., et al. Structural and functional consequences of Trolox C treatment in the rat model of postnatal hyperoxia.

**Investigative Ophthalmology & Visual Science.** v. 47, p. 1101-1108, 2006.

DORMAN, D.C., et al. Neurotoxicity of manganese chloride in neonatal and adult CD rats following subchronic (21-day) high-dose oral exposure. **Journal of Applied Toxicology.** v. 20, p. 179-187, 2000.

DUFFUS, J.H. Heavy metals - a meaningless term? (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry.** v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

DUNKLEY, P.R., et al. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. **Journal of Neurochemistry.** v. 91, p. 1025-1043, 2004.

EOM, S.J., et al. Zn(2+) induces stimulation of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway through phosphoinositide 3-Kinase. **Molecular Pharmacology.** v. 59, p. 981-986, 2001.

ERIKSON, K.M., et al. Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate. **Pharmacology & Therapeutics.** v. 113, p. 369-377, 2007.

ERIKSON, K.M.; ASCHNER, M. Manganese causes differential regulation of glutamate transporter (GLAST), taurine transporter, and metallothionein in cultured rat astrocytes. **Neurotoxicology.** v. 23, p. 595-602, 2002.

ERIKSON, K.M.; SUBER, R.L.; ASCHNER, M. Glutamate/aspartate transporter (GLAST), taurine transporter and metallothionein mRNA levels are differentially altered in astrocytes exposed to manganese chloride, manganese phosphate or manganese sulfate. **Neurotoxicology.** v. 23, p. 281-288, 2002.

ESCHENKO, O., et al. Behavioral, electrophysiological and histopathological consequences of systemic manganese administration in MEMRI. **Magnetic Resonance Imaging.** v. 28, p. 1165-1174, 2010.

FIENBERG, A.A., et al. DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. **Science.** v. 281, p. 838-842, 1998.

FIENBERG, A.A.; GREENGARD, P. The DARPP-32 knockout mouse. **Brain Research Reviews**. v. 31, p. 313-319, 2000.

FITSANAKIS, V.A., et al. Measuring brain manganese and iron accumulation in rats following 14 weeks of low-dose manganese treatment using atomic absorption spectroscopy and magnetic resonance imaging. **Toxicological Sciences**. v. 103, p. 116-124, 2008.

FITSANAKIS, V.A., et al., Manganese (Mn) and Iron (Fe): interdependency of transport and regulation. **Neurotoxicity Research**. v. 18, p. 124-131, 2010.

FOSMIRE, G.J. Zinc toxicity. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 51, p. 225-227, 1990.

FRANCO, J.L., et al. Involvement of glutathione, ERK1/2 phosphorylation and BDNF expression in the antidepressant-like effect of zinc in rats. **Behavioral Brain Research**. v. 188, p. 316-23, 2008.

FRANKEL, E.N. Antioxidants. In: Frankel, E.N. (Ed.), **Lipid Oxidation**. Bridgewater: The Oily Press, 2005, p. 209-258.

FREDERICKSON, C.J. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. **International Review of Neurobiology**. v. 31, p. 145-238, 1989.

FREDERICKSON, C.J., et al. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. **Journal of Nutrition**. v. 130, p. 1471S-1483S, 2000.

FREDERICKSON, C.J., et al. Synaptic release of zinc from brain slices: factors governing release, imaging, and accurate calculation of concentration. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 154, p. 19-29, 2006.

FREDERICKSON, C.J.; KOH, J.Y.; BUSH, A.I. The neurobiology of zinc in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 6, p. 449-462, 2005.

- GALVAN, A.; WICHMANN, T. Pathophysiology of Parkinsonism. **Clinical Neurophysiology**. v. 119, p. 1459-1474, 2008.
- GARCIA, et al. A manganese-enhanced diet alters brain metals and transporters in the developing rat. **Toxicological Sciences**. v. 92, p. 516-525, 2006.
- GAVIN, C.E.; GUNTER, K.K.; GUNTER, T.E. Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. **Biochemical Journal**. v. 266, p. 329-334, 1990.
- GERFEN, C.R. Basal ganglia. Em: PAXINOS, G. (Ed.). **The Rat Nervous System**. Amsterdam: Elsevier Academic, 2004, p. 445-508.
- GIAFIS, N., et al. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the generation of arsenic trioxide-dependent cellular responses. **Cancer Research**. v. 66, p. 6763-6771, 2006.
- GONG, C.X., et al. Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain. **Brain Research Protocols**. v. 6, p. 134-140, 2001.
- GONZALEZ, L.E., et al. Manganese activates the mitochondrial apoptotic pathway in rat astrocytes by modulating the expression of proteins of the Bcl-2 family. **Neurochemistry International**. v. 53, p. 408-415, 2008.
- GOTO, Y.; GRACE, A.A. Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of nucleus accumbens in goal-directed behavior. **Nature Neuroscience**. v. 8, p. 805-812, 2005.
- GOTTLIEB, A.; KEYDAR, I.; EPSTEIN, H.T. Rodent brain growth stages: An analytical review. **Biology of the Neonate**. v. 32, p. 166-176, 1977.
- GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P.J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. **Lancet**. v. 368, p. 2167-2178, 2006.
- GRANT, E.R., et al. Protection against glutamate toxicity through inhibition of the p44/42 mitogen activated protein kinase pathway in

neuronally differentiated P19 cells. **Biochemical Pharmacology**. v. 62, p. 283-296, 2001.

GRASS, D.S., et al. Airborne particulate metals in the New York City subway: A pilot study to assess the potential for health impacts. **Environmental Research**. v. 110, p. 1-11, 2010.

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

GREENGARD, P.; ALLEN, P.B.; NAIRN, A.C. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. **Neuron**. v. 23, p. 435-447, 1999.

GRIMALDI FILHO, G. **Técnica histológica**. São Paulo: Fiocruz, 1981.

GUILARTE, T.R., et al. Nigrostriatal dopamine system dysfunction and subtle motor deficits in manganese-exposed non-human primates. **Experimental Neurology**. v. 202, p. 381-390, 2006.

GUILARTE, T.R.; CHEN, M.K. Manganese inhibits NMDA receptor channel function: implications to psychiatric and cognitive effects. **Neurotoxicology**. v. 28, p. 1147-1152, 2007.

GUNTER, T.E., et al. Speciation of manganese in cells and mitochondria: A search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. **NeuroToxicology**. v. 27, p. 765-776, 2006.

HAASE, H.; MARET, W. Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. **Experimental Cell Research**. v. 291, p. 289-298, 2003.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Research**. v. 301, p. 5-17, 2000.

HADDAD, J.J. Mitogen-activated protein kinases and the evolution of Alzheimer's: a revolutionary neurogenetic axis for therapeutic intervention? **Progress in Neurobiology**. v. 73, p. 359-377, 2004.

- HAFEMAN, D., et al. Association between manganese exposure through drinking water and infant mortality in Bangladesh. **Environmental Health Perspectives**. v. 115, p. 1107-1112, 2007.
- HANADA, M.; FENG, J.; HEMMINGS, B.A. Structure, regulation and function of PKB/AKT - A major therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1697, p. 3-16, 2004.
- HANSEN, S.L., et al. Iron transporters are differentially regulated by dietary iron, and modifications are associated with changes in manganese metabolism in young pigs. **Journal of Nutrition**. v. 139, p.1474-1479, 2009.
- HARDY, G. Manganese in parenteral nutrition: who, when, and why should we supplement? **Gastroenterology**. v. 137, p. S29-S35, 2009.
- HARDY, G.; MENENDEZ, A.M.; MANZANARES, W. Trace element supplementation in parenteral nutrition: Pharmacy, posology, and monitoring guidance. **Nutrition**. v. 25, p. 1073-1084, 2009.
- HARDY, I.J.; GILLANDERS, L.; HARDY, G. Is manganese an essential supplement for PN? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. v. 11, p. 289-296, 2008.
- HARPER, S.J.; LOGRASSO, P. Signaling for survival and death in neurons: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. **Cell Signal**. v. 13, p. 299-310, 2001.
- HARVEY, R.J., et al. Identification of an inhibitory Zn<sup>2+</sup> binding site on the human glycine receptor alpha1 subunit. **The Journal of Physiology**. v. 520, p. 53-64, 1999.
- HAZELL, A.S., et al. Alzheimer type II astrocytic changes following sub-acute exposure to manganese and its prevention by antioxidant treatment. **Neuroscience Letters**. v. 396, p. 167-171, 2006.
- HE, L., et al. ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties. **Molecular Pharmacology**. v. 70, p. 171-80, 2006.

- HEATH, L.M., et al. Toxicity of environmental lead and the influence of intestinal absorption in children. **Reviews on Environmental Health**. v. 18, n. 4, p.231-250, 2003.
- HIRATA, Y., et al. Anti-apoptotic and pro-apoptotic effect of NEPP11 on manganese-induced apoptosis and JNK pathway activation in PC12 cells. **Brain Research**. v. 1021, p. 241-247, 2004.
- HOMMA, S., et al. Pulmonary vascular lesions in the adult respiratory distress syndrome caused by inhalation of zinc chloride smoke: a morphometric study. **Human Pathology**. v. 23, p. 45-50, 1992.
- HONG, E.J.; WEST, A.E.; GREENBERG, M.E. Transcriptional control of cognitive development. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 15, p. 21-28, 2005.
- HORNING, M.S.; TROMBLEY, P.Q. Zinc and copper influence excitability of rat olfactory bulb neurons by multiple mechanisms. **Journal of Neurophysiology**. v. 86, p. 1652-1660, 2001.
- HUI, L., et al. The neuroprotection of insulin on ischemic brain injury in rat hippocampus through negative regulation of JNK signaling pathway by PI3K/Akt activation. **Brain Research**. v. 1052, p. 1-9, 2005.
- HUNTER, T.; SEFTON, B.M. **Protein phosphorylation. Part A. - Methods in Enzymology**. San Diego: Academic Press, 1991, v. 200.
- ITO, Y., et al. p44/42 MAP kinase and c-Jun N-terminal kinase contribute to the up-regulation of caspase-3 in manganese-induced apoptosis in PC12 cells. **Brain Research**. v. 1099, p. 1-7, 2006.
- JADHAV, S.H., et al. Effects of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water-contaminating metals: A biochemical and histopathological study in male rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 53, p. 667-677, 2007.

- JAN, C.R.; WU, S.N.; TSENG, C.J. Zn<sup>2+</sup> increases resting cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels and abolishes capacitative Ca<sup>2+</sup> entry induced by ATP in MDCK cells. **Archives of Pharmacology**. v. 360, p. 249-255, 1999.
- JANG, B.C. Induction of COX-2 in human airway cells by manganese: Role of PI3K/PKB, p38 MAPK, PKCs, Src, and glutathione depletion. **Toxicology in Vitro**. v. 23, p. 120-126, 2009.
- JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**. v. 68, p. 167-182, 2003.
- JIANG, C., et al. Dopaminergic properties and experimental anti-parkinsonian effects of IPX750 in rodent models of Parkinson disease. **Clinical Neuropharmacology**. v. 27, p. 63-73, 2004.
- JONES, D.C.; MILLER, G.W. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. **Biochemical Pharmacology**. v. 76, p. 569-581, 2008.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Veterinary Pathology**. 6ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1997.
- KANDEL, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**. v. 294, p. 1030-1038, 2001.
- KANNURPATTI, S.S.; JOSHI, P.G.; JOSHI, N.B. Calcium sequestering ability of mitochondria modulates influx of calcium through glutamate receptor channel. **Neurochemical Research**. v. 25, p. 1527-1536, 2000.
- KERN, C.; SMITH, D.R. Pre-weaning Mn exposure leads to prolonged astrocyte activation and lasting effects on the dopaminergic system in adult male rats. **Synapse**. v. 65, p. 532-44, 2011.
- KERN, C.; STANWOOD, G.D.; SMITH, D.R. Prewearing manganese exposure causes hyperactivity, disinhibition, and spatial learning and memory deficits associated with altered dopamine receptor and transporter levels. **Synapse**. v. 64, p. 363-378, 2010.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. v. 26, p. 239-257, 1972.

KETTERMAN, J.K.; LI, Y.V. Presynaptic evidence for zinc release at the mossy fiber synapse of rat hippocampus. **Journal of Neuroscience Research**. v. 86, p. 422-434, 2008.

KHALID, M.; AOUN, R.A.; MATHEWS, T.A. Altered striatal dopamine release following a sub-acute exposure to manganese. **Journal of Neuroscience Methods**. *in press*, 2011.

KIM, D.; JOE, C.O.; HAN, P.L. Extracellular and intracellular glutathione protects astrocytes from Zn<sup>2+</sup>-induced cell death. **NeuroReport**. v. 14, p. 187-190, 2003.

KIM, E.Y., et al. Zn<sup>2+</sup> entry produces oxidative neuronal necrosis in cortical cell cultures. **European Journal of Neuroscience**. v. 11, p. 327-334, 1999a.

KIM, Y.H., et al. Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis mediation by free radicals. **Neuroscience**. v. 89, p. 175-182, 1999b.

KLEIN, C., et al. Zinc induces ERK-dependent cell death through a specific Ras isoform. **Apoptosis**. v. 11, p. 1933-1944, 2006.

KRESSE, W., et al. Zinc ions are endogenous modulators of neurotransmitter-stimulated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in both cultured and in situ mouse astrocytes. **European Journal of Neuroscience**. v. 21, p. 1626-1634, 2005.

KUMAR, O.; SUGENDRAN, K.; VIJAYARAGHAVAN, R. Protective effect of various antioxidants on the toxicity of sulphur mustard administered to mice by inhalation or percutaneous routes. **Chemico-Biological Interactions**. v. 134, p. 1-12, 2001.

KUMER, S.C.; VRANA, K.E. The intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. **Journal of Neurochemistry**. v. 67, 443-462, 1996.

- LATCHOUMYCANDANE, C., et al. Protein kinase Cdelta is a key downstream mediator of manganese-induced apoptosis in dopaminergic neuronal cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 313, p. 46-55, 2005.
- LATINI, A., et al. 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. **Neuroscience**. v., 135, p. 111-120, 2005.
- LAZRISHVILI, I.L., et al. Morphological changes and manganese content in the brains of rat pups subjected to subchronic poisoning with manganese chloride. **Neuroscience and Behavioral Physiology**. v. 39, p. 7-12, 2009.
- LEAL, R.B., et al. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. **Toxicology**. v. 234, p. 34-43, 2007.
- LEBEL, M., et al. Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat. **Neurobiology of Disease**. v. 38, p. 59-67, 2010.
- LEE, J.Y., et al. Induction by synaptic zinc of heat shock protein-70 in hippocampus after kainite seizures. **Experimental Neurology**. v. 161, p. 433-441, 2000.
- LEE, Y.J., et al. Mechanisms of pyruvate inhibition of oxidant-induced apoptosis in human endothelial cells. **Microvascular Research**. v. 66, p. 91-101, 2003.
- LEO, D., et al. Altered midbrain dopaminergic neurotransmission during development in an animal model of ADHD. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 27, p. 661-669, 2003.
- LI, Y., et al.  $\alpha$ -Synuclein overexpression during manganese-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Brain Research Bulletin**. v. 81, p. 428-433, 2010.
- LIAO, S.L., et al. Induction of cyclooxygenase-2 expression by manganese in cultured astrocytes. **Neurochemistry International**. v. 50, p. 905-915, 2007.

LICHTEN, L.A.; COUSINS, R.J. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. **Annual Review of Nutrition**. v. 29, p. 153-176, 2009.

LIU, X., et al. Manganese-induced neurotoxicity: the role of astroglial-derived nitric oxide in striatal interneuron degeneration. **Toxicological Sciences**. v. 91, p. 521-531, 2006.

LIU, Y., et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**. v. 69, p. 581-593, 1997.

LJUNG, K.; VAHTER, M. Time to re-evaluate the guideline value for manganese in drinking water? **Environmental Health Perspectives**. v. 115, p. 1533-1538, 2007.

LOZOFF, B.; GEORGIEFF, M.K. Iron deficiency and brain development. **Seminars in Pediatric Neurology**. v. 13, p. 158-165, 2006.

LUCACIU, C.M., et al. Manganese transport through human erythrocyte membranes. An EPR study. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1328, p. 90-98, 1997.

LUCCHINI, R.; ZIMMERMAN, N. Lifetime cumulative exposure as a threat for neurodegeneration: Need for prevention strategies on a global scale. **NeuroToxicology**. v. 30, p. 1144-1148, 2009.

LUCCHINI, R.G., et al. High prevalence of parkinsonian disorders associated to manganese exposure in the vicinities of ferroalloy industries. **American Journal of Industrial Medicine**. v. 50, p. 788-800, 2007.

MAGISTRETTI, J., et al. Dual effect of Zn<sup>2+</sup> on multiple types of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents in rat palaeocortical neurons. **Neuroscience**. v. 117, p. 249-264, 2003.

MANEV, H., et al. Characterization of zinc-induced neuronal death in primary cultures of rat cerebellar granule cells. **Experimental Neurology**. v. 146, p. 171-178, 1997.

- McDOUGALL, S.A., et al. Postnatal manganese exposure alters dopamine transporter function in adult rats: potential impact on nonassociative and associative processes. **Neuroscience**. v. 154, p. 848-860, 2008.
- MCHICHI, B.E., et al. p38 MAPK and MSK1 mediate caspase-8 activation in manganese-induced mitochondria-dependent cell death. **Cell Death and Differentiation**. v. 14, p. 1826-1836, 2007.
- MENEZES-FILHO, J.A., et al. Manganese exposure and the neuropsychological effect on children and adolescents: a review. **Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health**. v. 26, p. 541-548, 2009.
- MIELKE, K.; HERDEGEN, T. JNK and p38 stress kinases - degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. **Progress in Neurobiology**. v. 61, p. 45-60, 2000.
- MILATOVIC, D., et al. Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 240, p. 219-225, 2009.
- MILATOVIC, D., et al. Protective effects of antioxidants and anti-inflammatory agents against manganese-induced oxidative damage and neuronal injury. **Toxicology and Applied Pharmacology**. *in press*, 2011.
- MILATOVIC, D.; MONTINE, T.J.; ASCHNER, M. Measurement of isoprostanes as markers of oxidative stress. **Methods in Molecular Biology**. v. 758, p. 195-204, 2011.
- MILATOVIC, D.; ASCHNER, M. Measurement of isoprostanes as markers of oxidative stress in neuronal tissue. **Current Protocols in Toxicology**. v. 12, p. 1-12, 2009.
- MIN, Y.K.; LEE, J.E.; CHUNG, K.C. Zinc induces cell death in immortalized embryonic hippocampal cells via activation of Akt-GSK-3beta signaling. **Experimental Cell Research**. v. 313, p. 312-321, 2007.

MOCCHEGIANI, E., et al. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. **Progress in Neurobiology**. v. 75, p. 367-390, 2005.

MOLZ, S., et al. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. **Neurochemical Research**. v. 30, p. 83-89, 2005.

MONNET-TSCHUDI, F., et al. Involvement of environmental mercury and lead in the etiology of neurodegenerative diseases. **Reviews on Environmental Health**. v. 21, p. 105-117, 2006.

MOOS, T.; MORGAN, E.H. A morphological study of the developmentally regulated transport of iron into the brain. **Developmental Neuroscience**. v. 24, p. 99-105, 2002.

MORELLO, M., et al. Manganese intoxication decreases the expression of manganoproteins in the rat basal ganglia: An immunohistochemical study. **Brain Research Bulletin**. v. 74, p. 406-415, 2007.

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

MORENO, J.A., et al. Age-dependent susceptibility to manganese-induced neurological dysfunction. **Toxicological Sciences**. v. 112, p. 394-404, 2009b.

MORENO, J.A., et al. Developmental exposure to manganese increases adult susceptibility to inflammatory activation of glia and neuronal protein nitration. **Toxicological Sciences**. v. 112, p. 405-415, 2009a.

MORENO, J.A., et al. Manganese-induced NF- $\kappa$ B activation and nitrosative stress is decreased by estrogen in juvenile mice. **Toxicological Sciences**. v. 122, p.121-33, 2011.

MORRIS, C.M., et al. Uptake and distribution of iron and transferrin in the adult brain. **Journal of Neurochemistry**. v. 59, p. 300-306, 1992.

MORROW, J.D.; ROBERTS II, L.J. Mass spectrometric quantification of F<sub>2</sub>-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. **Methods in Enzymology**. v. 300, p. 3-12, 1999.

NAGAI, H., et al. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. **Journal Biochemistry and Molecular Biology**. v. 40, p. 1-6, 2007.

NAITO, W., et al. Exposure and risk assessment of zinc in Japanese surface waters. **Science of the Total Environment**. v. 408, p. 4271-4284, 2010.

NESTLER, E.J.; GREENGARD, P. **Protein phosphorylation in the nervous system**. New York: Wiley, 1984.

NESTLER, E.J.; GREENGARD, P. Serine and threonine phosphorylation. In: **Basic Neurochemistry**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999, p. 472-495.

NISHI, N., et al. Glutamate regulation of DARPP-32 phosphorylation in neostriatal neurons involves activation of multiple signaling cascades. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 102, p. 1199-1204, 2005.

NISWANDER, J.M.; DOKAS, L.A. Phosphorylation of HSP27 and synthesis of 14-3-3epsilon are parallel responses to hyperosmotic stress in the hippocampus. **Brain Research**. v. 1116, p. 19-30, 2006.

NORDBERG, G.F., et al. **Handbook on the toxicology of metals**. 3ed. Burlington: Academic Press, 2007, p. 975.

NORMANDIN, L., et al. Assessment of bioaccumulation, neuropathology, and neurobehavior following subchronic (90 days) inhalation in Sprague-Dawley rats exposed to manganese phosphate. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 183, p. 135-145, 2002.

OKUDA, B., et al. Parkinsonism after acute cadmium poisoning. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. v. 99, p. 263-265, 1997.

OLIVEIRA, M.R., et al. Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats. **Brain Research**. v. 1169, p. 112-119, 2007.

OTEIZA, P.I.; MACKENZIE, G.G.; VERSTRAETEN, S.V. Metals in neurodegeneration: involvement of oxidants and oxidant-sensitive transcription factors. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 25, p. 103-115, 2004.

PACKARD, M.G.; KNOWLTON, B.J. Learning and memory functions of the basal ganglia. **The Annual Review of Neuroscience**. v. 25, p. 563-593, 2002.

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

PAOLETTI, P.; ASCHER, P.; NEYTON, J. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. **Journal of Neuroscience**. v. 17, p. 5711-5725, 1997.

PARK, E.J.; PARK, K. Induction of oxidative stress and inflammatory cytokines by manganese chloride in cultured T98G cells, human brain glioblastoma cell line. **Toxicology in Vitro**. v. 24, p. 472-479, 2010.

PARK, J.A.; KOH, J.Y. Induction of an immediate early gene *egr-1* by zinc through extracellular signal-regulated kinase activation in cortical culture: its role in zinc-induced neuronal death. **Journal of Neurochemistry**. v. 73, p. 450-456, 1999.

PENN, J.S.; TOLMAN, B.L.; BULLARD, L.E. Effect of a water-soluble vitamin E analog, Trolox C, on retinal vascular developing in an animal model of retinopathy of prematurity. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 22, p. 977-984, 1997.

- PERL, D.P.; OLANOW, C.W. The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**. v. 66, p. 675-682, 2007.
- PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**. v. 83, p. 346-356, 1977.
- PLUM, L.M.; RINK, L.; HAASE, H. The essential toxin: impact of zinc on human health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 7, p. 1342-1365, 2010.
- POLISSIDIS, A., et al. Individual differences in the effects of cannabinoids on motor activity, dopaminergic activity and DARPP-32 phosphorylation in distinct regions of the brain. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 13, p. 1175-1191, 2010.
- POSSER, T., et al. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38MAPK and JNK1/2 but not of ERK1/2. **Archives of Toxicology**. v. 81, p. 407-414, 2007.
- PRABHAKARAN, K., et al. Molecular mechanism of manganese exposure-induced dopaminergic toxicity. **Brain Research Bulletin**. v. 76, p. 361-367, 2008.
- QI, Z.; MILLER, G.W.; VOIT, E.O. The internal state of medium spiny neurons varies in response to different input signals. **BMC Systems Biology**. v. 4, p. 1-16, 2010.
- QIN, Y., et al. Mechanisms of Zn<sup>2+</sup> efflux in cultured cortical neurons. **Journal of Neurochemistry**. v. 107, p. 1304-1313, 2008.
- RAIVICH, G.; BEHRENS, A. Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. **Progress in Neurobiology**. v. 78, p. 347-363, 2006.
- RAO, K.V.R., et al. Aquaporin-4 in manganese-treated cultured astrocytes. **Glia**. v. 58, p. 1490-1499, 2010.
- RASPOR, P., et al. Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-

tetramethylkroman-2-carboxyl acid). **Cell Biology International**. v. 29, p. 57-63, 2005.

RELIGA, D., et al. Elevated cortical zinc in Alzheimer disease. **Neurology**. v. 67, n. 1, p. 69-75, 2006.

RICCIO, A., et al. Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. **Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 12302-12309, 2002.

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, p. 511-533, 2000.

RIGON, A.P., et al. Neurotoxicity of cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for p38 MAPK. **Neurotoxicology**. v. 29, p. 727-734, 2008.

RIVERA-MANCÍA, S.; RÍOS, C.; MONTES, S. Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies. **Biometals**. v. 24, p. 811-825, 2011.

ROCHA, J.B.T., et al. Effect of treatment with mercuric chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver and blood of suckling rats. **Toxicology**. v. 100, p. 27-37, 1995..

RODIER, P.M. Developing brain as a target of toxicity. **Environmental Health Perspectives**. v. 103, p. 73-76, 1995.

ROOS, P.M.; VESTERBERG, O.; NORDBERG, M. Metals in motor neuron diseases. **Experimental Biology and Medicine**. v. 231, p. 1481-1487, 2006.

ROTH, J.A. Are there common biochemical and molecular mechanisms controlling manganism and parkinsonism. **Neuromolecular Medicine**. v. 11, p. 281-296, 2009.

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

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

RUBIN, R.; STRAYER, D.S. **Rubin's pathology: Clinicopathologic foundations of medicine**. 5ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

SAGACH, V.F., et al. The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage *in vitro* and *ex vivo*. A comparison with vitamin E. **Pharmacological Research**. v. 45, p. 435-439, 2002.

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

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

SANTAMARIA, A.B.; SULSKI, S.I. Risk assessment of an essential element: manganese. **J Journal of Toxicology and Environmental Health**. Part A, v. 73, p. 128-155, 2010.

SANTINI, E., et al. Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. **The Journal of Neuroscience**. v. 27, p. 6995-7005, 2007.

SAUER, H., et al. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF- $\alpha$ : The role of intracellular reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 35, n. 6, p. 586-94, 2003.

SCHENK, U., et al. A novel pathway for presynaptic mitogen-activated kinase activation via AMPA receptors. **Journal of Neuroscience**. v. 25, p. 1654-1663, 2005.

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

SCHUCK, P.F., et al. *In vitro* effect of quinolinic acid on energy metabolism in brain of young rats. **Neuroscience Research**. v. 57, p. 277-288, 2007.

SENSI, S.L., et al. Zinc in the physiology and pathology of the CNS. **Nature Review Neuroscience**. v.10, p. 780-791, 2009.

SENSI, S.L.; JENG, J. Rethinking the excitotoxic ionic milieu: the emerging role of Zn(2+) in ischemic neuronal injury. **Current Molecular Medicine**. v. 4, p. 87-111, 2004.

SEO, S.R., et al. Zn<sup>2+</sup>-induced ERK activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated PC12 cells. **Journal of Neurochemistry**. v. 78, p. 600-610, 2001.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nature Cell Biology**. v. 4, p. 131-136, 2002.

SHIN, H.J., et al. Manganese-mediated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  protein in Hep2 human laryngeal epithelial cells via activation of the family of MAPKs. **Toxicology in Vitro**. v. 24, p. 1208-1214, 2010.

SIDDAPPA, A.J.M., et al. Developmental changes in the expression of iron regulatory proteins and iron transport proteins in the perinatal rat brain. **Journal of Neuroscience Research**. v. 68, p. 761-775, 2002.

SIDORYK-WEGRZYNOWICZ, M., et al. Manganese disrupts astrocyte glutamine transporter expression and function. **Journal of Neurochemistry**. v. 110, p. 822-830, 2009.

SINICROPI, M.S., et al. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. **Archives in Toxicology**. v. 84, p. 501-520, 2010.

SMART, T.G.; XIE, X.; KRISHEK, B.J. Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. **Progress in Neurobiology**. v. 42, p. 393-441, 1994.

STORK, C.J.; LI, Y.V. Rising zinc: a significant cause of ischemic neuronal death in the CA1 region of rat hippocampus. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v. 29, p. 1399-1408, 2009.

SUBRAMANIAM, S.; UNSICKER, K. Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. **Neuroscience**. v. 138, p. 1055-1065, 2006.

SUZUKI, H., et al. Temporal parenteral nutrition in children causing T1 shortening in the anterior pituitary gland and globus pallidus. **Neuropediatrics**. v. 34, p. 200-204, 2003.

SVENNINGSSON, P., et al. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. **The Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 44, p. 269-296, 2004.

SWEATT, J.D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **Journal of Neurochemistry**. v. 76, p. 1-10, 2001.

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

TAKEDA, A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. **Brain Research Reviews**. v. 34, p. 137-148, 2000.

TAKEDA, A., et al. Differential effects of zinc on glutamatergic and GABAergic neurotransmitter systems in the hippocampus. **Journal of Neuroscience Research**. v. 75, p. 225-229, 2004.

TAKEDA, K.; ICHIJO, H. Neuronal p38 MAPK signaling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. **Genes to Cells**. v. 7, p. 1099-1111, 2002.

TAMM, C; SABRI, F.; CECCATELLI, S. Mitochondrial-mediated apoptosis in neural stem cells exposed to manganese. **Toxicological Sciences**. v. 101, p. 310-320, 2008.

TAPIERO, H.; TEW, K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 57, p. 399-411, 2003.

TAROHDA, T.; YAMAMOTO, M.; AMANO, R. Regional distribution of manganese, iron, copper, and zinc in the rat brain during development. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 380, p. 240-246, 2004.

TAYLOR, K.M., et al. ZIP7-mediated intracellular zinc transport contributes to aberrant growth factor signaling in antihormone-resistant breast cancer cells. **Endocrinology**. v. 149, p. 4912-4920, 2008.

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

TIAN, Y; YANG, Z.; ZHANG, T. Zinc ion as modulator effects on excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 neurons in Wistar rats. **Neuroscience Research**. v. 68, p. 167-175, 2010.

TJALKENS, R.B., et al. Manganese suppresses ATP-dependent intercellular calcium waves in astrocyte networks through alteration of mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium dynamics. **Brain Research**. v. 1113, p. 210-219, 2006.

TKÁČ, I., et al. Developmental and regional changes in the neurochemical profile of the rat brain determined by *in vivo* <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Medicine**. v. 50, p. 24-32, 2003.

TOLOSA, E.M.C., et al. **Manual de técnicas para histología normal e patológica**. 2ed. Barueri: Manole, 2003.

TRUMBO, P., et al. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 101, p. 294-301, 2001.

- USUKI, F., et al. *In vivo* protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. **Neuroscience Letters**. v. 304, p. 199-203, 2001.
- VALLEE, B.L.; FALCHUK, K.H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiological Reviews**. v. 73, p. 79-118, 1993.
- 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, p. 205-221, 2006.
- VERINA, T.; ROHDE, C.A.; GUILARTE, T.R. Environmental lead exposure during early life alters granule cell neurogenesis and morphology in the hippocampus of young adult rats. **Neuroscience**. v. 145, p. 1037-1047, 2007.
- WAETZIG, V.; HERDEGEN, T. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. **Neuroscience Letters**. v. 361, p. 64-67, 2004.
- WALAAS, S.I.; ASWAD, D.W.; GREENGARD, P. A dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. **Nature**. v. 301, p. 69-71, 1983.
- WANG, J.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. **European Journal of Neuroscience**. v. 25, p. 59-68, 2007.
- WASSERMAN, G.A., et al. Developmental impacts of heavy metals and undernutrition. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 102, p. 212-217, 2008.
- WAYMAN, G.A., et al. Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. **Neuron**. v. 50, p. 897-909, 2006.
- WEBER, S., et al. Effects of manganese (Mn) on the developing rat brain: Oxidative-stress related endpoints. **NeuroToxicology**. v. 23, p. 169-175, 2002.

WILLIAMS, R.J. et al. Zinc-histidine complex protects cultured cortical neurons against oxidative stress-induced damage. **Neuroscience Letters**. v. 371, p. 106-110, 2004.

WONG, W.; SCOTT, J.D. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 5, p. 959-970, 2004.

WRIGHT, R.O.; BACCARELLI, A. Metals and Neurotoxicology. **The Journal of Nutrition**. v. 137, p. 2809-2813, 2007.

XU, B.; XU, Z.; DENG, Y. Protective effects of MK-801 on manganese-induced glutamate metabolism disorder in rat striatum. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 62, p. 381-390, 2010.

YAMADA, M., et al. Chronic manganese poisoning: a neuropathological study with determination of manganese distribution in the brain. **Acta Neuropathologica**. v. 70, p. 273-278, 1986.

YAMASAKI, S., et al. Zinc is a novel intracellular second messenger. **The Journal of Cell Biology**. v. 177, n. 4, p. 637-645, 2007.

YANG, Y., et al. Intrastratial manganese chloride exposure causes acute locomotor impairment as well as partial activation of substantia nigra GABAergic neurons. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 31, p. 171-178, 2011.

YIN, Z., et al. Mitochondrial-dependent manganese neurotoxicity in rat primary astrocyte cultures. **Brain Research**. v. 1206, p. 1-11, 2008.

YOKEL, R.A. Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 10, p. 223-253, 2006.

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.
- YOON, M., et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling of fetal and neonatal manganese exposure in humans: describing manganese homeostasis during development. **Toxicological Sciences**. v. 122, p. 297-316, 2011.
- ZEPEDA, R.C., et al. Glutamate-dependent transcriptional regulation in bergmann glia cells: involvement of p38 MAP kinase. **Neurochemical Research**. v. 33, p. 1277-1285, 2008.
- ZHANG, F., et al. *In vitro* effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 26, p. 232-236, 2008.
- ZHANG, Q.G., et al. NMDA receptor/L-VGCC-dependent expression and AMPA/KA receptor-dependent activation of c-Jun induced by cerebral ischemia in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**. v. 398, p. 268-273, 2006.
- ZHANG, S.; FU, J.; ZHOU, Z. *In vitro* effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. **Toxicology in Vitro**. v. 18, p. 71-77, 2004.
- ZUSE, A., et al. 9-Benzylidene-naphtho[2,3-b]thiophen-4-ones and benzylidene-9(10H)-anthracenones as novel tubulin interacting agents with high apoptosis-inducing activity. **European Journal of Pharmacology**. v. 575, n. 1-3, p. 34-45, 2007.