



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

ISADORA MONTEIRO DA SILVA RABELO GONÇALVES GUIMARÃES

**EFEITO DO GÊNERO SOBRE A DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DE MANGANÊS EM
RATOS TRATADOS COM DOSE NEUROTÓXICA DESSE METAL**

CEILÂNDIA, DF

2015

ISADORA MONTEIRO DA SILVA RABELO GONÇALVES GUIMARÃES

**EFEITO DO GÊNERO SOBRE A DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DE MANGANÊS EM RATOS
TRATADOS COM DOSE NEUROTÓXICA DESSE METAL**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Profa. Dra. Vivian da Silva Santos

CEILÂNDIA, DF

2015

ISADORA MONTEIRO DA SILVA RABELO GONÇALVES GUIMARÃES

**EFEITO DO GÊNERO SOBRE A DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DE MANGANÊS EM RATOS
TRATADOS COM DOSE NEUROTÓXICA DESSE METAL**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vivian da Silva Santos (FCE/ Universidade de Brasília)
Orientadora

Prof. Dr. José Eduardo Pandossio (FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza (FCE/ Universidade de Brasília)

CEILÂNDIA, DF

2015

AGRADECIMENTOS

Àquele que me deu o dom da vida e me chamou pelo nome ainda no ventre da minha mãe, Deus. Agradeço por nunca me deixar desistir e abençoar minha vida e meus passos, por me dar forças para seguir em frente, sempre de cabeça erguida. Também agradeço a minha mãezinha do céu, por passar sempre a minha frente, me conduzindo, me amando e intercedendo sempre ao Pai para que o melhor sempre aconteça, seu amor, carinho e proteção me deram forças e sustento nessa jornada.

Aos meus pais, Mauro e Aparecida, que fizeram o possível e o impossível para que essa etapa do meu sonho se realizasse. Eles que não mediram esforços para que tudo ocorresse da melhor maneira, e principalmente por me apoiarem incondicionalmente e acreditarem no meu sonho, ultrapassando distâncias e saudades intermináveis, e me amando com o amor mais puro que conheço. Por serem meus maiores exemplos de vida, dedicação e amor. Ao meu irmão Rennan, por sempre acreditar que eu podia ser melhor, por se orgulhar de mim e despertar meu melhor lado sempre.

A todos os meus familiares que sonharam comigo a conclusão dessa trajetória, avós, tios e primos, que mesmo longe torceram por mim. Em especial a minha avó Maria, que com seu olhar carinhoso, seu silêncio e suas orações, sempre me deram força e amparo.

Aos meus amigos que estiveram presentes de diferentes maneiras, aqueles que conheci na faculdade, aos de infância (Ceres - GO), e aqueles que a vida me permitiu conhecer e escolher. Todos as suas maneiras contribuíram para a conclusão dessa fase.

De forma particular, agradeço a minha orientadora, professora Vívian da Silva Santos, por ter aceito o meu convite para trabalharmos juntas, pela oportunidade que me confiou de participar do seu grupo de pesquisa em 2014, por acreditar em mim, por ser tão presente, prestativa e por me ensinar tanto. Sua postura profissional e pessoal são um exemplo para mim e me impulsionam a ser uma pessoa melhor.

Sou grata aos professores José Eduardo Pandossio e Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza por participarem da banca examinadora e contribuírem com seus conhecimentos.

Ao professor Fernando Barbosa Júnior pelo espaço cedido em seu laboratório para a realização de alguns experimentos, o Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. À técnica do laboratório, Vanessa, pelo auxílio, dedicação e cuidado com meus experimentos.

A todos meus colegas de pesquisa, que foram parte essencial para a realização deste trabalho, professor José Eduardo Pandossio, Diogo Santana, Michelly Gonçalves, Adriana Tiemi e Matheus Tavares, por todo o companheirismo, momentos de descontração e pelo convívio contínuo ao longo desse ano, compartilhando alegrias e angústias da vida acadêmica.

Ao meu querido amigo Aléxi Muchale, pela amizade sincera, auxílio em meus experimentos em tempos de férias e viagens, pelo cuidado durante o preparo das amostras e por todo o companheirismo e disposição.

Ao meu mais novo achado, Natália Guimarães, por ter me dado seu apoio, seu olhar carinhoso, suas palavras reconfortantes e seu entusiasmo quando este me faltava.

À minha conselheira e amiga de fé, Bruna Fontineles, por me incentivar, cuidar, amparar, aconselhar e lembrar que no final tudo daria certo.

À minha amiga Thais Oliveira e sua família por cuidarem de mim e serem minha segunda família em Brasília.

À Universidade Católica de Brasília por ceder o espaço e os animais para que este trabalho pudesse se realizar.

À Universidade de Brasília/Faculdade de Ceilândia por proporcionar a oportunidade da realização desse sonho, ao corpo docente do curso de Farmácia, que pelo ensino e dedicação permitiu formar profissionais completos.

Meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, auxiliaram na minha formação e acreditaram em mim. Concluo esse curso com muita satisfação e orgulho e com a certeza de que isso é só o começo.

A todos vocês meus mais sinceros agradecimentos!

RESUMO

GUIMARÃES, I. M. S. R. G. **Efeito do gênero sobre a distribuição tecidual de manganês em ratos tratados com dose neurotóxica desse metal.** 2015. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

O manganês (Mn) é um elemento químico essencial à vida, pois apresenta inúmeras funções já bem estabelecidas. No entanto, em altas doses pode-se estabelecer a condição de intoxicação, a qual pode desencadear inúmeros sinais e sintomas. O Mn é preferencialmente neurotóxico, entretanto, pouco se sabe sobre o bioacúmulo do Mn em diferentes tecidos cerebrais envolvendo estudos gênero-específicos. No presente estudo, foram avaliados ratos tratados com manganês, intraperitonealmente, por 30 dias, comparados com ratos tratados com solução salina 0,9% (controle). Esses grupos foram subdivididos por gênero (machos e fêmeas). Na primeira semana, todos os machos tratados com Mn a 10mg/Kg I.P. foram a óbito, o que não era esperado. Sendo assim, foi avaliado apenas o grupo das fêmeas tratadas com Mn e essas comparadas com o controle. Foram avaliados cinco estruturas do SNC, além dos tecidos renais e hepáticos. A estrutura com maior acúmulo de Mn foi o tronco encefálico. Cabe destacar que, em valores médios, todos os dissecados do SNC tiveram acúmulo significativo quando comparados ao controle. No dissecado hepático houve apenas uma tendência ao acúmulo ($p=0,083$), mesmo esse sendo o principal órgão excretor de Mn. Já no dissecado renal o acúmulo foi estatisticamente significativo, o que sugere a hipótese de aumento na produção de metalotioneínas e essas eliminariam Mn pelos rins, explicando o acúmulo neste tecido. O acúmulo de Fe nos dissecados também foi avaliado, uma vez que a literatura sugere que o aumento do Mn diminui o Fe, pois ambos competem pelos mesmos transportadores (DMT1). Porém, o acúmulo de Fe não foi proporcional ao de Mn, o que sugere que existam outras maneiras de transportar Mn além do DMT1. Conclui-se, neste estudo, que: (i) machos são menos tolerantes a doses neurotóxicas de Mn; (ii) o Mn apresentou acúmulo significativo em todos os dissecados do SNC aqui estudados, sendo o de maior acúmulo o tronco encefálico; (iii) o ferro é um biomarcador de acúmulo de Mn, porém existem outras vias de transporte além do DMT1.

Palavras chave: manganês; ferro; neurotoxicidade do manganês; tratamento subcrônico; estudo de gêneros.

ABSTRACT

GUIMARÃES, I. M. S. R. G. **Gender effect on the tissue distribution of manganese in rats treated with neurotoxic dose of that metal.** 2015. Graduation Dissertation – Faculty of Ceilândia, University of Brasília, Brasília, 2015.

Manganese (Mn) is an essential chemical element for life, as its biological functions are already well established. However, high doses of manganese can establish the condition of intoxication, which can trigger numerous symptoms. The Mn is preferably neurotoxic, however, little is known about Mn bioaccumulation in different brain tissues involving gender-specific studies. In the present study, we evaluated rats treated with manganese for 30 days, compared with rats treated with 0.9% saline solution (control). These groups were divided by gender (males and females). On the first week, all male rats treated with Mn 10mg/Kg I.P. were dead, which was not expected. After that, we evaluated only the group of female rats treated with Mn compared to control. It was evaluated five dissected CNS in addition to the renal and hepatic tissues. Brainstem was the tissue with more Mn accumulation. It is worth mentioning that in average values, all the CNS dissected had significantly increased accumulation when compared to controls. However in the hepatic tissue there was only a trend in accumulation ($p = 0.083$), even the liver being the main excretory organ of Mn. In renal dissected the accumulation was significant, suggesting the possibility of an increase in the production of Metallothioneins and that these would eliminate Mn by the kidneys, explaining the accumulation on this tissue. The accumulation of Fe in the dissected was also evaluated, as the literature suggests that with the increase of Mn, Fe levels decrease, as both compete for the same transporters (DMT1). The accumulation of Fe was not proportional to the Mn, which suggests that there are other ways of transporting Mn beyond DMT1. This study concluded that: (i) males are less tolerant of neurotoxic doses of Mn; (ii) the Mn presented significant accumulation on all CNS dissected studied, being the most accumulation occurring in the brainstem; (iii) iron is a biomarker of manganese accumulation, however there are other transport routes beyond the DMT1.

Keywords: manganese; iron; neurotoxicity of manganese; subchronic treatment; study of gender.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Variação de massa corporal de ratas tratadas com manganês por 30 dias, comparadas com ratas tratadas com solução salina 0,9% (controle).....14
- Figura 2.** Variação de massa corporal de ratos tratados com manganês por 30 dias, comparadas com ratos tratados com solução salina 0,9% (controle).....15
- Figura 3.** Deposição de Manganês em tecidos hepático e renal. Valores de $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente diferentes.....16
- Figura 4.** Deposição de Manganês em dissecados do SNC. Valores de $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente diferentes.....18
- Figura 5.** Deposição de Ferro em tecidos hepáticos e renais. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.....19
- Figura 6.** Deposição de Ferro em dissecados do SNC. Valores de $p < 0,001$ e $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente diferentes.....21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de machos tratados.....11

Tabela 2. Grupos de fêmeas tratadas.....11

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BHE	barreira hematoencefálica
Cd	Cádmio
CE	Cerebelo
CEUA-UnB	Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília
CO	Córtex
DMT1	Transportador de metais divalentes tipo 1
DP	Doença de Parkinson
EST	Estriado
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.
Fe	ferro
Hg	mercúrio
HIP	Hipocampo
ICP-MS	espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado
IP	Intraperitoneal
Mn	manganês
MTs	metalotioneínas
MnCl ₂ .4H ₂ O	cloreto de manganês tetra-hidratado
NaCl	solução salina 0,9%
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TE	Tronco Encefálico
TMAH	hidróxido de tetrametilamônio

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 A Essencialidade do Elemento Químico Manganês	1
1.2. Toxicologia do Manganês	2
1.3. Neuroanatomia do Sistema Nervoso Central e sua relação com sintomas de Neurotoxicidade.....	4
1.4. Influência do Gênero na Intoxicação por Manganês	7
2 JUSTIFICATIVA.....	8
3 OBJETIVOS	9
3.1 Objetivos Geral.....	9
3.2 Objetivos Específicos.....	9
4 MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1. Reagentes	10
4.2. Animais e tratamento.....	10
4.3. Determinação de Mn e Fe, por ICP-MS.....	12
4.4. Estatística	12
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5.1. Exposição subcrônica à 10 mg/Kg de Mn por via I.P. diminui a massa corporal em ratos tratados.....	13
5.2. Exposição subcrônica a 10 mg/Kg I.P. de Mn em ratas altera a distribuição do Mn no tecido renal e não altera no tecido hepático.	16
5.3. Exposição subcrônica a 10 mg/Kg I.P. de Mn em ratas altera a distribuição do Mn nos dissecados de SNC.....	18
5.4. Exposição subcrônica a 10 mg/Kg I.P. de Mn em ratas altera a distribuição do Fe tanto no tecido renal quanto no tecido hepático.....	19
5.5. Exposição sub-crônica a 10 mg/Kg I.P. de Mn em ratas altera a distribuição do Fe apenas no tronco encefálico e no córtex.....	21
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
Anexo I – Aprovação do Projeto em Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) ...	29

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A Essencialidade do Elemento Químico Manganês

O Manganês (Mn) é um elemento químico essencial por apresentar funções bem estabelecidas em inúmeros processos fisiológicos, desempenhando papéis tanto estruturais, quanto enzimáticos. Dentre suas diversas funções, podem-se citar o seu papel no desenvolvimento do sistema esquelético, funções do sistema nervoso e imunológico e funções hormonais reprodutivas (KEEN, et al., 1999). As funções metabólicas básicas desempenhadas pelo Mn são: (i) atuação como ativador de enzimas na gliconeogênese de enzimas piruvato-carboxilase e isocitrato desidrogenase; (ii) cofator da isoenzima 2 da superóxido dismutase (Mn-SOD2) que atua na proteção mitocondrial detoxificando ânions superóxido; (iii) ativa a glicosil-transferase, que está diretamente envolvida na síntese de mucopolissacarídeos, dentre outros (SANTAMARIA, 2008).

Em concentrações apropriadas nos sistemas dependentes de Mn, age como antioxidante, sendo crucial para tecidos de alta demanda energética, tais como o hepático e cerebral. No cérebro, é um cofator enzimático importante para inúmeras enzimas, entre elas: superóxido dismutase 2 (já citada) e glutamina sintetase (SANTAMARIA, 2008).

Já em concentrações subótimas, o Mn tem implicações na saúde que caracterizam sua deficiência, corroborando com o fato de ser um elemento químico essencial. Como consequência da deficiência de Mn, o metabolismo de hidratos de carbono, glicose e lipídios é alterado, além da síntese e ação da insulina (KEEN, 1994). FRIEDMAN e colaboradores (1987) observaram que a deficiência de Mn em humanos apresenta sintomas que incluem dermatites, retardo de crescimento de cabelo e unhas, diminuição de níveis séricos de colesterol e diminuição dos níveis de proteínas da coagulação, assim a manutenção da homeostasia para o Mn possui variação, pois os níveis exigidos para esta podem ser diferentes dependendo da idade e do gênero (ROELS, et al., 2012).

A fonte mais importante de Mn para a população em geral é a dieta, sendo que o consumo médio de Mn varia de 2 a 9 mg/dia. A ingestão máxima tolerada para o Mn proveniente dos alimentos é de 10 mg/dia para um indivíduo de 70kg, segundo a literatura aceita até o momento (GREGER, 1998).

O Mn é comumente encontrado nos alimentos, e os alimentos considerados fonte de Mn, são: nozes, cereais, legumes, frutas, grãos e chás, dentre outros (SANTAMARIA, 2008). Deste modo, a abundância de alimentos fonte de Mn torna a deficiência de Mn discutível, pois dessa maneira as populações estão constantemente suprindo as concentrações essenciais. Além disso, suplementos vitamínicos e minerais podem conter de 1 a 20 mg de Mn/tabletes (ASTDR, 2000; ASCHNER, et al., 2005).

Com relação a população brasileira, a ingestão média de Mn é variável, devido à escolha dos alimentos, pois existem os alimentos típicos de cada região. A exemplo, o que acontece no sul do Brasil com o consumo da erva-mate, pela tradição do chimarrão que é rico em Mn, fazendo com que os valores médios de exposição diária pela alimentação sejam 7 vezes maiores que a segunda região mais exposta que é a Centro –Oeste, para homens e mulheres (POF, 2011).

O organismo de mamíferos possui mecanismos regulatórios que mantêm o Mn em concentrações homeostáticas no corpo, a fim de evitar a falta ou o excesso desse metal. Esse controle homeostático equilibra a absorção e eliminação dos excessos do Mn via excreção hepatobiliar (ABRAMS, et al., 1976).

Entretanto, em certas condições a exposição a elevadas concentrações de Mn pode sobrecarregar os mecanismos de eliminação e então gerar acúmulo em diversos tecidos do corpo, tais como ósseo, renal, hepático e esplênico (CRITCHFIELD, 1992; KEEN, 1994). O Mn na sua forma 2+ e 3+ atravessa facilmente a barreira hematoencefálica (BHE), podendo gerar acúmulo em regiões específicas do cérebro, tais como hipocampo, cerebelo e estriado, desencadeando efeitos neurotóxicos (O'NEAL, et al., 2014b).

1.2. Toxicologia do Manganês

Apesar de sua comprovada essencialidade, o Mn pode induzir efeitos tóxicos quando em excesso, principalmente após exposições repetidas em longo prazo. Tais efeitos tóxicos são bem estabelecidos para o de sistema nervoso central (SNC) devido à bioacumulação preferencial do Mn na região dos núcleos da base. Nessa estrutura cerebral, o Mn é conhecido por causar danos motores similares ao parkinsonismo e denominado de Manganismo (RACETTE, et al., 2001). Apesar de

diversas similaridades nos sinais e sintomas, o manganismo é refratário à terapêutica do parkinsonismo (BARBEAU, 1984; BOWLER, et al., 2006).

O primeiro relato sobre o manganismo aconteceu em 1837, na França, por John Couper. Durante alguns anos, ele observou efeitos neurológicos apresentados em cinco trabalhadores de um minério de Mn. A doença se instalou através da intoxicação ocupacional crônica, que se dava devido à inalação. Entre os sintomas observados estavam: fraqueza muscular, tremor nos membros, fala sussurrada, aumento da salivação e uma postura curvada.

Historicamente, a neurotoxicidade do Mn está associada com a atividade ocupacional, tais como: mineração de Mn e fundição, fabricação de baterias e produção de aço, (SANTAMARIA, 2007), além de água contaminada (LJUNG, et al., 2007).

Atualmente se sabe que, pacientes que sofrem de manganismo tem sinais e sintomas muito semelhantes, mas não idênticos, a doença de Parkinson (DP) (JIANG, et al., 2006; ASCHNER, et al., 2007; RACETTE et al., 2012). Em geral, os sintomas clínicos da neurotoxicidade do Mn são progressivos e irreversíveis, o que torna crítico o diagnóstico precoce para o devido tratamento e prevenção da intoxicação e danos mais severos (O'NEAL, et al., 2014a). Dados mais recentes também demonstram que Mn pode acelerar o aparecimento dos primeiros sintomas da DP em pacientes já geneticamente predispostos a desenvolver a doença (DEWITT, et al., 2013).

O mecanismo geral e conhecido de ação toxicológica do Mn é resultado de interações desse (quando há uma deposição excessiva) com células dopaminérgicas, desencadeando a auto-oxidação da dopamina levando à morte celular. A diminuição da dopamina estriatal devido à elevada exposição ao Mn foi verificada em camundongos (LIU, et al., 2006), ratos (DORMAN, et al., 2000), coelhos (MUSTAFA; CHANDRA, 1971) e primatas (BIRD, et al., 1984). A atividade aumentada ou diminuída da dopamina na neurotransmissão leva a uma série de distúrbios, ligados não somente a sintomas do parkinsonismo, como também à esquizofrenia e outros efeitos neuropsíquicos, o que explica a utilização do termo *Locura manganica*, além do termo Manganismo para designar alguns casos clínicos de intoxicação por esse elemento químico (BEN-JONATHAN; HNASKO, 2001; FINKELSTEIN, et al., 2007).

A exposição crônica ao Mn, em macacos, determinou o aparecimento de um comportamento hiperativo no início e, subsequentemente, transformou-se em hipoativo, com uma marcha instável e o tremor de ação em alguns animais (ERIKSSON, et al., 1987). Um estudo recente com administração via intraperitoneal na dose 25 mg/Kg por 21 dias realizado com camundongos, demonstrou que a exposição ao Mn, levou a alteração comportamental e perda de peso, com sintomas de distúrbios neurológicos. Além disso, efeitos diferenciais no perfil neuroquímico regional foram observados, indicando que além da dopamina, outros neurotransmissores também podem ser afetados pela exposição ao manganês (BAGGA; PATEL, 2012).

SASSINE e colaboradores (2002) também afirmaram existir uma ação sinérgica entre o consumo de álcool e a exposição ao manganês, produzindo efeitos neuropsiquiátricos. Estes dados confirmam que além da exposição ambiental e ocupacional, o estilo de vida pode ser um fator de susceptibilidade para a observação de efeitos neurotóxicos.

FORDAHL e colaboradores (2012) observaram que ratos tratados por 15 semanas com água contendo 1 g/L de Mn (correspondente a uma ingestão diária de 100 mg/Kg corpóreo) altera o metabolismo lipídico associado a um comportamento estereotipado e exploratório com alterações no ciclo circadiano dos ratos. Entretanto, estudos com menores doses de Mn devem ser encorajados pois poderiam refletir de uma forma mais fidedigna a exposição humana quer de origem ocupacional e ambiental, por alimentos e água contaminados.

Em suma, o sistema nervoso central (SNC) é particularmente susceptível ao excesso de Mn. Nos seres humanos, tem sido postulado que existe um espectro de efeitos comportamentais e neurofisiológicos, associados com a neurotoxicidade do Mn, incluindo tanto os sintomas clínicos como os subclínicos. (MERGLER, et. al., 1999).

1.3. Neuroanatomia do Sistema Nervoso Central e sua relação com sintomas de Neurotoxicidade

O sistema nervoso (SN) é dividido em: sistema nervoso central e sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é constituído pelo encéfalo e a medula espinhal, que estão situados no interior da proteção do crânio e na coluna vertebral,

respectivamente. Essa é a parte mais complexa do SN, pois cada parte é responsável por uma função principal e o acúmulo de toxicantes em regiões específicas pode indicar os tipos de efeitos tóxicos observados.

Neste estudo cinco regiões do SNC foram estudadas, são elas: Cerebelo (CE), Tronco Encefálico (TE), Hipocampo (HIP), Estriado (EST) e Córtex (CO).

O tronco encefálico é constituído por: bulbo, ponte e mesencéfalo. Ele forma apenas uma pequena porção do encéfalo, contudo é de extrema importância, pois é através dele que passam tratos de fibras nervosas aferentes e eferentes, as quais ligam o encéfalo à medula espinhal. São esses tratos que levam informações sensitivas do tronco e membros e assim permitem movimentos. É também no tronco encefálico que estão os locais de origem e as terminações de muitos nervos cranianos e é através deles que o encéfalo enerva a cabeça. É ainda no TE que estão situados os centros que controlam funções vitais como a respiração, o sistema cardiovascular e o nível de consciência. Lesões no TE podem ser particularmente perigosas, pois nele estão localizados os centros respiratório e vasomotor (MACHADO, 2007)

O cerebelo está ligado ao TE por uma grande massa de fibras nervosas que se situam lateralmente ao quarto ventrículo, uma de cada lado. O CE consiste em uma lâmina externa de substância cinzenta e está envolvido com a coordenação do movimento, operando em um nível inteiramente inconsciente. Quando lesionado, os sintomas apresentados podem ser agrupados em três categorias, são elas: (i) incoordenação dos movimentos; (ii) perda de equilíbrio; e (iii) hipotonia.

O hipocampo é uma estrutura complexa que ocupa a porção medial do assoalho do corno temporal, formando um arco ao redor do mesencéfalo. Anatomicamente, pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda. É ele o responsável pela consolidação de memórias, transformando memórias de curto prazo em memórias de longo prazo, porém memórias já consolidadas não estão envolvidas com o HIP, como é mostrado no caso do paciente H.M. que, na infância, era uma criança normal mas, aos 9 anos, sofreu um grave acidente de bicicleta e teve um traumatismo craniano grave, com isso H.M. sofria de graves epilepsias. Após muitos exames foi constatado o local exato da lesão e então proposta a retirada dos seus hipocampos, giros parahipocampal, amígdalas e o córtex entorrinal. Posteriormente à cirurgia o paciente se livrou da epilepsia, porém perdeu a capacidade de reter

novas memórias (MADER, 2001). Lesões no HIP sugerem uma desregulação do comportamento emocional e da memória.

O corpo estriado é formado por dois núcleos, o núcleo caudado e o núcleo lentiforme, eles são separados em toda a sua extensão por uma cápsula interna, sendo unidos por porções anteriores. Ele é dividido em duas partes: o neoestriado ou estriado e o paleoestriado ou pallidum. A porção dorsal do estriado possui função motora somática e a porção ventral função do comportamento emocional. O estriado possui conexões por dois circuitos fundamentais, o básico e o subsidiário. O circuito básico conecta o estriado ao córtex cerebral, processando diversas informações de inúmeras áreas corticais e influencia a atividade motora através do trato córtico-espinhal, além de possuir função no planejamento motor. No circuito subsidiário temos a via nigro-estriato-nigral, a qual neurônios dopaminérgicos da substância negra se conectam a neurônios neoestriatais, os quais recebem aferências corticais e enviam eferências ao globo pálido. Essa via está intimamente ligada à Doença de Parkinson (DP). Já a via pálido-subtálamo-palidal está ligada ao hemibalismo, que é um quadro neurológico que faz o indivíduo ter movimentos involuntários de membros superiores. Quando lesionado, os sintomas são essencialmente motores, tanto na execução do movimento quanto no planejamento. Existem quatro principais síndromes associadas a lesões no EST, são elas: (i) doença de Parkinson; (ii) coreia ou Doença de Huntington, que são movimentos rápidos e involuntários de grande amplitude que lembram uma dança; (iii) atetose, a qual se manifesta por movimentos involuntários lentos e sinuosos, especialmente nos antebraços e mãos; (iiii) hemibalismo, caracterizado por movimentos involuntários violentos de uma das extremidades que, em casos mais graves não desaparecem nem com o sono, o que pode levar o doente à exaustão (MACHADO, 2007).

O córtex é uma fina camada de substância cinzenta que reveste o centro branco medular do cérebro. É uma das partes mais importantes do SNC. É nele que chegam impulsos provenientes de todas as vias da sensibilidade, que então se tornam conscientes e são interpretadas. É também dele que saem os impulsos nervosos que iniciam e comandam os movimentos voluntários e, com ele, estão relacionados os fenômenos psíquicos. Lesões no CO geralmente comprometem a capacidade do indivíduo de pensar, de controlar as emoções e comportar-se normalmente. Contudo, existem áreas específicas do CO que são responsáveis por

tipos específicos de comportamentos, podendo gerar danos motores, espaciais ou emocionais (MACHADO, 2007)

1.4. Influência do Gênero na Intoxicação por Manganês

É discutido recentemente na literatura que machos e fêmeas possam responder diferentemente ao excesso de Mn. SAHNI e colaboradores (2007) observaram, em um estudo de caso com uma família exposta sazonalmente ao Mn, que o sexo feminino foi mais propenso à intoxicação com apresentação de sintomas clínicos. Outro fato observado é que a idade também influencia o aparecimento de sintomas, pois toda a família foi exposta, porém apenas a filha de 6 anos teve apresentações clínicas. ATSDR (2000), também afirma que fêmeas absorvem Mn de forma mais eficaz, e estudos com animais indicam que os jovens podem absorver mais que os adultos.

OULHOTE e colaboradores (2014) examinaram os níveis de Mn no sangue na população dos Estados Unidos da América (EUA) por uma amostragem, em relação ao sexo, idade, raça, gravidez e menopausa, além de níveis de elemento traço no sangue, tais como chumbo e mercúrio. Foi observado que os níveis sanguíneos de Mn foram superiores nas mulheres e, ainda maiores, em grávidas, aumentando ainda mais no final da gestação, cerca de 4 vezes maiores.

É amplamente demonstrado que, durante a infância, os níveis de Mn são maiores que na fase adulta, sendo que mulheres tendem a ter níveis ligeiramente mais altos do que homens. Pessoas com deficiência de ferro tendem a ter os níveis de Mn aumentados e uma hipótese desse aumento é a regulação positiva do mecanismo de absorção gastrointestinal compartilhada por Mn e Fe (ZOTA, et. al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

É crescente a preocupação do meio científico com os problemas de saúde relacionados à intoxicação por Mn envolvendo sua neurotoxicidade. Porém poucas são as pesquisas que demonstram o bioacúmulo do Mn em diferentes tecidos cerebrais envolvendo estudos gênero-específicos.

Vale ressaltar ainda que existem inúmeros estudos na literatura sobre intoxicação crônica por Mn incluindo a sua distribuição e avaliação de possíveis mecanismos de ação. Porém a grande maioria é com populações do gênero masculino. Sendo assim, existe uma carência de estudos que sujeitem ambos os gêneros às mesmas condições a fim de gerar dados fidedignos de exposição.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Geral

Expor ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) a dose reconhecidamente neurotóxica de manganês e avaliar a deposição do metal em diferentes estruturas.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a concentração de Mn nos tecidos hepático e renal;
- Avaliar a concentração de Mn nos tecidos encefálicos, Tronco Encefálico, Cerebelo, Hipocampo, Estriado e Córtex;
- Avaliar a concentração de Fe nos tecidos hepático e renal;
- Avaliar a concentração de Fe nos tecidos encefálicos, Tronco Encefálico, Cerebelo, Hipocampo, Estriado e Córtex;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Os reagentes químicos foram adquiridos a partir das seguintes fontes: cloreto de manganês tetra-hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos); solução de soro fisiológico (NaCl 0,9%); ketamina (Fort Dodge, IA); Xilazina from Vedco (São José, MO) ; triton X-100 e hidróxido de tetrametilamônio em água (TMAH) 25% (m/v) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) . Todos os reagentes foram de grau analítico, grau HPLC, ou o melhor grau farmacêutico disponível.

Todas as amostras foram armazenadas em tubos de propileno do tipo Falcon[®] livres de contaminação por metais (BD[®] - Becton, Dickinson and Company).

4.2. Animais e tratamento

Ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) foram adquiridos do Biotério do curso de Psicologia da Universidade Católica de Brasília, (UCB) (Brasília, DF, Brasil). Foram alojados em gaiolas coletivas em um ciclo de 12 h de claro/escuro, com temperatura controlada de $22^\circ\text{C} \pm 2$. No momento da utilização, os ratos tinham 8 semanas de idade e pesavam entre 180 a 220 g.

Os animais tiveram acesso *ad libitum* a água da torneira filtrada e ração extrusada (Presence Nutrição Animal – Industria Brasileira). Os estudos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (CEUA- UnB) conforme certificado em anexo, (anexo I)

O delineamento experimental para a verificação de acúmulo de Mn nos tecidos foi de um tratamento subcrônico (CASARETT e DOULL, 2012), totalizando 30 dias ininterruptos de tratamento. Os animais foram divididos em 2 grupos (controle n=16 e Mn n=15) como mostram as tabelas 1 e 2 abaixo, e posteriormente cada grupo foi dividido em machos e fêmeas, os quais foram submetidos às mesmas condições, porém em gaiolas coletivas separadas.

Tabela 1. Grupos de machos tratados

Machos	Número de Animais	Tempo Tratamento	Dose Administrada
Grupo Mn	07	30 Dias	10 mg/Kg de Mn por dia/ I.P.
Grupo Controle	08	30 Dias	10 mg/Kg de NaCl 0,9% por dia/ I.P.

Tabela 2. Grupos de fêmeas tratadas.

Fêmeas	Número de Animais	Tempo Tratamento	Dose Administrada
Grupo Mn	08	30 Dias	10 mg/Kg de Mn por dia/ I.P.
Grupo Controle	08	30 Dias	10 mg/Kg de NaCl 0,9% por dia/ I.P.

Os grupos controles receberam administração diária de solução de soro fisiológico (NaCl 0,9%) a 10% do total do peso corporal do animal. Os grupos Mn receberam administração diária de 10 mg Mn/kg tendo seus cálculos ajustados para que a dose administrada fosse puramente Mn. Todos os animais foram tratados com injeções intraperitoneais (IP).

Solução salina 0,9% foi administrada nos animais dos grupos controles por injeções IP no volume de 10% do peso corporal de cada animal, uma vez ao dia, durante 30 dias ininterruptos. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ dissolvido em solução salina estéril, foi administrado aos ratos por injeções intraperitoneais de 10 mg de Mn / kg, uma por dia, 7 dias por semana, durante 30 dias. Este regime de dose foi selecionado com base na literatura, onde essa é uma dose usual em machos, que mostram um aumento significativo na acumulação de Mn em tecidos cerebrais de ratos (SANTOS, et al., 2011).

Vinte e quatro horas após a última injeção, os ratos foram anestesiados com ketamina/xilazina (75:10 mg/kg, 1mg/kg, ip). Todo o sangue do animal foi coletado, sendo a causa da morte exsanguinação. Posteriormente, amostras de rim e fígado

foram coletadas usando pinças e posteriormente acondicionados em microtubos. Os cérebros dos ratos foram dissecados para coleta de: cerebelo (CE), tronco encefálico (TE), hipocampo (HIP), estriado (EST) e córtex (CO). As amostras foram armazenadas a -80°C para análise posterior (O'NEAL, et al., 2014a).

4.3. Determinação de Mn e Fe, por ICP-MS

As determinações de manganês e ferro foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) modelo ELAN DRC II (Perkin Elmer[®], Norwalk, CT, EUA) operando com argônio de alta pureza (99,999%, Praxair – White Martins, Brasil) que está instalado em sala limpa classe 1000 no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da FCFRP-USP. Todos os parâmetros instrumentais foram diariamente otimizados.

Antes das determinações, as amostras de tecidos biológicos tiveram sua matriz solubilizada com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) por 7 dias, em seguida foi adicionado o diluente Triton X-100 e ácido nítrico 0,2%. Os elementos determinados foram o Manganês (^{55}Mn) e o Ferro (^{57}Fe) e a leitura no ICP-MS foi realizada duas vezes.

4.4. Estatística

Para a validação dos resultados obtidos por ICP-MS, foi analisado material de referência certificado. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. O teste estatístico aplicado foi ANOVA One-Way com *pos hoc* Tukey para verificar diferenças no que se refere à distribuição do manganês analisados em relação aos controles. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram analisados com auxílio do programa Statistica[®] 10.0 e os gráficos feitos com o OriginPro[®] 2015.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Exposição subcrônica à 10 mg/Kg de Mn por via I.P. diminui a massa corporal em ratos tratados

Durante o tratamento, a massa corporal dos animais foi verificada semanalmente. Houve diferença significativa entre o grupo tratado com manganês 10 mg/Kg e o grupo controle tratado com solução salina a 0,9%, conforme mostram as Figuras 1 e 2. A massa corporal do grupo controle aumentou ao longo das semanas, enquanto que no grupo manganês houve perda de peso, levando a hipótese de que a dose tratada tem relação com o metabolismo, sendo a primeira semana a de adaptação para os animais tratados com a dose de 10 mg/Kg. Ao longo do tratamento os animais continuaram a se adaptar a dose, o que fez com que começassem a ganhar peso, porém essa adaptação não foi o suficiente para que todos chegassem vivos ao fim do tratamento. Houve três mortes ao longo do tratamento, sendo elas nos dias 11,12 e 25, representadas na figura 1 abaixo pela letra "X". Durante o período das injeções os animais eram observados, e os que morreram durante o tratamento apresentaram incoordenação dos movimentos, marcha lenta e atáxica mais pronunciada em relação ao restante do grupo.

Como mostra a figura 2 abaixo, os machos do grupo Mn morreram logo na primeira semana de tratamento, o que não era esperado, pois a dose utilizada no tratamento foi uma dose comumente usada na literatura (SANTOS, et al., 2011; BOUABID, et al.2014) Houve perda de peso drástica logo nos dois primeiros dias, sendo que a primeira morte ocorreu no dia 3, os animais continuaram a perder peso e no dia 5 houve três mortes, não houve recuperação dos animais que continuaram no tratamento e os mesmos morreram nos dias 6 e 7, sendo assim todos morreram logo na primeira semana.

Por se tratar de uma dose usual em machos (SANTOS, et al., 2011), algumas hipóteses foram levantadas para explicar as mortes inesperadas, são elas: (i) baixa diversidade genética, uma vez que existem cruzamentos consanguíneos os quais poderiam ter gerado algum defeito genético para o acúmulo de Mn; (ii) dose usada no tratamento, a dose de 10mg/Kg de Mn é amplamente utilizada na literatura. Porém, no presente estudo essa dose foi ajustada para que os animais recebessem 10mg de Mn livre de excipientes. Sendo assim como na literatura esse dado não é

informado, é possível que neste estudo os animais tenham recebido doses maiores de Mn, o que pode ter gerado uma intoxicação mais pronunciada, levando os animais a morte.

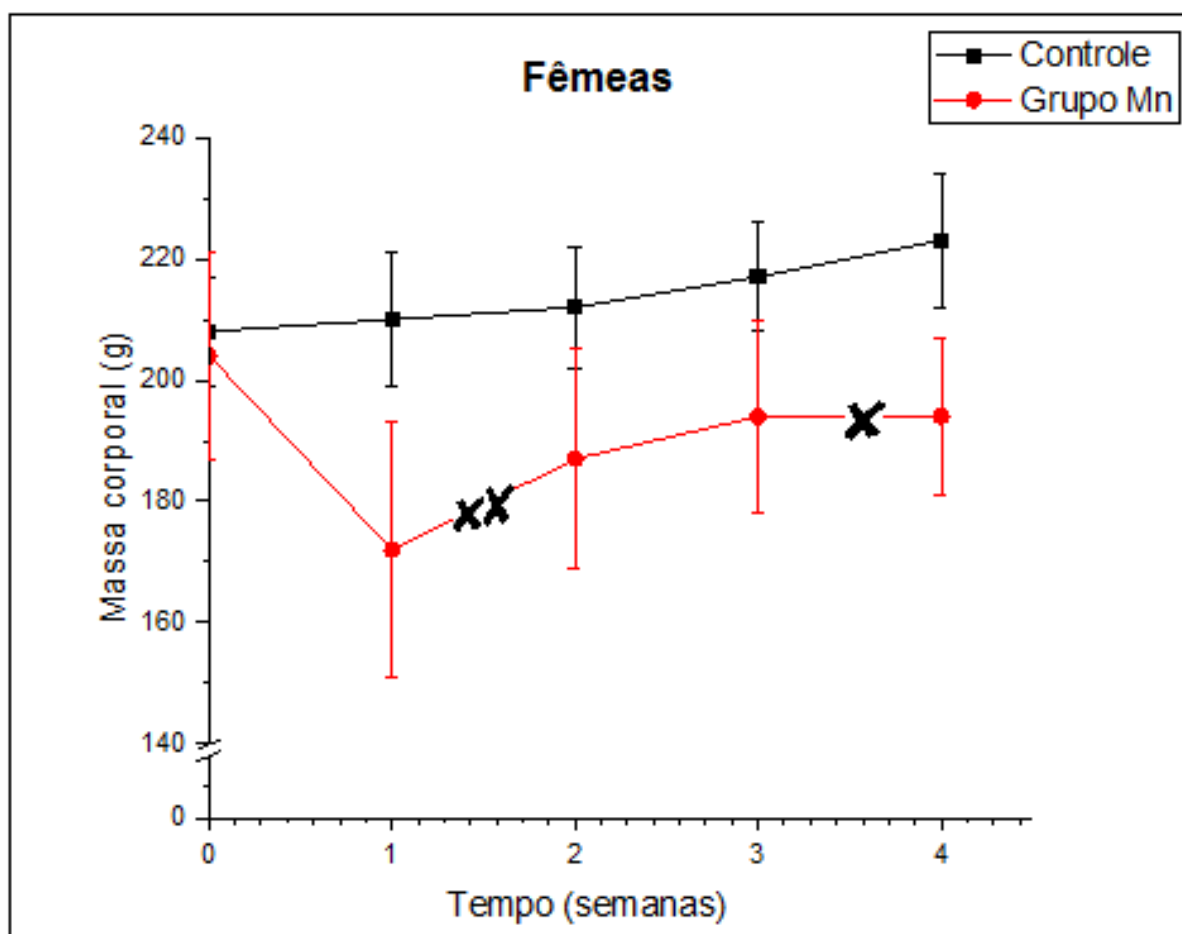


Figura 1. Variação de massa corporal de ratas tratadas com manganês por 30 dias, comparadas com ratas tratadas com solução salina 0,9% (controle), onde “X” representa a morte dos animais.

Além disso, alguns estudos sugerem que a intoxicação por Mn pode promover desaceleração do ganho de peso corporal, este efeito pode refletir uma ampla interferência com processos fisiológicos normais, tais como a deficiência no metabolismo energético e alterações funcionais nos núcleos hipotalâmicos que contribuem para o controle do peso corporal (CROSSGROVE; ZHENG, 2012; JACKSON, et al., 2011).

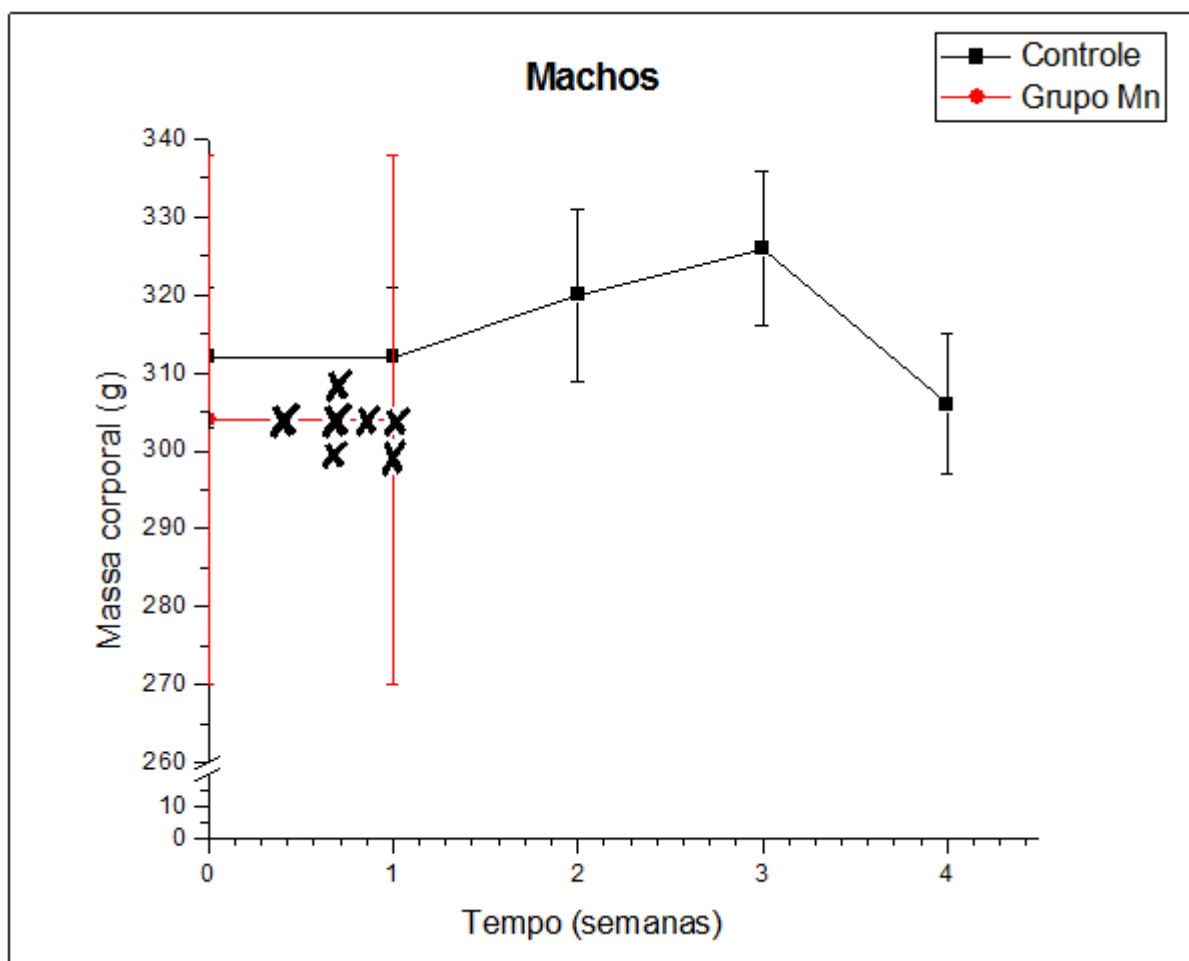


Figura 2. Variação de massa corporal de ratos tratados com manganês por 30 dias, comparadas com ratos tratados com solução salina 0,9% (controle), onde “X” representa a morte dos animais.

PAL e colaboradores (1999) relataram que com relação à perda de peso, uma hipótese sugerida seria que, uma das manifestações precoces da neurotoxicidade do Mn inclui a perda de apetite, o que poderia explicar a perda de peso logo na primeira semana de tratamento. Como a exposição continuou, a intoxicação progrediu, assim foi observada nos animais a diminuição dos movimentos musculares (hipocinesia) e marcha lenta.

5.2. Exposição subcrônica a 10 mg/Kg I.P. de Mn em ratas altera a distribuição do Mn no tecido renal e não altera no tecido hepático.

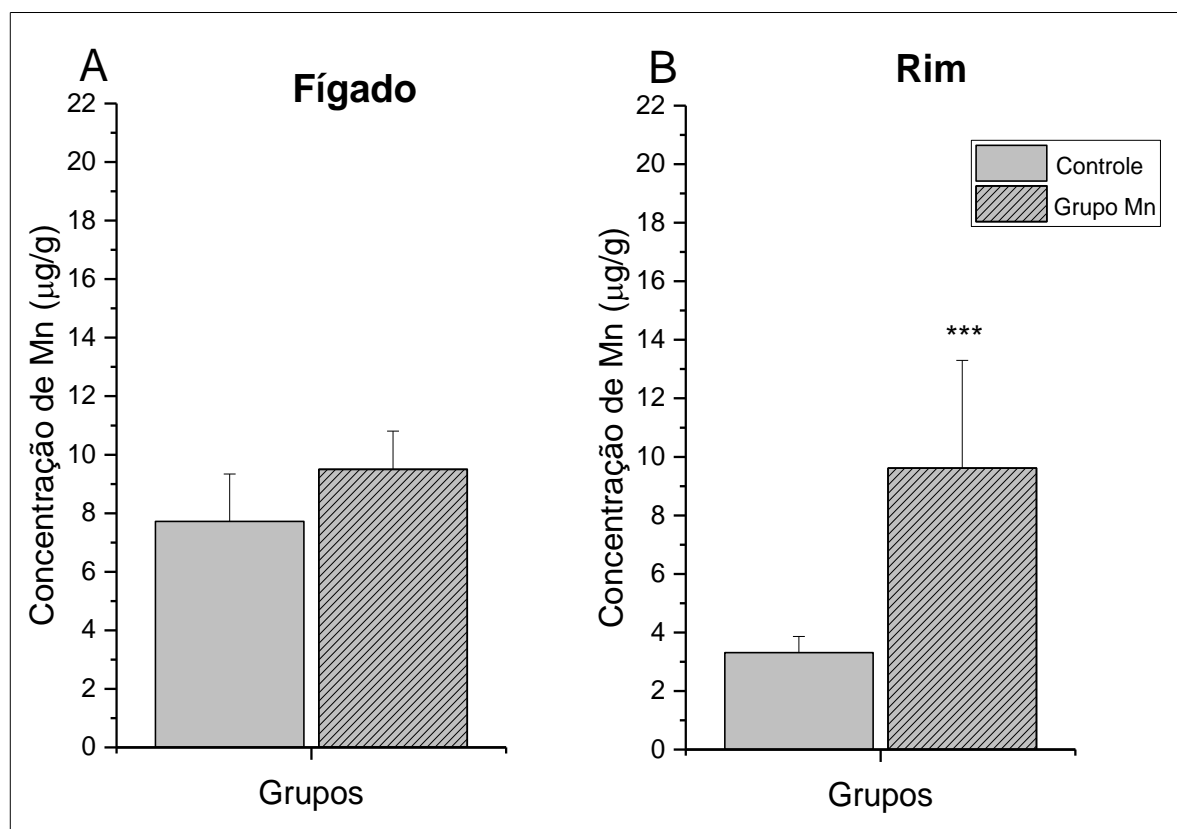


Figura 3. Deposição de Manganês em tecidos hepático e renal. Valores de $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente diferentes.

A literatura sugere que devido a baixa absorção gastrointestinal e a rápida excreção do Mn, é limitada a intoxicação do organismo quando exposto a altas doses. Porém quando exposto por via I.P., com dose considerada tóxica e por tratamento subcrônico como no presente estudo, a biodisponibilidade do Mn é aumentada. Isso, gera sobrecarga no principal órgão excretor desse metal, o fígado. Que como mostra na figura 3 existe uma tendência ao acúmulo de Mn pelas fêmeas no fígado ($p=0,083$) em relação ao grupo controle.

No tecido renal, por sua vez, as concentrações de Mn mostraram-se significativamente aumentadas em ratas tratadas com Mn quando comparadas com ratas controle ($p < 0,001$).

Mesmo os rins não sendo o principal órgão de excreção do Mn esses resultados levam a hipótese de que, devido à sobrecarga de Mn no fígado, pode ter sido gerada uma resposta indutora para o aumento na produção de metalotioneínas (MTs), que atuam como agente detoxificador de metais, em especial para cádmio (Cd) e mercúrio (Hg), mas que também pode atuar em casos de sobrecarga de outros metais. As MTs agem sequestrando estes metais em excesso, o que protege contra condições de estresse, sendo assim uma proteína muito importante na proteção contra danos oxidativos resultantes da exposição excessiva a metais. Estudos sobre a regulação da expressão gênica mostram evidências de que há indução da síntese desta proteína por metais, e é uma resposta direta ao aumento da concentração intracelular de metais mediada por fatores regulatórios.

A habilidade de metais em induzir a síntese de MTs foi originalmente descrita por PISCATOR (1964), que mostrou o aumento de níveis de MT hepática em coelhos expostos a Cd. As MTs são produzidas no fígado quando este está sobrecarregado. Assim, a produção de MT é aumentada fazendo com que a excreção se dê de forma mais eficaz, pois as MTs eliminam os metais quelados a elas através dos rins. O que explicaria a figura 3, onde o fígado foi sobrecarregado devido a dose tóxica do tratamento, aumentando a produção de MT e estas eliminaram Mn pelos rins, explicando a concentração de Mn significativamente aumentada neste tecido.

5.3. Exposição subcrônica a 10 mg/Kg I.P. de Mn altera a distribuição do Mn nos dissecados de SNC.

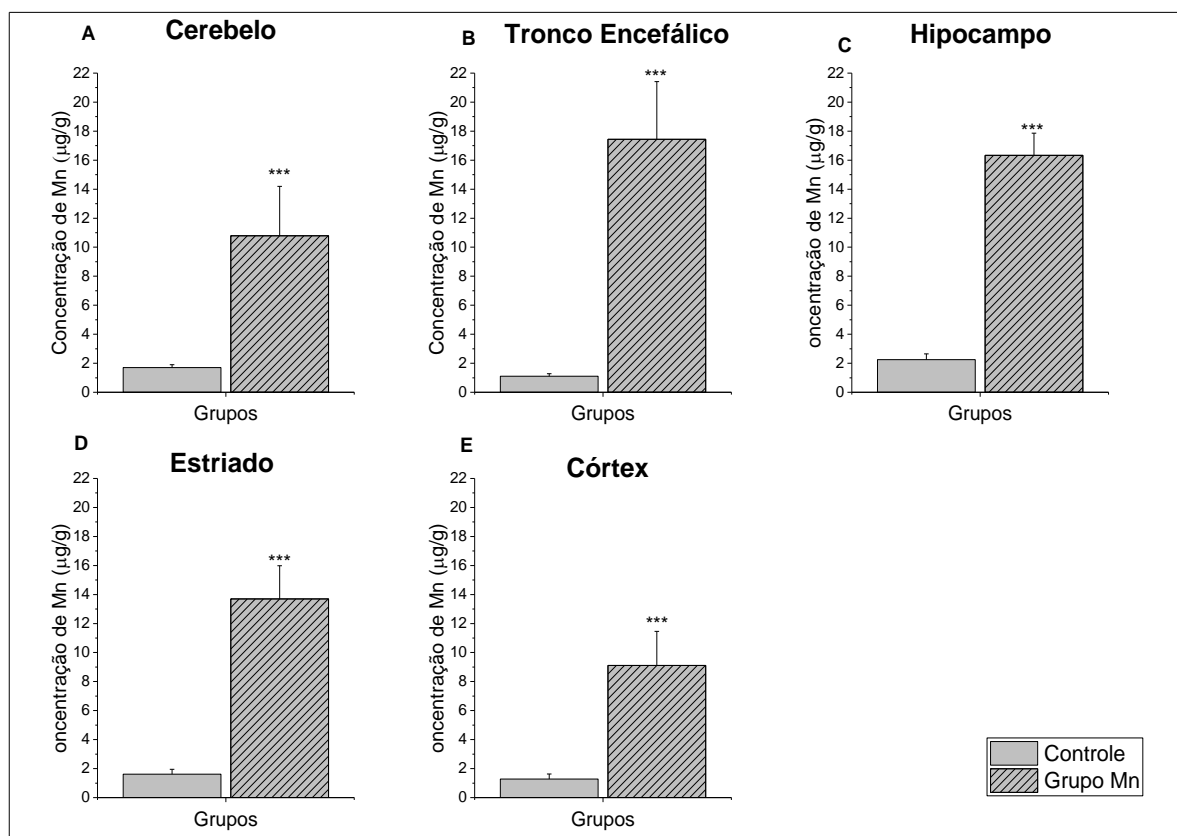


Figura 4. Deposição de Manganês em dissecados do SNC. Valores de $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente diferentes.

A figura 4 acima demonstra que, embora o organismo tente manter a homeostasia, as estruturas do SNC (alvos do Mn) são atingidas com a dose de tratamento. Na literatura o dissecado de SNC mais estudado é o estriado, uma vez que o sintoma de intoxicação crônica por Mn mais bem estabelecido é o manganismo, o qual se assemelha com a DP que gera danos motores ao paciente. Sendo assim, o acúmulo de Mn no EST é justificado, assim como também o é no CE, pois esse dissecado também tem funções motoras bem estabelecidas, as quais se diferenciam do EST por se tratarem de funções essencialmente inconscientes.

Durante o estudo, o grupo Mn foi observado e comparado com o controle. Ao longo do tratamento os animais apresentaram diminuição do tônus da musculatura esquelética, além de uma marcha instável, a qual se assemelha àquela observadas

em indivíduos durante a embriaguez aguda que neste caso específico se dá devido ao efeito tóxico que o álcool exerce sobre as células de Purkinje.

Nos dissecados analisados o que apresentou acúmulo mais significativo de Mn foi o TE, fato pouco descrito na literatura, porém sugere a relação que a intoxicação por Mn tem com a ansiedade e a depressão (BOWLER et al, 2003), os quais estudos devem ser encorajados.

BOUCHARD e colaboradores (2011) sugerem que uma exposição crônica ao Mn pode causar déficit de memória. Pôde-se observar que o segundo dissecado com maior acúmulo foi o hipocampo, o qual está diretamente ligado à memória, sendo assim, estudos relacionados a aprendizagem devem ser encorajados.

5.4. Exposição subcrônica a 10 mg/Kg I.P. de Mn em ratas altera a distribuição do Fe tanto no tecido renal quanto no tecido hepático.

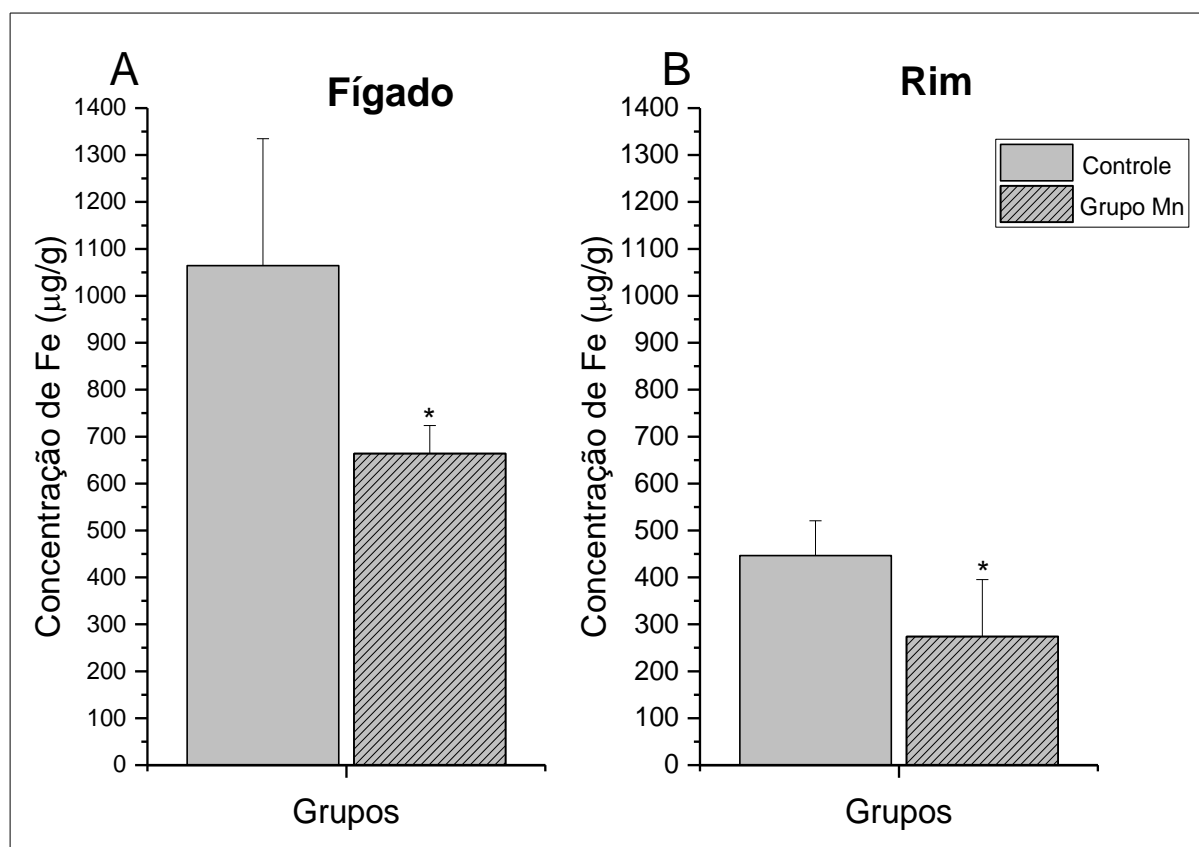


Figura 5. Deposição de Ferro em tecidos hepáticos e renais. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

Pesquisas apontam que quando a concentração de Mn é aumentada, pode-se ter a concentração de Fe diminuída, isso ocorre devido à similaridade química entre ambos, que faz com que haja competição pelos mesmos transportadores (FITSANAKIS, et al., 2010).

Como demonstra a figura 5 acima, os níveis de Fe são maiores no grupo controle, uma vez que o acúmulo de Mn foi menor, o que fez com que a competição pelos transportadores fosse diminuída. As concentrações de Fe foram ainda menores no tecido hepático, o que corrobora com os resultados da figura 3 (já citada).

Alguns estudos na literatura reportam dados que afirmam que o transportador de metais divalentes tipo 1 (DMT1) é a principal proteína responsável pela absorção de Mn, esse fato é baseado em várias observações, incluindo o fato de que DMT1 está presente na parede da vasculatura, juntamente com receptores de transferrina e ferroportina, a proteína que se considera estar envolvida na exportação de Mn para fora da célula endotelial vascular (BURDO et al., 2001, 2004; WU et al., 2004).

A literatura ainda relata que a expressão de DMT1 é regulada pelo estado de Fe no organismo, o que sugere que a baixa ligação de Fe, aumenta a expressão de DMT1, o que leva ao aumento de Mn no organismo. (MOOS et al., 2002; ERIKSON et al., 2004).

5.5. Exposição sub-crônica a 10 mg/Kg I.P. de Mn em ratas altera a distribuição do Fe apenas no tronco encefálico e no córtex

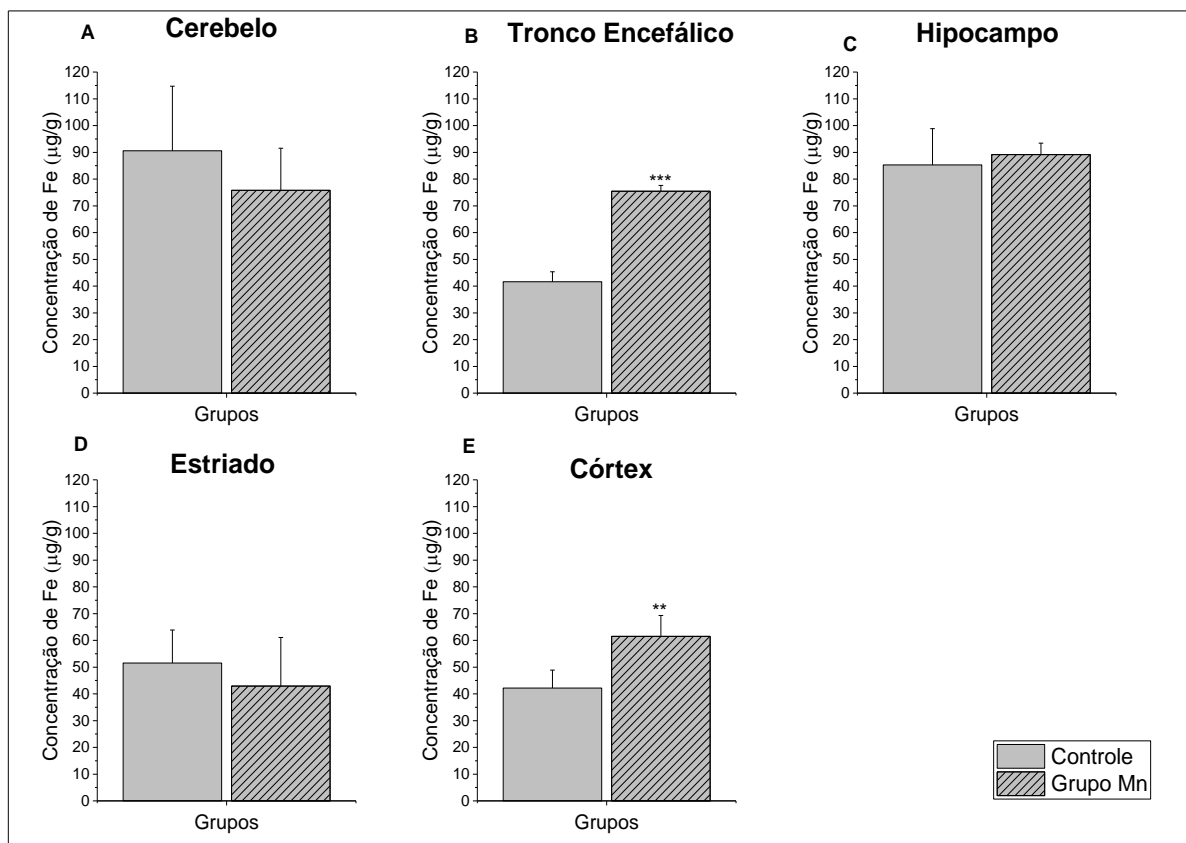


Figura 6. Deposição de Ferro em dissecados do SNC. Valores de $p < 0,001$ e $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente diferentes.

Diversos estudos relataram que a acumulação de Mn no SNC é, de fato, elevada durante a deficiência de ferro, suportando a hipótese de que DMT1 está envolvido neste processo de captação (ERIKSON et al., 2004).

Além disso, estudos com ratos Belgrado, que possuem mutação em DMT1, que torna esses transportadores essencialmente inativos, mostraram níveis cerebrais de Mn e outros metais divalentes diminuídos (BURDO et al., 2001).

Entretanto, existem diversos trabalhos que argumentam contra DMT1, no transporte de Mn para o SNC, os quais revelam que o complexo Mn-transferrina não é a espécie mais favorável capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, além de que DMT1 não está presente nas células endoteliais capilares (YOKEL, et al., 2004).

CROSSGROVE e colaboradores (2004) demonstraram que há conflitos nos ótimos pHs de cada sistema, onde no transporte de Mn para o cérebro é necessário um pH neutro, e a captação mediada por DMT1 é realizada em pH ácido também demonstraram que o ótimo pH neutro observado para o transporte de Mn para o cérebro é inconsistente com o ótimo pH ácido esperado para a captação mediada por DMT1. O estudo propôs canais de cálcio, assim como outros mecanismos como responsáveis pelo transporte de Mn através da barreira hematoencefálica.

No entanto as evidências citadas acima não são suficientes para excluir a possibilidade de que DMT1 desempenhe um papel no transporte de Mn para o SNC, estudos sugerem que isso pode ser explicado pelo fato de que o transporte dependente de transferrina para dentro da célula endotelial pode não ser o passo limitante da velocidade para a transferência de Mn para o SNC (TAKEDA, et al., 2000; YOKEL; CROSSGROVE, 2004). Além disso, também é considerada a possibilidade de que o transporte de Mn para fora da célula seja limitada pela velocidade, e isso pode ocorrer em pH próximo da neutralidade ideal, essa sugestão foi introduzida para o transporte de Fe através de enterócitos (BEUTLER, 2004).

É também possível que Mn atravesse a barreira hematoencefálica complexado com transferrina por um processo envolvendo a transcitose, que é o transporte de macromoléculas através de vesículas, do interior de uma célula a outra (FENART; CECHELLI, 2003).

No presente trabalho, como mostra na figura 6, houve diferenças no acúmulo de Fe nos dissecados cerebrais, o que sugere que diversos são os mecanismos para transporte de Fe no SNC, levando assim a uma deposição independente do acúmulo de Mn, como foi mostrado na figura 4 (já citada).

Contudo, mais estudos são necessários para caracterizar adequadamente os mecanismos específicos responsáveis pelo transporte de Mn em todo o SNC.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de bioacúmulo de Mn em gêneros-específicos é importante. O presente estudo demonstrou que machos são menos tolerantes a doses neurotóxicas de Mn, fato não esperado até então. O Mn apresentou acúmulo significativo em todos os dissecados do SNC aqui estudados, sendo o de maior acúmulo o tronco encefálico e o ferro se mostrou como um biomarcador de acúmulo de Mn apenas em algumas estruturas e não em todas, demonstrando que existem outras vias de aporte de Mn além do DMT1.

Assim, há a necessidade de maiores pesquisas em ambos os gêneros para a geração de dados mais fidedignos, assim como mais pesquisas relacionando o acúmulo de Mn com sintomas emocionais, tais como ansiedade e depressão, além de pesquisas na área neurológica no que tange à distribuição Mn-SNC. Por fim, vale ressaltar a possível ação das metalotioneínas que, se confirmadas, foram cruciais na tentativa da manutenção da homeostase do organismo, fazendo com que houvesse acúmulo de Mn nos rins, fato não esperado. Sendo assim, estudos mais amplos e aprofundados devem ser encorajados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, E., et al. Absorption as a factor in manganese homeostasis. **Journal of Animal Science**, v. 42, n.3, p. 630-636, 1976.

ASCHNER, M., ERIKSON KM, Dorman D.C. Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. **Critical Reviews Toxicology**, v. 35, p. 1-32, 2005

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

ASTDR., Toxicological profile for manganese. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2000. p. 1-466, 2000.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry **Toxicological Profile for Manganese**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151.html>>. Acesso em 2 de Maio de 2015.

BAGGA, P.; PATEL, A.B. Regional cerebral metabolism in mouse under chronic manganese exposure: Implications for Manganism. **Neurochemistry International**, v. 60, p. 177-185, 2012

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

BEN-JONATHAN, N.; HNASKO, R. Dopamine as a prolactina (PRL) inhibitor. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 6, p. 724-763, 2001.

BEUTLER E. “Pumping” iron: The proteins. **Science**, v. 306, p. 2051-2053, 2004.

BIRD, E.D.; ANTON, A.H.; BULLOCK, B. The effects of manganese inhalation on basal ganglia dopamine concentrations in rhesus monkey. **Neurotoxicology**, v. 5, p. 59-65, 1984.

BOUABID, S., et al. Manganese-Induced Atypical Parkinsonism Is Associated with Altered Basal Ganglia Activity and Changes in Tissue Levels of Monoamines in the Rat. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

BOUCHARD, M.F. et al. Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. **Environmental Health Perspectives**, v.1, n.1, p.138–143, 2011.

BOWLER, R.M., et al., Neuropsychological sequelae of exposure to welding fumes in a group of occupationally exposed men. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.206, n.6, p.517–529, 2003

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

BURDO, J.R., et al. Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. **The Journal of Neuroscience**, v.66, p.1198- 1207, 2001

BURDO, J.R., et al. Regulation of the profile of iron-management proteins in brain microvasculature. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.24, p.67-74, 2004

CASARETT e DOULL. Fundamentos em Toxicologia. 2.ed, Artmed, 2012.

CRITCHFIELD, J.W., KEEN, C.L., Manganese +2 exhibits dynamic binding to multiple ligands in human plasma. **Metabolism**, v.4, p. 1087-1092, 1992.

CROSSGROVE, J., ZHENG, W., Manganese toxicity upon overexposure. **NMR in Biomedicine**, v.17, p. 544–553, 2004

DEWITT, M.R., CHEN, P., ASCHNER, M. Manganese efflux in parkinsonism: insights from newly characterized slc30a10 mutations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 432, p.1–4. 2013.

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

ERIKSSON, H., et al. Effects of manganese oxide on monkeys as revealed by a combined neurochemical, histological and neurophysiological evaluation. **Archives of Toxicology**, v. 61, p. 101-118, 1987.

ERIKSON, K.M., et al. Globus pallidus: A target brain region for divalent metal accumulation associated with dietary iron deficiency. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.15, p.335-341, 2004.

FENART L., CECHELLI R., Protein transport in cerebral endothelium. In vitro transcytosis of transferrin. **Methods in Molecular Medicine**, v.89, p. 277-290, 2003

FINKELSTEIN, Y., et al. Modulation of cholinergic systems by manganese. **Neurotoxicology**, v. 28, p. 1003-1014, 2007.

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

FORDAHL, S., et al. Waterborne manganese exposure alters plasma, brain, and liver metabolites accompanied by changes in stereotypic behaviors. **Neurotoxicology and Teratology**. v. 34, n. 1, p. 27-36, 2012.

JACKSON, S.J., et al. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of rat brain after systemic administration of MnCl₂: Hippocampal signal enhancement without disruption of hippocampus-dependent behavior. **Behavioural Brain Research** v.216, p.293–300, 2011

JIANG, Y.M., et al. Effective treatment of manganese-induced occupational parkinsonism with p-aminosalicylic acid: a case of 17-year follow-up study. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v.48, p. 644–649, 2006.

KEEN, C.L. Nutritional and toxicological aspects of manganese intakes: An overview. **Risk assessment of essential elements**, p. 221- 235, 1994.

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..

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.

MACHADO, A. B.M. *Neuroanatomia Funcional*. 2.ed, Atheneu, 2007, 346p.

- MADER, M.J. Avaliação neuropsicológica nas epilepsias: importância para o conhecimento do cérebro. **Psicologia: Ciência e Profissão**. v.21. n.1. 2001
- MERGLER, D., et al. Manganese neurotoxicity, a continuum of dysfunction: Results from a community based study. **Neurotoxicology**, v. 20, p. 327-342, 1999.
- MOOS, T., et al. Effect of iron status on DMT1 expression in duodenal enterocytes from beta2-microglobulin knockout mice. **American Journal of Physiology**, v.283, p.687-694, 2002
- MUSTAFA, S.J.; CHANDRA, S.V. Levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and norepinephrine in whole brain of rabbits in chronic manganese toxicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 18, p. 931 - 933 1971.
- O'NEAL, S.L., et al. Subacute manganese exposure in rats is a neurochemical model of early manganese toxicity. **NeuroToxicology**, v. 44, p. 303 - 313, 2014a.
- O'NEAL, S.L., et al. Manganese accumulation in bone following chronic exposure in rats: Steady-state concentration and half-life in bone. **Toxicology Letters**, v. 229, p. 93 - 100, 2014b.
- OULHOTE, Y. MERGLER, D. BOUCHARD, M.F. Sex- and age-differences in blood manganese levels in the U.S. general population: national health and nutrition examination survey 2011–2012. **Environmental Health**, 2014.
- PAL, P.K., SAMII, A., CALNE, D.B., Manganese neurotoxicity: A review of clinical features, imaging and pathology. **Neurotoxicology**, v.20 (2-3) p. 227-238. 1999.
- PISCATOR, M., Om kadmium i normala ma"nniskornjurar samt redogo" relse for isolering av metallothionein ur lever fra"n kadmiumexponerade kaniner (English summary), **Nordisk hygienisk tidskrift**, p.65- 76, 1964.
- POF, Pesquisa de Orçamentos Familiares – Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil 2008-2009, IBGE, 2011.
- RACETTE, B.A. et al. Welding-related parkinsonism: Clinical features, treatment, and pathophysiology. **Neurology**, v. 56, p. 8-13, 2001.

- RACETTE, B.A. et al. Pathophysiology of manganese-associated neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 33, n.4, p.881–886, 2012.
- SAHNI, V. Case Report: A Metabolic Disorder Presenting as Pediatric Manganism. **Research Environmental Medicine**, v. 115, p. 1776-1779, 2007.
- SANTOS, A.P.M., et al. Prolactin is a peripheral marker of manganese neurotoxicity. **Brain Research**, v.1382, p.282–290, 2011.
- SASSINE, M.P., et al. Manganese accentuates adverse mental health effects associated with alcohol use disorders. **Biological Psychiatry**, v. 51, n. 11, p. 909-921, 2002.
- 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. Manganese exposure, essentiality & toxicity. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, p. 484 - 500, 2008.
- TAKEDA, A., et al. Influence of transferrin on manganese uptake in rat brain, **Journal of Neuroscience Research**, v.59, p. 542-552, 2000.
- WU, L.J., et al. Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. **Brain Research**, v.1001: p.108-117, 2004.
- YOKEL, R.A., CROSSGROVE, J.S. Manganese toxicokinetics at the blood-brain barrier. **Research report (Health Effects Institute)**, v.119, p.7-58, 2004.
- ZHENG, W., MONNOT, A.D., Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: implication in neurodegenerative diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 133, p.177–188, 2012.
- ZOTA, A.R. et al. Maternal blood manganese levels and infant birth weight. **Epidemiology**, v. 20, n. 3, p. 367–373, 2009.

Anexo I – Aprovação do Projeto em Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA)

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 6 de abril de 2015.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO E TOXICOLÓGICO DO MANGANÊS EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DO NADO FORÇADO."**, UnBDoC n.º 33255/2015, sob responsabilidade do Professor José Eduardo Pandóssio foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus*: 50. A presente aprovação é válida pelo período de 10/5/2015 a 1/12/2015.



Rafael Plakoudi Souto Maior

Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.