

INTOXICAÇÃO SUBAGUDA AO MANGANÊS EM RATOS WISTAR ADULTOS: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS NO SNC E DEPOSIÇÃO DO METAL EM DIFERENTES TECIDOS

Maria Victória Branco Flores¹
Tuany Eichwald²
Analu Mantovani³
Viviane Glaser⁴
Carine Raquel Richter Schimitz⁵
Carina Rossoni⁶
Jovani Antônio Steffani⁷
Diego Perinetto⁸
Diego de Carvalho⁹
Aline Pertile Remor¹⁰

Recebido em: 08 mar. 2018
Aceito em: 26 nov. 2018

RESUMO: O Manganês (Mn) é um metal essencial para o organismo. É distribuído no ambiente e utilizado em processos industriais. Apesar de essencial, é neurotóxico à exposições cumulativas, causando uma desordem neurológica, o Manganismo. O estudo avaliou o efeito da administração subaguda de Mn sob a forma de cloreto e acetato de Mn, sobre a função mitocondrial e parâmetros oxidativos no encéfalo, bem como o acúmulo deste metal no encéfalo e tecidos periféricos de ratos adultos. Os ratos receberam 6 mg/kg de Mn i.p. na forma de cloreto ou acetato de Mn, 5 dias/semana por 4 semanas. O grupo controle recebeu solução salina 0,9% pela mesma via de administração e mesmo período. Foi mensurada a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupamentos NPSH, a atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória no encéfalo e/ou estruturas cerebrais, bem como o peso corporal e a concentração de Mn e Fe no soro, encéfalo, tecido renal e hepático. Foi observada uma diminuição no ganho de peso corporal dos animais que receberam o Mn, um aumento na concentração/depósito de Mn no soro, encéfalo e tecido renal, tanto na forma de cloreto e acetato de Mn, quando comparados

¹ Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, UNOESC Joaçaba, SC, mariavictoriabrancoflores@gmail.com.

² Mestre em Biociências e Saúde pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, UNOESC Joaçaba, SC, tuany.e@hotmail.com.

³ Doutora em Ciências do Solo, Professora na Universidade do Oeste de Santa Catarina, UNOESC, Campos Novos, SC, analu.mantovani@unoesc.edu.br.

⁴ Doutora em Neurociências, Professora na Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Curitibaanos, SC, viviglaser@gmail.com.

⁵ Mestranda em Biociências e Saúde pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, UNOESC, Joaçaba, SC. E-mail: cariraquell@gmail.com.

⁶ Doutora em Medicina e Ciências da Saúde, Professora do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, UNOESC Joaçaba, SC, carina.rossoni@unoesc.edu.br.

⁷ Doutor em Ergonomia, Professor do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, UNOESC Joaçaba, SC, jovani.steffani@unoesc.edu.br.

⁸ Mestrando em Biociências e Saúde pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, UNOESC, Joaçaba, SC. E-mail: diperinetto@gmail.com.

⁹ Doutor em Fisiologia Geral, Professor do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, UNOESC Joaçaba, SC, diego.carvalho@unoesc.edu.br.

¹⁰ Doutora em Neurociências, Professora do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, UNOESC Joaçaba, SC, aline.remor@unoesc.edu.br.

com o grupo controle. Além disso, houve um aumento significativo no conteúdo de NPSH no encéfalo e, embora não significativo, uma tendência de aumento da concentração de TBARS, no grupo que recebeu cloreto de Mn. Ainda, foi verificada uma inibição na atividade do complexo I no estriado dos animais expostos ao cloreto de Mn. Não houve diferença entre os grupos nas atividades do complexo I e II no encéfalo e hipocampo. Em conjunto, os dados indicam que a exposição ao Mn em baixas doses contribui para o desenvolvimento de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial no SNC, com aparente predileção de dano ao estriado.

Palavras-chave: Manganês. Exposição subaguda. Parâmetros oxidativos. Função mitocondrial.

MANGANESE SUBACUTE INTOXICATION IN ADULT WISTAR RATS: EVALUATION OF OXIDATIVE PARAMETERS IN CNS AND METAL DEPOSITION IN DIFFERENT TISSUES

ABSTRACT: Mn is an essential metal to the organism. It is distributed in the environment and used in industrial processes. Although essential, it is neurotoxic to cumulative exposures, and can cause a neurological disorder, called Manganism. This study evaluated the effect of subacute Mn as chloride and acetate of Mn administration on mitochondrial function and oxidative parameters in adult rat brain, as well as the accumulation of this metal in the brain and peripheral tissues. The rats received 6 mg/kg of Mn i.p., as Mn chloride or Mn acetate, 5 days/week for 4 weeks. The control group received 0.9% of saline solution in the same way of administration and in the same period. It was measured the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and NPSH groups, the activity of mitochondrial complex I and II in brain and/or in the brain structures, as well as the body weight and the concentration of Mn and Fe accumulation. It was observed a decrease on body weight gain in animals exposed to Mn and an increase of concentration/deposit of Mn in serum, brain and kidney, in the both Mn chloride and acetate form when compared to the control group. In addition, there was a significant increase in brain NPSH content and, although it was not significant, a trend of increasing on TBARS concentration in the group that received Mn. Besides that, a significant inhibition of complex I activity was observed in the striatum of the animals exposed to Mn. There was not difference between groups on complex I and II in the brain and hippocampus. Together, these data indicate that exposure to Mn at low doses contributes to the development of oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the CNS, with apparent predilection of striatum damage.

Keywords: Manganese. Subacute exposure. Oxidative parameters. Mitochondrial function.

INTRODUÇÃO

O Manganês (Mn) é um metal abundante na crosta terrestre e normalmente é encontrado no ar, na água, no solo, nas rochas e também nos alimentos como cereais, sementes, feijões, nozes, chás, frutos do mar, chocolates, especiarias, frutas, vegetais e

grãos em geral. É também muito utilizado na confecção de produtos e na indústria da mineração, do aço, ligas de alumínio, dentre outras (WILLIAMS et al., 2012).

Participa de processos fisiológicos importantes no organismo (WILLIAMS et al., 2012), é essencial para a fisiologia do cérebro e possui papel de cofator em processos enzimáticos, pois algumas enzimas importantes como a arginase, glutamina sintase, superóxido dismutase (SOD) e a piruvato carboxilase são dependentes de Mn (BOWMAN et al., 2011; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ; ASCHNER, 2013).

Os mecanismos de absorção do Mn ainda são bastante controversos, mas sabe-se que ao ser ingerido, o Mn é absorvido nos enterócitos do intestino sob a forma divalente (Mn^{2+}) (LEBLONDEL; ALLAIN, 1999) e entra nas células na forma de cátion Mn^{2+} , por difusão passiva ou pelo transporte ativo, através do transportador de metais divalente 1 (DMT1), transporte que usa o gradiente de prótons para translocar metais pela membrana celular (BELL; KEEN; LÖNNERDAL, 1989; GARRICK et al., 2003).

Após entrada na circulação sanguínea, o Mn^{2+} é, em maior parte, oxidado a Mn trivalente (Mn^{3+}) e transportado pela transferrina (Tf), aos demais tecidos do organismo (ASCHNER; GANNON, 1994; TAKEDA; SAWASHITA; OKADA, 1995). É distribuído do plasma para os tecidos de forma rápida e o fígado, o pâncreas, os ossos, os rins e o cérebro são os tecidos que retêm a maior quantidade de Mn, pois requerem maior necessidade de energia e possuem grande quantidade de mitocôndrias (ASCHNER; ASCHNER, 2005). O Mn^{3+} é mais oxidante que o Mn^{2+} , desta forma, o Mn^{3+} transportado pela Tf possui um alto potencial oxidativo, é depositado dentro das células, e em excesso é tóxico e pode causar estresse oxidativo (EO) (GUNTER et al., 2013). Também pode ser inalado e essa via é considerada mais eficiente, mais rápida e com maior potencial de transferência de Mn, principalmente para o cérebro (ROTH, 2006). Neste caso, DMT1 auxilia no transporte do Mn pelo sistema respiratório (THOMPSON et al., 2007) e capta o Mn do pulmão (HEILIG et al., 2005). Atualmente, além do DMT1, sabe-se que existem outros transportadores e/ou translocadores envolvidos no influxo de Mn para o interior das células (CHEN et al., 2015).

Como o Mn e o ferro (Fe) partilham dos mesmos mecanismos de absorção e distribuição, a absorção do Mn está relacionada com a do Fe. Estes metais competem entre si por transportadores presentes no organismo, e apresentam uma relação inversa entre a quantidade de Fe e a absorção do Mn. Quando os níveis de Fe do organismo estão diminuídos, a quantidade de transportadores de membrana é aumentada (GUNSHIN et al., 1997), ocorrendo assim uma maior absorção e acumulação do Mn (FITSANAKIS et al., 2011; SMITH et al., 2013).

A exposição ocupacional é uma das principais causas de intoxicação humana ao Mn. No meio ambiente, tanto na água quanto nos alimentos, há elevados níveis de Mn, favorecendo um alto risco de contaminação para a população em geral (OULHOTE et al., 2014). Assim, exposições a elevadas quantidades de Mn podem levar a uma doença neurotóxica conhecida por Manganismo, doença que compartilha de vários sintomas com a doença de Parkinson (DP), como deficiências motoras, cognitivas e emocionais (HORNING et al., 2015; KWAKYE et al., 2015; ASCHNER et al., 2007; ROTH, 2006), porém

os mecanismos envolvidos parecem ser distintos.

O Manganismo é causado por lesões neuronais em regiões corticais e subcorticais do cérebro, os gânglios da base (HERRERO HERNANDEZ et al., 2006) e é morfológicamente caracterizada pela perda neuronal no globo pálido, substância negra e estriado (OLANOW, 2004). As características clínicas são caracterizadas como disfunção cognitiva, distúrbios comportamentais como de humor e psicose (LÜCKING et al., 2000). Os sintomas apresentados no início da doença compreendem perda de memória, cefaleia, palpitações, tremor nas mãos, dormência nos braços e pernas. Além destes sintomas, os casos mais graves podem apresentar dificuldades como tremor na escrita, em desenhar círculos, morder a língua enquanto fala, entre outros sintomas (JIANG et al., 2006).

Por outro lado, a DP é caracterizada, principalmente, pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta do estriado. E as características clínicas mais comuns são manifestações neurocomportamentais, psicose, tremor postural, alteração da marcha e do equilíbrio, sinais piramidais e rápida progressão (JANKOVIC, 2005).

Diversos estudos apontam como uma das causas das doenças neurodegenerativas, a geração de radicais livres e a predisposição ao EO (HUANG; ONG; CONNOR, 2004). As células neuronais são mais suscetíveis ao EO em comparação aos outros tecidos do organismo (UTTARA et al., 2009), pois o cérebro no seu metabolismo possui um elevado consumo de glicose e oxigênio, desta maneira se expõe aos radicais livres (NAVARRO-YEPES et al., 2014), e quando comparado ao restante dos tecidos do corpo, ele é mais sensível por possuir uma menor defesa antioxidante (SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013). Além disso, a sobrecarga de metal no cérebro pode ser uma forte fonte causadora de EO (UTTARA et al., 2009).

O EO é desencadeado a partir do aumento da geração das espécies reativas de oxigênio (EROs) (SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013), as quais são originadas, principalmente, através do oxigênio molecular que é o aceptor final de elétrons da cadeia respiratória (AON et al., 2012).

Como consequência, o EO (CAROCHO; FERREIRA, 2013) pode contribuir com a peroxidação dos lipídeos de membrana, oxidação de receptores hormonais e enzimas, inativação da atividade de enzimas, e a uma série de lesões celulares, culminando para a morte celular (LEONARDUZZI; SOTTERO; POLI, 2010; MAGDER, 2006).

Estudos demonstraram que, quando em excesso, a mitocôndria armazena o Mn intracelularmente (COTZIAS, 1958), resultando na inibição da fosforilação oxidativa (GAVIN; GUNTER; GUNTER, 1992). Em estudos utilizando ratos adultos, foi verificado que a administração crônica de Mn inibe diretamente o complexo II (SINGH et al., 1974) e os complexos I-IV da cadeia respiratória no encéfalo (ZHANG; ZHOU; FU, 2003), o que poderia causar aumento na produção de EROs, contribuindo para a disfunção mitocondrial e apoptose dos neurônios (CHUN; LEE; SON, 2001; ZWINGMANN; LEIBFRITZ; HAZELL, 2003).

Conforme o exposto, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na toxicidade causada pelo Mn, embora estas alterações mencionadas foram observadas em modelos de intoxicação crônica em ratos adultos e em modelos experimentais com ratos neonatos. Desta forma, este estudo objetivou avaliar o efeito da administração intraperitoneal de Mn, de forma subaguda, em baixa dose, por longo período de exposição, sobre respostas de EO, função mitocondrial no encéfalo e em estruturas cerebrais e o perfil de deposição de Mn e Fe em tecidos de ratos Wistar adultos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados ratos Wistar machos adultos com 60 dias de vida pesando entre 250-350g, com aprovação do CEUA/UNOESC sob o protocolo número 45/2016. Os animais foram mantidos por 15 dias para aclimatização em gaiolas de plástico comunitárias alocadas num ambiente com temperatura controlada a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, em ciclo de iluminação de 12 horas claro/escuro e livre acesso à água e a ração. Durante todos os procedimentos foram seguidos os princípios básicos do uso de animais em toxicologia (adotados pela Sociedade de Toxicologia em Julho de 1989), minimizando o número de animais, bem como seu sofrimento. Os animais foram divididos em três grupos experimentais, sendo eles: 1) Grupo controle que recebeu administração salina 0,9% intraperitonealmente; 2) Grupo Cloreto de Manganês que recebeu 6 mg/kg de Mn sob a forma de cloreto de Manganês (MnCl_2) e o 3) Grupo Acetato de Manganês que recebeu 6 mg/kg de Mn sob a forma de acetato de manganês $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

Indução do modelo de toxicidade subaguda ao Mn: Cada grupo recebeu uma administração diária, intraperitonealmente, de cloreto de Mn ou de acetato de Mn na dose de 6mg/kg (dose baixa), durante 5 dias por semana, por 4 semanas consecutivas, a fim de ser observado a intoxicação subaguda. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de solução salina estéril 0,9% (O'NEAL et al., 2014).

Preparação das amostras para análise: Após 30 dias de administração ao Mn, os animais foram anestesiados em ambiente adequado (capela) com uma mistura de cetamina 80mg/kg e xilasina 12mg/kg e procedeu-se a eutanásia por decapitação. O encéfalo foi rapidamente dissecado e as estruturas cerebrais, hipocampo e estriado foram separadas. Além disso, foram dissecados tecidos periféricos, como tecido renal e fígado, a fim de quantificar o metal depositado. Os tecidos foram mantidos homogeneizados em tampão adequado para posterior análise.

Determinação da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial: A atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial foi mensurada através da redução do ferricianeto dependente de NADH em um comprimento de onda de 420 nm, como previamente descrito por Cassina e Radi (1996) A atividade do complexo II foi mensurada através da oxidação do DCIP em 600 nm, de acordo com Fischer e colaboradores (1985). As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram

mensuradas utilizando-se o leitor de placas SpectraMax M5, com temperatura controlada e calculadas como $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína.

Mensuração de parâmetros oxidativos: A mensuração de TBARS (também conhecido como uma medida de peroxidação lipídica) foi determinada em uma reação contendo ácido tiobarbitúrico na presença de calor, conforme descrito por Esterbauer e Cheesman (1990). Após incubação à 100°C, a absorbância da cor formada foi determinada a 532 nm. Os resultados foram expressos em $\eta\text{mol}/\text{mg}$ de proteína. Os grupamentos tióis não proteicos (NPSH), representados pela glutathiona (90%), foram determinados conforme descrito por Ellman (1959). Uma alíquota de ácido tricloroacético 20% foi adicionada a uma alíquota de mesmo volume de amostra e centrifugados a 10.000 x g, durante 10 min, a 4°C. Após, uma alíquota do sobrenadante foi diluída em 800 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,4 e adicionado 500 μM de DTNB (5,5'-ditio bis-2-ácido nitrobenzóico). A absorbância da cor formada foi determinada a 412 nm após 10 minutos. Os resultados foram expressos em $\eta\text{mol}/\text{mg}$ de proteína.

Avaliação da concentração de Mn e Fe por espectrometria de absorção atômica: 100 mg de tecido foram utilizados para determinar a concentração de Mn e Fe, através da espectrometria de absorção atômica de acordo com Fitsanakis e colaboradores (2008) com algumas modificações. Para isto, o tecido foi digerido em 1,5mL de uma mistura de ácidos contendo 1,2 mL de ácido nítrico 65% e 300 μL de ácido perclórico por 24 horas à temperatura ambiente. Após, as amostras permaneceram em banho ultrassônico à 70°C por 3 horas. A esta solução obtida, foi adicionado 3,5mL de ácido perclórico 1% e posteriormente filtrada em membrana com poro de 0,22 μm . Em todas as determinações, foram utilizadas curvas padrões para o cálculo da concentração.

Determinação de proteínas: O conteúdo de proteínas foi determinado de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando albumina bovina sérica como padrão.

Análise estatística: Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, e analisados por ANOVA para medidas repetidas e ANOVA de uma via ou Teste *t* de Student para amostras independentes de acordo com cada desenho experimental, utilizando-se o software Graph Pad Prism® versão 5.00.

RESULTADOS

A Figura 1 mostra o ganho de peso corporal de ratos Wistar adultos de 60 dias de vida, que receberam um administração diária de Mn na forma de cloreto de Manganês (MnCl_2) ou acetato de Manganês ($\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) ao longo das 4 semanas de tratamento (intoxicação subaguda). Pode ser observado que houve uma diminuição significativa no ganho de peso corporal dos animais que receberam tanto cloreto quanto acetato de manganês quando comparados com o grupo controle ao longo do tratamento (diferença entre os grupos [$F_{(2,15)}=2,2767$; $P=0,1369$], entre as semanas de tratamento [$F_{(3,45)}=6,8999$;

$P < 0,001$] e interação entre os grupos e a semanas de tratamento [$F_{(3,45)}=97,289$; $P < 0,001$]).

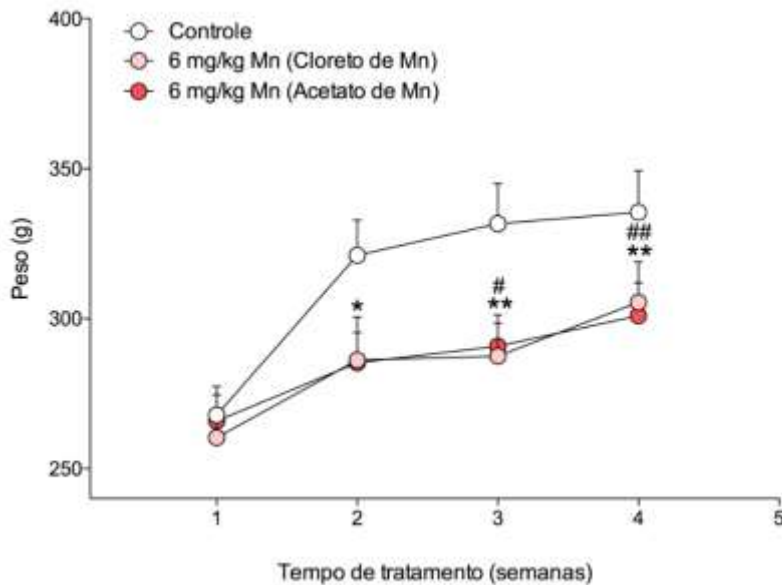


Figura 1. Efeito da administração subaguda de cloreto e acetato de manganês sobre o ganho de peso corporal em ratos Wistar (machos, 60 dias, 250-350g). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=6 animais por grupo) * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ quando comparado o grupo Cloreto de Mn com o grupo controle e # $P < 0,05$; ## $P < 0,05$ quando comparado o grupo Acetato de Mn com o grupo controle (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

A Figura 2 representa a concentração/acúmulo de Mn avaliada por espectrometria de absorção atômica no soro (Figura 2A), encéfalo (Figura 2B), tecido hepático (Figura 2C) e tecido renal (Figura 2D) dos ratos Wistar machos adultos após exposição subaguda de Mn sob a forma de Cloreto e Acetato de Mn. Pode ser observado na figura que houve um aumento significativo na concentração deste metal no soro [$F_{(2,13)}=29,82$; $P < 0,001$], quando administrado sob a forma de acetato de Mn quando comparado com os outros grupos. Também houve um aumento significativo deste metal no encéfalo [$F_{(2,9)}=18,49$; $P < 0,001$] e no tecido renal [$F_{(2,12)}=47,94$; $P < 0,001$], tanto na forma de cloreto como acetato de Mn, quando comparados com o grupo controle.

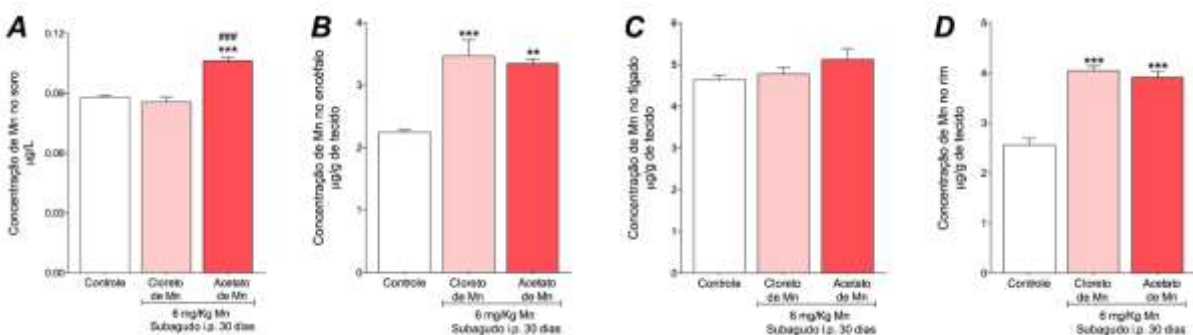


Figura 2. Efeito da administração subaguda de cloreto e acetato de manganês sobre a concentração/acúmulo de Mn no soro (A), encéfalo (B), fígado (C) e rim (D) de ratos Wistar (machos, 60 dias, 250-350g). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=4 a 5 animais por grupo) *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle e #### $P < 0,001$ quando comparado com o grupo Cloreto de Mn (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

A Figura 3 mostra a concentração de Fe avaliada por espectrometria de absorção atômica no soro (Figura 3A), encéfalo (Figura 3B), tecido hepático (Figura 3C) e tecido renal (Figura 3D) dos ratos Wistar machos adultos após exposição subaguda de Mn sob a forma de cloreto e acetato de Mn. Pode ser observado na figura que não houve diferença significativa entre os grupos em todos os tecidos avaliados.

A Figura 4 mostra o efeito da administração subaguda de Mn sob a forma de cloreto e acetato de Mn sobre parâmetros de estresse oxidativo em encéfalo de ratos. Pode ser observado que o tratamento com cloreto de Mn causou uma tendência ao aumento na concentração de TBARS (Figura 4A) em relação ao grupo controle, porém este aumento não foi significativo.

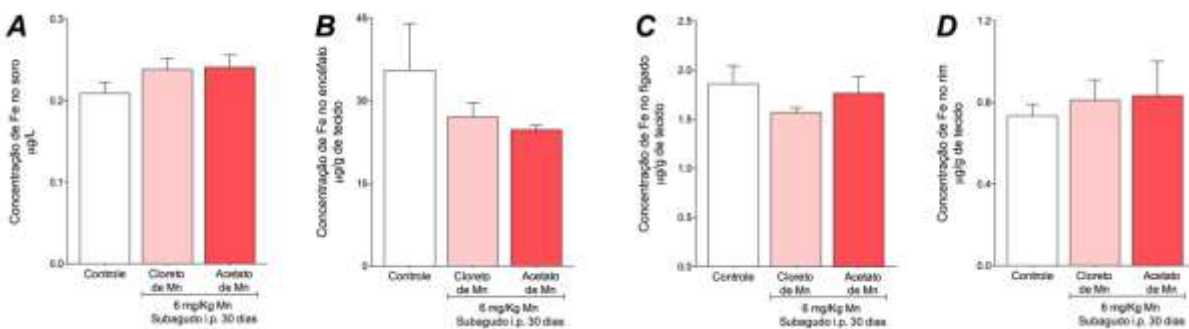


Figura 3. Efeito da administração subaguda de cloreto e acetato de manganês sobre a concentração de Fe no soro (A), encéfalo (B), fígado (C) e rim (D) de ratos Wistar (machos, 60 dias, 250-350g). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=4 a 5 animais por grupo) (ANOVA de uma via).

Houve diminuição significativa de TBARS no encéfalo dos ratos que receberam acetato de Mn quando comparados com o grupo que recebeu cloreto de Mn [$F_{(2,13)}=7,002$; $P<0,01$]. Por outro lado, a administração subaguda do cloreto de Mn, favoreceu a um aumento significativo no conteúdo de NPSH (Figura 4B), indicando um aumento nas concentrações de grupamentos tiólicos no encéfalo dos ratos [$F_{(2,12)}=5,063$; $P<0,05$]. Este aumento pode indicar um mecanismo compensatório para combater a peroxidação lipídica.

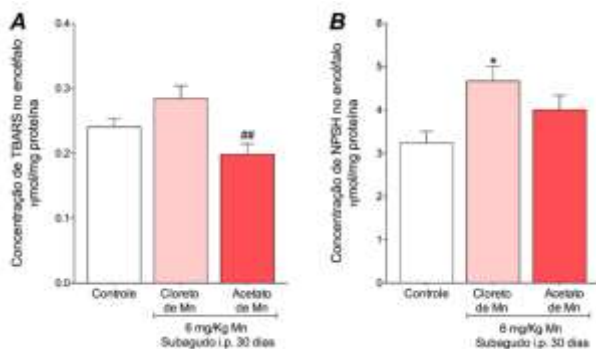


Figura 4. Efeito da administração subaguda de cloreto e acetato de manganês sobre o conteúdo de TBARS (A) e de NPSH (B) em encéfalo de ratos Wistar (machos, 60 dias, 250-300g). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=5 animais por grupo) # $P<0,05$ comparados com o grupo $MnCl_2$ (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

De acordo com a figura 5, pode ser observado que houve uma inibição estatisticamente significativa na atividade do complexo I no estriado [$t_{(4)}=2,345$; $P<0,05$] (Figura 5B) nos ratos expostos ao Mn através do cloreto de Mn, a qual foi detectada através de análise estatística realizada pelo teste t de Student para amostras independentes. Embora haja uma tendência a diminuição, nos demais tecidos, encéfalo (Figura 5A) e no hipocampo (5C), este efeito não foi observado em nenhum dos dois tratamentos.

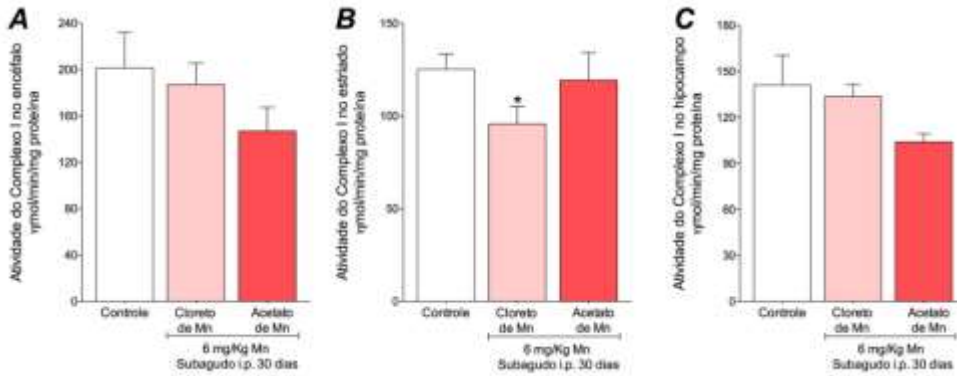


Figura 5. Efeito da administração subaguda de cloreto e acetato de manganês sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória em encéfalo (A) e nas estruturas cerebrais estriado (B) e hipocampo (C) de ratos Wistar (machos, 60 dias, 250-300g). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3 e 4 animais por grupo) * $P<0,05$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via; teste t de Student para amostras independentes).

Do mesmo modo, a Figura 6 mostra que, embora haja uma tendência à diminuição na atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial em todos os tecidos, não houve diferença significativa entre os grupos analisados. Este fato observado na atividade tanto do complexo I como do complexo II poderia ser explicado devido ao baixo número de animais utilizados nestas mensurações.

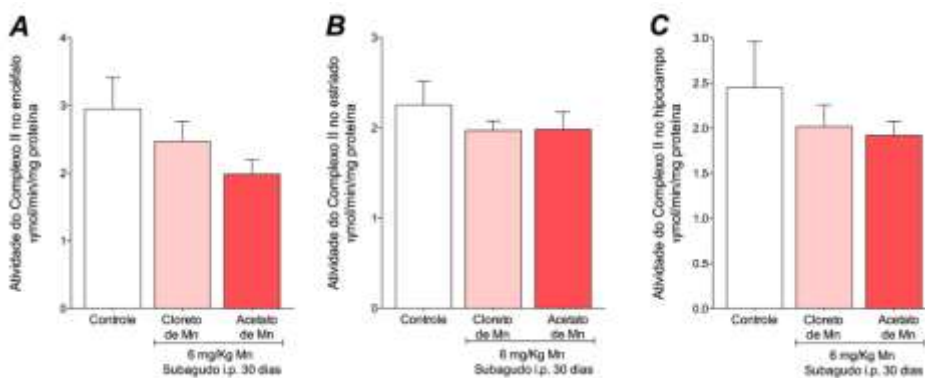


Figura 6. Efeito da administração subaguda de cloreto e acetato de manganês sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial em encéfalo (A) e nas estruturas cerebrais estriado (B) e hipocampo (C) de ratos Wistar (machos, 60 dias, 250-300g). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3 e 4 animais por grupo) (ANOVA de uma via; teste t de Student).

DISCUSSÃO

Ainda que os efeitos e sintomas da exposição crônica e/ou em baixas doses ao Mn à população em geral permanecem desconhecidos, estes representam um importante problema de saúde pública, pois afetam trabalhadores através da exposição ocupacional e a população em geral que convive no entorno das regiões foco, como indústrias e outras atividades afetadas. Este estudo utilizou um modelo experimental de intoxicação subaguda de Mn em ratos Wistar machos adultos e demonstrou que a administração intraperitoneal de Mn sob a forma de cloreto de manganês ($MnCl_2$) e acetato de manganês $Mn(CH_3COO)_2$, diminuiu significativamente o ganho de peso corporal dos animais ao longo do tratamento, favoreceu ao acúmulo deste metal de maneira significativa no soro, encéfalo e no tecido renal e contribuiu para o desenvolvimento de EO e disfunção mitocondrial no SNC, com aparente predileção de dano ao estriado.

Mais precisamente, foi observado que a exposição subaguda ou em baixa dosagem por um curto período de tempo (30 dias) ao Mn diminuiu significativamente o ganho de peso corporal dos ratos em relação ao grupo controle. Não foram observadas evidências de peritonite ou toxicidade abdominal evidente, sugerindo que o efeito observado não foi devido a problemas com as doses e/ou administração, mas sim pelo efeito do Mn. Em estudo realizado por Fitsanakis e colaboradores (2008), onde ratos receberam tratamento com injeções intravenosas de baixa dose de Mn por 14 semanas, também foi observado diferença entre o ganho de peso corporal dos grupos tratados em relação ao grupo controle, e o perfil do consumo de ingesta alimentar foi o mesmo entre todos os grupos. Além disso, segundo Cannon e colaboradores (2013) a perda de peso está comumente associada em modelos animais de (DP). Ainda que os animais expostos ao Mn tenham demonstrado significativa diminuição do ganho de peso corporal em relação ao grupo controle, foi observado que todos os grupos do estudo ganharam peso ao longo do tratamento.

Após a absorção do Mn, o fígado é o primeiro órgão alvo e é considerado um reservatório de Mn, o qual pode concentrar até 1,5 mg/Kg no fígado humano ou 3 mg/Kg no fígado de suínos (NISCHWITZ; MICHALKE; KETTRUP, 2003). Assim, segundo Crossgrove e Zheng (2004), o fígado é considerado crítico na manutenção da homeostase do Mn, o qual remove o Mn do sangue através da excreção biliar. Desta forma, a exposição crônica a este metal resulta em um aumento da liberação de Mn pelo fígado, causando aumento do transporte para outros órgãos (HUANG et al., 1989). No presente estudo, o qual consiste na intoxicação subaguda, não foi encontrado aumento significativo na deposição de Mn, sob forma de cloreto ou acetato, no fígado em relação ao grupo controle. Em controvérsia, em estudo realizado por Huang e colaboradores (2011), ratos Sprague-Dawley que receberam administração intraperitoneal (i.p.) de 6mg de Mn/Kg por um período de 30 e 90 dias apresentaram aumento significativo na concentração hepática de 1,5 e 2,5 vezes, respectivamente, demonstrando que pode haver diferenças entre linhagens de ratos. Por outro lado, em nosso estudo a administração subaguda deste metal acumulou de forma significativa no SNC e no tecido renal sob forma de cloreto e de acetato quando comparado com o grupo controle. De acordo com O'neal e colaboradores (2014), esta

mesma dose de Mn proporcionou deposição aumentada, principalmente, em duas regiões do encéfalo, no estriado e no hipocampo dos ratos Sprague-Dawley adultos que participaram do estudo.

O transporte do Mn através da circulação sanguínea é realizado, principalmente, pela Tf aos demais tecidos do organismo (ASCHNER; GANNON, 1994; TAKEDA; SAWASHITA; OKADA, 1995). Após, a entrada deste metal nas células alvo pode ocorrer por diversas formas, incluindo pelo transportador DMT1, também conhecido como transportador de cátions divalentes, muito expresso na barreira hematoencefálica, o qual favorece o influxo tanto de íons Mn como de íons Fe na valência 2⁺, bem como para outros metais divalentes (ASCHNER; GANNON, 1994). Desta forma, em roedores, a deficiência de Fe está intimamente associada ao aumento da absorção de Mn nos tecidos alvo, principalmente no encéfalo, por competirem pelo mesmo mecanismo de entrada na célula (FITSANAKIS et al., 2008; FREELAND-GRAVES; LIN, 1991; GARCIA et al., 2007). No presente estudo, era esperado observar uma diminuição na concentração de Fe no grupo exposto ao Mn, devido ao aumento da deposição de Mn observada no encéfalo e tecido renal. Porém, não foi observada diferença significativa na concentração de Fe entre os grupos analisados, embora haja uma tendência a uma menor concentração de Fe nestes tecidos. Possivelmente, pois além do DMT1 que é o principal transportador de Mn sob forma Mn²⁺ e da Tf que é o principal transportador sob forma Mn³⁺, estudos mostraram que existem vários outros transportadores como os transportadores de zinco ZIP8 e ZIP14, transportador de dopamina (DAT), canais de Cálcio, transportadores de colina e transportadores de citrato, que não são específicos de Mn, mas que fazem o carregamento dele para o interior na célula. Ainda, o Mn utiliza transportadores de efluxo, como a ATPase 13A2, o SLC30A10, a ferroportina e o SPCA1, para que ocorra a homeostase de sua concentração citoplasmática, sugerindo, finalmente, que ele possa estar utilizando estas outras proteínas transportadoras e não competindo com a Tf (CHEN et al., 2015).

Diversos são os mecanismos envolvidos na toxicidade causada pelo Mn, incluindo o EO e a disfunção mitocondrial com depleção de ATP, indução de EROs com consequente morte celular por apoptose e/ou mecanismos de necrose (BOWMAN et al., 2011). Contudo, estudos *in vitro* e *in vivo* vêm, por outro lado, confirmando o efeito pró-oxidativo deste metal em modelos de exposição crônica (ALI et al., 1995; JIAO et al., 2008; ZHANG; FU; ZHOU, 2004). Neste sentido, o Mn é um cofator obrigatório para o funcionamento de diversas enzimas, incluindo a enzima antioxidante SOD, a qual atua como *scavenger* de radicais livres, incluindo o H₂O₂ (HUSSAIN; ALI, 1999).

Durante o processo de intoxicação por Mn, o Mn²⁺ pode ser convertido para a forma Mn³⁺ que é a forma biologicamente ativa em mamíferos e adquire maior capacidade quelante nos sistemas biológicos. Nesta conversão, o Mn²⁺ pode gerar tanto o radical hidroxil (•OH) quanto o radical superóxido (•O₂⁻) a partir de H₂O₂, de acordo com a seguinte equação: Mn²⁺ + O₂ → Mn³⁺ + •O₂⁻ e Mn²⁺ + H₂O₂ → Mn³⁺ + OH⁻ + •OH. Estes dois radicais formados podem danificar o DNA (GERBER; LÉONARD; HANTSON, 2002) e também causar peroxidação dos lipídeos de membrana, acarretando alteração química e

física na organização celular das membranas levando ao comprometimento de sua função. Além disso, os produtos da peroxidação dos lipídeos de membrana podem produzir diversos efeitos danosos, de forma direta, reagindo com proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, bem como de forma indireta, através da ativação de vias de sinalização mediada por receptores (FORMAN et al., 2008; POLI et al., 2008). Por outro lado, a glutathiona (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina e é um cofator obrigatório para o funcionamento da enzima glutathiona peroxidase (GPx), enzima antioxidante chave na proteção do organismo contra o dano oxidativo.

O acúmulo de Mn no encéfalo, observado neste estudo causou um aumento significativo na concentração de grupamentos tiólicos não proteicos, que representam a forma reduzida e funcional da molécula antioxidante GSH (ANDERSON; MEISTER, 1983). Em contrapartida, foi observado uma tendência, embora não significativa, de aumento de LPO. De acordo com Zhang e colaboradores (2008), em seus estudos utilizando modelos *in vitro* de intoxicação, foi observado o inverso, altos níveis de peroxidação dos lipídeos de membrana e baixos níveis de GSH devido a oxidação dos grupamentos tiólicos, assim como em estudos desenvolvidos por Desole e colaboradores (1995), onde ratos idosos e jovens expostos a ingestão forçada de Mn, apresentaram redução de GSH no estriado. No presente modelo, embora tenha havido aumento de deposição de Mn no encéfalo, o aumento de GSH encontrado em nosso estudo parece ser um mecanismo de adaptação ou de compensação ao EO, visto que o principal diferencial do modelo experimental é a dose subaguda, a qual pode mimetizar uma intoxicação ocupacional precoce, onde os danos centrais nos indivíduos acometidos parecem não ser aparentes ou evidentes.

A mitocôndria tem demonstrado ter um papel central na etiologia tanto da DP como do Manganismo, principalmente devido as seguintes hipóteses: I) as mitocôndrias dos neurônios dopaminérgicos parecem ser seletivamente vulneráveis à toxinas que causam disfunção mitocondrial; II) neurônios presentes na substância negra produzem toxinas endógenas mitocondriais e/ou III) as mitocôndrias da substância negra apresentam defeitos enzimáticos, como por exemplo o complexo I, o que provoca um comprometimento no metabolismo energético (BOWMAN et al., 2011; FARINA et al., 2013), com conseqüente aumento do escape de elétrons da cadeia respiratória e aumento na produção de superóxido (GAVIN; GUNTER; GUNTER, 1992; SCHOLTE, 1988). De acordo com Zhang e colaboradores (2003), em estudos com ratos adultos, em tratamentos crônicos utilizando 7,5, 15 e 30mg/Kg de Mn, foi demonstrado diminuição nas atividades dos quatro complexos mitocondriais (I a IV) no encéfalo em relação ao grupo controle. Por outro lado, no presente estudo, foi observado uma inibição significativa apenas na atividade do complexo I da cadeia respiratória no estriado, enquanto não houve inibição no hipocampo e no encéfalo total. Isto demonstra que, embora a intoxicação subaguda do Mn aumentou os níveis da molécula antioxidante GSH na tentativa de combater e/ou prevenir o desequilíbrio oxidativo, o complexo I mitocondrial do estriado foi o principal alvo da toxicidade do Mn.

Em relação a comparação dos sais de Mn, em estudos realizados por Chen e colaboradores (2001), o Mn trivalente (Mn^{3+}) se mostrou mais potente na inibição do

Complexo I, levando a uma disfunção na respiração mitocondrial e inibição dos centros mitocondriais de Fe-S que contém enzimas como a aconitase, em comparação ao Mn^{2+} . No presente estudo, somente foi observado uma diminuição na atividade do complexo I no grupo que recebeu cloreto de Mn, o qual está sob a forma Mn^{2+} .

Em estudos com hipocampus de ratos e neurônios estriatais, Gunter e colaboradores (2013), descreveram que o Mn^{3+} é transportado para as células neuronais através do mecanismo da Tf, transporte que compartilha características e mecanismos com o Fe^{3+} . Ainda, a captação de Mn^{3+} através da Tf é muito menor do que o Mn^{2+} , e o transporte de Mn^{3+} é mais lento quando comparado com o Mn^{2+} . Desta forma, o Mn^{3+} é transportado em menor concentração e o Mn^{2+} é captado em maior concentração; a absorção de Mn^{2+} é maior e mais rápida do que a de Mn^{3+} . Estes achados estão de acordo com o que foi observado no presente estudo, onde houve um maior acúmulo de Mn no soro dos animais que receberam acetato de Mn quando comparado com os animais que receberam cloreto de Mn.

Segundo Chen e colaboradores (2001), o acetato de Mn contribui com a toxicidade por ser mais oxidativo, o que pode causar danos oxidativos severos a níveis endossomais. Embora os efeitos causados pelo Mn^{2+} e Mn^{3+} sejam similares, o estado de valência do Mn é o que determina o grau de toxicidade que ele irá exercer, por isso, Mn^{3+} é mais potente e mais citotóxico com relação às alterações de funções celulares quando comparado com o Mn^{2+} .

Neste sentido, quanto maior o estado de valência, maior o poder oxidante e maior a possibilidade de desencadear produção de EROs e, conseqüente, aumento da peroxidação lipídica (Ali et al., 1995). Em estudos realizados por Ali e colaboradores (1995), a exposição ao cloreto e ao acetato de Mn *in vitro*, resultou no aumento de EROs no estriado. Este efeito foi observado utilizando-se dose/concentração de acetato de Mn muito mais baixa quando comparado com a dose/concentração de cloreto de Mn. Em relação a exposição ao cloreto e ao acetato de Mn *in vivo*, enquanto o acetato produziu um aumento de EROs no estriado e no hipocampo, a exposição ao cloreto de Mn, não foi significativa.

CONCLUSÕES

Ainda pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do Mn, os quais estão diretamente envolvidos no desenvolvimento de diversas patologias, incluindo as doenças neurodegenerativas e o Manganismo. O conjunto dos dados apresentados indica que a exposição subaguda, em baixas doses de Mn, contribui para o desenvolvimento de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial no SNC, principalmente no estriado. Sugerimos que o modelo de intoxicação subaguda por Mn sob a forma de cloreto de Mn, é um modelo adequado para o estudo do Manganismo. No entanto, maiores investigações são necessárias para confirmar se a exposição subaguda apresenta mecanismos de danos oxidativos similares aos já evidenciados durante a exposição crônica

a este metal.

REFERÊNCIAS

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

ANDERSON, M. E.; MEISTER, A. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 3, p. 707–11, 1983.

AON, M. A. et al. Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: An experimental-computational study. **The Journal of General Physiology**, v. 139, n. 6, p. 479–491, 2012.

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

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

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

BELL, J. G.; KEEN, C. L.; LÖNNERDAL, B. Higher retention of manganese in suckling than in adult rats is not due to maturational differences in manganese uptake by rat small intestine. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 26, n. 4, p. 387–398, 1989.

BOWMAN, A. B. et al. Role of manganese in neurodegenerative diseases. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 25, n. 4, p. 191–203, 2011.

CANNON, J. R. et al. Expression of human E46K-mutated α -synuclein in BAC-transgenic rats replicates early-stage Parkinson's disease features and enhances vulnerability to mitochondrial impairment. **Experimental Neurology**, v. 240, n. 1, p. 44–56, 2013.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.

CASSINA, A; RADII, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 328, n. 2, p. 309–316, 1996.

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

CHEN, P. et al. Manganese homeostasis in the nervous system. **Journal of**

Neurochemistry, v. 134, n. 4, p. 601–610, 2015.

CHUN, H. S.; LEE, H.; SON, J. H. Manganese induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates multiple caspases in nigral dopaminergic neuronal cells, SN4741.

Neuroscience Letters, v. 316, n. 1, p. 5–8, 2001.

COTZIAS, C. THE HIGH SPECIFICITY OF THE MANGANESE PATHWAY THROUGH THE BODY 1, 2 The accepted ideas about the physiological role of manganese have been derived predominantly from in vitro experiments. However, these are characterized by lack of specificity: Only a. p. 1298–1305, 1958.

CROSSGROVE, J.; ZHENG, W. Manganese toxicity upon overexposure. **NMR in Biomedicine**, v. 17, n. 8, p. 544–553, 2004.

DESOLE, M. S. et al. Cellular defense mechanisms in the striatum of young and aged rats subchronically exposed to manganese. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 3, p. 289–295, 1995.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl Groups. p. 70–77, 1959.

ESTERBAUER H. K, Cheeseman H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407–421, 1990.

FARINA, M. et al. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 575–594, 2013.

FISCHER, J. C. et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta**, v. 153, n. 1, p. 23–36, 1985.

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. v. 103, n. 1, p. 116–124, 2008.

FITSANAKIS, V. A. et al. Changes in dietary iron exacerbate regional brain manganese accumulation as determined by magnetic resonance imaging. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. 1, p. 146–153, 2011.

FORMAN, H. J. et al. The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 477, n. 2, p. 183–195, 2008.

FREELAND-GRAVES, J. H.; LIN, P. H. Plasma uptake of manganese as affected by oral loads of manganese, calcium, milk, phosphorus, copper, and zinc. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 10, n. 1, p. 38–43, 1991.

GARCIA, S. J. et al. Iron deficient and manganese supplemented diets alter metals and transporters in the developing rat brain. **Toxicological Sciences**, v. 95, n. 1, p. 205–214, 2007.

GARRICK, M. D. et al. DMT1: A mammalian transporter for multiple metals. **BioMetals**, v. 16, n. 1, p. 41–54, 2003.

GAVIN, C. E.; GUNTER, K. K.; GUNTER, T. E. Mn²⁺ sequestration by mitochondria and

inhibition of oxidative phosphorylation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 115, n. 1, p. 1–5, 1992.

GERBER, G. B.; LÉONARD, A.; HANTSON, P. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 1, p. 25–34, 2002.

GUNSHIN, H. et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature**, v. 388, n. July, p. 482–488, 1997.

GUNTER, T. E. et al. Manganese transport via the transferrin mechanism. **NeuroToxicology**, v. 34, n. 1, p. 118–127, 2013.

HEILIG, E. et al. Pharmacokinetics of pulmonary manganese absorption: evidence for increased susceptibility to manganese loading in iron-deficient rats. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 288, n. 5, p. L887–L893, 2005.

HERRERO HERNANDEZ, E. et al. Follow-up of patients affected by manganese-induced Parkinsonism after treatment with CaNa₂EDTA. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 3, p. 333–339, 2006.

HORNING, K. J. et al. Manganese Is Essential for Neuronal Health. **Annual review of nutrition**, v. 35, n. May, p. 71–108, 2015.

HUANG, C. et al. Chronic Manganese Intoxication. **Archives Neurology**, v. 46, p. 1104–1106, 1989.

HUANG, E.; ONG, W. Y.; CONNOR, J. R. Distribution of divalent metal transporter-1 in the monkey basal ganglia. **Neuroscience**, v. 128, n. 3, p. 487–496, 2004.

HUANG, P. et al. Manganese effects in the liver following subacute or subchronic manganese chloride exposure in rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 615–622, 2011.

HUSSAIN, S.; ALI, S. F. Manganese scavenges superoxide and hydroxyl radicals: An in vitro study in rats. **Neuroscience Letters**, v. 261, n. 1–2, p. 21–24, 1999.

JANKOVIC, J. Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease. **Neurology**, v. 64, n. 12, p. 2021–2028, 2005.

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 / American College of Occupational and Environmental Medicine**, v. 48, n. 6, p. 644–649, 2006.

JIAO, J. et al. Manganese-induced single strand breaks of mitochondrial DNA in vitro and in vivo. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 123–127, 2008.

KWAKYE, G. F. et al. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease: Shared and distinguishable features. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 7, p. 7519–7540, 2015.

LEBLONDEL, G.; ALLAIN, P. Manganese transport by caco-2 cells. **Biological Trace**

Element Research, v. 67, n. 1, p. 13, 1999.

LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: The antioxidant concept revisited. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 128, n. 2, p. 336–374, 2010.

LOWRY, H; J, NIRA;A, ROSEBROUGH; FARR, LEWIS AND RANDALL, J. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LÜCKING, C. B. et al. ASSOCIATION BETWEEN EARLY-ONSET PARKINSON'S DISEASE AND MUTATIONS IN THE PARKIN GENE. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 21, p. 1560–1567, 2000.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Critical care (London, England)**, v. 10, n. 1, p. 208, 2006.

NAVARRO-YEPES, J. et al. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 142, n. 2, p. 206–230, 2014.

NISCHWITZ, V.; MICHALKE, B.; KETTRUP, A. Optimisation of extraction procedures for metallothionein-isoforms and superoxide dsmutase from liver samples using spiking experiments. **The Royal Society of Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 109–115, 2003.

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, 2014.

OLANOW, C. W. Manganese-induced parkinsonism and parkinson's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, p. 209–223, 2004.

OULHOTE, Y. et al. Research | Children ' s Health Neurobehavioral Function in School-Age Children Exposed to Manganese in Drinking Water. v. 122, n. 12, p. 1343–1350, 2014.

POLI, G. et al. 4-Hydroxynonenal: A Membrane Lipid Oxidation Product of Medicinal Interest. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 4, p. 569–631, 2008.

ROTH, J. A. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. **Biological Research**, v. 39, n. 1, p. 45–57, 2006.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 273, n. 3, p. 442–455, 2013.

SCHOLTE, H. R. The biochemical basis of mitochondrial diseases. **J Bioenerg Biomembr**, v. 20, n. 2, p. 161–191, 1988.

SIDORYK-WEGRZYNOWICZ, M.; ASCHNER, M. Manganese toxicity in the central nervous system: The glutamine/glutamate-??-aminobutyric acid cycle. **Journal of Internal Medicine**, v. 273, n. 5, p. 466–477, 2013.

SINGH, J. et al. Biochemical and histopathological alterations in early manganese toxicity in rats. **Environmental physiology & biochemistry**, v. 4, n. 1, p. 16, 1974.

SMITH, E. A. et al. Increased whole blood manganese concentrations observed in children with iron deficiency anaemia. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 27, n. 1, p. 65–69, 2013.

TAKEDA, A.; SAWASHITA, J.; OKADA, S. Biological half-lives of zinc and manganese in rat brain. **Brain Research**, v. 695, n. 1, p. 53–58, 1995.

THOMPSON, K. et al. Olfactory uptake of manganese requires DMT1 and is enhanced by anemia. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, n. 1, p. 223–30, 2007.

UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65–74, 2009.

WILLIAMS, M. et al. Toxicological Profile for Manganese. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, n. September, p. 504, 2012.

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, n. 2, p. 232–236, 2008.

ZHANG, S.; FU, J.; ZHOU, Z. In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 1, p. 71–77, 2004.

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

ZWINGMANN, C.; LEIBFRTZ, D.; HAZELL, A. S. Energy Metabolism in Astrocytes and Neurons Treated with Manganese: Relation among Cell-Specific Energy Failure, Glucose Metabolism, and Intercellular Trafficking Using Multinuclear NMR-Spectroscopic Analysis. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 756–771, 2003.