UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

RAÚL BONNE HERNÁNDEZ

MANGANÊS:
O PAPEL DO FRACIONAMENTO QUÍMICO E DA
ESPECIAÇÃO COMO DETERMINANTES DE SEU
COMPORTAMENTO GEOQUÍMICO E NEUROTÓXICO
NOS ORGANISMOS EM DESENVOLVIMENTO

São Paulo
Data do Depósito na SPG
30/09/2009

RAÚL BONNE HERNÁNDEZ

**MANGANÊS:
O PAPEL DO FRACIONAMENTO QUÍMICO E DA
ESPECIAÇÃO COMO DETERMINANTES DE SEU
COMPORTAMENTO GEOQUÍMICO E NEUROTÓXICO
NOS ORGANISMOS EM DESENVOLVIMENTO**

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em*

Química (Química Inorgânica)

Orientador: Prof. Dr. Breno Pannia Espósito

São Paulo
2009

Raúl Bonne Hernández

MANGANÊS: O papel do fracionamento químico e da especiação como determinantes de seu comportamento geoquímico e neurotóxico nos organismos em desenvolvimento

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em*

.....

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

O trabalho de vários anos foi resumido em 140 páginas, porém o apoio moral e logístico recebido durante todo esse tempo necessitaria de um volume de folhas “n-vezes maior” para ser expresso, e ainda correria o risco de esquecer pessoas e entidades. De maneira que a menção de alguns dos artífices deste trabalho estará relembrando a todos os que embarcaram no desafio de conhecer um pouquinho mais o *manganês*.

A Rafaela Lunardi (esposa) e familiares no Brasil

Ao amigo e orientador Prof. Dr. Breno Pannia Espósito

Aos meus familiares em Cuba

Aos alunos Anderson, Thiago, Samanta e Elen

Aos que integraram e ainda são integrantes do laboratório 1265-IQUSP (2006-2009)

Aos técnicos Marco Antonio Sanches (IQ-USP), Audrey Schon Rodrigues (IQ-USP),

Cruz Alberto Mendoza Rigonati e Gaspar Ferreira de Lima (ICB1-USP)

À Prof^a. Dra. Elisabeth de Oliveira (IQUSP)

À Prof^a. Dra. Cristina Suñol e seu grupo de pesquisa (IIBB-Espanha)

Ao Prof. Dr. Stefan Scholz e seu grupo de pesquisa (UFZ-Alemanha)

Ao Prof. Dr. Marcelo Farina (UFSC)

À Prof^a. Dra. Maria Inês Borella (ICB1-USP)

À Prof^a. Dra. Lurdes Foresti de Almeida-Toledo e colaboradores (IB-USP)

À Prof^a. Dra. Mônica de Toledo-Piza Ragazzo (IB-USP)

Ao Prof. Dr. Jorge César Masini (IQ-USP)

À Prof^a. Dra Jaisa Fernandes Soares (UFPR)

À Prof^a. Dra Ana Mercê Ramalho (UFPR)

Ao Prof. Ciro Alberto Ribeiro e o seu grupo de pesquisa (UFPR)

À Prof^a. Helena Cristina da Silva de Assis (UFPR)

Ao Prof. Luis Julià (IIQAB-Espanha)

Aos amigos e colegas

À comunidade da bacia Alto do Paranapanema

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da IQ-USP.

Aos Laboratórios de Microscopia Eletrônica da UFPR e LNLS

À Agência de Áreas Protegidas do Estado de São Paulo

À Pró-Reitoria de Pós-graduação da USP

Ao IBAMA

Às Agências FAPESP (06/00001-3), CNPq (506072/2004-5), DAAD (A0875452).

À VIDA

**“Uma experiência nunca é um fracasso,
pois sempre vem demonstrar algo”**

Thomas Alva Edison

RESUMO

Hernandez R.B. MANGANÊS: O papel do fracionamento químico e da especiação como determinantes de seu comportamento geoquímico e neurotóxico nos organismos em desenvolvimento. 2009. 140p. Tese (Doutorado) -Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O manganês (Mn) é um elemento essencial, porém pode ser tóxico em concentrações acima do requerido fisiologicamente. Assim, motivado pelo aumento nos teores desse metal na bacia hidrográfica Alto do Paranapanema (ALPA) e o crescente número de estudos internacionais relacionando desordens neurológicas ao excesso de Mn em águas superficiais, o presente trabalho foi conduzido para avaliar o perfil geoquímico e neurotoxicológico do Mn nos organismos em desenvolvimento em função da especiação química do metal. Desta maneira, no período de agosto/2006 a abril/2007, foram realizadas quatro coletas de amostras de águas superficiais e de sedimentos, nos rios Paranapanema e Itapetininga e no reservatório Jurumirim, localizados na bacia hidrográfica Alto do Paranapanema (ALPA, SP). Os estudos de fracionamento químico demonstraram que na bacia ALPA o Mn ocorre basicamente nos sedimentos (Mn ligado a hidr(óxidos) de Fe e Mn > Mn ligado a carbonatos $\approx$ Mn intercambiável $\approx$ Mn ligado a silicatos > Mn ligado a matéria orgânica) porém em constante troca com a coluna líquida, onde o Mn ocorre como metal particulado e em menor proporção como metal lábil. Acredita-se que esse padrão de distribuição esteja governado pelas características oxidantes e alcalinas desses sistemas aquáticos. Adicionalmente, foi verificado que a origem do Mn nesses sistemas é de caráter natural, porém com $\sim 30\%$ de riscos ecotoxicológicos. Neste sentido, estudos *in vitro* (modelos de neurônios) e *in vivo* (embriões de paulistinha, *Danio rerio*) com as espécies MnCl_2 , Mn(II)Cit , Mn(III)Cit , Mn(III)PPi (Cit: Citrato, PPi: Pirofosfato) sugeriram que o Mn(II) é mais tóxico do que o Mn(III) . Contudo, independentemente da especiação química, o Mn foi mais tóxico para neurônios glutamatérgicos do cerebelo em diferenciação, e para o paulistinha no período embrio-larval, pós-eclosão (> 72 horas pós-fertilização), no qual foram verificados danos neuromusculares. No entanto, a espécie mais tóxica para embriões expostos por 48 h foi o MnCl_2 e por 120 h o Mn(II)Cit , sugerindo que o citrato está mediando essa toxicidade, o que é uma exceção ao “Free Ion Activity Model”. Conforme esses resultados foram veri-

ficados inibição do metabolismo do lactato e do ascorbato in vitro. Estudos de expressão gênica no paulistinha, mediante RT-PCR qualitativo e quantitativo permitiram verificar alterações no gene mitocondrial *mt-co1*, que pode ser compensada pela superexpressão do gene *hspb11*. Esses resultados sugerem que os danos induzidos pelas espécies de Mn devem estar associados à disfunção mitocondrial e do metabolismo energético, seguido da indução de estresse oxi-redutivo, o qual pode ser parcialmente revertido pela administração exógena de lactato e/ou ascorbato, sendo propostos os prováveis mecanismos. A probabilidade de que esses eventos toxicológicos aconteçam em outras espécies, incluindo os seres humanos, é sustentada principalmente pelos estudos tóxico-genômicos, dado que em outras espécies podem ser encontrados ortólogos para esses genes, e especialmente para *mt-co1*, que poderia ser um biomarcador da toxicidade do Mn. Finalmente, sugere-se que os valores de referência de Mn em sedimentos sejam revistos em função das contribuições de frações biodisponíveis, e que esses resultados sejam considerados pelas agências ambientais do Estado em seus programas de avaliação e gerenciamentos de riscos.

Palavras-chave: manganês, especiação, Paranapanema, neurotoxicidade, ecotoxicidade, *Danio rerio*

ABSTRACT

Hernandez R.B. Manganese: role of chemical fractioning and speciation as determinants of its geochemical and developmental neurotoxicological effect. 2009. 140p. PhD Thesis- Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Manganese (Mn) is an essential element, however it may be toxic in higher than required physiological levels. The present work was motivated by the increased levels of this metal in the Alto do Paranapanema (ALPA, São Paulo state) hydrographic basin and to the growing amount of international evidence relating neurological disorders to excess Mn in superficial waters. Therefore, experiments were conducted in order to evaluate Mn both geochemical and neurotoxicological profiles on the developmental stages of aquatic organisms and mammalian models as a function of metal speciation. During August 2006 to April 2007, four expeditions to ALPA were performed to collect water and sediment samples from rivers Paranapanema and Itapetininga, as well as from Jurumirim reservoir. Chemical fractioning studies showed that Mn occurs mainly in sediments (Mn bound to Fe, Mn (hydr)oxides > Mn bound to carbonates $\approx$ Interchangeable Mn $\approx$ Mn bound to silicates > Mn bound to organic matter) but in constant exchange with the liquid column, where Mn occurs as particulated metal and, in lesser amounts, as a labile metal. This distribution pattern is thought to be governed by the oxidant and alkaline conditions of this aquatic system. Also, Mn was found to be of natural origin, however posing $\sim$ 30% of ecotoxicological risks. In vitro (neuronal cells) and in vivo (zebrafish, *Danio rerio* embryos) studies with the species MnCl_2 , Mn(II)Cit , Mn(III)Cit , Mn(III)PPi (Cit: Citrate, PPi: Pyrophosphate) suggest that Mn(II) is more toxic than Mn(III). However, independently of chemical speciation, Mn was more toxic to cerebellar glutamatergic neurons during differentiation and to zebrafish in the embryo-larval period (> 72 hours pos-fertilization), to which neuromuscular damage was observed. The most toxic species for embryos exposed for 48 h was MnCl_2 , but in the 120 h exposition experiment Mn(II)Cit was more toxic, suggesting that citrate mediates the toxicity, in an exception to the Free Ion Activity Model. According to these results, it was observed inhibition in the metabolism of lactate and ascorbate in vitro. Gene expression studies of zebrafish were performed by both qualitative and quan-

titative RT-PCR, displaying changes in the expression of the mitochondrial gene *mt-co1* which may be compensated by an overexpression of *hspb11* gene. These results suggest that the damage induced by Mn species may be related to mitochondrial and energy metabolism disfunction followed by induction of oxi-reductive stress, which can be partially reverted by the exogenous administration of lactate and/or ascorbate. The putative mechanisms are proposed. The possibility that these toxic events might be important to other species, humans included, is substantiated mainly by the toxicogenomics studies, since ortologs for both genes are widespread. This is especially true to *mt-co1*, which may be a bio-marker for Mn toxicity. Finally, it is suggested that the reference values of Mn in sediments should be revised to accomodate the contributions of bioavailable fractions, and that results should be considered by official environment control agencies during their evaluation and risk management programs.

Keywords: manganese, speciation, Paranapanema, neurotoxicity, ecotoxicity, *Danio rerio*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processos de transporte e transformação de xenobióticos no meio ambiente (Connel and Miller, 1984).....	2
Figura 2: Inter-relação entre a toxicologia ambiental e outras ciências.....	2
Figura 3: Alguns exemplos das aplicações dos complexos de manganês: Mancozeb (fungicida), MMT (aditivo para combustíveis); EUK8 (representante de uma classe de miméticos de SOD); Teslascan: agente de contraste para MRI.	6
Figura 4: Mecanismos do transporte do manganês através da Barreira Hemato-Encefálica (BHE) para níveis fisiológicos de Mn Os transportadores associados com o transporte do manganês (segundo o estado de oxidação) são indicados. O complexo do Mn com albumina é limitado para atravessar a BHE. A largura da seta descreve a importância relativa de cada um dos transportadores neste processo (?,) ainda em estudo, (ZIP8) Transportador de proteína, (DMT-1) Transportador de Metais Divalentes tipo-1, (Tf) Transferrina (Aschner et al., 2007).	11
Figura 5: Distribuição do Mn no cérebro após uma única injeção intravenosa de MnCl ₂ (2 mg /kg). Diferenças em relação a cada controle são indicadas (*P , 0,05; **P , 0,01; ***P , 0,001) (Sotogaku et al., 2000).....	12
Figura 6: Estudo comparativo da IC ₅₀ para o MnCl ₂ , determinda a partir de ensaios de densidade celular com linhagem celulares representativas de diferentes, expostas para o Mn. Rim (MDCK , ▲), fígado (HepG2, Δ), glial (GL15, ■), neurônios (SHSY5Y , □) (Rovetta et al., 2007).....	16
Figura 7: Localização dos pontos de amostragem na bacia ALPA: Itapetininga (ITAP), Paranapanema (PARA) e Jurumirim (JURU). (CETESB, 2006).....	46
Figura 8: Utensílios de amostragem de campo, desenhados e construídos no Laboratório de Bioinorgânica Ambiental do IQ-USP. A) coletor de água (barra de PVC e um frasco (1L) de polietileno acoplado e coletor sedimento (tubo de PVC- 5 cm de diâmetro interno- com tampas), B) imagem ampliada do diâmetro interior do coletor de sedimento, C) imagem ampliada da base do coletor de sedimento, D) imagem ampliada do coletor de água, E) Roupa de polietileno com botas e luvas de PVC sedimento, F) Amostragem de sedimento no rio Itapetininga.....	47
Figura 9: Paulistinhas adultos (a, fêmea; b, macho); e embriões: c, 2 hpf (64 células); d, 24 hpf; e, 72 hpf.....	59
Figura 10. Distribuição de espécies de Mn nas águas superficiais (a) e nos sedimentos (b) da ALPA durante as quatro etapas de amostragem (Agosto 2006 (06-08), Novembro 2006 (06-11); Fevereiro 2007 (07-02) e Abril 2007 (07-04)). Itapetininga, Itap; Paranapanema, Para; Jurumirim, Juru. S.T: Pseudo Total (I+II+III+IV+V); LD: limite de detecção (0,6 µg/L para água e 0,6 µg/kg para sedimento); LL: menor nível (<i>Lower Level</i>) (CETESB, 2006); HL: maior nível (<i>Higher Level</i>)(CETESB, 2006); LEL: nível com menor efeito na vida aquática(MEEO, 1993) (<i>Lowest Effect Level</i>); SEL: nível com efeitos severos na vida aquática (<i>Severe Effect Level</i>) (MEEO, 1993). Dados de Hernandez et al. (2009).	64
Figura 11: Fator de enriquecimento, EF (a), Índice geoquímico, I _{geo} (b) e Código de avaliação de risco, RAC (c), para o Mn na ALPA. (Agosto 2006 (06-08), Novembro 2006 (06-11); Fevereiro 2007 (07-02) e Abril 2007 (07-04)); Itapetininga, Itap; Paranapanema, Para; Jurumirim, Juru. (Hernandez et al., 2009b).....	66
Figura 12: a) Espectros eletrônicos das espécies de Mn(III) e seus respectivos ligantes. b) Espectros de EPR (37°C) de: MnCl ₂ 2 mM em solução aquosa (1 – 3) e em meio de cultura (4 – 6); Mn(III)PPi 1 mM em solução aquosa (7, 9, 11) e em meio de cultura (8, 10); Mn(III)Cit 1 mM em solução aquosa (12, 14, 16) e em meio de cultura (13, 15).	68
Figura 13: Voltamogramas dos complexos de Mn e os respectivos ligantes (0,1 V.s ⁻¹ ; 10 varreduras) vs Ag/AgCl.....	69
Figura 14: Neurotoxicidade induzida pelas espécies de Mn em células granulares do cerebelo (CGC) após 120 h de tratamento. As células foram expostas em diferentes períodos de desenvolvimento durante a diferenciação celular (1-6 div) e após a diferenciação celular (6-11 div). Valores representam (média ± S.E.M). * p < 0,05, ** p < 0,0001. Mn(III) pyrP = Mn(III)PPi (Hernandez et al., 2009a).....	71

Figura 15: Curvas dose-resposta (viabilidade celular) para as espécies do Mn em células granulares do cerebelo (CGC) (■) e células granulares do neocórtex (CTX) (▲). As células (1-6 div) foram expostas por 120 horas. Os valores representam (média ± S.E.M) de três experimentos independentes, cada um feito em triplicata.....72

Figura 16: Níveis de glutathione total intracelular após os tratamentos com as diferentes espécies do Mn. Células granulares do cerebelo (CGC) (A-B) e células neocorticais (CTX) (C-D). As células (1-6 div) foram expostas por 120 horas. Os valores representam (média ± SD) de 4-6 experimentos independentes. (Farina et al., 2008; Hernandez et al., 2009a).....73

Figura 17: Captação de glutamato em CGC (célula glutamatérgica), após tratamento com $MnCl_2$ (A) e captação de GABA em CTX (célula GABAérgica), após tratamento com $MnCl_2$ e $Mn(III)Cit$ (B-C). As células (1-6 div) foram expostas por 120 horas (1-6 div). Os valores representam (média ± SD) de dois experimentos independentes, cada um foi feito em triplicata.74

Figura 18: Viabilidade celular avaliada pelo ensaio do MTT, onde a neurotoxicidade induzida pelo Mn é reduzida por ácido ascórbico, AA (A e B) e lactato, Lac (C e D) em células granulares do cerebelo. As células (1-6 div) foram expostas a $MnCl_2$ (A e C) ou $Mn(III)Cit$ (B e D) durante 120 horas. Os valores representam (média ± S.E.M) de três experimentos independentes, cada um feito em triplicata. As diferenças significativas entre os tratamentos (barra em preto: Mn na ausência de neuroprotetores AA ou Lac; barra em branco: Mn com neuroprotetores) foram confirmadas com análises de ANOVA em duas vias, seguido do teste de Dunnet. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ com respeito ao controle correspondente; + $P < 0,05$ e ++ $P < 0,01$ indica diferenças entre tratamentos para mesma concentração de Mn (ANOVA em uma via, seguido do teste de Dunnet) (Hernandez et al., 2009a)75

Figura 19: Viabilidade celular avaliada pelo ensaio do MTT, onde a neurotoxicidade induzida pelo Mn é reduzida por ácido ascórbico, AA (A), lactato, Lac (B) e AA + Lac (C) em células neocorticais (CTX). As células (1-6 div) foram expostas por 120 horas a $MnCl_2$ ou $Mn(III)Cit$. Os valores representam (média ± S.E.M) de três experimentos independentes, cada um feito em triplicata. As diferenças significativas entre os tratamentos (barra em preto: Mn na ausência de neuroprotetores AA, Lac ou AA + Lac; barra em branco: Mn com neuroprotetores) foram confirmadas com análises de ANOVA em duas vias, seguido do teste de Dunnet. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ com respeito ao controle correspondente; ■ $P < 0,05$ e ♦ $P < 0,01$ indica diferenças entre tratamentos para mesma concentração de Mn (ANOVA em uma via, seguido do teste de Dunnet) (Hernandez et al., 2009a)76

Figura 20: Viabilidade celular avaliada pelo ensaio do MTT, onde o probucol não atenua (e em alguns casos exacerba) a neurotoxicidade induzida pelo Mn em células neocorticais (A e B) ou em células granulares do cerebelo (C e D). As células (1-6 div) foram expostas a $MnCl_2$ (A e C) ou $Mn(III)Cit$ (B e D) durante 120 horas. Os valores representam (média ± S.E.M) de três experimentos independentes, cada um feito em triplicata. As diferenças significativas entre os tratamentos (barra em preto: Mn na ausência de probucol; barra em branco: co-administração de Mn e probucol) foram confirmadas com análises de ANOVA em duas vias, seguido do teste de Dunnet. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ com respeito ao controle correspondente; ♦ $P < 0,05$ indica diferenças e Dunnet's).77

Figura 21: Estudo comparativo da toxicidade das espécies de Mn (LC50) em embriões de Danio rerio de diferentes estados de desenvolvimento e diferentes tempos de exposição ao Mn. dC: embriões sem córion (removidos manualmente dos ovos; a eclosão acontece entre 48 e 72 hpf). Resultados de tratamentos que não apresentam a mesma letra nas mesmas condições são estatisticamente diferentes uns dos outros ($p < 0,05$). Toxicidade significativa induzida pelo $Mn(II)Cit$ foi detectada somente entre 2-122 hpf. Barras representam LC50 (média ± desvio padrão) de três experimentos independentes79

Figura 22: Resumo de efeitos subletais induzidos pelas diferentes espécies de Mn em embriões de Danio rerio. dC: embriões removidos manualmente dos ovos, mot: mobilidade reduzida ou alterada em resposta a estímulo na cauda, hrt: batimento cardíaco reduzido, bd: deformação corporal, pce: edema pericárdico80

Figura 23: Estudo comparativo da redução da mobilidade estimulada (EC50) em embriões de Danio rerio de diferentes estados de desenvolvimento e diferentes tempos de exposição após serem expostos a $MnCl_2$ e $Mn(II)Cit$. dC: embriões sem córion (removidos manualmente dos ovos; a eclosão acontece entre as 48 e as 72 hpf). Resultados de tratamentos que não apresentam a mesma letra nas mesmas condições são estatisticamente diferentes uns dos outros ($p < 0,05$). * ($p < 0,05$) indica diferença significativa entre as espécies de Mn. Barras representam EC50 (media ± desvio padrão) de três experimentos independentes81

Figura 24: Sensibilidade dos embriões de paulistinha a $MnCl_2$ e $Mn(II)Cit$, com respeito ao período de desenvolvimento. Dados referidos como a razão $LC50/EC50$ 82

Figura 25: Expressão de genes (*gad1*, *mt-co1* e *hspb11*) em embriões de *Danio rerio*. A expressão relativa de genes foi analisada quantitativamente RT-PCR em embriões expostos de 2-122 hpf para diferentes concentrações de $MnCl_2$ (A) ou $Mn(II)Cit$ (B). Como o $Mn(II)Cit$ é preparado com citrato 6 mM, foram incluídos controles de citrato (6 mM) e sem citrato (água-ISO). Os dados de $Mn(II)Cit$ foram normalizados com respeito ao controle de citrato. *gad1* (glutamato decarboxilase 1), *mt-co1* (citocromo c oxidase mitocondrial I) e *hspb11* (proteína de choque térmico b11 “ α -Crystallin-Related”). Barras representam (média $\pm$ desvio padrão) de três experimentos independentes. ★ = $p < 0,05$ e ★★ = $p < 0,01$ indicam diferenças significativas com respeito ao respectivo controle (para $Mn(II)Cit$, foi considerado o citrato). 83

Figura 26: Proposta de distribuição e dinâmica do Mn na bacia ALPA. L: H_2O , Cl^- , CO_3^{2-} , HCO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Cit^{3-} , $P_2O_7^{4-}$, etc. Me: Metal, [R]: Redução, [O]: Oxidação, [AR]: Agente Redutor, [U]: Consumo, [S]: Sedimentação, [Ad]: Adsorção, [D]: Dessorção, [M]: Mineralização, [Rd-S]: Re-dissolução ou Re-suspensão (Hernández et al., 2009). 87

Figura 27: Mecanismo de neurotoxicidade das espécies de Mn e mecanismo de neuroproteção mediante co-administração de lactato (Lac). 1- As espécies de Mn induzem inibição do metabolismo do Lac, seguido de estresse oxi-redutivo. 2- Co-administração de Lac contribui para a recuperação do metabolismo energético mitocondrial. 3- A reciclagem do Lac gera piruvato (Pyr), que sequestra espécies reativas de oxigênio. 4- A oxidação metabólica do Pyr gera acetato (AC), que poderia complexar íons de Mn e conseqüentemente bloquear os efeitos inicialmente induzidos pelas espécies desse metal. 5- Complexos Mn-AC poderiam ser removidos do espaço intramitocondrial e intracelular. Gli: Glicose; GLU: transportador de glicose; gl: glicólise; LDH1: lactato desidrogenase 1 (mitocondrial); LDH5: lactato desidrogenase 5 (citossólica); ROS: espécies reativas de oxigênio; MCT2: transportador de Lac tipo 2; (Ca^{2+}) : canal de cálcio, possível entrada de $Mn(II)$ nas mitocôndrias; ?: via alternativa para o transporte de espécies de $Mn(III)$ e complexos Mn-AC; DMT2: transportador de metais divalentes, possível via de acesso no espaço intracelular para o $Mn(II)$. Barras (|) indicam inibição. 97

Figura 28: Mecanismo de neurotoxicidade das espécies de Mn e mecanismo de neuroproteção mediante co-administração de ácido ascórbico (AA) em CGC e CTX ou lactato-AA em CTX. 1- As espécies de Mn induzem inibição do metabolismo do lactato (Lac) e do AA, seguido de estresse oxi-redutivo. 2- Co-administração de AA e/ou Lac-AA contribui para a recuperação do metabolismo energético mitocondrial e reativa o sistema antioxidante GSH/AA via recuperação dos níveis de AA. Adicionalmente, o AA intracelular inibe a via glicolítica (gl) e estimula o transporte de Lac. 3- Síntese in loco de Lac a partir de dihidroascorbato (DHA) pela rota metabólica da pentose fosfato (ppp), que é uma alternativa à gl. Simultaneamente, a reciclagem do Lac gera piruvato (Pyr), que sequestra espécies reativas de oxigênio. 4- A oxidação metabólica do Pyr gera acetato (AC), que poderia complexar íons de Mn e conseqüentemente bloquear os efeitos inicialmente induzidos pelas espécies desse metal. 5- Complexos Mn-AC poderiam ser removidos do espaço intramitocondrial e intracelular. Gli: Glicose; GLU: transportador de glicose; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; GSS-pr: complexo glutatona-proteína; LDH1: lactato desidrogenase 1; ROS: espécies reativas de oxigênio; SVCT2: transportador de AA; MCT2: transportador de lactato tipo 2; DCT: transportador de dicarboxilatos; (Ca^{2+}) : canal de cálcio, possível entrada de $Mn(II)$ nas mitocôndrias; ?: via alternativa para o transporte de espécies de $Mn(III)$ e complexos Mn-AC; DMT2: transportador de metais divalentes, possível via de acesso no espaço intracelular para o $Mn(II)$. Barras (|) indicam inibição. 100

Figura 29: O Mn induz neuro-toxicidade durante o desenvolvimento dos embriões de paulistinha (*Danio rerio*) dependente da especiação química, idade dos embriões e situação energética: 1) embriões antes da eclosão são tolerantes ou apresentam baixa neuro-toxicidade (ovo + elevado conteúdo energético); 2) incremento da neuro-toxicidade pós-eclosão (ovos removidos + diminuição do conteúdo energético (Jeziarska and Witeska, 2004; Gündel et al., 2007; Lucitt et al., 2008). Intensificação da cor das setas horizontais = incremento da toxicidade das espécies de Mn; $Mn(II)Cit > MnCl_2 > Mn(III)Cit$. O $MnCl_2$ foi a espécie mais tóxica para todas as exposições de 48 h (mais detalhes Figuras 18-22). Setas verticais em preto: início dos ensaios; setas de 48h: avaliação toxicológica. Em 122h: avaliação tóxico-genômica. O: ovo; E: conteúdo energético. 108

Figura 30: Espécies de Mn induzem toxicidade em embriões de paulistinha (*Danio rerio*) provavelmente por uma cascata de eventos deletérios intra-mitochondriais. 1) As espécies de Mn induzem disfunção do gene *mt-co1* e inibição da atividade do complexo IV mitocondrial. 2) O desregulamento do gene *mt-co1* conduz a alterações na expressão de genes da família citocromo c oxidase (Baden et al., 2007; Fontanesi et al., 2008), perda de atividade dos complexos II e III (Hargreaves et al., 2007), estresse oxi-redutivo (ROS) liberação do citocromo c, ativação de caspase e, finalmente, apoptose (Zhang et al., 2003; Choi et al., 2007; Farina et al., 2008; Quintanar, 2008; Hernandez et al., 2009a). 3) Todos esses eventos podem ser abolidos parcialmente pela super-expressão do gene *hspb11*, conforme (Beere, 2004; Bellyei et al., 2007). Inclui-se também uma representação simplificada da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Complexos I-IV) e da produção de ATP (complexo V). *mt-co1-3*, família de genes mitocondriais da citocromo c oxidase; Cyt C: Citocromo C; CoQ: co-enzima Q redutase; n-DNA: DNA nuclear; mt-DNA: DNA mitocondrial. A inibição sugerida por dados deste estudo é representada por barras (|) cheias; inibição sugerida por outros estudos é representada por barras tracejadas. (-) repressão- e (+) indução dos genes estudados..... 113

Figura 31: O Mn induz neurotoxicidade no desenvolvimento in vitro (neurônios granulares cerebelares e neurônios corticais) e in vivo (paulistinha, *Danio rerio*), provavelmente mediado por disfunção mitocondrial, inibição do metabolismo energético e indução de estresse oxi-redutivo: (-1) inibição, (+1) indução e (0) não alterado. 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagens de resultados inconformes de análise de águas em relação aos padrões de qualidade (Resolução CONAMA 20/86) para metais durante o período 1992 – 2005 na UGRHI 14, Alto Paranapanema (CETESB 2006).....	36
Tabela 2. Características da bacia ALPA (UGRHI 14)	45
Tabela 3. Índices geoquímicos e toxicológicos (EF, Igeo e RAC) e suas interpretações.	51
Tabela 4. Detalhes dos genes e seqüências dos primers selecionadas para os estudos de expressão de gene. Os genes listados são reguladores de diversos processos fisiológicos, comportamentais e do neurodesenvolvimento, assim como outros marcadores da toxicidade crônica com metais, neurogênese, estresse oxidativo e/ou de resposta geral de estresse, os quais podem ser afetados pelo manganês. Nomenclatura segundo ZFIN.	61
Tabela 5. Parâmetros gerais da qualidade do sistema aquático em diferentes localidades da bacia ALPA.....	63
Tabela 6: Inter-relações entre espécies de Mn e parâmetros físico-químicos na ALPA, conforme os coeficientes de correlação de Pearson ($p < 0,05$), (Hernandez et al., 2009b).....	65
Tabela 7: Fe pseudototal e Fe de fundo (mg/kg)	66
Tabela 8: Citotoxicidade (LC50 em μM) induzida pelas espécies de Mn em cultura primária de neurônios granulares cerebelares (CGC) e neurônios do córtex (CTX). As células foram expostas durante 120 horas, iniciando o primeiro dia in vitro (1- 6 div).	72
Tabela 9: Resultados de análises de Mn no meio de cultura dos embriões	78
Tabela 10: Principais resultados toxicológicos in vitro e in vivo, parâmetros observados em campo e valores declarados pelas agências brasileiras e internacionais relacionados ao Mn.	115

LISTAS DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
ALPA	Alto do Paranapanema
BHE	Barreira hematoencefálica
BLM	Biotic Ligand Model
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Cit	Citrato
CNS	Sistema nervoso central
CTX	Células corticais
CGC	Células granulares cerebelares
dC	Embriões removidos manualmente dos ovos
div	dia in vitro
EF	Fator de enriquecimento
EC50	Concentração que causa 50% de efeito
EPA	Agência dos EUA para a Proteção do Meio Ambiente
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
FDA	Food e Drug Administration
FIAM	Free Ion Activity Model
g	Fator giromagnético
Gad	Glutamato decarboxilase
GSHt	Glutathione total
GSSG	Glutathione oxidada
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HL	<i>Higher Level</i> (maior nível)
HpF	Horas pós fertilização
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
I _{geo}	Índice geoquímico
ITAP	Rio Itapetininga
I _a , II _a , III _a	Frações I, II e III de Mn na coluna de água
I _s , II _s , III _s , IV _s , V _s	Frações I, II, III, IV, V de Mn no sedimento
JURU	Reservatório Jurumirim
Lac	Lactato
LC50	Concentração que causa 50% de morte
LC10	Concentração que causa 10% de morte
LEL	<i>Lowest Effect Level</i> (nível com menor efeito na vida aquática)
LL	<i>Lower Level</i> (menor nível)
Mn	Manganês
mot	Mobilidade reduzida ou alterada em resposta a estímulo na cauda
mt-col	Citocromo c oxidase I mitocondrial
MMT	Tricarbonilmetilciclopentadienilmanganês
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial de Saúde
RAC	Código da estimativa de risco
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
PARA	Rio Paranapanema
Pi	Pirofosfato
SEL	<i>Severe Effect Level</i> (nível com efeitos severos na vida aquática)
SD	Desvio padrão (definido como a raiz quadrada positiva da variância)
SEM	Erro padrão da média (analisa a variabilidade de uma média)
TH	Tirosina hidroxilase
UGRHI 14	Unidade de Gestão de Recursos Hídricos do Alto do Paranapanema
ZFIN	Zebrafish Information Network

SUMÁRIO

RESUMO	IV
ABSTRACT	VI
LISTA DE TABELAS	V
LISTAS DE ABREVIATURAS	VI
PREÂMBULO.....	1
CAPÍTULO 1: Introdução ao manganês, aspectos básicos da especiação química e estudos toxicológicos.....	5
1.1 Propriedades físicoquímicas do Mn.	5
1.2 Produção e usos do Mn.	5
1.3 Ocorrência do Mn de origem natural.....	6
1.3.1 Ocorrência do Mn nas águas.	7
1.3.2 Ocorrência do Mn nos sedimentos.	8
1.3.3 Ocorrência do Mn nos alimentos.....	8
1.4 Ocorrência do Mn de origem antrópica.	8
1.5 Fatores que podem influenciar a toxicidade do Mn.	9
1.5.1 Exposição ao Mn.	9
1.5.2 Rotas de exposição e absorção.	10
1.5.3 Distribuição do Mn.	11
1.5.3.1 Distribuição do Mn em mamíferos.....	11
1.5.3.2 Distribuição do Mn em organismos aquáticos.	13
1.5.4 Excreção.....	14
1.6 Essencialidade e toxicidade do Mn.	15
1.6.1 Deficiência do Mn.	15
1.6.2 Toxicidade do Mn em mamíferos.....	15
1.6.3 Toxicidade do Mn para organismos aquáticos.....	17
1.7 Tratamentos da intoxicação por Mn.	19
1.8 Biomarcadores da toxicidade do Mn.	19
1.8.1 Biomarcadores de exposição.	20
1.8.2 Biomarcadores de efeito.	21
1.8.3 Biomarcadores de susceptibilidade.	21
1.9 Mecanismos de toxicidade do Mn.	22
1.9.1 Mecanismos de toxicidade do Mn em mamíferos.	22
1.9.1.1 Neurotoxicidade.	22
1.9.1.2 Nefrotoxicidade e Hepatotoxicidade.	22
1.9.1.3 Cardiotoxicidade.....	23
1.9.2 Mecanismos de toxicidade do Mn em peixes.	23
1.9.2.1 Neurotoxicidade.	23
1.9.2.2 Desregulação osmótica.	24
1.9.2.3 Desregulamento do metabolismo de carboidratos.....	24
1.9.2.4 Imunotoxicidade.	24
1.9.2.5 Desregulamento do metabolismo de íons.	24
1.10 Especiação química: conceitos, métodos e importância - destaque para o Mn. ..	25
1.10.1 Definição de especiação e fracionamento.....	25
1.10.2 Análise de especiação e fracionamento.	26
1.10.2.1 Amostragem.	26
1.10.2.2 Estocagem e preparação das amostras para análise.....	26
1.10.2.3 Dinâmica e especiação.....	27
1.10.2.4 Especiação do Mn em solos e sedimentos.	28
1.10.2.5 Especiação do Mn em matrizes biológicas.	29
1.10.2.6 Controle da qualidade em análises de especiação.	30

1.10.3	Utilidade das análises de especiação: destaque para caso do Mn.	30
1.10.4	Ensaio toxicológicos.....	31
1.10.5	Ensaio toxicológicos sob o princípio dos 3R.....	32
1.10.5.1	Ensaio in vitro sobre neurotoxicidade no desenvolvimento.	33
1.10.5.2	Ensaio in vivo sobre neurotoxicidade no desenvolvimento.	34
1.10.5.3	O papel da integração de resultados na avaliação de riscos.....	35
1.11	Importância da investigação.....	36
1.12	Hipóteses.....	37
1.13	Objetivo Geral.....	38
1.14	Objetivos Específicos.....	38
CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS.....		39
2.1	Materiais.....	39
2.2	Instrumentos.....	40
2.3	Reagentes.....	41
2.4	Soluções.....	42
2.5	Métodos.....	45
2.5.1	Informação e descrição geral da área de amostragem.	45
2.5.2	Coleta e análises de parâmetros gerais de qualidade de água e sedimento.....	46
2.5.3	Fracionamento e análises do Mn nas amostras de sedimento.	48
2.5.4	Fracionamento e análises do Mn nas amostras de água.....	49
2.5.5	Determinação do fator de enriquecimento.....	50
2.5.6	Determinação do índice de geoacumulação.....	51
2.5.7	Estimativa do risco ecotoxicológico associado à ocorrência do Mn.	52
2.5.8	Síntese dos complexos de Mn.	52
2.5.9	Espectroscopia UV-Visível.....	53
2.5.10	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	53
2.5.11	Voltametria Cíclica.....	53
2.5.12	Análises de Mn.....	54
2.5.13	Cultura de células neuronais e tratamentos.....	54
2.5.13.1	Descrição dos tratamentos.....	55
2.5.14	Ensaio de citotoxicidade (viabilidade celular).....	56
2.5.15	Avaliação do estado redox celular (ensaio de GSHt/GSSG).....	56
2.5.16	Captação de GABA em neurônios do córtex.....	57
2.5.17	Captação de Glutamato em neurônios granulares do cerebelo.....	57
2.5.18	Dosagem de proteínas.....	58
2.5.19	Ensaio de toxicidade com embriões de Paulistinha (<i>Danio rerio</i>).....	58
2.5.20	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).....	60
2.5.21	Análises estatísticas.....	62
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....		63
3.1	Fracionamento e distribuição do Mn na bacia ALPA.....	63
3.2	Inferências geoquímicas.....	65
3.3	Seleção de espécies de Mn potenciais para estudos toxicológicos.....	67
3.4	Caracterização espectroscópica dos complexos de Mn.....	67
3.5	Caracterização voltamétrica dos complexos de Mn.....	68
3.6	Caracterização dos riscos neurotoxicológicos do Mn no desenvolvimento: Importância da especiação do Mn, o tipo de células alvo e o grau de desenvolvimento.....	70
3.6.1	Células granulares do cerebelo em estado inicial da diferenciação celular são mais vulneráveis à neurotoxicidade induzida pelo Mn.....	70
3.6.2	Células granulares do cerebelo (CGC), em estado inicial da diferenciação celular, são mais vulneráveis que as células corticais (CTX) à neurotoxicidade induzida pelo Mn.....	71
3.6.3	O Mn não altera o metabolismo da glutatona em neurônios.....	72
3.6.4	O Mn parece não induzir excitotoxicidade.....	73

3.6.5	A neurotoxicidade induzida pelo Mn é reduzida por ácido ascórbico e lactato: implicações para o mecanismo de neurotoxicidade do Mn.....	75
3.6.6	Mn induz toxicidade em embriões de <i>Danio rerio</i> : Importância da especiação química e do grau de desenvolvimento embrionário.	77
3.6.7	Efeitos do Mn na expressão de genes em embriões de <i>Danio rerio</i>	82
CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO		84
4.1	Na bacia ALPA, O Mn está presente principalmente nos sedimentos.	84
4.1.1	Inferências geoquímicas-ecotoxicológicas do fracionamento do Mn em amostras da bacia ALPA.....	87
4.2	Caraterização físico-química das espécies de Mn sujeitas a estudos toxicológicos.	90
4.3	In-vitro: Espécies químicas do Mn induziram neurotoxicidade no desenvolvimento, especialmente a nível cerebelar, o que pode repercutir em perda de funções cognitivas e neuromusculares.	93
4.3.1	A neurotoxicidade induzida pelo Mn é possivelmente mediada por inibição do metabolismo energético, disfunção mitocondrial e indução de estresse oxi-redutivo.....	95
4.4	In vivo: O Mn induz toxicidade no desenvolvimento de embriões de <i>Danio rerio</i> , que é dependente do grau do desenvolvimento embrionário, do tempo de exposição e da especiação química do metal.	102
4.4.1	O Mn induz toxicidade em embriões de paulistinha.	103
4.4.2	O Mn afeta as funções neuromusculares no paulistinha.....	106
4.4.3	O efeito da exposição ao Mn na expressão de genes-alvo potencialmente sensíveis sugere que a toxicidade do Mn pode ser mediada por disfunção mitocondrial..	109
4.5	Integração dos resultados: considerações para a avaliação de risco ecotoxicológico e neurotoxicológico do Mn durante o desenvolvimento.....	114
4.5.1	Estimativa de risco de danos induzidos por espécies de Mn	114
4.5.2	Descrição dos riscos de danos induzidos por espécies de Mn.	116
CONCLUSÕES		118
RECOMENDAÇÕES		119
BIBLIOGRAFIA		119

PREÂMBULO

Dos 111 elementos identificados, 90 ocorrem naturalmente na costra terrestre e a maioria (67) são metais. De fato, a química inorgânica dedica-se majoritariamente ao estudo destes elementos, os quais são definidos geralmente com base nas suas propriedades físicas no estado sólido. Porém, a definição mais útil dos metais, capaz de explicar os seus efeitos tóxicos, é baseada nas suas propriedades em solução aquosa. Assim, “um metal é um elemento que, no meio biológico, pode reagir perdendo um ou vários elétrons, para formar um cátion” (Cornelis and Nordberg, 2007). Um dos problemas ambientais mais antigos refere-se aos “metais tóxicos”. Hoje, há novas dimensões do problema tais como a produção de metais em países em desenvolvimento, conduzindo à exposição ocupacional e à exposição ao público geral através do ar, da água, dos alimentos, e de outros produtos nutricionais (Nordberg, 2007). Certamente, os íons metálicos são dos poluentes mais tóxicos devido à sua toxicidade aguda, carcinogenicidade e não-biodegradabilidade (Gupta et al., 2007). O avanço registrado, durante as décadas passadas, no entendimento da toxicologia das espécies metálicas deve-se às consideráveis contribuições da **química bio-inorgânica** (por exemplo, a descoberta que espécies metálicas submetidas à biometilação podem formar compostos organometálicos), o que deu origem à **especiação química**. Esta última também é fundamental no próprio entendimento dos efeitos adversos dos metais para a saúde (Cornelis and Nordberg, 2007) e é peça chave da **química ambiental**, que trata das origens, transportes, reações, efeitos e destinos das espécies químicas na água, no ar, na terra, e nos sistemas vivos, assim como a influência das atividades humanas em tais processos e vice-versa (Manahan, 2001), (Figura 1).

Figura 1: Processos de transporte e transformação de xenobióticos no meio ambiente (Connel and Miller, 1984)

A química ambiental é uma disciplina essencial para o estudo da química, dado o grau de interação que estabelece entre as diferentes sub-disciplinas, tais como a química geral, a química orgânica, a química analítica, a físico-química, a fotoquímica, a geoquímica, e a bioquímica (Manahan, 2001). Neste contexto, pode ser incluída a **toxicologia ambiental**, ciência que pressupõe semelhantes interações interdisciplinares (Figura 2), e estuda os efeitos dos xenobióticos ambientais sobre os ecossistemas e os seres humanos (Azevedo and Chasin, 2004).

Figura 2: Inter-relação entre a toxicologia ambiental e outras ciências

Ao mesmo tempo, os ecossistemas aquáticos são uma fonte inestimável de recursos, tanto para os organismos que neles habitam como para os seres humanos. Neste sentido, as águas aptas para o consumo só atingem o 0,03% dos recursos hídricos da Terra, por tanto a degradação

dos ecossistemas aquáticos é um tema de extrema preocupação internacional. Nesse respeito, é crescente o número estudos internacionais relacionando desordens neurológicas em crianças com a ocorrência inadequada do Mn em águas de consumo (**Ljung and Vahter, 2007**). Esses autores até levantaram a hipótese de que *é hora de revisar e mudar os valores de referência para o manganês em águas de consumo, considerados como “seguros”*. Outros autores apontam que, ainda há muitas perguntas sobre como o desequilíbrio dos metais no sistema nervoso central contribui à neurodegeneração, especialmente a nível cerebelar (**Popescu et al., 2009**), o que é associado com perda de capacidades cognitivas e neuromusculares (**Hoppenbrouwers et al., 2008**). Desta maneira o presente trabalho está convidando ao debate da relação essencialidade/toxicidade do Mn nos organismos em desenvolvimento.

Organização da tese

O desenvolvimento da pesquisa e sua apresentação foram organizadas em quatro etapas:

1. Revisão bibliográfica dos aspectos básicos sobre o manganês, especiação química e os ensaios toxicológicos. Esta etapa terminou com a apresentação dos **Capítulos 1 e 2**, nos quais foram apresentados os antecedentes, estado atual e perspectivas da temática proposta, os principais problemas a serem abordados, assim como as principais ferramentas para estudar os mesmos.
2. Desenvolvimento de estudos de fracionamento em amostras ambientais, na bacia Alto Paranapanema (ALPA), visando identificar espécies ou grupos de espécies de manganês e as suas implicações. Esta etapa se concluiu com a apresentação do **Capítulo 3**, que ofereceu informação da ocorrência, distribuição e possíveis riscos das principais espécies de manganês presentes em várias regiões da bacia ALPA o que permitiu selecionar algumas delas e caracterizar os principais danos neurotoxicológicos que elas são capazes de induzir nos organismos em desenvolvimento.
3. Avaliação da importância do fracionamento químico e da especiação química do Mn. Esta etapa foi concluída com a apresentação do **Capítulo 4**, onde foram discutidas as possíveis origens do Mn na bacia ALPA, o seu comportamento e implicações ambientais. Ao mesmo tempo, são discutidas várias evidências do mecanismo de neurotoxicidade do manganês no desenvolvimento, a partir da análise de resultados in vitro e in vivo. Por último foram oferecidas as principais **Conclusões** do trabalho e as **Recomendações** pertinentes.

CAPÍTULO 1: Introdução ao manganês, aspectos básicos da especificação química e estudos toxicológicos.

1.1 Propriedades físicoquímicas do Mn.

O manganês (Mn) pertence ao grupo VIIB do sistema periódico e ocorre em 11 estados de oxidação, onde o +2, +4 e o +7 são os mais importantes. Os sais divalentes do Mn são os mais estáveis, o óxido MnO_2 é o composto mais importante de nox +4, e os permanganatos são típicos representantes de nox +7 (Cornelis and Nordberg, 2007).

1.2 Produção e usos do Mn.

A maioria do Mn é obtida em minas abertas ou subterrâneas rasas. Mais de 80% do minério de primeira qualidade (teor de Mn >35%) é produzido na África do Sul, na Austrália, no Brasil, no Gabão, na Índia, e mais recentemente na China e na Comunidade dos Estados Independentes (CEI) (Cornelis and Nordberg, 2007).

O Mn é usado principalmente em processos metalúrgicos; aproximadamente 90% do metal é usado na manufatura de aço como um aditivo de desoxidação e dessulfurização e como componente de ligas metálicas (Cornelis and Nordberg, 2007). Outros usos do Mn incluem: (i) manufatura de baterias de pilha seca; (ii) produção de permanganato de potássio e de outros produtos químicos de Mn; (iii) oxidante na produção de hidroquinona; (iv) manufatura do vidro; (v) descolorimento de material têxtil; (vi) revestimento para eletrodos oxidantes de soldas; (vii) fósforos e fogos de artifício; (viii) curtimento do couro; e (ix) agente de contraste em exames de imagem por ressonância magnética. Entre os compostos orgânicos do Mn encontram-se o aditivo de combustível tricarbonilmetilciclopentadienilmanganês (MMT) e os fungicidas Maneb e Mancozeb (Santamaria, 2008). Adicionalmente, complexos do Mn(II) ou (III) são sintetizados com vista ao possível uso como miméticos de enzimas antioxidantes tais

como a superóxido dismutase (SOD) ou a catalase (Lanza and Vecchio, 2009). Na figura 3, são apresentados alguns desses compostos.

Figura 3: Alguns exemplos das aplicações dos complexos de manganês: Mancozeb (fungicida), MMT (aditivo para combustíveis); EUK8 (representante de uma classe de miméticos de SOD); Teslascan: agente de contraste para MRI.

1.3 Ocorrência do Mn de origem natural.

Basicamente, todos os íons metálicos ocorrem na crosta terrestre em diferentes abundâncias, estados de oxidação e formando compostos, mas às vezes ocorrem também no estado livre. A concentração total de um elemento traço pode ser estática e a de suas espécies pode ser altamente dinâmica. Em alguns casos as espécies instáveis no meio ambiente podem ser predominantes e exigem especial atenção (Gupta et al., 2007). O Mn, que é o décimo-segundo elemento mais abundante na crosta terrestre (aproximadamente 0,1% em massa), não constitui uma exceção, podendo ser encontrado nas rochas, no solo, na água, e nos alimentos. Este elemento não ocorre naturalmente como um metal livre, mas sim em mais de 100 minerais, como óxidos, carbonatos e silicatos, que são os mais importantes (Cornelis and Nordberg, 2007).

1.3.1 Ocorrência do Mn nas águas.

Os ecossistemas aquáticos são normalmente os mais contaminados por íons metálicos tóxicos (Gupta et al., 2007). O Mn está presente no ambiente aquático principalmente como espécies divalentes e tetravalentes, e a sua distribuição é governada fortemente por variações de pH e potencial redox. O Mn(II) é predominante em baixos valores de pH e potencial redox, com uma proporção crescente de oxi-hidróxidos de Mn coloidal acima de pH 5,5 em águas não-distróficas (águas altamente oxigenadas, neutras ou alcalinas, com dureza relativamente alta, ricas em nutrientes e povoadas de algas) (Howe et al., 2004).

O Mn trivalente e o tetravalente são bons agentes oxidantes, que ocorrem na fase sólida dos solos como óxidos ou oxi-hidróxidos insolúveis. Se complexado com ânions, tais como o sulfato (Howe et al., 2004), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), pirofosfato e o citrato (Klewicki and Morgan, 1998), a espécie Mn(III) pode ser detectada em solução, embora tenha geralmente uma vida muito curta (Stueben et al., 2004). Ao mesmo tempo, o citrato pode sustentar o ciclo redox Mn(II)/Mn(III) em ambientes aquáticos (Klewicki and Morgan, 1998). O Mn pode ser interconvertido nas diferentes espécies citadas anteriormente em reações de oxi-redução, que podem ser abióticas ou bióticas (microbianas) (Howe et al., 2004).

Segundo a agência dos EUA para a Proteção do Meio Ambiente (EPA), as concentrações naturais do Mn na água do mar estão na faixa de 0,4 – 10 µg/L, com uma média de 2 µg/L. Dados mais recentes da EPA e da Organização Mundial de Saúde (OMS) sugerem níveis seguros de Mn na faixa de 1 – 200 µg/L em águas superficiais (Saric and Lucchini, 2007) e 2,0 mg/L para águas de irrigação (Colombini and Fuoco, 1983). Contudo, a EPA e a Food e Drug Administration (FDA) têm sugerido que em águas de consumo humano a concentração máxima desejável não deva ser maior que 0,05 mg/L (Saric and Lucchini, 2007).

1.3.2 Ocorrência do Mn nos sedimentos.

No meio ambiente, normalmente o sedimento e a água se encontram em um equilíbrio dinâmico. No entanto, a habilidade natural dos sedimentos para acumular íons metálicos propicia geralmente concentrações mais elevadas do que as presentes na água e no ar adjacente (Gupta et al., 2007). Certamente, em sistemas aquáticos o Mn se encontra principalmente no sedimento, onde as concentrações oscilam entre 410 e 6700 mg/kg de peso seco, podendo alcançar até 13400 mg/kg em lagos contaminados (Howe et al., 2004). O ciclo sedimentar do Mn é dominado por fatores químicos que incluem o índice de oxigênio na água sobrejacente, a penetração deste nos sedimentos, e fontes de carbono orgânico bentônico (carbono derivado do metabolismo ou decomposição dos organismos que vivem no fundo de rios, lagos e mares) (Howe et al., 2004).

1.3.3 Ocorrência do Mn nos alimentos.

O Mn é um componente natural da maioria dos alimentos, onde a sua concentração varia marcadamente, mas em geral é maior do que o presente na água de abastecimento. As concentrações mais elevadas do Mn são encontradas no trigo e no arroz, para os quais têm sido registradas concentrações entre 10 e 100 mg/kg. Concentrações elevadas (até 50 mg/kg) também são encontradas na castanha, no chá, nas leguminosas, no abacaxi e nos grãos inteiros. Níveis inferiores (até 5 mg/kg) estão presentes em produtos como leite, carnes, peixes e ovos. O consumo elevado de Mn pode estar associado às populações que freqüentemente consomem chá. Por exemplo, um copo do chá pode conter 0,4 – 1,3 mg de Mn (Saric and Lucchini, 2007).

1.4 Ocorrência do Mn de origem antrópica.

A deposição através de esgotos municipais, atividade mineira e siderúrgica, o consumo de combustíveis fósseis e, em menor escala, a combustão de aditivos de combustíveis e o lixivi-

amento agrícola constituem as principais fontes antropogênicas desse metal para o meio ambiente (Howe et al., 2004).

1.5 Fatores que podem influenciar a toxicidade do Mn.

Segundo Azevedo e Matta (2004) a toxicidade de todo produto químico depende de vários fatores que envolvem:

- toxicocinética, que busca conhecer o destino do agente tóxico em contato com o organismo, através da descrição da Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME); e
- toxicodinâmica, área que se ocupa do estudo dos mecanismos de ação dos tóxicos nos planos, molecular, bioquímico e fisiológico.

Além disso, a toxicidade de um metal é específica da sua forma química, nível de exposição e período de exposição (Kakkar and Jaffery, 2005).

1.5.1 Exposição ao Mn.

A via mais importante de exposição ocupacional ao Mn ocorre pela inalação de material particulado contendo o metal. Isto acontece principalmente nas indústrias de ferro-manganês, ferro, aço, baterias de pilha seca e soldagem. A exposição por essa via também pode ocorrer durante a mineração do Mn e o processamento do minério (Saric and Lucchini, 2007). Estas exposições são associadas com o manganismo, que envolve sintomas psiquiátricos e características semelhantes à doença de Parkinson (Erikson et al., 2007b). Em indivíduos não expostos ocupacionalmente, a rota principal da exposição ao Mn é através dos alimentos, com taxa média 2 – 9 mg/ por dia para uma pessoa de 70 kg (Aschner, 2000). Desta maneira, o consumo de águas com níveis do Mn mais elevados que 0,4 mg/L (WHO, 2004) foi associado a efeitos neurológicos sub-clínicos (Kondakis et al., 1989), diminuição das funções intelectuais (Wasserman et al., 2006) e a um risco aumentado de mortalidade para crianças durante o primeiro ano de vida (Hafeman et al., 2007).

Embora com poucos estudos, os peixes apresentam maior sensibilidade para excesso do Mn inorgânico quando comparados com mamíferos e aves, o que sugere que a toxicidade do Mn deva ser espécie-dependente. No caso específico dos mamíferos, estes são mais suscetíveis ao Mn inorgânico que o da dieta. Ao mesmo tempo, os efeitos registrados em humanos e ratos expostos a compostos de Mn de origem orgânica (MMT, Maneb e/ou Mancozeb) parecem estar mais associados com o complexo metálico que ao próprio Mn (NRC, 2005), o que pode ser uma decorrência da própria especiação do metal.

1.5.2 Rotas de exposição e absorção.

A disponibilidade biológica do Mn é dependente da rota da exposição e da absorção subsequente. A absorção do Mn na circulação ocorre através de quatro rotas: inalação, ingestão, absorção cutânea e injeção intravenosa. A inalação e a ingestão são as rotas mais significativas da exposição (Cowan, 2008).

O Mn ingerido pelo consumo dos alimentos ou da água é absorvido no intestino delgado e dirigido ao fígado através da veia porta. Uma vez no fígado, o Mn é excretado na bile antes de se incorporar à corrente circulatória. Os mecanismos que regulam a absorção do Mn não são compreendidos inteiramente, mas acredita-se que ocorra através de um mecanismo Mn-específico (Cowan, 2008). Por exemplo, devido às similaridades entre o Fe e o Mn, este último pode usar os mesmos mecanismos de transporte do Fe, daí que a deficiência de Fe possa aumentar a absorção do Mn. Ademais, a absorção do Mn é dependente da idade, e as crianças, especialmente as prematuras, retêm uma proporção mais elevada de Mn do que os adultos (Saric and Lucchini, 2007).

Os efeitos mais sérios da exposição ao Mn sobre a saúde ocorrem com a inalação de partículas de Mn de aproximadamente 4 µm, que são absorvidas diretamente na circulação pulmonar

(circulação sangüínea que oxigena as células pulmonares) e daí seguem à circulação sistêmica (circulação sangüínea que oxigena as células dos demais tecidos corporais) (Saric and Lucchini, 2007). Também se verificou que a absorção do Mn através da mucosa olfativa é um contribuinte potencial ao depósito do Mn no cérebro. Isto pode ocorrer se o Mn atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), através de mecanismo(s) cujo funcionamento tem sido alvo de várias hipóteses, descritas a seguir (Aschner, 2000).

1.5.3 Distribuição do Mn.

1.5.3.1 Distribuição do Mn em mamíferos.

A concentração de Mn na maioria dos tecidos de humanos e animais é aproximadamente 0,1 – 1 µg/g. Após entrar na circulação sanguínea, o Mn espalha-se rapidamente para outros tecidos, sendo acumulado preferencialmente naqueles ricos em mitocôndrias (por exemplo, tecidos musculares estriados esqueléticos e tecido adiposo marrom) (Saric and Lucchini, 2007). O cérebro tem a menor taxa de acumulação, porém o maior tempo de retenção desse metal (Crossgrove e Zheng, 2004).

Figura 4: Mecanismos de transporte de manganês através da Barreira Hemato-Encefálica (BHE) para níveis fisiológicos de Mn. Os transportadores associados com o transporte do manganês (segundo o estado de oxidação) são indicados. O complexo do Mn com albumina é limitado para atravessar a BHE. A largura da seta descreve a importância relativa de cada um dos transportadores neste processo. (?) ainda em estudo, (ZIP8) Transportador de proteína, (DMT-1) Transportador de Metais Divalentes tipo-1, (Tf) Transferrina (Aschner et al., 2007).

A distribuição do Mn no cérebro varia durante o desenvolvimento e o envelhecimento (**Saric and Lucchini, 2007**) e/ou com os prováveis sistemas de transporte do Mn no cérebro, Figura 4 (**Aschner et al., 2007**). Segundo estes autores, “Mn(II) livre”, Mn(II)Citrato e Mn(III)Transferrina poderiam atravessar a BHE, enquanto o Mn complexado com albumina, um componente importante do sangue, teria poucas chances de internalização no cérebro.

Figura 5: Distribuição do Mn no cérebro após uma única injeção intravenosa de MnCl₂ (2 mg/kg). Diferenças em relação a cada controle são indicadas (*P, 0.05; **P, 0.01; ***P, 0.001) (**Sotogaku et al., 2000**).

Dados de estudos com animais sugerem que o cerebelo é uma das áreas do cérebro que mais concentra Mn. Por exemplo, **Tandon and Chandra, (1978)** propuseram a seguinte distribuição do Mn no cérebro: medula > cerebelo > cérebro > ponte medular > medula espinal > restante do cérebro. **Sotogaku e colab. (2000)**, sugeriram que a concentração total do Mn no cérebro poderia estar na escala de 0,2 – 0,9 ng/mg do tecido, com a seguinte distribuição: ponte medular > culículo inferior > cerebelo > putâmen ≈ córtex cerebral ≈ hipotálamo > hipocampo > tálamo (Figura 5). Consistente com esses resultados, **Fitsanakis e colab. (2008)** demonstraram que cerebelo e a ponte medular de cérebro concentram mais Mn do que outras regiões tais como o mesencéfalo, o hipocampo, o striatum e o córtex. Porém, ratos expostos a concentrações equimolares de ambos os estados de oxidação tiveram um acúmulo cerebral

mais elevado de Mn(III) do que Mn(II), mas sem diferenças significativas entre as áreas do cérebro estudadas (globo pálido, striatum, tálamo e córtex) (**Reaney et al., 2006**).

1.5.3.2 Distribuição do Mn em organismos aquáticos.

Registros de teores elevados de íons metálicos em animais e plantas normalmente são considerados como contaminação ambiental, que é controlada por fatores bióticos e abióticos (**Gupta et al., 2007**). Sendo assim, o Mn pode ser bioconcentrado significativamente pela biota aquática, com fatores da ordem de 2000 – 20000 para plantas marinhas e de água doce, de 2500 – 6300 para o fitoplâncton, de 300 – 5500 para as macroalgas marinhas, de 800 – 830 para os mexilhões de zonas de oscilação de marés, e de 35 – 930 para os peixes (**Howe et al., 2004**). A absorção de Mn pelos invertebrados aquáticos e peixes aumenta consideravelmente com a temperatura e a diminuição da salinidade, e diminui com o aumento de pH, enquanto que o oxigênio dissolvido não tem um efeito importante (**Howe et al., 2004**).

As concentrações de Mn observadas em tecidos de peixes de água doce ou salgada tendem a variar entre < 0,2 e 19 mg/kg de peso seco, chegando a 100 mg/kg de peso seco em peixes de águas superficiais contaminadas (**Howe et al., 2004**).

Gomaa e colab. (1995) determinaram que em peixes egípcios a maior concentração de Mn estava no cérebro (0,331 mg/kg), enquanto que a mais baixa foi encontrada em músculos (0,048 mg/kg), que foi mais baixa do que no fígado (0,152 mg/kg). De acordo com isto, a concentração de ^{54}Mn nos peixes cultivados em pH 5,3 foi significativamente mais elevada (1,7 vezes) do que em peixes cultivados em pH 7,5, onde as vísceras, o cérebro, e os olhos mostraram o mesmo padrão de bioconcentração (**Rouleau et al., 1996**). Adicionalmente, foi demonstrado que o ^{54}Mn é preferencialmente concentrado nos ossos, nas brânquias, na pele e no cérebro (**Adam et al., 1997**). Estudos com o peixe *Channa asiatica* revelaram os mais ele-

vados níveis de Mn (~ 25 µg/g) nos ossos e os músculos apresentaram a mais baixa concentração (~0,4 µg/g), enquanto os restantes órgãos e tecidos avaliados mostraram valores similares (Ezoe *et al.*, 2001)

Trabalhos de campo com duas espécies de peixe (*Oreochromis niloticus* e *O. mossambicu*) revelaram um similar padrão de distribuição para o Mn: osso > brânquia > fígado > músculo, onde o nível do Mn oscilou entre 159 e 203 mg/kg (Chatterjee *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram encontrados nas amostras de *Argyrosomus japonicus* tratadas com MnCl₂, sob diferentes graus de salinidade (Partridge and Lymbery, 2009). É sabido que os ossos podem armazenar minerais como um mecanismo de defesa ou desintoxicação (Thomas *et al.*, 1990), mas pode mediar processos de toxicidade pela liberação do metal (Silbergeld, 1991).

Embora o Mn tenha sido considerado um agente neurotóxico para mamíferos (Erikson *et al.*, 2007b) e peixes (Herrera and Catap, 1992; Krishnani *et al.*, 2003), até o presente não existem estudos referentes à distribuição do Mn no cérebro de peixes.

1.5.4 Excreção

A homeostase do Mn é conseguida primariamente pela excreção. O Mn absorvido é excretado quase que exclusivamente através da parede intestinal por diversas rotas, onde a bile é a principal. O Mn é removido do sangue pelo fígado, onde, conjugado com a bile, é excretado nos intestinos. Alcançando os intestinos, a maior parte do metal é excretada pelas fezes. Pequenas quantidades de Mn podem ser encontradas na urina, no leite ou nas placas da pele afetadas pela dermatose neutrofílica aguda. Entretanto, após exposição ao MMT, a excreção do Mn ocorre em grande parte através da urina, em quantidades comparáveis com a excreção gastrointestinal. Isto foi atribuído à bio-transformação do MMT no rim (Saric and Lucchini, 2007).

1.6 Essencialidade e toxicidade do Mn.

1.6.1 Deficiência do Mn.

O Mn, como o zinco e o cobre, é essencial para o desenvolvimento normal pré-natal e neonatal (Saric and Lucchini, 2007). O Mn é essencial para seres humanos e animais e desempenha um papel importante no funcionamento do sistema nervoso, na mineralização dos ossos, no metabolismo e regulamento energético e de proteínas, na proteção celular contra espécies reativas de oxigênio, e na formação de glicosaminoglicanos (substâncias que atuam na formação, manutenção e reparação de tecidos estruturais) (Santamaria, 2008). Diversos sistemas enzimáticos são dependentes do Mn para as suas respectivas funções regulatórias tais como a superóxido dismutase mitocondrial, a piruvato carboxilase, decarboxilases, hidrolase, deidrogenases, sintetases e liases (Saric and Lucchini, 2007; Santamaria, 2008). Há evidências limitadas de desordens ou doenças nos seres humanos que possam ser associadas com um desequilíbrio nos níveis celulares do Mn, podendo ser citados a esclerose lateral amiotrófica, a acromegalia, a doença catabólica e a epilepsia (Saric and Lucchini, 2007). Entretanto, estudos com animais mostraram claramente que a deficiência do Mn pode originar anomalias esqueléticas, retardo do crescimento, falha do ouvido interno e ataxia (Saric and Lucchini, 2007).

1.6.2 Toxicidade do Mn em mamíferos.

Em humanos, assim como em modelos *in vivo* e *in vitro*, o Mn pode induzir nefrotoxicidade (Atessahin *et al.*, 2003; Ponnappakkam *et al.*, 2003), hepatotoxicidade (Casalino *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008), cardiotoxicidade (Brurok *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2006), imunotoxicidade (Oweson *et al.*, 2008), alterações hematológicas, toxicidade reprodutiva, endocrinotoxicidade, genotoxicidade e carcinogenotoxicidade (Saric and Lucchini, 2007). Porém o sistema nervoso central (CNS) é o principal alvo da toxicidade do Mn, onde crianças e recém-nascidos representam os subgrupos mais sensíveis das populações (Saric and Lucchini,

2007; Erikson et al., 2007). Neste sentido, foi mostrado que as células neuronais SHSY5Y depois do primeiro dia de cultura e tratadas por 24 h com MnCl_2 são significativamente mais sensíveis do que os outros tipos de células, resultando em cerca de 160%, 150% e 140% de inibição no crescimento celular (efeitos agudos) para linhagens da glia (GL15), do fígado (HepG2) e renais (MDCK), respectivamente, Figura 6 (Rovetta et al., 2007).

Figura 6: Estudo comparativo da IC_{50} para o MnCl_2 , determinada a partir de ensaios de densidade celular com linhagens celulares representativas de diferentes tecidos expostas ao Mn. Rim (MDCK, ▲), fígado (HepG2, △), glial (GL15, ■), neurônios (SHSY5Y, □) (Rovetta et al., 2007).

Quando a exposição é prolongada (efeitos crônicos) a partir do segundo dia a sensibilidade relativa celular para o Mn muda, porém maior do que exposições por curto período, mostrando uma sensibilidade elevada das células HepG2 e forte resistência de células MDCK, enquanto que as células GL15 e neurônios (SHSY5Y) mostraram uma sensibilidade intermediária, Figura 6 (Rovetta et al., 2007).

Certamente, hoje é bem aceito que os neurônios são mais sensíveis do que os astrócitos na neurotoxicidade do Mn (Zwingmann et al., 2003; Malthankar et al.,

Estudos da neurotoxicidade do Mn com neurônios de diferentes regiões do cérebro são escassos.

2004). Entretanto, estudos comparativos com neurônios de diferentes regiões do cérebro são escassos. Ao mesmo tempo, nenhum dado está disponível sobre os efeitos neurológicos da exposição ao Mn durante os primeiros estágios da vida e após longos períodos (Erikson et al.

2007). Por outro lado, diversas doenças neurodegenerativas e desordens neuropsiquiátricas estão associadas à ocorrência excessiva de Mn no cérebro, tais como a demência, doença de Alzheimer, esquizofrenia, esclerose lateral amiotrófica e autismo (Banta and Markesbery, 1977; Donaldson, 1987; McEachern *et al.*, 2000; Herbert *et al.*, 2006)

1.6.3 Toxicidade do Mn para organismos aquáticos.

A água é um recurso precioso e os peixes têm sido usados com sucesso para monitorar a contaminação química e potenciais efeitos adversos sobre a saúde humana associados à contaminação hídrica. Exemplos destas contaminações incluem o desregulamento da função tireóidea pelas bifenila policloradas (PCBs), indução de tumores associada com descargas industriais e retardo no desenvolvimento embrionário de espécies aquáticas expostas a metais liberados pelas indústrias e mineradoras (Tyler *et al.*, 2008). Trabalhos com plantas aquáticas demonstraram que o Mn é fitotóxico e mutagênico (Singh, 1978; Kitao *et al.*, 1997).

Poucos estudos de toxicidade aguda ou crônica para organismos aquáticos têm sido desenvolvidos com Mn (Stubblefield *et al.*, 1997). A LC50 do Mn iônico como

Estudos da toxicidade do Mn em sistemas aquáticos ainda são escassos.

cloreto e/ou sulfato foi determinada para várias espécies de peixes a 96 h de exposição, sendo encontrado o valor mais baixo (2,4 mg/L) para a *Oncorhynchus kisutch* e o valor mais alto (3350 mg/L) para a *Heteropneustes fossilis* (Howe *et al.*, 2004). Ao mesmo tempo, as toxicidades mais elevadas foram observadas em água brandas (25 mg/L de CaCO₃), nos estágios embrionários da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), quando os seus ovos foram expostos a 1 mg/L de MnSO₄ por 29 dias. Alevinos da truta marrom (*Salmo trutta*), quando expostos 30 dias ao MnCl₂ (~0,4 mg/L) em pH 6,5, mostraram uma redução significativa nos níveis de cálcio e sódio (Howe *et al.*, 2004). Adicionalmente, alterações hematológicas foram observadas em *Colisa fasciatus* e *Oreochromis niloticus*, quando expostos a MnSO₄ (2500 mg/L para

90 h) e a MnCl_2 (500 – 1500 mg/L para 96 h), respectivamente (Agrawal and Mahajan, 1980; Al-Akel *et al.*, 1998). Outros estudos mostraram aumento na mortalidade das trutas arco-íris e marrom na presença de formas oxidadas do Mn (concentração total <0,5–1 mg/L) na interfase entre zonas anóxicas e oxigenadas e sob pH ácido (4,5–5,4), onde a concentração de Mn inorgânico lábil oscilava entre 0,1–0,4 mg/L (Howe *et al.*, 2004).

Adicionalmente, MnCl_2 induziu múltiplas alterações histopatológicas no cérebro, no coração e no fígado da perca-gigante (*Lates calcarifer*) (Krishnani *et al.*, 2003). Espécimes de carpa (*Cyprinus carpio*) apresentaram uma diminuição de anticorpos e do hematócrito após exposição a águas com 50 mg/L de Mn(II) por 2,5 meses, conjuntamente com o aumento da concentração de Mn nos órgãos linfóides (baço e rim), consistente com um efeito imunotóxico (Cossarinidunier *et al.*, 1988).

A neurotoxicidade tem sido discutida como a questão principal da exposição ambiental ao Mn (Erikson *et al.*, 2007; Quintanar, 2008), mas poucos estudos apontam esse tipo de dano nos peixes. Por exemplo, alterações morfológicas nos cérebros de *Oreochromis niloticus* e *Lates calcarifer* foram registradas depois de exposições a MnCl_2 (2000 mg/L por 8 dias e 220 mg/L por 96 h, respectivamente) (Herrera and Catap, 1992; Krishnani *et al.*, 2003).

Entretanto, a maioria desses testes foi realizada usando o Mn iônico e pouco é sabido sobre a toxicidade aquática do Mn coloidal e/ou complexado, embora seja assumido

O papel da especiação química na toxicidade do Mn ainda precisa ser estudado.

que a toxicidade destas espécies seja menor que as respectivas espécies iônicas (Howe *et al.*, 2004).

Vários autores têm sugerido que a dureza da água afeta significativamente a toxicidade do Mn nos primeiros estágios de vida da truta marrom (62 dias), sendo que a toxicidade diminui com

o aumento na dureza da água (30 – 450 mg/L de CaCO_3). Nesse sentido, os valores de IC_{25} , baseados na sobrevivência e no crescimento, variaram de 4,7 mg/L sob 30 mg/L de CaCO_3 a 8,7 mg/L sob 450 mg/L de CaCO_3 (Stubblefield *et al.*, 1997). Entretanto, outros estudos sugeriram que a toxicidade aguda ou crônica do Mn para as espécies *Pimephales promelas* e *Ceriodaphnia dubia* não variam sob mudanças da dureza da água (Stubblefield *et al.*, 1997).

Ao mesmo tempo, tem sido sugerido que o Mn catiônico é mais tóxico que o Mn aniônico, assim como o Mn(II) seria três vezes mais tóxico que o Mn(III) (Saric and Lucchini, 2007). Porém, resultados de estudos *in vitro* apontam o contrário (Reaney *et al.*, 2002; HaMai and Bondy, 2004; Reaney and Smith, 2005). Ante essas aparentes divergências, pode-se identificar que o papel da especiação química na toxicidade do Mn não tem sido esclarecido satisfatoriamente.

1.7 Tratamentos da intoxicação por Mn.

A falta de detalhes sobre os mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade do Mn, como será discutido adiante, explica a inexistência de intervenções clínicas eficazes para casos de intoxicações com este metal nos seres humanos. Em casos severos do envenenamento com Mn, a terapia da quelação tem sido recomendada, embora o EDTA, um quelante amplamente utilizado nesse tipo de tratamentos, tenha tido pouco sucesso pelo fato de remover apenas o Mn extracelular (Aschner *et al.*, 2007). Ao contrário, um tratamento mais eficaz foi obtido com o paraaminossalicilato de sódio (PAS) (Jiang *et al.*, 2006), mas o mecanismo exato dessa remoção permanece desconhecido (Aschner *et al.*, 2007).

1.8 Biomarcadores da toxicidade do Mn.

Biomarcadores são indicadores internos de mudanças nos organismos em nível molecular ou celular, que têm grande potencial para ajudar a compreender alterações ambientais e melhorar

os processos de avaliação de risco. Um biomarcador válido pode ser considerado um elemento-chave na relação entre uma exposição ambiental específica e o impacto na saúde (**Bennett and Waters, 2000**).

Biomarcadores moleculares podem ser classificados em três categorias (**Bennett and Waters, 2000; Azevedo and Chasin, 2004**), mas na realidade eles funcionam integrados (**Bennett and Waters, 2000**).

1. *Biomarcadores de exposição*, que são usados para avaliar a(s) dose(s) a que um indivíduo foi exposto, mas não informam sobre o grau do efeito ;
2. *Biomarcadores de efeito* são usados para medir alterações bioquímicas, fisiológicas ou outras que possam ser correlacionadas com efeitos negativos na saúde de um indivíduo;
3. *Biomarcadores de susceptibilidade*, que oferecem a informação sobre a susceptibilidade de um indivíduo a um tipo de doença de origem ambiental. Essa susceptibilidade pode surgir por causas genéticas ou não, tais como idade ou regime alimentar.

1.8.1 Biomarcadores de exposição.

O nível de Mn urinário, apesar de detectável (**Aschner et al., 2005**), não é um indicador útil da exposição ao metal, pois representa somente 1% da quantidade de Mn diariamente absorvida e 6% da quantidade total excretada (**Smargiassi and Mutti, 1999**). Ao mesmo tempo, o uso da concentração de Mn no sangue (B-Mn) como marcador de exposição é controverso, principalmente porque o B-Mn muda muito pouco com a exposição. Alternativamente, tem sido proposta a relação Mn/Fe existente neste meio (**Cowan, 2008**). Por outro lado, as amostras de cabelo têm sido propostas como marcadores da exposição ao Mn (**Bouchard et al., 2007**). Entretanto, diversas dificuldades são encontradas com o uso do cabelo como um bio-

marcador, dado que a textura, a cor, o uso de xampus, a taxa de crescimento do fio e a amostragem podem afetar negativamente os resultados finais das análises (**Ljung et al., 2007**).

1.8.2 Biomarcadores de efeito.

Kim (2004) sugeriu que as intensidades elevadas do sinal T1 das imagens da ressonância magnética (MRI) poderiam servir como um biomarcador da exposição ao Mn. Ele sugeriu que o nível do Mn necessário para aumentar as intensidades do sinal em MRI é muito mais baixo do que o ponto inicial necessário para o surgimento de evidências clínicas do manganismo. Entretanto, a inconsistência no significado clínico dos sinais elevados detectados em MRIs não tem permitido a aceitação dessas medidas como biomarcador válido na avaliação de intoxicações com Mn (**Santamaria, 2008**).

1.8.3 Biomarcadores de susceptibilidade.

Tem sido sugerido recentemente que alterações na expressão de diversos genes possam ser usadas como biomarcadores para avaliar a toxicidade de produtos químicos em laboratório e

Até hoje não existem biomarcadores precisos da toxicidade do Mn

para biomonitoramento ambiental (**Bennett and Waters, 2000; Neumann and Galvez, 2002; Tyler et al., 2008**). Astrócitos de humanos tratados com MnCl_2 apresentaram um aumento na expressão de 28 genes que codificam quimoquinas, citocinas, processos pró-inflamatórios e funções semelhantes. Da mesma forma, 15 genes tiveram suas expressões diminuídas, aqueles que codificam funções envolvidas na réplica e no reparo do DNA e no controle do ciclo celular (**Sengupta et al., 2007**). Estudos com amostras de cérebro de macacos expostos por inalação ao MnSO_4 mostraram que houve diminuição na expressão dos genes transportador de glutamato-1 (GLT-1) e tirosina hidroxilase (TH) no putâmen e no córtex frontal, e um significativo aumento na expressão dos genes GLT-1, transportador de glutamato/aspartato (GLAST) e TH na região palidal, do gene TH no córtex olfativo e finalmente do

gene GLAST no cerebelo (Erikson *et al.*, 2007a). Entretanto, expressões de genes ainda não são biomarcadores validados de susceptibilidade (Santamaria, 2008) e mais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários.

Em uma aproximação diferente, como a exposição ao Mn altera o metabolismo do Fe, mudanças nas concentrações de algumas proteínas relacionadas ao metabolismo do Fe têm sido avaliadas em amostras de soro como biomarcadores da toxicidade do Mn, tais como ferritina, transferrina (Tf) e do receptor de transferrina (TfR) (Lu *et al.*, 2005).

1.9 Mecanismos de toxicidade do Mn.

1.9.1 Mecanismos de toxicidade do Mn em mamíferos.

1.9.1.1 Neurotoxicidade.

Diversas hipóteses têm sido avaliadas para explicar a neurotoxicidade do Mn (Erikson *et al.*, 2007b; Quintanar, 2008), as quais incluem: (1) alterações mitocondriais e do metabolismo energético, (2) alterações nos níveis de neurotransmissores e a morte por excitotoxicidade, (3) ativação de caspases e morte por apoptose, (4) oxidação de componentes celulares por Mn(III), (5) déficit de Fe, o que estimularia o aumento da concentração do Mn no sistema nervoso central, conduzindo à exacerbação da neurotoxicidade do Mn via alterações do metabolismo de neurotransmissores (Erikson *et al.*, 2005), e por último, (6) o Mn pode gerar alterações na homeostase do Fe e subsequente incremento de estresse oxidativo (Li *et al.*, 2006).

1.9.1.2 Nefrotoxicidade e Hepatotoxicidade.

O manganês induz nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, porém as incertezas enquanto a Mecanismo são ainda maiores que as existentes para os eventos de neurotoxicidade. No entanto, a ocorrência de estresse oxidativo é um fator comum (Atessahin *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2008).

1.9.1.3 Cardiotoxicidade.

Algumas evidências sugerem que, em humanos e animais, o Mn induz cardiotoxicidade devido a um rápido acúmulo do metal no tecido do coração, gerando ruptura mitocondrial e obstrução dos canais de Ca (**Jiang and Zheng, 2005**). De fato, estudos in vitro demonstraram que o Mn(II) na forma de MnCl_2 é absorvido e retido em tecido cardíaco mais rapidamente do que o difosfato de dipiridoxil Mn(II) (MnDPDP) em uma relação do 8:1. Conseqüentemente o MnCl_2 , e não o MnDPDP, perturba o metabolismo energético mitocondrial devido a um ligeiro aumento da (CrP) creatina fosfato, da trifosfato de adenosina (ATP) e da diminuição de teores de creatina e/ou fluxo intracelular de Ca^{2+} (**Brurok et al., 1997**). Isto poderia estar associado a uma expressão diminuída do mRNA da subunidade α -1C do canal de cálcio tipo L, conforme estudos com miócitos ventriculares isolados do rato (**Yang et al., 2006**).

A neurotoxicidade do Mn é o dano mais notório deste metal, porém os mecanismos associados permanecem ainda não resolvidos, e conseqüentemente os tratamentos terapêuticos não têm sido efetivos.

1.9.2 Mecanismos de toxicidade do Mn em peixes.

Ao contrário do número de estudos em humanos e outros mamíferos, nos organismos aquáticos existem poucas investigações acerca do mecanismo da toxicidade do Mn (**Howe et al., 2004**). De fato, o mecanismo da toxicidade do Mn em peixes não foi bem definido (**Partridge and Lymbery, 2009**).

1.9.2.1 Neurotoxicidade.

Apesar de terem sido relatadas alterações morfológicas no cérebro de peixes expostos ao Mn (**Herrera and Catap, 1992; Krishnani et al., 2003**), o mecanismo associado a essas alterações não é conhecido. Adicionalmente, **Nayak e colab. (1999)** sugeriram que o cérebro do teleósteo *Channa punctatus* não apresentou alterações no sistema antioxidante quando tratado

com MnCl_2 , onde a inibição da atividade da catalase é compensada pelo aumento na atividade da peroxidase (POD), mantendo desse modo a desintoxicação do H_2O_2 .

1.9.2.2 Desregulação osmótica.

Nyberg e colab. (1995) sugeriram que ação tóxica do Mn em peixes seja provavelmente similar à de outros metais, iniciando-se pela deposição nas brânquias e causando em seguida o rompimento das funções fisiológicas iono- e/ou osmo-reguladoras. (Partridge e Lymbery, 2009) sugeriram que a maior toxicidade do MnCl_2 em ambientes de alta salinidade seja devida aos seus efeitos na osmorregulação, apesar da absorção ser reduzida.

1.9.2.3 Desregulamento do metabolismo de carboidratos.

Nath and Kumar (1988) revelaram que *Colisa fasciatus* exposto a MnSO_4 , apresentou uma diminuição nos níveis de glicogênio muscular e aumento do teor do ácido láctico em sangue. (Partridge e Lymbery, 2009) encontraram uma redução dos níveis de potássio e glicogênio no fígado de exemplares jovens de *Argyrosomus japonicus* quando expostos a MnCl_2 .

1.9.2.4 Imunotoxicidade.

Cossarinidunier e colab. (1988) relataram que as exposições da carpa ao Mn estimularam a fagocitose. Ghanmi e colab. (1990) mostraram que o MnCl_2 alterou o sistema imune de peixes in vivo e in vitro devido à modulação da atividade das células assassinas naturais (NK cells).

1.9.2.5 Desregulamento do metabolismo de íons.

Como outros metais tais como cádmio, cromo, cobre, ferro, mercúrio, molibdênio, prata e zinco, o Mn é captado rapidamente pelos ovos e larvas e conseqüentemente danifica as funções fisiológicas normais de Ca^{2+} e de Mg^{2+} por se ligar aos receptores desses íons. As fases

iniciais do desenvolvimento dos ovos parecem ser as menos sensíveis para as concentrações ambientais do metal, já que aparentemente não interferem com a fecundação (Finn, 2007).

1.10 Especiação química: conceitos, métodos e importância - destaque para o Mn.

Hoje, já é bem aceito que o comportamento particular dos metais-traço no ambiente está determinado mais pelas propriedades físico-químicas de suas espécies do que por suas concentrações totais (Tack and Verloo, 1995). A seguir serão abordados alguns aspectos relevantes da especiação química de metais, com destaque para o Mn.

1.10.1 Definição de especiação e fracionamento.

Há algum tempo foi resolvida a confusão conceitual entre os termos especiação e fracionamento, para o qual foram sugeridas quatro definições (Templeton *et al.*, 2000) aceitas até hoje:

- I) *Espécie química* é a forma química específica de um elemento, definida pela sua composição isotópica, estado eletrônico ou de oxidação, e/ou a estrutura molecular ou de seu complexo.
- II) *A análise de especiação* é a atividade da química analítica que identifica e/ou quantifica uma ou várias espécies químicas individuais em uma amostra.
- III) *A especiação de um elemento* é a distribuição do mesmo entre as espécies químicas definidas de um sistema.
- IV) *Fracionamento* é o processo de classificação de um elemento ou de um grupo de elementos de uma determinada amostra de acordo com as suas propriedades físicas (por exemplo, tamanho, solubilidade) ou químicas (por exemplo, complexação, reatividade). Esta classificação deve ser usada quando a especiação não é aplicável ou factível.

1.10.2 Análise de especiação e fracionamento.

Nas últimas décadas, foi feita uma distinção em função das abordagens analíticas entre a especiação ambiental e a biológico-médica. Entretanto, problemas analíticos tais como amostragem, conservação das amostras, limites de detecção, entre outros, são geralmente similares em ambos os campos, e conseqüentemente essa distinção artificial não existe realmente (Michalke, 2003).

1.10.2.1 Amostragem.

Geralmente, a etapa da amostragem é uma das mais críticas na análise de especiação, onde interferências descontroladas nos equilíbrios de uma espécie causam sérios erros. Entre tais interferências contam-se: modificações biológicas por microorganismos, oxidação pelo oxigênio atmosférico, variações térmicas (que podem conduzir à precipitação do analito) e a contaminação de amostras biológicas com ferramentas metálicas. A representatividade da amostra freqüentemente não é garantida, especialmente nas amostras do solo e sedimentos, onde a importância de perdas de analito por fixação nas paredes do amostrador tem sido cada vez mais reconhecida (Michalke, 2003).

1.10.2.2 Estocagem e preparação das amostras para análise.

As amostras tipicamente não podem ser analisadas no local, necessitando de armazenamento sob condições limpas, bem como de processamentos fáceis e rápidos, para não alterar a amostra original. Sendo assim, é aconselhável o armazenamento por curto prazo, preferivelmente a 4°C. Para o armazenamento das amostras durante longo prazo, são recomendados a liofilização ou o congelamento a -80°C. Não obstante, algumas espécies voláteis podem ser perdidas. Nenhum agente que possa gerar mudanças no pH deve ser adicionado, e os ciclos de descongelamento/congelamento devem ser evitados. No acondicionamento das amostras devem ser

usados materiais poliméricos ao invés de materiais de vidro, para evitar ou diminuir os eventos de complexação (Michalke, 2003).

1.10.2.3 Dinâmica e especiação.

Os sistemas aquáticos naturais geralmente estão sujeitos a mudanças e praticamente nunca se encontram em equilíbrio termodinâmico, fato que é frequentemente ignorado em diversos modelos e planejamentos experimentais (Leeuwen *et al.*, 2005). Por essa razão, o conhecimento de fatores dinâmicos é fundamental para estabelecer uma base quantitativa rigorosa nas inter-relações estabelecidas entre a especiação do íon metálico, a biodisponibilidade, a bioabsorção e as escalas de tempo em que esses processos ocorrem, assim como para avaliações de risco (Templeton *et al.*, 2000; Leeuwen *et al.*, 2005). Tal compreensão de um sistema complexo é igualmente uma condição prévia para a interpretação apropriada dos dados analíticos obtidos de sistemas que não estão em equilíbrio (Templeton *et al.*, 2000), contrariamente a outras aproximações de limitado valor preditivo tais como o modelo do ligante biótico (BLM, *Biotic Ligand Model*), e o modelo da atividade do íon livre (FIAM, *Free Ion Activity Model*) para metais (Templeton *et al.*, 2000; Leeuwen *et al.*, 2005). Consistentemente com isto, tem sido demonstrado recentemente que, para a maioria dos organismos, as taxas de bioabsorção de um metal não são uma constante universal, onde as concentrações corporais são reguladas por variações temporais nas concentrações do metal, incluindo a especiação química. Portanto a modelagem dos efeitos da exposição a um metal somente pode ser estimada (Vink, 2009).

1.10.2.4 Especiação do Mn em água.

Diversos métodos químicos de especiação e fracionamento já foram descritos para compreender o comportamento ambiental dos metais e das suas espécies (Tack and Verloo, 1995; Templeton *et al.*, 2000; Michalke, 2003).

A voltametria de redissolução anódica (*Anodic Stripping Voltammetry*) ou a voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial foram aplicadas com sucesso na investigação da especiação do Mn em função de pH em amostras de rios e riachos, e em soluções aquosas diluídas (**Pearson and Greenway, 2005**). Mediante espectroscopia XANES (*X-ray Absorption Near-Edge Structure*) em amostras da água de um lago, foram identificadas diferentes espécies de Mn (Mn(II), Mn(III) e Mn(IV)), este último encontrado em maior proporção. A variação nos estados de oxidação foi atribuída às mudanças de profundidade e às condições anaeróbicas (**Stueben et al., 2004**).

Com relação àqueles compostos industrialmente mais importantes do Mn, escassos trabalhos na literatura especializada têm sido relatados, a grande maioria dos quais lidando com o MMT. A esse respeito, métodos cromatográficos de alto desempenho foram utilizados para a determinação de MMT e seus derivados não metilados como o ciclopentadieniloMn (CMT) e o Mn inorgânico (**Walton et al., 1991; Butcher et al., 1999**).

1.10.2.5 Especiação do Mn em solos e sedimentos.

Estudos feitos na Austrália com amostras de solos agrícolas, mediante espectroscopia XANES, permitiram determinar mudanças nos estados de oxidação do Mn, sendo identificados Mn(II), Mn(III) ou Mn(IV) (**Twining et al., 2004**). Trabalhos com espectroscopia EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) permitiram estudar as diversas fases sólidas no ciclo do Mn em lagos eutrofizados (**Friedl et al., 1997**).

Em amostras de sedimentos, os estudos do Mn têm sido bem sucedidos com a aplicação de métodos de fracionamento como o protocolo de Tessier (**Pearson and Greenway, 2005**). **Davidson e colab. (1998)** utilizaram o conhecido esquema extração sequencial “Bureau Community of Reference” (BCR), verificando que o Mn é predominante na fração residual ou

inerte, mas em áreas mais profundas encontra-se associada frações reduzíveis. Em outro estudo, (Pizarro *et al.*, 2003) encontraram quase 50 % do Mn na fração residual, seguido de Mn ligado a hidr(óxidos) de Fe e Mn e, em menor proporção, como metal intercambiável.

1.10.2.6 Especiação do Mn em matrizes biológicas.

Estudos da transferência de elétrons no fotossistema II de plantas fotossintéticas, nos quais o Mn muda seus estados de oxidação, foram desenvolvidos mediante espectroscopia XANES (Dau *et al.*, 2001; Robblee *et al.*, 2001). Determinações de Mn(II) e Mn(III) foram feitas em mitocôndrias de cérebro sob uma gama de condições. O estudo foi estendido à investigação da formação de Mn(III) a partir da oxidação de Mn(II) por espécies reativas de oxigênio em células PC12 (Gunter *et al.*, 2005).

A combinação da eletroforese capilar, plasma indutivamente acoplado e espectrometria de massa (CE-ICP-MS) permitiu a determinação das espécies Mn-arginase, Mn-transferrina e Mn-albumina, dentre outras, em amostras de fígado (Michalke, 2004). Através de perfusão *in situ*, outros autores estudaram o trânsito das espécies $^{54}\text{Mn(II)}$, $^{54}\text{Mn(II)-citrato}$ e

A especiação do Mn pode determinar a sua velocidade de penetração no cérebro.

$^{54}\text{Mn(III)-transferrina}$ ($^{54}\text{Mn-Tf}$) através da barreira hematoencefálica. Embora o coeficiente de fluxo para o interior do cérebro (K_{in}) mostrou-se semelhante para as três espécies, a espécie Mn(II)citrato (como forma não-protéica presente no sangue) foi incorporada proporcionalmente mais do que as outras. Esses resultados mostram claramente a importância que a especiação tem na cinética do metal através da barreira hematoencefálica e, por conseguinte, na penetração no cérebro (Crossgrove *et al.*, 2003).

1.10.2.7 Controle da qualidade em análises de especiação.

De acordo com (Michalke, 2003), o controle da qualidade deve ter um papel dominante nas análises de especiação, sugerindo alguns aspectos fundamentais tais como:

- **Calibração**, processo que deve ser feito com padrões de estequiometria conhecida, com base na massa e não no volume, e preferivelmente em replicatas. Adicionalmente, os produtos químicos utilizados devem ser de elevada pureza e os gráficos da calibração devem ser gerados.
- **Quantificação**, que constitui a base das análises de balanço de massas, que por sua vez permite obter informação sobre perdas e contaminações. A quantificação pode ser feita pelos métodos de padronização interna e/ou de adição padrão, mas isto não é possível ao monitorar compostos desconhecidos. Nestes casos, a quantificação somente pode ser estimada, comparando áreas máximas da espécie desconhecida com as respectivas dos gráficos de calibração de uma espécie conhecida.
- **Uso de materiais de referência certificados** (CRM, Certified Reference Material), considerado por muitos uma das melhores soluções para o controle da qualidade. Entretanto, tal prova não é totalmente indispensável, porque as matrizes de amostras reais nem sempre são totalmente idênticas à matriz do CRM. Além disso, a concentração da espécie sujeita a análise pode ser diferente da sua similar no material de referência, alterando assim o resultado da análise. Finalmente, para alguns elementos não estão disponíveis os CRM.

1.10.3 Utilidade das análises de especiação: destaque para caso do Mn.

Somente o conhecimento da espécie química dos elementos pode conduzir a uma compreensão das reações químicas e bioquímicas que envolvem estas espécies, fornecendo assim a informação sobre a toxicidade ou a essencialidade (Michalke, 2003). Os trabalhos relacionados com especiação do Mn têm se concentrado na investigação do transporte deste metal e de suas

espécies nos sistemas biológicos (**Pearson and Greenway, 2005**). Por exemplo, no leite, no soro e no fluido cerebrospinal humanos foram identificadas as espécies Mn(II) e de Mn(III) tais como o Mn(III)transferrina, Mn(II)-Citrato e/ou Mn(III)Citrato, capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. Análises das mitocôndrias do cérebro indicaram que a espécie predominante nessa organela é o Mn(II). Baseado nestes conhecimentos, múltiplos mecanismos têm sido propostos para explicar como o Mn pode atravessar a barreira hematoencefálica, como descrito anteriormente (**Michalke *et al.*, 2009**).

Além disso, as análises de especiação vêm se constituindo em uma ferramenta essencial na avaliação e gerenciamento de riscos ambientais e para a saúde (**Wilken, 1998; Michalke, 2003; Yokel *et al.*, 2006**). Neste sentido, a metodologia pioneira de avaliação e gestão de risco ambiental, oriunda da Academia Nacional de Ciência Americana (NAS) e adaptada pela EPA, separam ambas as tarefas e, no referente à avaliação de risco, é tradicionalmente composta por quatro etapas inter-relacionadas (**Azevedo and Chasin, 2004**), que podem ser aplicadas no caso do Mn ou outro xenobiótico.

- Identificação do perigo; O Mn é perigoso?
- Avaliação dose-resposta; Quão tóxico ou perigoso pode ser o Mn?
- Avaliação da exposição; Quem está exposto, a que quantidade, por quanto tempo e com que frequência?
- Caracterização de risco: Há risco ou não há risco?

1.10.4 Ensaios toxicológicos.

Um dos grandes desafios na especiação de metais é a sua correlação correta com os mecanismos de toxicidade que tais espécies podem desencadear em sistemas biológicos (**Tessier, 1996**). Isto pressupõe o desenvolvimento de estudos toxicológicos, para o qual devem ser considerados vários fatores, tais como as propriedades físicas e químicas das substâncias, a

via de exposição, a duração e a frequência dessa exposição, as espécies testadas, as características individuais, a idade e maturação do organismo testado e a natureza do ponto final do efeito tóxico que está sendo medido (**Azevedo and Chasin, 2004**).

Segundo **Azevedo e Chasin (2004)**, existem diferentes tipos de estudos de toxicidade:

- a) *toxicidade aguda*: visam demonstrar a ocorrência de efeito adverso em um curto período (24 h a 96 h) e frequentemente envolvem a determinação de uma dose letal média (DL50) ou de uma concentração letal média (CL50). Ao mesmo tempo, nesses estudos, objetiva-se identificar órgãos que possam ser alvos potenciais, determinar a variabilidade das respostas entre as diferentes espécies e indicar a toxicidade comparativa.
- b) *toxicidade subaguda e subcrônica*: desenvolvidos, por períodos que não excedem 10% da vida do animal, e geralmente são empregados no delineamento de estudos de,
- c) *toxicidade crônica* ou de *longa duração*: estes são realizados em um período correspondente a toda a vida do animal.

1.10.5 Ensaios toxicológicos sob o princípio dos 3R.

Os produtos químicos atuais no ambiente têm um impacto na saúde das crianças e no neurodesenvolvimento (**Hass, 2006**). Nos últimos anos, muita atenção foi dada aos procedimentos para o desenvolvimento de modelos de avaliação de risco para a toxicidade reprodutiva, mas a área específica da neurotoxicidade no desenvolvimento tem sido relativamente negligenciada nos testes e estudos de avaliação de risco (**Coecke et al., 2007**).

Por outro lado, o desenvolvimento de estudos toxicológicos apresentou um aumento significativo no uso de animais durante o século XX (**Paixão, 2001**), o que tem sido criticado pela comunidade internacional, sobretudo por setores ativistas que lutam em defesa dos direitos dos animais (**Abreu, 2008**). Isto tem motivado o aprimoramento do conceito desenvolvido

por Willian Russel e Rex Burch em 1959, definido como princípio dos 3R's, (“*refinement*”, “*reduction*”, “*replacement*”), que significam respectivamente: (1) refinamento: a modificação de algum procedimento operacional com animais, objetivando minimizar a dor e/ou o estresse; (2) redução, um menor número de animais sendo utilizado para obter a mesma qualidade de informação, ou maximização da informação obtida, utilizando-se mesmo número de animais utilizados no teste clássico; e (3) substituição dos testes *in vivo* por testes *in vitro* (Abreu, 2008). Neste sentido, têm sido assinados acordos internacionais para aumentar a cooperação, a comunicação e a validação de métodos alternativos de experimentação animal (ICATM, 2009).

Segundo (Repetto, 1999), as possíveis alternativas compreendem: *Evitar a repetição desnecessária de experimentos in vivo e in vitro*, fazendo uso da informação disponível quanto a protocolos, estudos prévios, intercâmbios, flexibilidade e aplicação de estratégias integradas, usando, quando possível, modelos matemáticos de previsão; *melhoras nos desenhos experimentais* segundo os critérios da redução e do refinamento; *uso de organismos filogeneticamente inferiores não protegidos por lei* tais como bactérias, fungos, protozoários, algas, plantas e animais invertebrados; *uso de vertebrados em etapas iniciais do desenvolvimento* tais como peixes, anfíbios, répteis, aves, mamíferos; *aplicação de métodos in vitro*: órgãos, banhos, perfusão, cortes, órgãos reconstituídos, re-agregados celulares, micro-massas, co-cultivos, cultivo primário de células dispersadas, linhagens celulares.

1.10.5.1 Ensaios *in vitro* sobre neurotoxicidade no desenvolvimento.

A cultura primária de células neuronais mantém muitas propriedades morfológicas, neuroquímicas e eletrofisiológicas dos neurônios *in vivo*. Por essa razão, são usadas freqüentemente para investigar os mecanismos celulares da neurotoxicidade no desenvolvimento observados *in vivo*. As diferenças nas origens das células quanto a regiões do cérebro podem demonstrar

uma eventual especificidade nos efeitos induzidos pelos xenobióticos (**Radio and Mundy, 2008**), como sugerido para outros modelos (**Azevedo and Chasin, 2004**). Apesar de que a cultura primária de células é de manutenção mais difícil e são menos duradouras (dias ou semanas) quando comparadas às células imortalizadas, as primeiras são mais sensíveis aos efeitos estressantes, e conseqüentemente podem constituir a linha base para o desenvolvimento de outros modelos (**Radio and Mundy, 2008**).

1.10.5.2 Ensaios in vivo sobre neurotoxicidade no desenvolvimento.

Geralmente os métodos para detectar neurotoxicidade in vivo são baseados na determinação de pontos finais (*endpoints*), que incluem os testes comportamentais, considerados cruciais para a avaliação de risco da neurotoxicidade. Porém os estudos in vitro não podem reproduzir tais pontos finais. Entretanto, o uso de espécies de animais não mamíferos é uma alternativa (**Coecke et al., 2007**). Neste sentido, o paulistinha (*Danio rerio*) oferece muitas vantagens: baixo custo, produção elevada, uma escala quase ilimitada de ensaios morfológicos e funcionais, e aparentemente um alto nível da correlação com sistemas mamíferos (**Peterson et al., 2008**). Além disso, os embriões dos peixes são considerados como um refinamento, se não uma substituição parcial das experiências com peixes adultos e/ou mamíferos (**Nagel, 2002; EFSA, 2005**), e o uso de embriões de peixes não está regulado. Sendo assim, embriões de peixes representam um modelo atraente para a avaliação de risco ambiental e humana dos produtos químicos, dado que oferecem a possibilidade executar em escala reduzida análises de alto valor informativo (**Scholz et al., 2008**). Uma alta correlação tem sido verificada entre a toxicidade em embriões e a toxicidade aguda em peixes adultos para diversos grupos de substâncias. Adicionalmente, análises de expressão de genes são uma melhoria nos testes com embriões, que permitem prever dados de toxicidade crônica com exposições de curta duração (**Voelker et al., 2007; Weil et al., 2009**).

Os ensaios baseados no paulistinha aferem pontos gerais do estudo de neurotoxicidade do desenvolvimento, tais como a proliferação celular, diferenciação e maturação neuronal, assim como o comportamento, que é o efeito final do desen-

Os métodos alternativos devem ser propostos sempre que possível ao invés dos estudos com mamíferos.

volvimento neuronal (Coecke *et al.*, 2007). Tais comportamentos podem ser analisados por respostas clássicas a determinados estímulos ou, mais recentemente, de forma molecular pela expressão de genes. Certamente, um “efeito” detectado em um modelo alternativo é uma boa indicação de que um efeito similar pode ser esperado nos seres humanos após a exposição química (Azevedo and Chasin, 2004; Coecke *et al.*, 2007), sobretudo porque os mecanismos do desenvolvimento neural são altamente conservados entre mamíferos e modelos não mamíferos como o paulistinha (Coecke *et al.*, 2007). Apesar destes avanços, os estudos de cardiotoxicidade em paulistinha são os que acumulam mais resultados, e inclusive com um alto nível de correlação com cardiotoxicidade em humanos (Peterson *et al.*, 2008).

1.10.5.3 O papel da integração de resultados na avaliação de riscos.

A avaliação de risco, com base em estudos *in vitro*, é baseada na premissa de que os produtos químicos capazes de induzir danos *in vitro* têm o potencial de alterar processos *in vivo* (Radio and Mundy, 2008). Porém, a aplicação direta dos resultados *in vitro* na avaliação de risco exige uma compreensão mais completa dos mecanismos de toxicidade, já que estes modelos não refletem o que acontece *in vivo* quanto a absorção, a distribuição, o metabolismo, e a excreção (ADME) dos compostos-teste, o que é igualmente verdadeiro para o uso de modelos *in vivo* que não são de mamíferos, nos quais os fenômenos de ADME não refletem necessariamente a situação humana (Coecke *et al.*, 2007). Conseqüentemente, a aplicação de uma bateria de ensaios *in vitro* e *in vivo* deve ser a maneira mais apropriada de fornecer dados coerentes para a avaliação de risco humana e ecotoxicológica.

1.11 Importância da investigação

De acordo com os aspectos tratados até o momento, o Mn pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de diferentes doenças neurológicas como o Parkinson e o Alzheimer, o que implica significativos gastos econômicos associados com o tratamento e cuidados desses pacientes. Por exemplo, (Weiss, 2006) sugeriu que, nos Estados de Unidos, o cuidado institucional de 30 pacientes com Parkinson por ano poderia custar pouco mais de um milhão de dólares (aproximadamente dois milhões de reais). Ao mesmo tempo, é crescente o número estudos internacionais, relacionado desordens neurológicas em crianças com a ocorrência inadequada do Mn em águas de consumo (Ljung and Vahter, 2007).

Além disso, segundo dados oficiais (CETESB, 2006), na Unidade de Gestão de Recursos Hídricos do Alto do Paranapanema (UGRHI 14; SP), da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), a concentração aquática do Mn ao longo dos últimos onze anos vem sendo consistentemente inconforme à legislação ambiental, que estipula o valor máximo de 0,1 mg/L do metal. De acordo com os dados da Tabela 1, a inadequação do Mn só não é maior do que a do Al, e fica na frente de metais pesados como Hg e Pb (CETESB, 2006).

Tabela 1: Porcentagens de resultados inconformes de análise de águas em relação aos padrões de qualidade (Resolução CONAMA 20/86) para metais durante o período 1992 – 2005 na UGRHI 14, Alto Paranapanema (CETESB 2006).

Metais	Al		Mn		Ni		Cu		Zn		Cd		Hg		Pb	
Código do ponto/ período	1994-2003	2005	1995-2004	2005	1995-2004	2005	1994-2003	2005	1995-2004	2005	1994-2003	2005	1995-2004	2005	1994-2003	2005
ITAP02800*	100	--	42	17	8	0	17	--	0	0	--	--	11	0	--	--
ITAR02500	100	--	28	0	2	0	7	--	0	0	11	--	20	0	7	--
PARP02100	100	--	35	33	3	0	8	--	0	0	7	--	18	0	11	--
JURU02500	92	--	0	0	4	33	17	--	0	0	8	--	18	0	0	--
TAQR02400	100	--	48	17	5	0	13	--	3	0	5	--	20	0	4	--

*Dados de 2003 somente

A possibilidade de remobilização e/ou ressolubilização do metal a partir do(s) seu(s) minério(s) aparentemente não explicaria essa discrepância, uma vez que as reservas de Mn do Es-

tado de São Paulo, que alcançam apenas as 514 mil toneladas (contra 73 milhões de toneladas do País), estão concentradas na região de Itapira, próximo à divisa com o Estado de Minas Gerais, ou seja, muito distantes da região de interesse (**DNPM, 2001**).

De acordo com nosso conhecimento, além dos trabalhos das agências governamentais, pouco se fez em termos do acompanhamento da especiação de metais pesados em geral, e do Mn em particular, nessa região. De fato, a literatura recente elenca apenas o trabalho de (**Tomazelli e Martinelli, 2003**), que avaliaram a carga de Hg, Pb e Cd nos sedimentos do rio Paranapanema e outros cinco rios paulistas.

1.12 Hipóteses

De acordo com os aspectos mencionados anteriormente, identificamos a necessidade de estudos adicionais relacionados com a distribuição ambiental e toxicidade do Mn, o que nos permitiu levantar as seguintes hipóteses:

- O desenvolvimento de esquemas de fracionamento de amostras ambientais na bacia Alto do Paranapanema deveria contribuir para o conhecimento da origem e distribuição do Mn nessa bacia, ao mesmo tempo em que permitiria identificar potenciais riscos ambientais associados com a ocorrência deste metal.
- A especiação do Mn deve ser determinante na sua toxicidade in vitro e in vivo. Mais especificamente:
 - In vitro, a neurotoxicidade do Mn deve se manifestar diferentemente em diferentes linhagens celulares de neurônios e nos seus diversos graus de diferenciação;
 - In vivo, o estado do desenvolvimento embrionário do paulistinha deve ser um parâmetro relevante para explicar a neurotoxicidade do Mn.

Como forma de contribuir ao estudo da toxicologia do Mn e seus compostos, bem como resolver as hipóteses levantadas, neste projeto foram perseguidos os seguintes objetivos:

1.13 Objetivo Geral

Determinar, na bacia Alto do Paranapanema (ALPA), o padrão de distribuição ambiental do Mn e a suas implicações; assim como possíveis mecanismos de toxicidade deste metal em função da sua especiação, o que servirá de base para possíveis programas de gestão ambiental nessa bacia.

1.14 Objetivos Específicos

- Desenvolver um esquema de fracionamento do Mn no sistema aquático da bacia ALPA, com o intuito de conhecer a origem, distribuição e possíveis riscos ambientais associados à ocorrência ambiental deste metal.
- Caracterizar o potencial toxicológico das espécies ou grupos de espécies do Mn que sejam identificadas na bacia ALPA.
- Determinar possíveis biomarcadores e mecanismos de toxicidade do Mn in vitro e in vivo em função da sua especiação química (estado de oxidação e formação de complexos).
- Contribuir para o refinamento dos estudos de neurotoxicidade e avaliação de risco do Mn no desenvolvimento, por meio da integração de estudos in vitro (culturas de células neuronais corticais e granulares de cerebelo) e in vivo (paulistinha, *Danio rerio*).

CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

- Frascos de polietileno com capacidade de 1 L
- Tubos de polivinil carbonato com diâmetro interno de 5 cm e 155 cm de comprimento
- Caixas isotérmicas (isopor)
- Bolsas plásticas
- Kit para análise de oxigênio dissolvido (Red Sea, France)
- Kits para análise de alcalinidade, dureza total e parcial (Tropic Marin, Alemanha)
- Placas de Petri de 70 e 90 mm de diâmetro
- Pinças de pontas finas
- Tesouras grandes e pequenas
- Pipetas Pasteur com algodão – autoclavadas
- Pipetas Pasteur sem algodão – autoclavadas
- Placas de teflon (5 cm x 5 cm)- autoclavadas
- Filtros estéreis (0,22 e 0,45 μM) (Millipore, EUA)
- Membrana de nucleoporos de éster de celulose (0,45 μm) (Millipore, EUA)
- Tubos de centrifuga (“Falcon”) estéreis de 15 e 50 mL (TPP)
- Microplacas estéreis de plástico (6, 24 e 96 poços, Corning, EUA)
- Béqueres de 20, 50 e 100 mL
- Balões volumétricos de 10, 25, 50 e 100 mL
- Papel de alumínio
- Papel de filtro Whatman 0,3 mm de porosidade e 90 cm de diâmetro
- Gelo
- Ratas NMRI: de 7 dias e grávidas, com 16 dias de gestação (Charles River, Iffa Credo, St. Germain-sur-l'Arbreste, França).
- Paulistinha (*Danio rerio*) UFZ-OBI (Alemanha).

2.2 Instrumentos

- Suporte para filtro (Millipore, EUA)
- pHmetro de bancada (Q-400AS, Quimis, Brasil) e pHmetro portátil (Q-400HM, Quimis, Brasil)
- Medidor de oxigênio (Q758P, Quimis, Brasil)
- Condutivímetro (DM-32, Digimed, Brasil)
- Espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) (Spectro, Spectroflame, Alemanha)
- Espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica Varian E-109 Century Series X-band (Varian, EUA)
- Espectrofotômetro UV-Visível, UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu, Brasil)
- Potenciostato PAR 263
- Purificador de água milli-Q (Millipore, Brasil)
- Centrifuga para tubos de 2 mL e 50 mL (Eppendorf, Brasil)
- Centrífuga refrigerada (4°C) (Eppendorf, Alemanha)
- Misturador Térmico para tubos de 1,5 e 2 mL (Eppendorf, Alemanha)
- ABI Step One Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany)
- Homogenizador Ultraturrax (ICA, Alemanha)
- Capelas de Fluxo laminar horizontal e fluxo laminar vertical
- Incubadora com atmosfera a 5 % de CO₂ com controle de temperatura (37 ± 1°C)
- Leitor espectrofotométrico de placas (iEMS Reader MF; Labsystems, Finlândia)
- Microscópio óptico, com aumento mínimo de 30×
- Micropipetas de 5, 10, 20, 200 e 1000 µL (Eppendorf, Alemanha)
- Incubadora com controle de temperatura (26 ± 1°C)
- Tanques (400 L) e Aquários (20 L) com recirculação de água.
- Manta de aquecimento, com agitação e controle de temperatura

2.3 Reagentes

Solução padrão de Mn para absorção atômica 1000 mg/L (Sigma-Aldrich, EUA), acetato de amônia 98 % ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, grau HPLC, Vetec, Brasil), ácido nítrico (HNO_3 , 70 %, grau análises de metais traços, Vetec, Brasil), ácido clorídrico (HCl , 35,6 %, grau análises de metais traços, Vetec, Brasil), cloreto de hidroxilamônio ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, 99 %, grau analítico, Vetec, Brasil), hidróxido de sódio (NaOH , grau analítico, Cromoline, Brasil), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 35 %, grau analítico, Cromoline, Brasil), cloreto de magnésio anidro (MgCl_2 98 %, grau analítico, Merck, EUA), sulfato de magnésio (MgSO_4 , Sigma-Aldrich, EUA), cloreto de Mn tetra hidratado ($\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, EUA), acetato de Mn(III) di hidratado, $((\text{CH}_3\text{COO})_3\text{Mn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, EUA), citrato tribásico de sódio di hidratado [Cit^{3-} , $(\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, EUA), pirofosfato de sódio deca hidratado [$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, Brasil], [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT, Sigma-Aldrich, EUA), tripsina (Sigma-Aldrich, EUA), inibidor de tripsina (Sigma-Aldrich, EUA), DNase (mantida em alíquotas de 80 μL a -20°C ; Sigma-Aldrich, EUA), poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, EUA), soro fetal bovino (Gibco, Reino Unido), Dulbecco's modified Minimum Essential Medium (DMEM, Biochrom, Alemanha), Álcool 99 % (Vetec, Brasil), dodecil sulfato de sódio $\geq 98,5$ (SDS, grau biologia molecular, Sigma-Aldrich, Alemanha), sulfeto de Mn 99,9 % (MnS , Sigma-Aldrich, Alemanha), RevAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Alemanha), *Taq* Polymerase (Promega, Alemanha), Tris-HCl >99 % (Sigma-Aldrich, Alemanha), sulfato de amônia >99 % $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Sigma-Aldrich, Alemanha), Triton-X 100 (Sigma-Aldrich, Alemanha), agarose de baixo ponto de fusão (Sigma-Aldrich, Alemanha), brometo de etídio (EtBr, Sigma-Aldrich, Alemanha), Trizol (Invitrogen, Alemanha), ácido etilenodiaminotetraacético ($\text{EDTA} \geq 99,5$ %, Sigma-Aldrich, Brasil), cloreto de sódio ($\text{NaCl} \geq 99,5$ %), Sigma-Aldrich, Brasil), cloreto de potássio (KCl , Sigma-Aldrich, Brasil), hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4 , Sigma-Aldrich, Brasil), dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4 , Sigma-Aldrich, Brasil), ácido 5-sulfosalicílico dihi-

dratado ($\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich, Espanha), β -nicotinamida adenina dinucleotídeo 2-fosfato reduzido de tetrassódio (NADPH, Sigma-Aldrich, Espanha), glutatona redutase (GR, ≥ 12 unidades/mg proteína, Sigma-Aldrich, Espanha), 2-vinilpiridina ($\geq 98,0$ %, Sigma-Aldrich, Espanha), ácido L-[G- ^3H]glutâmico ([G- ^3H]-Glu ≈ 2 TBq/mmol, Amersham Life Science, UK) ácido 4-amino-*n*-[2,3- ^3H]butírico ([^3H]GABA ≈ 3 TBq/mmol, Amersham Life Science, UK), ácido gama-aminobutírico (GABA ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Espanha), L-glutamato de sódio (glu $\geq 98,0$ %, Sigma-Aldrich, Espanha), ácido p-amino benzóico (pABA $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Espanha).

2.4 Soluções

Todas as soluções relacionadas a seguir foram preparadas com água (H_2O) milli-Q a menos que indicado o contrário, e foram conservadas em geladeira (4°C).

- MgCl_2 1 M, pH 7
- Acetato de sódio (NaAc) 1 M (pH 5, ajustado com ácido acético)
- Acetato de sódio (NaAc) 2 M (pH 5,5, ajustado com ácido acético)
- $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0,04 M (preparado com ácido acético 25 %)
- HNO_3 0,02 M
- H_2O_2 30 % (preparada no momento de desenvolver o ensaio referido)
- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 3,2 M (preparado com HNO_3 20 %)
- HNO_3 0,5 M
- Curva padrão de Mn 100, 10, 1, 0,1 mg/L (preparados com HNO_3 1 %)
- Soluções tampão pH 4,01; 6,86 e 9,18 (Quimis, Brasil)
- Solução de MTT (0,25 mg/mL)
- Solução tampão Hank's: solução 5 (9,9 mL) + solução 6 (0,1 mL)
 - Solução 1: NaCl 8 g + KCl 0,4 g em H_2O (100 mL)
 - Solução 2: Na_2HPO_4 anidro 0,358 g + KH_2PO_4 0,60 g em H_2O (100 mL)

- Solução 3: CaCl_2 0,72 g em H_2O (50 mL)
- Solução 4: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,23 g em H_2O (50 mL)
- Solução 5: Misturar as soluções 1-4, na seguinte ordem (10 mL de 1 + 1 mL de 2 + 1 mL de 3 + H_2O 86 mL + 1 mL de 4)
- Solução 6: NaHCO_3 0,35 g em H_2O 10 mL
- Solução tampão HBSS: 10 mL de Solução Hank's + glicose 0,0035 g
- NaOH 0,2 M,
- Glu 2 mM e 120 μM ,
- GABA 5 mM e 10 μM
- Solução de SDS 5 % (massa /volume)
- Tampão fosfato de potássio pH 7,4 (100 mM): solução A, (16 mL) + Solução B, (84 mL)
 - Solução A (KH_2PO_4 6,8 g em H_2O 500 mL)
 - Solução B (K_2HPO_4 8,5 g ou $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 11,4 g em H_2O 500 mL)
- Solução KREBS (mmol/l): KCl 4,7, NaCl 118, CaCl_2 2,5, NaHCO_3 23,3, KH_2PO_4 1,2, MgSO_4 1,2 e glicose 10
- EDTA 1 mM
- Tampão PE, Tampão fosfato de potássio pH 7,4 (100 mM) + EDTA (1 mM)
- Ácido sulfosalicílico 2 % (massa/volume)
- Meio de cultura celular para estudos in vitro (500 mL):
 - a) 50 mL DMEM (GIBCO® ou BIOCHROM®) 10x + 450 mL de água
 - b) Ajustar o pH até 7 com NaOH
 - c) Acrescentar: 591,2 mg de glicose H_2O + 1,1 g de NaHCO_3
 - d) Separar 20 mL de (c) e adicionar: 0,5 mL de pABA (1 mg/mL) + 2 mL de insulina (solução B*) + 1 mL de penicilina (3 g/100 mL) + 14,6 mg de L-glutamina
 - e) Filtrar (0,22 μm) em capela de fluxo laminar
 - f) Adicionar 50 mL de soro fetal bovino

g) Guardar em geladeira (4°C, máximo 15 dias)

h) Adicionar 710 mg de KCl

➤ Soluções utilizadas na extração celular

- Solução 1: 80 mL de KREBS + 0,24 g de albumina bovina + 0,62 mL de solução de MgSO_4 150 mM
- Solução 2: 20 mL de solução 1 + 4 mg de tripsina + 80 μL de DNase 10 mg/mL
- Solução 3: 20 mL de solução 1 + 10,4 mg de inibidor de tripsina + 0,2 mL de de solução de MgSO_4 150 mM + 80 μL de DNase 10 mg/mL
- Solução 4: 20 mL de solução 1 + 3,2 mL de solução 3

Em fluxo laminar vertical, filtrar (Filter Millex GP Millipore) as soluções na seguinte ordem: 1, 2, 4 e 3,

- A solução 2 deve ser filtrada em frasco de vidro e as demais em tubos Falcon estéreis de 50 mL

- Equilibrar as soluções 1 e 2 com carbogênio (1 min cada)

* Preparo da solução B **Insulina**

- Tampão de insulina:	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,442 g	(32,4 mM)
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,262 g	(7,6 mM)
	Albumina bovina	2,5 g	
	H_2O qsp	250 mL.	

Insulina - Solução A: Dissolver 1 mg de insulina em 100 μL de HCl 0,01 M e adicionar “Tampão de Insulina” até 10 mL

Insulina - Solução B: Dissolver 2 mL da solução A com 200 mL do “Tampão de Insulina”. Aliquotar 1,75 mL e congelar (-20°C).

➤ Solução de SDS 5 % massa/volume

➤ Soluções utilizadas na cultura e tratamentos de embriões de paulistinha (*Danio rerio*)

- Água-ISO, segundo as normas ISO 7346-1 e 7346-2 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 294,0 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 123,3 mg/L; NaHCO_3 63 mg/L; KCl 5,5 mg/L).
- Solução de estoque de SDS, 20 mg/L (deve ser preparada por agitação por uma noite, no escuro e usada no máximo em até duas semanas). As soluções de trabalho de SDS são preparadas a partir de diluições do estoque para atingir concentrações finais de 3, 6 e 12 mg/L, as quais são usadas como controle positivo nos ensaios com *Danio rerio*. Devem ser preparadas no dia do ensaio.

2.5 Métodos

2.5.1 Informação e descrição geral da área de amostragem.

A bacia Alta do Paranapanema (ALPA), pertencente ao estado de São Paulo da República Federativa do Brasil, abrange 34 municípios, faz parte da Área de Proteção Ambiental (APA) “Corumbataí – Botucatu – Tejuapá”. A Tabela 2 mostra outros aspectos de caráter geral dessa localidade, devendo-se destacar que os rios Itapetininga e Paranapanema e o reservatório Jurumirim recebem de forma direta aproximadamente 10 % da carga poluidora de origem doméstica da bacia, bem como outros aportes de origem industrial e agrícola (CETESB, 2006).

Tabela 2. Características da bacia ALPA (UGRHI 14)

Área de drenagem	22,795 km².
Constituintes principais	Rio Paranapanema, Rios Apiaí-Guaçu, Taquari, Itapetininga e Itararé e Ribeirão das Almas.
Reservatórios	Xavantes, Jurumirim e Paineiras.
Usos do solo	Predomínio de atividade pecuária. Além de extensas áreas de pastagens, a presença de culturas temporárias (milho e feijão) e a silvicultura também são bastante expressivas.
Usos da água	Abastecimento público e industrial; recepção de efluentes domésticos e industriais; geração de energia elétrica e irrigação de plantações.
População	749.607 habitantes
Ictiofauna*	As espécies mais abundantes em termos de número de indivíduos são <i>Astyanax altiparanae</i> (15,2%) e <i>Astyanax</i> sp. 1 (12,3%); aquelas com maior biomassa são <i>A. altiparanae</i> (28%) e <i>Geophagus brasiliensis</i> (13%). A composição da ictiocenose em termos de abundância e biomassa por família indica a predominância expressiva de Characidae, seguida por Loricariidae, Pimelodidae e Cichlidae.
Geomorfologia	Rochas epimetamórficas (metassedimentos argilosos, arenosos e carbonáticos) e rochas sedimentares vulcânicas básicas constituintes da bacia do rioParaná. Os recursos minerais principais são por carvão, turfa, pedras ornamentais, quartzo, argila, talco, caulín, cobre e areias e cascalhos.
Principais atividades	Agroindústrias e mineração

*Informação referente à bacia do rio Paranapanema (Castro et al., 2003).

2.5.2 Coleta e análises de parâmetros gerais de qualidade de água e sedimento.

As amostras foram coletadas em Agosto de 2006, Novembro de 2006, Fevereiro de 2007 e Abril de 2007 em diferentes localidades da bacia Alto do Paranapanema (ALPA), representada pela unidade de gerenciamento de recursos hídricos 14 (UGRHI 14), como descrito na Figura 7 (CETESB, 2006): rio Itapetininga (ITAP; $-23^{\circ}33:38$; $-48^{\circ}23:20$), onde a atividade industrial está afetando a qualidade das águas; rio Paranapanema (PARA; $-23^{\circ}28:41$; $-48^{\circ}37:54$), o qual recebe as águas do rio Itapetininga e tributa ao reservatório Jurumirim (JURU; $-23^{\circ}19:40$; $-48^{\circ}42:39$), que por sua vez constitui a terceira localidade de amostragem. Este se encontra na região central da bacia, e serve como fonte de abastecimento de água para os setores domésticos e industriais (CETESB, 2006). A distância entre as diferentes localidades de amostragem foi de aproximadamente 30 km.

Figura 7: Localização dos pontos de amostragem na bacia ALPA: Itapetininga (ITAP), Paranapanema (PARA) e Jurumirim (JURU) (CETESB, 2006).

As amostras de água superficiais foram coletadas a uma profundidade de 1 m, usando um amostrador composto por uma barra de PVC e um frasco acoplado de polietileno, com capa-

cidade para 1 L (Fig. 8A, D). De igual maneira, das camadas superficiais (0 – 10cm) do sedimento foram coletadas as amostras para análises usando como amostrador um tubo de PVC de 5 cm de diâmetro interno (Fig. 8B, C). Para ambos os casos, foram coletadas pelo menos três sub-amostras de cada localidade para compor uma amostra, a qual foi utilizada nas análises posteriores.

No local de amostragem foram feitas medidas de pH e de temperatura com um pHmetro portátil (Q-400HM). Alcalinidade, oxigênio dissolvido, dureza total e a dureza parcial (quantidade de carbonato de cálcio) foram determinadas colorimetricamente com kits comerciais (Red Sea e Tropic Marin), também no local. A condutibilidade das amostras de água foi determinada no laboratório usando um condutivímetro DM-32.

Figura 8: Utensílios de amostragens de campo, desenhados e construídos no Laboratório de Bioinorgânica Ambiental do IQ-USP. A) coletor de água (barra de PVC e um frasco (1L) de polietileno acoplado e coletor sedimento (tubo de PVC- 5 cm de diâmetro interno- com tampas), B) imagem ampliada do diâmetro interior do coletor de sedimento, C) imagem ampliada da base do coletor de sedimento, D) imagem ampliada do coletor de água, E) Roupa de polietileno com botas e luvas de PVC sedimento, F) Amostragem de sedimento no rio Itapetinga.

Os coletores foram previamente lavados com ácido nítrico 10 % e água milli-Q, e a amostragem foi feita com traje de polietileno e PVC (Fig. 8E, F), para minimizar a contaminação das amostras. Todas as amostras foram armazenadas em sacolas plásticas no gelo (4°C) e transportadas ao laboratório para as análises imediatas, e com o intuito de evitar ou minimizar alterações na especiação do Mn.

2.5.3 Fracionamento e análises do Mn nas amostras de sedimento.

O esquema de fracionamento do Mn nas amostras de sedimento (Tessier *et al.*, 1979) foi precedido por medidas de pH em uma suspensão sedimento/água (1/2,5 v:v), a que foi equilibrada por 30 minutos. Já no laboratório, as amostras foram submetidas a secagem em estufa (60°C, 24h) e peneiradas (40 µm). Cinco frações de Mn foram geradas e analisadas:

- a) Fração I_s (Metal intercambiável): **i)** 1g de amostra seca foi misturada com 8 mL de MgCl₂ 1M a pH 7 e agitada durante 30 min em temperatura ambiente (T_{amb}) e **ii)** Centrifugada a 4000 rpm, 30 min. **iii)** Foi retirado o sobrenadante **A**, **iv)** e o resíduo foi lavado com água (4 mL) e se repeteram os passos (ii-iii), sendo os sobrenadantes misturados a **A**. O resíduo foi conservado para obter a fração II_s. **v)** Completar o volume até 25 mL, com 2 mL de HNO₃ (concentrado) e suficiente H₂O. A fração I_s indica a capacidade dos sedimentos absorver e dessorver metais traços sob a influência de mudanças na composição iônica da coluna líquida.
- b) Fração II_s (Metal ligado a carbonatos): **i)** O resíduo da fração I foi tratado com 8 mL de NaAc 1 M pH 5 sob agitação por 5 horas em T_{amb}, **ii)** tratamentos como nos passos (ii-v) do item anterior o resíduo foi conservado para obter a fração III. A fração II_s é composta por metais associados a carbonatos, a qual pode ser alterada por mudanças de pH.
- c) Fração III_s (Metal ligado a hidr(óxidos) de ferro e Mn): **i)** O resíduo da fração II foi tratado com 20 mL de (NH₂OH·HCl 0,04 M em HAC 25 %) sob agitação a 96°C durante 6h, seguido de **ii)** tratamentos como no item a (ii-v). O resíduo foi conservado para obter a fração IV. A fração III_s é composta por metais seqüestrados pelos óxidos e hidróxidos de ferro e Mn, a qual também é sensível a mudanças do potencial redox.
- d) Fração IV_s (Metal ligado a matéria orgânica): **i)** O resíduo da fração III foi tratado com 3 mL de HNO₃ 0,02M + 5 mL de H₂O₂ 30 % sob agitação e refluxo a 85°C durante 2h; a seguir foram adicionado 3 mL de H₂O₂ 30 % sob agitação e refluxo a 85°C durante 30 min e, finalmente foram adicionados 5 mL de NH₄Ac 3,2M em HNO₃ 20 % sob agitação du-

rante 30 min. **ii)** Seguiran-se os tratamentos como no item a (ii-v). O resíduo foi conservado para obter a fração V. A fração IV_s é composta por metais ligados a diversas formas de matéria orgânica, os quais podem ser liberados sob condições oxidantes.

- e) Fração V_s (Metal ligado a silicatos): **i)** O resíduo da fração IV foi re-suspendido em 5 mL de HNO₃ 0,5M; a seguir foi adicionado HNO₃ /HCl (2,3 mL/7 mL ambos concentrados) sob agitação e refluxo a 80°C durante 16 h. **ii)** Seguiram-se os tratamentos como no item a (ii-v). A fração V_s é composta por metais incluídos em minerais, os quais raramente são liberados sob condições naturais.

Para cada fração foi obtido um branco sob as mesmas condições operacionais. As frações obtidas foram divididas em 15 sub-amostras e analisadas em duplicata por ICP-OES, com limite de detecção de 0,6 µg/kg, ver item 2.5.12.

2.5.4 Fracionamento e análises do Mn nas amostras de água.

A seguir, é detalhado o procedimento de fracionamento do Mn nas amostras de águas:

- a) Mn total: uma alíquota de 100 mL de amostra acidificada com 2 mL de HNO₃ e 5 mL de HCl, ambos concentrados, foi submetida a digestão ($95 \pm 1^\circ\text{C}$) até o volume ser reduzido a 15-20 mL. O volume final foi ajustado para 25 mL, com água milli-Q, e analisado em duplicata por ICP-OES, ver item 2.5.12.
- b) Mn dissolvido: amostras de água não tratadas foram filtradas através de membranas de acetato (0,45 µm) aproximadamente três horas depois de terem sido coletadas em campo. Uma alíquota de 100 mL foi tratada e analisada como em (a).
- c) Fração I_a (Mn particulado): Esta fração foi calculada pela diferença entre Mn total e Mn dissolvido.
- d) Frações II_a e III_a: uma alíquota do filtrado (b) foi agitada por duas horas em contato com a resina ChelexTM-100 (ensaio de complexação) a pH natural (6,5-8), resultando em duas frações de Mn (**Hart and Davies, 1977**): Fração II_a (complexos lábeis de metal de origem

orgânica e inorgânica e/ou metal adsorvido em material orgânica e/ou inorgânica), que é retida na resina. A fração III_a (complexos metálicos no lábeis de origem orgânica e inorgânica e/ou metal no lábil adsorvido em material orgânico e/ou inorgânico), que não é retida na resina, e a fração III_a foi tratada e analisada como descrito em (a). A quantidade de Mn na fração II_a foi obtida pela diferença entre a fração III_a e o Mn dissolvido.

- e) Frações IV_a e V_a : Uma alíquota da fração III_a foi ajustada a pH 5,5 e tratada como descrito em (d), gerando a fração IV_a (complexos lábeis de metal de origem orgânica e/ou inorgânica e/ou metal livre) e a fração V_a (metal inerte). Esta última foi tratada e analisada como descrito em (b). A concentração de Mn na Fração IV_a foi calculada pela diferença entre a Fração V_a e o conteúdo da fração III_a .

Para cada fração foi obtido um branco sob as mesmas condições operacionais. As frações obtidas foram divididas em 12 sub-amostras e analisadas em duplicata por ICP-OES, com um limite de detecção de 0,6 µg/L, ver item 2.5.12.

2.5.5 Determinação do fator de enriquecimento.

O fator de enriquecimento (EF) é usado para avaliações ecotoxicológicas e geoquímicas (Buat-menard and Chesselet, 1979) e pode ser definido como:

$$EF = \frac{\left(\frac{M}{Fe}\right)_{amostra}}{\left(\frac{M}{Fe}\right)_{background}}$$

Onde EF é o fator de enriquecimento, $(M / Fe)_{amostra}$ é a relação entre a concentração do metal estudado e a concentração de ferro (Fe) na amostra, e $(M / Fe)_{background}$ é relação do metal e do ferro em uma amostra padrão não contaminada, considerada como “fundo” (*background*) geoquímico (Tabela 3) (Ergin *et al.*, 1991; Loska *et al.*, 2003).

Tabela 3. Índices geoquímicos e toxicológicos (EF, I_{geo} e RAC) e suas interpretações.

Categoria*	EF^{a,b}	Grau de enriquecimento	I_{geo}^{b,c}	Grau de poluição	RAC^d	Risco
1	< 2	Nenhum-mínimo	≤ 0	Nenhum	< 1	Nenhum
2	2 – 5	Moderado	0 – 1	Nenhum-Moderado	1 – 10	Baixo
3	5 – 20	Significativamente	1 – 2	Moderado	11 – 30	Moderado
4	20 – 40	Muito alto	2 – 3	Moderado-Muito poluído	31 – 50	Alto
5	> 40	Extremamente enriquecido	3 – 4	Muito poluído	> 50	Muito alto
6			4 – 5	Muito poluído- Extremamente poluído		
7			≥ 5	Extremamente poluído		

*A categoria de cada índice por separado é indicada por números crescentes. As interpretações foram feitas segundo ^a(Ergin *et al.*, 1991), ^b(Loska *et al.*, 2003), ^c(Muller, 1969), ^d(Ghreifat and Yusuf, 2006)

As análises de ferro nos sedimentos foram feitas segundo os procedimentos descritos para o Mn, tendo como resultado Fe pseudototal ou (FI_s + FII_s + FIII_s + FIV_s + FV_s).

2.5.6 Determinação do índice de geoacumulação.

O índice geoquímico (I_{geo}) permite a quantificação da contaminação dos sedimentos de uma localidade pela comparação das concentrações de um determinado metal em um estudo atual com os níveis de uma região não contaminada, pré-industrial. Este índice pode ser definido como:

$$I_{geo} = \log_2 \left(\frac{C_n}{1,5B_n} \right),$$

onde C_n é a concentração medida do metal “n” na fração fina do sedimento (< 63 μm) e B_n é o valor geoquímico de "background" desse metal baseado na composição média dos folhelhos (rochas que possuem grãos de tamanho da argila). O fator 1,5 da equação é usado para compensar possíveis variações dos dados de "background" devido a efeitos litogênicos (conjunto de fenômenos físicos e químicos que levam à degradação e enfraquecimento das rochas) (Muller, 1969; Loska *et al.*, 2003). As diferentes categorias descritas para este índice são mostradas na Tabela 3.

2.5.7 Estimativa do risco ecotoxicológico associado à ocorrência do Mn.

A avaliação e estimativa de riscos ambientais devidos à ocorrência de metais nos sedimentos podem ser feitas pela determinação do código da estimativa de risco (RAC, sigla do inglês) (Ghrefat and Yusuf, 2006). Este índice representa a porcentagem de metais disponíveis nos sedimentos (Frações I_s e II_s) com respeito ao metal total ou pseudo-total (somatória das frações I-V) encontrado no sedimento. O RAC é definido como:

$$RAC = \left(\frac{I_s + II_s}{I_s + II_s + III_s + IV_s + V_s} \right) \% 100,$$

sendo os seus valores apresentados na Tabela 3.

2.5.8 Síntese dos complexos de Mn.

Uma solução estoque de $MnCl_2$ usada nos ensaios in vitro e com paulistinha foi preparada por dissolução do sal $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ em água milli-Q para atingir uma concentração final de 2 M. O citrato de Mn(II), $(MnCit)^-$, foi preparado pela dissolução de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ em solução de citrato (350 mM) para atingir uma concentração final de Mn^{2+} de 50 mM. Por outro lado, o citrato de Mn(III), $MnCit$, e o pirofosfato de Mn(III), $(MnP_2O_7)^-$, foram preparados segundo (Parker *et al.*, 2004) pela dissolução de acetato de Mn(III) nas respectivas soluções de citrato e pirofosfato (350 mM), para atingir uma concentração final de Mn 37,3 mM. Nos estudos com embriões de paulistinha, as condições anteriores foram alteradas para uma concentração final de citrato de 6 mM, e conseqüentemente as concentrações finais de Mn(II) e Mn(III) nos seus respectivos complexos foram de 6 mM e 3 mM respectivamente. Para todos os casos o excesso de ligante (Citrato, Cit ou Pirofosfato, PPI) foi usado para garantir a estabilidade dos complexos, como sugerido por (Klewicki and Morgan, 1998).

2.5.9 Espectroscopia UV-Visível.

As transições entre diferentes estados eletrônicos conduzem à absorção da energia no ultravioleta e no visível para muitos complexos dos metais de transição. Daí que métodos espectroscópicos que possam captar tais transições podem fornecer valiosas informações sobre o íon metálico e seus ligantes (Atkins, 2006). Neste sentido, os espectros de absorção na região do visível e ultravioleta dos complexos estudados foram obtidos em um espectrofotômetro UV/Visível modelo 1700 PharmaSpec (Shimadzu, Brasil), utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,00 cm.

2.5.10 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) tem sido aplicada com sucesso em vários sistemas para avaliar íons ou moléculas com elétrons desemparelhados (Atkins, 2006), como por exemplo nos complexos de metais de transição. Desta maneira, os compostos Mn-Cl_2 (supostamente $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$), $(\text{MnCit})^-$, MnCit e $[\text{Mn}(\text{P}_2\text{O}_7)]^-$ foram estudados em meio aquoso e em meio de cultura celular, para vários tempo de incubação (0 h, 48 h e 120 h) a 37 °C. As medidas, que visavam verificar o estado de oxidação do Mn nos respectivos complexos, foram realizadas usando um espectrômetro de EPR modelo Varian E-109 Century Series X-band a temperatura ambiente com um tempo de varredura de 8 min, frequência de 9,5 GHz (banda X), potência de 5 mW, campo central de 3365 gauss, largura de campo de 1000 gauss, amplitude de modulação de 3,2 gauss, frequência de modulação 100 kHz e ganho do receptor de 8×10^4 . Para a calibração do campo e cálculos do fator giromagnético (g) foi utilizada uma amostra padrão de MnS com valor $g = 2,0054$.

2.5.11 Voltametria Cíclica.

A voltametria é um método eletroanalítico que permite obter informações acerca de um sistema redox através de medidas de corrente elétrica em função de um potencial aplicado. De

fato, a atividade redox de complexos de Mn tem sido amplamente investigada (**Gerbaldi *et al.*, 2005**). Para efetuar as leituras no potenciostato foram utilizados eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência de Ag/AgCl preenchido com KCl e eletrodo auxiliar de aço inox. A faixa de varredura foi de -0,8 V até 1,2 V, com uma velocidade de 100 mV.s⁻¹. Fizeram-se 10 leituras, registrando-se os dados apenas da última. Para o experimento prepararam-se soluções aquosas 1 mM dos complexos de MnCl₂, (MnCit)⁻, MnCit, [Mn(P₂O₇)]⁻, citrato de sódio, (Cit)³⁻ e pirofosfato de sódio, (P₂O₇)⁴⁻; todas elas contendo quantidade suficiente de KCl para uma concentração final de 0,1 M.

2.5.12 Análises de Mn.

O Mn presente nas amostras de campo (água e sedimento), assim como nos ensaios sob condições controladas (meio aquoso onde foram expostos os embriões de paulistinha), foi quantificado por meio de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), usando as seguintes condições: potência RF 1200 W, plasma de Ar 12 L/min, Ar auxiliar 1,2 L/min, Ar nebulizador 26 psi, fluxo de introdução de amostra 1,5 mL/min, altura de observação 12 mm e linha espectral $\lambda(\text{Mn}) = 293,930$ nm (sem interferências de origem espectral e/ou de matriz, conforme a correção automática de background).

2.5.13 Cultura de células neuronais e tratamentos.

Em ratos, a neurogênese do neocórtex (CTX) acontece entre os dias 14 e 18 do período embrionário, enquanto que as células granulares do cerebelo (CGC) se desenvolvem entre os dias 0 e 15 do período pós-natal (**Bayer *et al.*, 1993**). O tecido do neocórtex ou do cerebelo é tomado em definidos estágios do desenvolvimento da neurogênese para assegurar que os neurônios não-diferenciados, em uma idade perto da última divisão mitótica celular, sejam usados para a preparação das culturas neuronais primárias. Conseqüentemente, as culturas primárias dos neurônios corticais (CTX) foram preparadas dos córtices cerebrais de fetos com 16 dias,

enquanto que a cultura de células neuronais granulares cerebelares (CGC) foram preparadas de filhotes sete dias após o nascimento (**Garcia *et al.*, 2006a**). Sendo assim, cerca de 120 milhões de células são obtidas, o que é suficiente para a preparação de aproximadamente 12 a 14 placas de 96 poços para os estudos posteriores.

A cultura primária do neocórtex é principalmente constituída por neurônios GABAérgicos e colinérgicos (**Thomas, 1985**), enquanto as células granulares do cerebelo são basicamente glutamatérgicas (**Gallo *et al.*, 1982**). Em ambos os casos, o conteúdo de astrócitos foi mantido em baixos níveis pela adição de agentes anti-mitóticos (uridina/deoxiuridina), garantindo dessa forma cultivos de quase 100 % de neurônios.

Estes experimentos foram conduzidos no Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (Espanha). Os animais foram tratados em conformidade com protocolos da Universidade de Barcelona, aprovados pela Generalitat de Catalunya, Espanha, de acordo com diretrizes da União Européia, e em conformidade com o Serviço para a Proteção dos Animais de Laboratório (OLAW) e do Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH), sob o número de identificação A5224-01,

2.5.13.1 Descrição dos tratamentos.

Tendo as células se aderido à superfície das microplacas de 6, 24 ou 96 poços, e se iniciado o desenvolvimento de neuritas, estas foram tratadas com as espécies de Mn durante o primeiro dia *in vitro* (div), quando o processo de diferenciação se inicia, e 6 div, quando os neurônios estão maduros. Os tratamentos foram conduzidos durante 5 div (120 h), usando concentrações logarítmicas na faixa de 0 a 1000 μM para cada espécie de Mn, de tal forma que a concentração mais alta pudesse induzir toxicidade apreciável, enquanto que a mais baixa não induziria perda de viabilidade ou alterações morfológicas detectáveis. Todas as experiências foram de-

envolvidas na presença e ausência de agentes neuroprotetores: ácido ascórbico 200 μM ; d,l-lactato (*Lac* 2,5, 5 e 10 mM) e probucol 3 μM) com os respectivos controles de células tratadas com água ou apenas os neuroprotetores isoladamente. A concentração final dos ligantes foi de 10 mM, que demonstrou não induzir toxicidade em estudos prévios com o citrato (Sonnewald *et al.*, 2002) e pirofosfato (Suarez *et al.*, 1995).

2.5.14 Ensaio de citotoxicidade (viabilidade celular).

A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), que é reduzido a uma formazana colorida apenas pelas células viáveis (Mosman, 1983). O ensaio foi conduzido conforme as modificações feita por (Garcia *et al.*, 2006a). Depois dos tratamentos durante 5 div, o meio de cultura com os respectivos agentes neurotóxicos e neuroprotetores foi removido, as células lavadas duas vezes com solução tampão Hanks (37 °C) e incubadas durante 1 h com 200 μL de MTT (0,25 mg/mL). Depois de remover o excesso de MTT, foram adicionados 200 μL de SDS 5 % e as células foram incubadas a 37°C durante a noite no escuro. A absorbância foi medida em 560 nm em um leitor de microplacas.

2.5.15 Avaliação do estado redox celular (ensaio de GSht/GSSG).

A avaliação do estado redox celular foi estimada através dos níveis de glutathiona total (GSht) e oxidada (GSSG), usando o método de reciclagem do ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) (Tietze, 1969). As células viáveis cultivadas em placas de 6 poços foram homogeneizadas em 150 μL do tampão PE (100 mM). O homogenato foi precipitado com ácido sulfosalicílico 2 % e centrifugado ($16000 \times g$, 5 min at 4 °C), e o sobrenadante não protéico foi usado para o ensaio de GSx. Uma alíquota de 50 μL do sobrenadante foi incubada com tampão de ensaio GSht (tampão PE, DTNB 0,8 mM e glutathiona redutase 0,32 U/mL), para um volume final de 250 μL . A reação foi iniciada pela adição de 0,6 mM de NADPH. A reação

cinética da reciclagem do DTNB foi monitorada a 412 nm durante 2 min. Para a medição de GSSG, 100 µL do sobrenadante foram tratados com 2-vinilpiridina, a qual reage covalentemente com a glutathiona reduzida (GSH), mas não com forma oxidada (GSSG) (**Rahman *et al.*, 2006**). Os valores de GSht e GSSG foram calculados através de uma curva padrão de GSH e GSSG respectivamente (0 a 25 nmol) e normalizados pela massa de proteínas (mg).

2.5.16 Captação de GABA em neurônios do córtex.

O transporte de GABA foi determinado como captação de [³H]-GABA em cultura primária de neurônios corticais. Depois dos tratamentos durante 120 h (1-6 div) em placas de 24 poços, o meio de cultura com os respectivos agentes neurotóxicos foi removido, as células lavadas duas vezes com solução tampão HBSS (35°C) e incubadas por 10 min na mesma solução tampão a 35°C contendo adicionalmente [³H]-GABA (4 nM) e GABA (10µM, que é a constante de captação (Km) aproximada para GABA em neurônios corticais) (**Vale *et al.*, 1999**). A reação foi terminada pela lavagem rápida com solução tampão previamente esfriada em gelo. As células foram digeridas com NaOH 0,2 M durante a noite. Após remover 10 µL da suspensão celular digerida, foi adicionado o líquido de cintilação sobre o restante, e a radioatividade incorporada foi determinada em um contador de cintilação. A captação específica foi determinada subtraindo-se as medidas da radioatividade realizadas na presença de 5 mM de GABA. O resultado foi expresso como desintegração por minuto (dpm) corrigido pela massa de proteínas (mg).

2.5.17 Captação de Glutamato em neurônios granulares do cerebelo.

O transporte de glutamato foi determinado como captação de [³H]-Glu em cultura primária de neurônios granulares do cerebelo. Depois dos tratamentos durante 120 h (1-6 div) em placas de 24 poços, o meio de cultura com os respectivos agentes neurotóxicos foi removido, as células lavadas duas vezes com solução tampão HBSS (37°C) e incubadas por 5 min na mesma

solução tampão a 37°C, contendo adicionalmente [^3H]-Glu (3 nM) e Glu (120 μM). A reação foi terminada pela lavagem rápida com solução tampão previamente esfriada em gelo. As células foram digeridas com NaOH 0,2 M durante a noite. Após remover 10 μL da suspensão celular digerida, foi adicionado o líquido de cintilação sobre o restante e a radioatividade incorporada foi determinada em um contador de cintilação. A captação específica foi determinada subtraindo-se as medidas da radioatividade realizadas na presença de Glu 2 mM. O resultado foi expresso como desintegração por minuto (dpm) corrigido pela massa de proteínas (mg).

2.5.18 Dosagem de proteínas.

Para padronizar as concentrações dos analitos nos testes, deve-se determinar o conteúdo protéico destas amostras. O método utilizado foi aquele descrito por (Bradford, 1976), cuja reação baseia-se na capacidade das proteínas interferirem com a absorbância do corante Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 em meio altamente ácido, resultando em modificação proporcional de cor, detectável em 595 nm. Foi usada uma curva padrão de Albumina de Soro Bovino (BSA).

2.5.19 Ensaios de toxicidade com embriões de Paulistinha (*Danio rerio*).

Os embriões foram expostos às diversas espécies de Mn, conforme descrito a seguir. Para MnCl_2 foram conduzidas uma curva de diluição (fator 2) a partir da solução estoque de MnCl_2 , para uma faixa de concentrações entre 0,75 – 400 mM. O citrato de Mn(II) foi preparado pela adição de solução estoque de MnCl_2 (fator 2) em citrato 6 mM para uma faixa de concentrações entre 0,375 – 6 mM. Finalmente o citrato de Mn(III) foi preparado por dissolução de acetato de Mn(III) em citrato 6 mM para uma faixa de concentrações entre 0,375 – 3 mM. Todas as soluções foram preparadas com água-ISO. A mesmo tempo, todos os ensaios foram conduzidos com os respectivos controles de água-ISO e citrato 6 mM. Estes experimentos foram conduzidos no Centro de Pesquisas Ambientais (UFZ) de Leipzig na Alemanha.

A linhagem de *Danio rerio* (UFZ-OBI), estabelecida de um estoque de paulistinha originalmente obtido de lojas comerciais de peixes, foi cultivada a $26\pm1^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro-escuro de 14:10 h. Os peixes foram alimentados *ad libitum* diariamente com *Artemia salina* e duas vezes com alimento comercial (Tetra, Melle, Alemanha). A coleta de embriões e a exposição destes foi conduzido, com mínimas modificações, segundo protocolos estabelecidos (Nagel, 1988; Schulte and Nagel, 1994). Para o registro de efeitos letais e sub-letais, foram expostos 10 embriões para cada concentração, com controle interno de água-ISO, em microplacas de 24 poços, colocando 2 mL de solução em cada poço. O regime de exposição foi estático e durante diferentes períodos do desenvolvimento embrionário (Fig. 9), por exemplo, de 2–50 hpf (horas após fertilização), 24–72 hpf, 24–72 hpf (ovos removidos manualmente com ajuda de pinças e agulhas-dc), 72–120 hpf e 2–122 hpf. Para as análises de expressão de genes, foram expostos 30 embriões (2–122 hpf) em placa de Petri de 70 mm com 20 mL da solução dos complexos MnCl_2 (0,675 – 6,3 mM) e Mn(II)Cit (0,325 – 2,9 mM).

Figura 9: Paulistinhas adultos (a, fêmea; b, macho); e embriões: c, 2 hpf (64 células); d, 24 hpf; e, 72 hpf.

Os resultados de mortalidade e desordens do desenvolvimento dos embriões foram usados como “pontos finais”, indicadores dos efeitos tóxicos induzidos pelas espécies de Mn. A mortalidade foi identificada por coagulação dos embriões, perda de batimento cardíaco, falha no desenvolvimento de somito ou cauda não destacada (Nagel, 2002). Os efeitos subagudos foram registrados por alterações na morfologia do corpo, avaliação qualitativa da diminuição do batimento cardíaco e respiração, e perda ou diminuição da mobilidade induzida por estímulos na região caudal em embriões de 72–122 hpf com agulha. Nas linhagens de embriões de pau-

listinha, este toque induz normalmente uma rápida e breve resposta da atividade natatória; uma perda e/ou resposta errática indica defeitos na transmissão neuromuscular e foi registrado como um efeito subagudo. Todas as experiências foram desenvolvidas ao menos em triplicatas, usando diferentes lotes de embriões e diferentes tanques. Os valores de EC50 só foram calculados para os efeitos de mobilidade a partir da porcentagem de embriões com alterações na mobilidade.

2.5.20 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

Após a cessação da exposição, os embriões foram observados com um microscópio e os embriões mortos foram removidos. O RNA total foi analisado homogeneizando-se 30 embriões com um Ultraturax em 500 µl de Trizol, de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi purificado pelo tratamento com o DNase I durante 15 min a 25°C, eliminando frações de DNA.

Tanto para RT-PCR qualitativa como para a quantitativa, o cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total, usando o kit “RevAid™ First Strand cDNASynthesis”, conforme as indicações do fabricante. Os *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) foram projetados usando-se o software “Beacon Designer” (Premier Biosoft, Palo Alto, CA). Uma lista completa dos genes e *primers* pode ser encontradas na Tabela 4. Para análises de RT-PCR qualitativas, os genes sob estudo e o de referência (*β-actin*) foram amplificados de 1 µl de cDNA, usando 1 unidade de Taq Polimerase, 50 mM Tris-HCl, pH 9,0; 1,5 mM MgCl₂, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % (v/v) Triton-X 100, 0,2 mM dNTP mix e 0,4 µM de cada *primer* para 25 µl de volume final de reação. O número de ciclos foi ajustado para que cada gene fornecesse os produtos da amplificação abaixo do nível de saturação da reação. Os fragmentos do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose, e as mudanças em níveis da expressão de gene foram avaliadas pela inspeção visual de densidades das faixas, tingidas com brometo de etídio.

Tabela 4. Detalhes dos genes e seqüências dos primers selecionadas para os estudos de expressão de gene. Os genes listados são reguladores de diversos processos fisiológicos, comportamentais e do neurodesenvolvimento, assim como outros marcadores da toxicidade crônica com metais, neurogênese, estresse oxidativo e/ou de resposta geral de estresse, os quais podem ser afetados pelo manganês. Nomenclatura segundo ZFIN.

Nome do gene	Símbolo	Nº de acesso	Seqüência do primer (5'→3')	Função ou evidência
<i>Atonal homolog 2a</i>	<i>atoh2a</i>	NM_131816	CACAACACGATGATGATAATGATG TGAGTTCCTAGACACCACAC	Neurogênese (a)
<i>Hairy-related 9</i>	<i>her9</i>	NM_131873	CAGCCGATAATATGGAGAAG GAGCATCAAGAAATGAGAGTC	Neurogênese (a)
<i>Tyrosine hydroxylase</i>	<i>th</i>	NM_131149	GACGGAAGATGATCGGAGAC CGGAAAGCCTCTAAATGTTTAC	Neurônios colinérgicos e dopaminérgicos (b)
<i>Myelin basic protein</i>	<i>mbp</i>	AY860977	CGGAGGAGACAAGAAGAG ACTTAGGACGAGGAGAGG	Regula os glia e neurônios (c)
<i>Glutamate decarboxylase 1</i>	<i>gad1</i>	NM_194419	CTGGTGGACTGTAGAGAC GCATCTTCTTGAGTGTGAG	Síntese de GABA (d)
<i>Glutamate decarboxylase 2</i>	<i>gad2</i>	BC093260	CGCATCGGACAAGATTCAG AGCAGAAGCCATCCAGAC	Síntese de GABA (d)
<i>Cytochrome c oxidase I, mitochondrial</i>	<i>mt-co1</i>	AY996924	CGCATCGGACAAGATTCAG AGCAGAAGCCATCCAGAC	Metabolismo mitocondrial e reposta de intoxicação por metais (e,f)
<i>monooxygenase, DBH-like 1</i>	<i>moxd1</i>	NM_001045206	GACGGATTACATTACTGAAGG AAGTGTCTGGCTGTGATAG	Dopamina β-monooxygenase, oxidoreductase, reposta de intoxicação por metais (g)
<i>si:dkey-204f11.62</i>	<i>si:dkey-204f11.62</i>	NM_001003500	GGCGGTTCGTGATGATAC TTGAGGCTGGAGTAATATGC	Resposta para estresse oxidativo (h)
<i>Heme oxygenase (decycling) 1</i>	<i>hmox1</i>	NM_199678	CAGTGGAGGAAGAGAATAACAG GAGGTAGCGGTGTAAGC	Resposta para estresse por compostos químicos (i)
<i>Minichromosome maintenance complex component 10</i>	<i>mcm10</i>	NM_001024813	GCACCAGCAGAGGATGATG GCCGAGATGAAGCGACAG	Regula os processos de iniciação, replicação do DNA e mantém a integridade do genoma (j)
<i>Seven in absentia homolog 2 (Drosophila)-like</i>	<i>siah2l</i>	NM_200427	CCACGGACATCAACCTAC AGTTCTCTGCTTGCTTCC	Necessário no desenvolvimento embrionário (k)
<i>Denticless homolog (Drosophila)</i>	<i>dtl</i>	NM_173241	TCTCTGCTGGACTGCTATG CCTTCTTCGTTGGCTACAG	Necessário na progressão do ciclo celular (l)
<i>BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)</i>	<i>bcl2l10</i>	NM_194398	TGGTCTCTATCTTCACATTCAC CTCTGGTTCAGTTGTCTTG	Apoptose e vários processos de sinalização celular (m)
<i>Forkhead box P2</i>	<i>foxp2</i>	NM_001030082	ACGAGCAGTGAAGTAAGC ACCTGTGGACTCATCATG	Desenvolvimento do cérebro e relacionado com comportamento (n)
<i>Gonadotropin-releasing hormone 2</i>	<i>gnrh2</i>	NM_181439	CTACAGCAGAAGATACCTCAAGAG GCACTCAGACACAGCATCAG	Desenvolvimento do cérebro e relacionado com comportamento (n)
<i>Metallothionein 2</i>	<i>mt2</i>	NM_194273	ACTAATTGCCAGTGTACTACC TCTCATCATCTCGCTCCTC	Induzido por metais e detoxificação de metais(e)
<i>Recombination activating gene 1</i>	<i>rag1</i>	NM_131389	TACCAGAAGCCTAATCCGAGTC TCATCAGCCGACGAGCATAG	Rearranjo do DNA para alterações do sistema imune (ñ)
<i>Heat shock protein, alpha-crystallin-related, b11</i>	<i>hspb11</i>	CN014934	CCTCATCTGAGCCATTCAT TGAAAGTCGTCATGGGTGAA	Resposta para estresse de caráter geral (o,p)
<i>bactin (cytoplasmatic)</i>	*bactin	AF057040	GCCAACAGAGAGAAGATGACACAG CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	housekeeping
<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>	**gapdh	GE617483	TGAATCTAGTCCATCCGCTTG TCATCAGGCAGGAAGCTA	housekeeping

^a(Bae *et al.*, 2005), ^b(Erikson *et al.*, 2007a), ^c(Kazakova *et al.*, 2006), ^d(Martin *et al.*, 1998), ^e(Gonzalez *et al.*, 2006), ^f(Cambier *et al.*, 2009), ^g(Jee *et al.*, 2007), ^h(Strausberg *et al.*, 2002), ⁱ(Weil *et al.*, 2009), ^j(Chattopadhyay and Bielinsky, 2007), ^k(Ro *et al.*, 2003), ^l(Sansam *et al.*, 2006), ^m(Arnaud *et al.*, 2006), ⁿ(Fitzpatrick *et al.*, 2005), ^ñ(Feng *et al.*, 2005), ^o(Bellyei *et al.*, 2007), ^p(Marvin *et al.*, 2008), Genes usados como controle em PCR *qualitativo e ** quantitativo.

As análises quantitativas de RT-PCR (qRT-PCR) foram feitas em um volume de reação de 10 μ l, usando Sensimix (Quantace, Finchley, UK) e 200 nM de cada *primer*. A amplificação foi conduzida em placas de 96 poços, usando um termociclador (Applied Biosystems, Darsms-tadt, Germany). Para avaliar a expressão relativa de genes, foi tomada como referência a expressão do gene *gapdh*, calculada com o software Q-Gene (Muller, 2002). A expressão relativa dos genes-alvo foi investigada em pelo menos três experimentos independentes. Os dados de expressão de genes de cada ensaio foram divididos pela média, que foi calculada entre todos os experimentos individuais. A média resultante destas séries de dados foi normalizada pelo valor do controle. Posteriormente, os valores de expressão de genes foram expressos em múltiplos do controle. A vantagem desta técnica sobre outras já usadas, como a representação dos dados como a porcentagem da expressão nos controles, é que a variação de dados de controle é visível.

2.5.21 Análises estatísticas.

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ SD, ou em alguns casos dos estudos in vitro como média $\pm$ S.E.M. Tanto os resultados in vivo como in vitro foram derivados de três experimentos individuais, a não ser que quando indicado de outra maneira. Os dados das concentrações que causam 50% de morte (LC50) ou 50 % de efeito (EC50) foram obtidos das curvas sigmoidais dose-resposta de replicatas individuais (triplicata no caso de estudos in vitro); assim como a concentração que causa 10% de morte (LC10), for calculada a partir da LC50, utilizando o software GraphPad. A normalidade do conjunto de dados foi verificada pelo teste D'Agostino & Pearson omnibus. A comparação dos conjuntos de dados foi feita com análises de correlação de Pearson's, t-test, assim como a análise de variância em uma e duas vias seguida dos testes de Tukey, Dunnes't e Bonferroni. As análises estatísticas foram feitas com o software GraphPad Prisma (GraphPad 4,0 software Inc, San Diego, CA, EUA).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Fracionamento e distribuição do Mn na bacia ALPA.

Na Tabela 5 se apresenta um resumo de vários parâmetros avaliados que podem influenciar na especiação do Mn em sistemas aquáticos. Pode ser verificado que essas águas são ligeiramente ácidas ou neutras, bem oxigenadas e brandas. Ao mesmo tempo os sedimentos são ligeiramente ácidos.

Tabela 5. Parâmetros gerais da qualidade do sistema aquático em diferentes localidades da bacia ALPA

Data	Ponto de Coleta	T (°C)		pH		OD (mg/L)	DT (mg/L CaO)	DP (mg/L CaCO ₃)	Alc. (meq/L)	Cond. (mS/cm)
		A	S	A	S	A	A	A	A	A
Agosto, 2006 (06-08)	ITAP	17,8	17,2	6,70	6,54	8-8,5	10,0	17,85	0-1,6	57,8
	PARA	18,5	17,8	7,88	7,58	8-8,5	20,0	35,70	0-1,6	75,2
	JURU	23,1	22,9	7,55	6,87	8-8,5	15,0	17,85	0-1,6	57,6
Novembro, 2006 (06-11)	ITAP	21,5	22,0	6,65	6,68	8-8,5	10,0	17,85	0-1,6	42,3
	PARA	22,0	22,2	6,87	6,51	8-8,5	30,0	17,85	0-1,6	51,4
	JURU	22,0	22,7	6,71	5,96	8-8,5	10,0	17,85	0-1,6	51,4
Fevereiro, 2007 (07-02)	ITAP	25,5	26,0	6,24	6,46	8-8,5	10,0	17,85	0-1,6	33,9
	PARA	25,0	25,2	6,37	6,75	8-8,5	10,0	17,85	0-1,6	41,6
	JURU	27,8	25,2	6,75	7,01	8-8,5	10,0	26,78	0-1,6	47,6
Abril, 2007 (07-04)	ITAP	20,8	20,2	6,32	6,16	8-8,5	10,0	17,85	0-1,6	47,0
	PARA	19,5	20,0	6,42	6,19	8-8,5	15,0	17,85	0-1,6	53,3
	JURU	22,1	23,0	6,58	6,54	8-8,5	10,0	17,85	0-1,6	52,0

t: Temperatura, OD: Oxigênio Dissolvido, A: Água, S: Sedimento, DT: Dureza Total, DP: Dureza Parcial, Alc: Alcalinidade, Cond: Condutividade (**Hernandez et al., 2009b**).

De acordo com os dados da Figura 10, a distribuição de Mn total na ALPA apresenta a seguinte ordem: ITAP $\approx$ PARA > JURU ($p < 0,05$). Neste sentido, as águas superficiais apresentaram níveis na faixa de 0,32–2,63 mg/L, que são mais altos que os reportados para essas localidades (PARA: $0,09 \pm 0,02$ mg/L; ITAP: $0,10 \pm 0,02$ mg/L; JURU: $0,01 \pm 0,01$ mg/L) (**CETESB, 2006**), e inclusive superiores aos valores aceitos pelas agências regulamentares brasileiras e internacionais (0,1–0,5 mg/L) (**CETESB, 2006**). Com respeito aos sedimentos, a concentração total de Mn (190-370 mg/kg) está abaixo do menor nível de indução de efeitos adversos na vida aquática (lowest effect level, LEL) (**MEEQ, 1993**), exceto na localidade do

rio Paranapanema durante os meses de fevereiro e abril de 2007. O Mn total foi comparável nos três pontos de amostragem, na água e nos sedimentos ($p < 0,05$) (Fig. 10-a, b).

Figura 10. Distribuição de espécies de Mn nas águas superficiais (a) e nos sedimentos (b) da ALPA durante as quatro etapas de amostragem (Agosto 2006 (06-08), Novembro 2006 (06-11); Fevereiro 2007 (07-02) e Abril 2007 (07-04). Itapetininga, Itap; Paranapanema, Para; Jurumirim, Juru. S.T: Pseudo Total (I+II+III+IV+V); LD: limite de detecção (0,6 µg/L para água e 0,6 µg/kg para sedimento); LL: menor nível (*Lower Level*) (CETESB, 2006); HL: maior nível (*Higher Level*) (CETESB, 2006); LEL: nível com menor efeito na vida aquática (MEEQ, 1993) (*Lowest Effect Level*); SEL: nível com efeitos severos na vida aquática (*Severe Effect Level*) (MEEQ, 1993). Dados de Hernandez et al. (2009).

Com poucas exceções, a abundância de espécies de Mn na coluna líquida da ALPA obedece à seguinte ordem: particulado > lábil $\approx$ não-lábil (Fig. 10-a, $p < 0,05$). Ao mesmo tempo, esses resultados confirmaram a aplicabilidade do método de complexação com a resina ChelexTM-100 como um procedimento de especiação do Mn (Tessier *et al.*, 1979; Sunda, 1984). Nos sedimentos, a distribuição de espécies de Mn segue a seguinte ordem: Mn ligado a hidr(óxidos) de Fe e Mn > Mn ligado a carbonatos $\approx$ Mn intercambiável $\approx$ Mn ligado a silicatos > Mn ligado a matéria orgânica (Fig. 10-b, $p < 0,05$).

3.2 Inferências geoquímicas

A Tabela 6 mostra as diferentes correlações existentes entre parâmetros físico-químicos e as diferentes espécies de Mn presentes nas águas e sedimentos, e também entre as espécies metálicas. Desta maneira, na estação JURU a fração I_a apresentou uma forte correlação com a fração II_a ; similar comportamento foi encontrado entre as frações I_s , II_s (ITAP, PARA) e entre os parâmetros pH_s and $Cond_a$ (ITAP). Ao mesmo tempo, a fração I_s na estação PARA esteve extremamente correlacionada com a fração II_s , mas em menor medida com a fração III_s e o pH da coluna líquida. Na estação ITAP a fração II_s encontra-se fortemente correlacionada com o pH do sedimento e a condutividade da água. Nas estações PARA e ITAP, a fração III_s ocorre em estreita correlação com o pH do sistema aquático e a condutividade da água.

Tabela 6: Inter-relações entre espécies de Mn e parâmetros físico-químicos na ALPA, conforme os coeficientes de correlação de Pearson ($p < 0,05$), (Hernandez et al., 2009b).

	Estação	I_a	II_a	III_a	I_s	II_s	III_s	IV_s	pH_a	pH_s	$Cond_a$
I_a	Itap	1,00									
	Para	1,00									
	Juru	1,00									
II_a	Itap	-0,88	1,00								
	Para	-0,73	1,00								
	Juru	0,33	1,00								
III_a	Itap	0,81	-0,47	1,00							
	Para	0,74	-0,23	1,00							
	Juru	0,84	0,64	1,00							
I_s	Itap	0,78	-0,84	0,32	1,00						
	Para	-0,79	0,88	-0,59	1,00						
	Juru	0,60	-0,38	0,46	1,00						
II_s	Itap	0,64	-0,83	0,08	0,96	1,00					
	Para	0,71	-0,50	0,19	-0,24	1,00					
	Juru	0,37	-0,76	-0,04	0,80	1,00					
III_s	Itap	0,30	-0,70	-0,21	0,46	0,65	1,00				
	Para	0,60	-0,98	0,07	-0,82	0,40	1,00				
	Juru	0,69	-0,14	0,21	0,33	0,59	1,00				
IV_s	Itap	0,81	-0,99	0,35	0,82	0,85	0,80	1,00			
	Para	0,81	-0,95	0,49	-0,98	0,38	0,90	1,00			
	Juru	0,84	0,72	0,99	0,36	-0,12	0,24	1,00			
pH_a	Itap	0,35	-0,61	-0,23	0,85	0,94	0,62	0,66	1,00		
	Para	0,13	-0,72	-0,50	-0,36	0,33	0,82	0,50	1,00		
	Juru	0,09	-0,15	-0,36	-0,34	0,18	0,73	-0,27	1,00		
pH_s	Itap	0,93	-0,95	0,54	0,94	0,88	0,52	0,92	0,68	1,00	
	Para	0,26	-0,84	-0,19	-0,68	0,07	0,92	0,74	0,87	1,00	
	Juru	-0,25	0,64	-0,13	-0,93	-0,82	-0,11	-0,02	0,41	1,00	
$Cond_a$	Itap	0,82	-0,98	0,33	0,91	0,93	0,73	0,98	0,77	0,96	1,00
	Para	0,05	-0,71	-0,34	-0,55	-0,09	0,82	0,60	0,86	0,98	1,00
	Juru	-0,26	-0,68	-0,73	-0,15	0,47	0,51	-0,71	0,81	0,02	1,00

Tabela 7: Fe pseudototal e Fe de fundo (mg/kg)

	Agosto 2006	Novembro 2006	Fevereiro 2007	Abril 2007	Fundo
ITAP	6351,5	16520,5	13891,2	12815,0	47200,0
PARA	22100,9	34321,9	26262,8	34740,6	
JURU	22979,4	30773,1	23613,8	23613,8	

A Figura 11 mostra uma dependência espaço-temporal de vários parâmetros geoquímicos e ecotoxicológicos do Mn na ALPA, onde $EF < 2$, $I_{geo} < 0$ e o RAC ~30% em fevereiro 2007 (final do período chuvoso) e são ligeiramente incrementados nas restantes datas de amostragem.

Figura 11: Fator de enriquecimento, EF (a), Índice geoquímico, I_{geo} (b) e Código de avaliação de risco, RAC (c), para o Mn na ALPA. (Agosto 2006 (06-08), Novembro 2006 (06-11); Fevereiro 2007 (07-02) e Abril 2007 (07-04)); Itapetininga, Itap; Paranapanema, Para; Jurumirim, Juru. (Hernandez *et al.*, 2009b)

3.3 Seleção de espécies de Mn potenciais para estudos toxicológicos.

Os nossos resultados sugerem que na bacia ALPA o Mn encontra-se em constante troca entre a coluna líquida e o sedimento, ligado a moléculas inorgânicas (H_2O , Cl^- , CO_3^{2-} , HCO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , $(\text{P}_2\text{O}_7)^{4-}$) ou orgânicas (citrato, aminoácidos, detergentes, etc) e apresentando moderados riscos ecotoxicológicos, que devem ser caracterizados. Neste sentido, foi sugerido estudar o Mn(II) “livre”, Mn(II)Cit, Mn(III)Cit e Mn(III)PPi (onde Cit: Citrato e PPi: Pirofosfato), considerando o potencial neurotoxicológico dessas espécies (Reaney *et al.*, 2002; Aschner *et al.*, 2007) e a escassez de estudos do papel da especiação química do Mn para sua toxicidade em sistemas aquáticos (Howe *et al.*, 2004).

3.4 Caracterização espectroscópica dos complexos de Mn.

A Figura 12a apresenta os espectros eletrônicos na região de 350–600 nm para Mn(III)Cit e Mn(III)PPi. Adicionalmente, a Figura 12b(1–6) apresenta vários espectros de EPR do composto MnCl_2 (Mn^{2+}), o qual é um sistema de alto spin (d^5 , $S=5/2$), com seis sinais equivalentes, equidistantes e centrados em $g = 2$. Este padrão não se altera sob incubação em meio aquoso a 37°C (Fig.12b 1-3). Entretanto, uma incubação na mesma temperatura, mas com meio de cultura celular induz uma diminuição na intensidade do sinal (Fig.12; 4-6). Estudos preliminares demonstraram que o Mn(II)Cit, embora apresente uma diminuição de intensidade no sinal de EPR, tem perfil similar ao do MnCl_2 , o que é compatível com um complexo de Mn(II). Por outro lado, os espectros 7–16, obtidos em meio aquoso e em meio de cultura celular, apresentaram um padrão característico de um sistema de alto spin Mn^{3+} (d^4 , $S = 2$), que é “silencioso” no EPR em frequências baixas (9,5 MHz) (Goldberg *et al.*, 1997).

Figura 12: a) Espectros eletrônicos das espécies de Mn(III) e seus respectivos ligantes. b) Espectros de EPR (a temp. ambiente depois de incubações a 37°C) de: MnCl_2 2 mM em solução aquosa (1 – 3; 0 h, 48 h e 120 h) e em meio de cultura (4 – 6; 0 h, 48 h e 120 h); Mn(III)PPI 1 mM em solução aquosa (7, 9, 11; 0 h, 48 h e 120 h) e em meio de cultura (8, 10; 0 h e 48 h); Mn(III)Cit 1 mM em solução aquosa (12, 14, 16; 0 h, 48 h e 120 h) e em meio de cultura (13, 15; 0 h e 48 h).

3.5 Caracterização voltamétrica dos complexos de Mn.

Consistente com as caracterizações feitas mediante UV-Vis e EPR, os complexos sintetizados apresentaram diferentes comportamentos eletroquímicos (Fig. 13). O íon Mn(II) “livre” apresenta dois processos redutivos e dois processos oxidativos reversíveis entre 0 – 1 V. A presença de complexantes (como o citrato) diminui o coeficiente de difusão do metal, diminuído a intensidade da corrente (**Habib *et al.*, 2006**). Das espécies trivalentes, o Mn(III)Cit mostrou processos de oxi-redução entre 0,5 – 1 V, enquanto que O Mn(III)PPI não apresentou processos eletroquímicos identificáveis nas condições de trabalho.

Figura 13: Voltamogramas dos complexos de Mn e os respectivos ligantes ($0,1 \text{ V.s}^{-1}$; 10 varreduras) vs Ag/AgCl.

3.6 Caracterização dos riscos neurotoxicológicos do Mn no desenvolvimento: Importância da especiação do Mn, o tipo de células alvo e o grau de desenvolvimento.

A neurotoxicidade do Mn é um dos maiores problemas ambientais desse metal (**Rovetta et al., 2007; Saric and Lucchini, 2007**). Neste sentido, foi avaliada in vitro e in vivo, a neurotoxicidade do Mn durante o desenvolvimento, considerando a influência:

- i) Da especiação química do metal (tipo de ligante e/ou estados de oxidação). Nesse sentido, sabe-se que em solução aquosa e pH fisiológico o Mn^{2+} é estável, entretanto o Mn^{3+} é um agente oxidante, e pode se desproporcionar em Mn^{2+} e Mn^{4+} ou (IV) (**Michalke et al., 2007**) de acordo com o esquema:

- ii) Do tipo de células neuronais.
- iii) Do grau de diferenciação celular.
- iv) Do grau de desenvolvimento embrionário.

3.6.1 Células granulares do cerebelo em estado inicial da diferenciação celular são mais vulneráveis à neurotoxicidade induzida pelo Mn.

Células granulares do cerebelo (CGC) de uma cultura primária foram expostas a MnCl_2 , $(\text{Mn(III)Cit})^-$, Mn(III)Cit e Mn(III)PPi durante 5 dias in vitro (div), começando no 1 div (período inicial de diferenciação celular, quando as células cultivadas começam a produzir neurites) ou começando no sexto div. Segundo **Suñol et al. (2008)**, estas células estão próximas da maturidade, com uma rede de neurites interconectadas e expressão de transportadores e receptores funcionais para neurotransmissores. A Figura 14 apresenta os valores de LC50 para diferentes espécies de Mn em CGC, para dois estados de diferenciação celular. A toxicidade mais alta foi encontrada em células expostas durante os estados iniciais do desenvolvimento

(1-6 div). A espécie Mn(III)PPi foi a menos tóxica para ambos os estados de diferenciação celular ($p < 0,05$, ANOVA seguido do teste de Tukey).

Figura 14: Neurotoxicidade induzida pelas espécies de Mn em células granulares do cerebelo (CGC) após 120 h de tratamento. As células foram expostas em diferentes períodos de desenvolvimento durante a diferenciação celular (1-6 div) e após a diferenciação celular (6-11 div). Valores representam (média $\pm$ S.E.M). * $p < 0,05$, ** $p < 0,0001$. Mn(III) pyrP = Mn(III)PPi (Hernandez et al., 2009a)

3.6.2 Células granulares do cerebelo (CGC), em estado inicial da diferenciação celular, são mais vulneráveis que as células corticais (CTX) à neurotoxicidade induzida pelo Mn.

Sabendo-se que CGC não diferenciadas são mais vulneráveis às espécies de Mn, um estudo comparativo foi feito entre CGC e CTX, para o mesmo estado de diferenciação (Fig. 15). Na Tabela 8 podem ser encontrados os valores de LC₅₀ para as espécies metálicas, em 1-6 div. Estas foram significativamente diferentes entre os modelos celulares, exceto Mn(III)PPi, sugerindo que CGC são mais vulneráveis que CTX para a toxicidade induzida pelo Mn.

Figura 15: Curvas dose-resposta (viabilidade celular) para as espécies do Mn em células granulares do cerebelo (CGC) (■) e células granulares do neocórtex (CTX) (▲). As células (1-6 div) foram expostas por 120 horas. Os valores representam (média $\pm$ S.E.M) de três experimentos independentes, cada um feito em triplicata.

Tabela 8: Citotoxicidade (LC50 em μM) induzida pelas espécies de Mn em cultura primária de neurônios granulares cerebelares (CGC) e neurônios do córtex (CTX). As células foram expostas durante 120 horas, iniciando o primeiro dia in vitro (1- 6 div).

Espécies de Mn	CGC	CTX
$MnCl_2$	27 ± 2 (13)	180 ± 90 (3) *
$Mn(II)Cit$	36 ± 4 (3)	132 ± 12 (2) *
$Mn(III)Cit$	24 ± 6 (4)	261 ± 41 (3) *
$Mn(III)PPi$	48 ± 11 (3)	69 ± 17 (4)

Resultados apresentados como média $\pm$ sd; (número de experimentos). Diferenças entre os grupos foram determinadas mediante análise de variância em duas vias seguida do t-test.

3.6.3 O Mn não altera o metabolismo da glutathiona em neurônios.

O estresse oxidativo é um dos mecanismos previstos da toxicidade do Mn, e a glutathiona é uma importante molécula de defesa antioxidante celular. Neste sentido, foi verificado se os diferentes níveis de glutathiona determinados em CTX e CGC poderiam ser a causa da diferen-

ça de vulnerabilidades encontrada. Análises de GSH (glutathiona reduzida) e GSSG (glutathiona oxidada) foram feitas, porém GSSG não foi detectada, motivo pelo qual foi desconsiderada, sendo reportados os resultados como glutathiona total (GSht), Figura 16.

Figura 16: Níveis de glutathiona total intracelular após os tratamentos com as diferentes espécies do Mn. Células granulares do cerebelo (CGC) (A-B) e células neocorticais (CTX) (C-D). As células (1-6 div) foram expostas por 120 horas. Os valores representam (média $\pm$ SD) de 4-6 experimentos independentes. (Farina et al., 2008; Hernández et al., 2009a).

Os níveis de GSht em células controle foram 113 ± 17 e 216 ± 29 nmol GSht/mg proteína em CGC e CTX, respectivamente ($p < 0,01$; $n = 8-10$). Para aquelas concentrações das espécies do Mn que não produziram efeitos citotóxicos importantes, não houve diminuição nos níveis de GSht em ambos os tipos de células, exceto para CGC, quando expostas para $Mn(III)Cit$, Figura 16. Apesar de se observar uma tendência para o aumento nos níveis de GSht nas concentrações mais baixas de Mn, este aumento não alcançou valores estatisticamente significativos.

3.6.4 O Mn parece não induzir excitotoxicidade.

A alteração no metabolismo de neurotransmissores, seguido de excitotoxicidade, é outra das hipóteses consideradas para explicar a neurotoxicidade do Mn. Neste sentido, nós quisemos

saber se a captação de neurotransmissores poderia estar associada com a perda de viabilidade celular observada em CGC e CTX, após os tratamentos com as espécies de Mn. Avaliaram-se o ácido gama-aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibidor e um dos principais reguladores da excitabilidade neuronal ao longo de todo o sistema nervoso, bem como o glutamato, um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso. Porém, em concentrações abaixo daquelas que induzem uma significativa perda da viabilidade celular, o Mn não provoca eventos de excitabilidade via incremento na captação de neurotransmissores (Figura 17).

Figura 17: Captação de glutamato em CGC (célula glutamatérgica), após tratamento com MnCl₂ (A) e captação de GABA em CTX (célula GABAérgica), após tratamento com MnCl₂ e Mn(III)Cit (B-C). As células (1-6 div) foram expostas por 120 horas (1-6 div). Os valores representam (média ± SD) de dois experimentos independentes, cada um foi feito em triplicata.

3.6.5 A neurotoxicidade induzida pelo Mn é reduzida por ácido ascórbico e lactato: implicações para o mecanismo de neurotoxicidade do Mn.

O ácido ascórbico (AA, 200 μM) protege CGC da neurotoxicidade induzida por ambos os estados de oxidação do Mn (MnCl_2 e Mn(III)Cit , Fig. 18A e 18B). Entretanto, AA foi menos efetivo contra a neurotoxicidade induzida pelo Mn em CTX (Fig. 19A). Estudos com outro reconhecido antioxidante, o probucol (3 μM) não ofereceu proteção contra a neurotoxicidade causada pelo Mn; o probucol inclusive exacerba a neurotoxicidade do Mn quando em baixas concentrações (Fig. 20).

Figura 18: Viabilidade celular avaliada pelo ensaio do MTT, onde a neurotoxicidade induzida pelo Mn é reduzida por ácido ascórbico, AA (A e B) e lactato, Lac (C e D em células granulares do cerebelo. As células (1-6 div) foram expostas a MnCl_2 (A e C) ou Mn(III)Cit (B e D) durante 120 horas. Os valores representam (média $\pm$ S.E.M) de três experimentos independentes, cada um feito em triplicata. As diferenças significativas entre os tratamentos (barra em preto: Mn na ausência de neuroprotetores AA ou Lac; barra em branco: Mn com neuroprotetores) foram confirmadas com análises de ANOVA em duas vias, seguido do teste de Dunnet. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ com respeito ao controle correspondente; + $P < 0,05$ e ++ $P < 0,01$ indica diferenças entre tratamentos para mesma concentração de Mn (ANOVA em uma via, seguido do teste de Dunnet) (Hernandez et al., 2009a)

O ácido láctico (Lac) protege contra a neurotoxicidade induzida pelo Mn em CGC (Fig. 18C e 18D) e em CTX (Fig. 19B). Adicionalmente, a combinação do ácido ascórbico e ácido láctico protege CTX contra os efeitos adversos do Mn (Figura 19C), contrastando com a ineficiência do AA isoladamente (Fig. 19A).

Figura 19: Viabilidade celular avaliada pelo ensaio do MTT, onde a neurotoxicidade induzida pelo Mn é reduzida por ácido ascórbico, AA (A), lactato, *Lac* (B) e AA + *Lac* (C) em células neocorticais (CTX). As células (1-6 div) foram expostas por 120 horas a MnCl₂ ou Mn(III)Cit. Os valores representam (média ± S.E.M) de três experimentos independentes, cada um feito em triplicata. As diferenças significativas entre os tratamentos (barra em preto: Mn na ausência de neuroprotetores AA, *Lac* ou AA + *Lac*; barra em branco: Mn com neuroprotetores) foram confirmadas com análises de ANOVA em duas vias, seguido do teste de Dunnet. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ com respeito ao controle correspondente; ■ $P < 0,05$ e ♦ $P < 0,01$ indica diferenças entre tratamentos para mesma concentração de Mn (ANOVA em uma via, seguido do teste de Dunnet) (Hernandez et al., 2009a)

Figura 20: Viabilidade celular avaliada pelo ensaio do MTT, onde o probucol não atenua (e em alguns casos exacerba) a neurotoxicidade induzida pelo Mn em células neocorticais (A e B) ou em células granulares do cerebelo (C e D). As células (1-6 div) foram expostas a $MnCl_2$ (A e C) ou $Mn(III)Cit$ (B e D) durante 120 horas. Os valores representam (média $\pm$ S.E.M) de três experimentos independentes, cada um feito em triplicata. As diferenças significativas entre os tratamentos (barra em preto: Mn na ausência de probucol; barra em branco: co-administração de Mn e probucol) foram confirmadas com análises de ANOVA em duas vias, seguido do teste de Dunnet. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ com respeito ao controle correspondente; ♦ $< 0,05$ indica diferenças e Dunnet's).

3.6.6 Mn induz toxicidade em embriões de *Danio rerio*: Importância da especiação química e do grau de desenvolvimento embrionário.

A toxicidade das espécies de Mn(II) e Mn(III) foi analisada comparando períodos diferentes de exposição dentro dos primeiros dias do desenvolvimento embrionário. Nestes estudos, uma precaução importante é a quantificação do metal presente no meio de cultura, e a verificação de seus teores no início e fim dos experimentos, para averiguar a eventual existência de acumulação ativa de Mn pelos embriões. De acordo com os dados da Tabela 9, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de Mn calculadas e as determinadas no meio de cultura; neste último caso tampouco houve diferenças entre a concentração inicial e

final do período de exposição, independentemente da duração do tratamento. Isto sugere que os danos observados nos embriões não estão associados a processos de bioacumulação.

Tabela 9: Resultados de análises de Mn no meio de cultura dos embriões

Desenvolvimento embrionário, hpf (Tempo de exposição, h)	Concentração Calculada de Mn (mM)	Concentração de Mn (mM) no meio de cultura			
		Antes		Depois	
		Média	sd	Média	sd
72-120 hpf (48 h)	MnCl ₂				
	0			0,00	0,00
	2,5			2,81	0,01
	5			5,26	0,03
	10			10,83	0,07
	15			16,34	0,19
2-122 hpf (120 h)	MnCl ₂				
	0	0,00	0,00	0,07	0,01
	0,68	0,71	0,05	0,96	0,41
	1,35	1,21	0,20	1,09	0,26
	2,70	2,68	0,02	2,71	0,02
	6,30	6,29	0,02	6,30	0,03
	Mn(II) Cit				
	0	0,00	0,00	0,00	0,00
	Cit	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,33	0,34	0,02	0,35	0,00
	0,65	0,66	0,01	0,64	0,01
	1,30	1,31	0,02	1,31	0,03
	2,90	3,02	0,17	3,09	0,07

A fim de excluir possíveis ambigüidades dos efeitos que pudessem ser atribuídas à presença do ovo, alguns experimentos foram desenvolvidos com embriões removidos manualmente dos ovos (sem córion, dc). Para o MnCl₂, representando o Mn(II) “livre”, a LC50 oscilam entre 3–100 mM, sendo observada a mais alta toxicidade para o período pós-eclosão (>72 hpf) ou para embriões removidos manualmente dos ovos (Figura 21). Desta maneira, a ordem de sensibilidade embrionária para a toxicidade do MnCl₂ foi a seguinte: 2–122 hpf > 72–120 hpf > 24–72(dC) > 24–72hpf ≈ 2–50hpf.

Figura 21: Estudo comparativo da toxicidade das espécies de Mn (LC50) em embriões de *Danio rerio* de diferentes estados de desenvolvimento e diferentes tempos de exposição ao Mn. dC: embriões sem córion (removidos manualmente dos ovos; a eclosão acontece entre 48 e 72 hpf). Resultados de tratamentos que não apresentam a mesma letra nas mesmas condições são estatisticamente diferentes uns dos outros ($p < 0,05$). Toxicidade significativa induzida pelo Mn(II)Cit foi detectada somente entre 2-122 hpf. Barras representam LC50 (média $\pm$ desvio padrão) de três experimentos independentes.

Estudos da letalidade dos embriões frente às espécies Mn(II)Cit e Mn(III)Cit foram conduzidos, mas quando o citrato foi testado isoladamente, induziu significativa toxicidade para concentrações ≥ 10 mM (dados não apresentados). Esta situação limitou o uso do citrato livre na concentração máxima de 6 mM, e conseqüentemente as concentrações máximas que puderam ser testadas do Mn foram de 6 mM para o Mn(II)Cit e 3 mM para o Mn(III)Cit respectivamente. É sabido que o Mn^{3+} é relativamente estável em solução na presença de excesso de ligante (Klewicki and Morgan, 1998), o que justifica ter sido testado a uma relação molar menor. Sob essas condições foi encontrada uma LC50 de $3,34 \pm 0,19$ mM para o Mn(II)Cit no período de exposição 2–122 hpf (Figura 21), a qual é discretamente menor que a encontrada para MnCl₂ ($p = 0,08$), porém o teste de análises de variâncias revelou que ambos conjuntos são diferentes ($p < 0,01$). Entretanto, a espécie Mn(III)Cit induziu apenas 10% de letalidade, não sendo possível determinar a LC50.

Figura 22: Resumo de efeitos subletais induzidos pelas diferentes espécies de Mn em embriões de *Danio rerio*. **dC:** embriões removidos manualmente dos ovos, **mot:** mobilidade reduzida ou alterada em resposta a estímulo na cauda, **rht:** batimento cardíaco reduzido, **bd:** deformação corporal, **pce:** edema pericárdico

O Mn induz vários efeitos subagudos tais como edema pericárdico, redução da batida de coração e alterações no movimento espontâneo ou estimulado dos embriões (Fig. 22). Os efeitos observados e as concentrações de Mn capazes de induzi-los foram dependentes do período de exposição e da especiação do Mn. Em alguns casos, somente uma débil e não clara dependência dose-resposta foi observada (por exemplo, redução da batida de coração devido aos efeitos do Mn(II)Cit). A redução da mobilidade estimulada dos embriões foi o mais comum e mais relevante efeito subagudo e, portanto, a EC50 foi calculada baseada neste efeito. Os valores de EC50 oscilaram no intervalo de $0,54 \pm 0,82$ mM a $1,43 \pm 0,41$ mM (Fig. 23).

Figura 23: Estudo comparativo da redução da mobilidade estimulada (EC50) em embriões de *Danio rerio* de diferentes estados de desenvolvimento e diferentes tempos de exposição após serem expostos a MnCl₂ e Mn(II)Cit. dC: embriões sem córion (removidos manualmente dos ovos; a eclosão acontece entre as 48 e as 72 hpf). Resultados de tratamentos que não apresentam a mesma letra nas mesmas condições são estatisticamente diferentes uns dos outros ($p < 0,05$). * ($p < 0,05$) indica diferença significativa entre as espécies de Mn. Barras representam EC50 (media $\pm$ desvio padrão) de três experimentos independentes

Quando comparadas ambas as espécies metálicas, com respeito as EC50 (redução da mobilidade estimulada) somente para embriões de 72-120 hpf, foram detectadas diferenças significativas, com MnCl₂ mais tóxico do que Mn(II)Cit. Porém, o ranking de toxicidade baseado nos valores de EC50 não mostrou diferenças significativas em embriões expostos a MnCl₂.

Entretanto o Mn(II)Cit continua sendo mais tóxico para exposições prolongadas, embora não tenham sido encontradas diferenças entre embriões expostos 24-72dc hpf e 2-122 hpf (Fig.23). No entanto, quando comparadas as LC50 e as EC50 (LC50/EC50), as EC50 mostraram uma elevada sensibilidade, com fatores entre 17 e 7 para o MnCl₂ e na ordem de 4 para o Mn(II)Cit (Fig. 24).

Figura 24: Sensibilidade dos embriões de paulistinha a MnCl₂ e Mn(II)Cit, com respeito ao período de desenvolvimento. Dados referidos como a razão LC50 /EC50.

3.6.7 Efeitos do Mn na expressão de genes em embriões de *Danio rerio*.

O termo expressão gênica refere-se ao processo em que a informação codificada por um determinado gene é utilizada para a construção de uma proteína. Teoricamente, a regulação em qualquer uma das etapas desse processo pode levar a uma expressão gênica diferencial. Neste sentido, foi analisada a expressão de 19 genes (Tabela 4), como potenciais indicadores de alguma rota genética envolvida na toxicidade das espécies MnCl₂ e Mn(II)Cit para embriões de *Danio rerio* de 2–122 hpf, período de maior sensibilidade. A expressão desses genes foi analisada preliminarmente de forma qualitativa (RT-PCR convencional) em embriões expostos à LC50 para o MnCl₂ e LC10 para o Mn(II)Cit e duas diluições (0,68 mM e 0,325 mM) como as concentrações mais baixas a serem testadas. Nesta etapa, três genes (*gad1*, *mt-col* e *hspb11*) apresentaram uma expressão diferencial, e foram analisados quantitativamente por RT-PCR (Figura 25).

Figura 25: Expressão de genes (*gad1*, *mt-co1* e *hspb11*) em embriões de *Danio rerio*. A expressão relativa de genes foi analisada quantitativamente RT-PCR em embriões expostos de 2-122 hpf para diferentes concentrações de $MnCl_2$ (A) ou $Mn(II)Cit$ (B). Como o $Mn(II)Cit$ é preparado com citrato 6 mM, foram incluídos controles de citrato (6 mM) e sem citrato (água-ISO). Os dados de $Mn(II)Cit$ foram normalizados com respeito ao controle de citrato. *gad1* (glutamato decarboxilase 1), *mt-co1* (citocromo c oxidase mitocondrial I) e *hspb11* (proteína de choque térmico b11 “ α -Crystallin-Related”). Barras representam (média $\pm$ desvio padrão) de três experimentos independentes. ★ = $p < 0,05$ e ★★ = $p < 0,01$ indicam diferenças significativas com respeito ao respectivo controle (para $Mn(II)Cit$, foi considerado o citrato).

Apenas o *hspb11* e *mt-co1* apresentaram expressões significativamente diferentes dos respectivos controles quando estudados por RT-PCR quantitativo. Enquanto que a expressão do *hspb11* foi induzida quase três vezes mais por ambas as espécies de Mn, o gene *mt-co1* apresentou um padrão de expressão menos claro. Para tratamentos com $MnCl_2$ foi observada uma repressão de 1,4 vezes. Em contraste, o $Mn(II)Cit$ induziu a síntese do gene por um fator de 3, na concentração mais alta testada (Figura 25).

CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO

4.1 Na bacia ALPA, O Mn está presente principalmente nos sedimentos.

Este é primeiro estudo de especiação de metais na bacia ALPA, e especificamente do Mn. Conforme os parâmetros físicoquímicos avaliados e apresentados na Tabela 5, as águas desta bacia são fortemente oxigenadas, ligeiramente ácidas, brandas e com presumível equilíbrio dos íons carbonatos ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$). Sob essas condições, a especiação do Mn deve estar dominada principalmente por hidr(óxidos), a seguir por aquo-complexos, carbonatos e em menor proporção, por outros complexos inorgânicos e orgânicos. Essas condições também são propícias para eventos de precipitação de metais. Consistente com isto, os maiores teores de Mn foram encontrados nos sedimentos (Fig. 10), como sugerido por **Buffle e DeVitre (1994)**.

A concentração total de Mn na coluna líquida da bacia ALPA esteve no intervalo 0,32 – 2,63 mg/L (Fig. 10-a), que é mais alta que a encontrada em estudos prévios, e que em valores indicados como aceitáveis pelas autoridades ambientais brasileiras (0,1 mg/L) (**CETESB, 2006**). Isto é um resultado que preliminarmente deve ser considerado com certa atenção, dado que 1 mg/L de Mn em águas brandas pode ser tóxico para os organismos aquáticos (**Howe et al., 2004**), assim como estudos epidemiológicos têm associado um aumento de desordens neurológicas durante o desenvolvimento pela exposição hídrica ao Mn a concentrações acima de 0,4 mg/L (**Wasserman et al., 2006**).

O predomínio de Mn particulado ($> 0,45 \mu\text{M}$) na coluna líquida foi mais evidente em ITAP, seguido de PARA e JURU. Coincidentemente, os rios estudados são mais poluídos que o reservatório Jurumirim (**CETESB, 2006**). A formação de Mn particulado é favorecida para pH $> 6,5$ e elevado teor de oxigênio dissolvido (**Howe et al., 2004**). Consistentemente, tem sido amplamente descrito que o Mn é sequestrado por argila e partículas coloidais (com grupos carboxilatos ou grupos hidroxilas disponíveis), seguido de sedimentação, sendo esse o princi-

pal mecanismo regulador das concentrações de Mn em sistemas aquáticos (**Buffle and DeVitre, 1994**). Além disso, fatores físicos que aumentam a turbulência das águas, tais como ondas e correntezas, podem favorecer fenômenos de trocas de espécies metálicas entre o sedimento e a coluna líquida (**Buffle and DeVitre, 1994**) e conseqüentemente contribuir para o aumento de material particulado na coluna líquida. Eventos dessa natureza foram mais evidentes nos rios (ITAP e PARA) do que na represa (JURU), o que foi consistente com os altos níveis da fração I_a nas estações ITAP e PARA (Fig. 10-a) durante o período chuvoso (entre os meses de Novembro 2006 e Fevereiro 2007), como descrito por outros autores (**Howe et al., 2004**). Adicionalmente, o período destacado pode ter aumentado os processos descritos anteriormente, assim como processos de lixiviação de metais das margens desses rios, levemente erodidas, o que certamente aumentaria a quantidade de metal nos corpos d'água.

As espécies lábeis do Mn (fração II_a), na faixa de 0,005 – 0,13 mg/L, foram observáveis principalmente em pH 6,2 – 8, podem estar relacionadas à presença de complexos de Mn com ligantes de baixa massa molecular (OH, H_2O , aminoácidos, citrato, pirofosfato, CO_3^{2-} , HCO_3^- e outros) ou com macromoléculas orgânicas (ácidos fúlvicos e proteínas) (**Hart and Davies, 1977; Sunda, 1984; Buffle and DeVitre, 1994**), os quais são menos estáveis do que os complexos de Mn com ChelexTM, em pH neutro ou básico (**Sunda, 1984**). Por outro lado, a quantidade de Mn removido com Chelex (fração III_a) foi menor que a calculada na fração II_a , sugerindo que o Mn dissolvido esteve majoritariamente complexado na coluna de água como espécies lábeis.

O Mn na fração intercambiável (I_s) dos sedimentos sugere uma degradação parcial de outras frações, o que está conectado provavelmente com diversas reações diagenéticas (processos químicos, físicos, e mudanças mineralógicas que podem ocorrer nos sedimentos durante e após o depósito de metais) (**Buffle and DeVitre, 1994**), assim como à sedimentação recente do metal, principalmente da fração I_a . De acordo com essas observações, o valor mais elevado

da fração I_s foi encontrado na estação de amostragem PARA (Fig. 10), talvez devido à condutividade ligeiramente mais elevada para pH neutro-básico (Agosto e Novembro de 2006) e/ou a ligeira acidez das águas e dos sedimentos (Fevereiro e Abril de 2007; Tabela 5). Como discutido em parágrafos anteriores, mecanismos de agitação também podem levar à liberação do metal das frações do sedimento, aumentando os níveis do Mn dissolvido ou suspenso. É sabido que o $MnCO_3$ é a principal fonte de Mn em águas neutras ou alcalinas, e em virtude da abundância de CO_2 em muitos sistemas aquáticos, essa seria a principal espécie do Mn(II) a ser encontrada, a menos que se aumentasse o pH e as condições oxidantes (**Barceloux, 1999**).

Os hidr(óxidos) de Mn e Fe são outras formas ambientalmente importantes do Mn encontrados em todos os locais estudados (Fig. 10 b), em conformidade com a natureza oxidante destes sistemas aquáticos (Tabela 5) e a prevalência de metal particulado (Fig. 10a) na bacia ALPA. O Mn ligado aos silicatos foi a fração de menor relevância ecotoxicológica para a bacia ALPA, dado que esta fração é menos alterada pelas condições ambientais encontradas neste estudo, conforme trabalhos prévios (**Tessier et al., 1979**). Mn ligado à matéria orgânica (fração IV_s) foi a fração menos presente nas estações de amostragem (Fig. 10 b), o que está de acordo com outros estudos (**Lazerte and Burling, 1990**). No entanto, os nossos resultados contrastam com os de trabalhos prévios em ambientes ligeiramente alcalinos, onde o Mn mostrou uma tendência para estar associado à matéria orgânica (**Hsu and Lo, 2001**). Porém, sob condições oxidantes, a matéria orgânica pode ser degradada, sendo liberado o metal, como descrito por outros investigadores (**Buffle and DeVitre, 1994**). De fato, esta espécie do metal deve contribuir à dinâmica da troca do metal entre a água e o sedimento.

processos biológicos ou transporte físico (ondas, correntezas e/ou turbulências das águas), mas com pouca contribuição do metal dissolvido, o que justificaria parcialmente os baixos valores de condutividade. Ao mesmo tempo, a forte correlação existente entre as frações I_a ou III_a e IV_s sugere a ocorrência de transporte do metal entre os sedimentos e as águas (ver Tabela 6).

Rios Itapetininga e Paranapanema: As correlações entre as frações $I_a - III_a$ e $I_a - IV_s$ podem ser da mesma natureza daquelas descritas para Jurumirim. Baixa dureza das águas, pH ligeiramente alcalino e $OD > 8$ favorecem a formação de hidr(óxidos) e/ou pequenas quantidades de carbonatos, os quais devem formar camadas de sedimentos recentes, através de I_a , seguido por precipitação e enriquecimento das frações I_s e II_s . Ao mesmo tempo, através de processos físicos, a fração I_a pode ser enriquecida por redissolução dos sedimentos, e posteriormente sedimentada de volta, com o que fecharia um ciclo. Essas suposições são apoiadas pela forte correlação entre I_a e as frações I_s e II_s (PARA) e entre fração $II_s - III_s$ na estação (ITAP). Por outro lado, os processos de mineralização e dessorção nos sedimentos poderiam ser explicados pela forte correlação existente entre I_s e II_s ou III_s . Adicionalmente, a remoção de metais dos sedimentos via processos biológicos ou físicos poderia influenciar a condutividade, levando a fortes correlações entre pH_a ou pH_s e IV_s , indicando que potenciais ligantes orgânicos, para o Mn, apresentam um equilíbrio ácido-base e estão desprotonados em pH entre 6,5-8 (Hsu and Lo, 2001), (ver Tabela 6, figura 26).

Informações geoquímicas e ecotoxicológicas:

A ordem de ocorrência das diferentes frações do Mn nos sedimentos da bacia ALPA (item 3.1) indica uma origem e uma composição heterogênea do Mn. Por exemplo, o predomínio de Mn, na forma de hidr(óxidos), carbonatos e intercambiável é compatível com processos de oxi-redução, complexação e precipitação e ressuspensão do Mn (que pode ser de origem

natural ou antropogênica). Isto indica que as camadas de sedimento e a coluna líquida dessa bacia recebem uma renovação constante do Mn. Por outro lado, a ocorrência de Mn ligado a silicatos pressupõe que o metal tenha uma origem vinculada com a composição geomorfológica desse sistema aquático. Sabe-se que o Mn pode ocorrer como boratos, carbonatos, fosfatos, óxidos, sulfatos e silicatos (**Barceloux, 1999**), às vezes associados a outros minérios na forma de impurezas. De fato, importantes fontes de pedra calcária (CaCO_3) e cascalho (silicatos) são encontrados nas municipalidades da bacia ALPA, bem distante das principais reservas de minérios de Mn do estado de São Paulo (**BMY, 2006**). Além disso, outras fontes de poluição difusas tais como a agricultura, o esgoto doméstico e industrial e a erosão (**CETESB, 2006**), juntamente com processos biogênicos (**Buffle and DeVitre, 1994**), poderiam ter aumentado a concentração do Mn nestes ambientes.

A habilidade natural dos sedimentos para acumular íons metálicos permite avaliar a qualidade dos sistemas aquáticos e indicar efeitos de emissões antropogênicas através de parâmetros como o fator de enriquecimento (EF) e o índice de geoacumulação (I_{geo}). A Figura 11 a-b mostra que na bacia ALPA, o Mn apresenta $\text{EF} < 2$ e $I_{\text{geo}} < 0$, o que sugere que não há contaminação com Mn (Categoria 1, Tabela 3), e portanto a origem deste metal deve ser de caráter natural, como tem sido discutido em outros trabalhos (**Muller, 1969; Buat-menard and Chesselet, 1979; Ergin et al., 1991; Ghrefat and Yusuf, 2006**). No entanto, 20 – 30 % (38 –

110 mg/kg) do Mn sedimentado encontram-se biodisponíveis na forma de metal intercambiável ou ligado a carbonatos (Tabela 3, Figura 11-c, Figura 26). Isto indi-

Na bacia ALPA, O Mn têm uma origem natural, porém com riscos de até 30% de induzir danos ecotoxicológicos.

ca moderados riscos ecotoxicológicos, embora tais níveis ainda sejam menores que o valor que induz danos ambientais nos sistemas aquáticos, $\text{LEL} = 460 \text{ mg/kg}$ (**MEEQ, 1993**). Uma comparação entre as diferentes etapas de amostragem mostrou níveis de Mn biodisponíveis

mais elevados em Fevereiro de 2007, o que pode estar relacionado com o final do período chuvoso.

Embora fossem encontradas diversas diferenças na distribuição e no comportamento do Mn na bacia ALPA, as concentrações totais do Mn foram similares para as três estações estudadas, o que deve ser devido a duas razões: a) composição geomorfológica similar nos locais estudados; e b) distância entre os pontos de coleta ~ 30 km. Por outro lado, o presente estudo confirma a tendência de crescimento nos teores de Mn na bacia ALPA, como apontado (CETESB, 2006), bem como sugere potenciais riscos ecotoxicológicos para a ocorrência das espécies do Mn, que merecem ser caracterizados. Neste sentido, propusemos o estudo do perfil toxicológico das espécies Mn(II) “livre”, Mn(II)Cit, Mn(III)Cit e/ou Mn(III)PPi, as quais podem estar na coluna líquida, mas que nas condições oxidantes dessas águas são passíveis de remoção e sedimentação, em condições de serem regeneradas e reincorporadas à coluna líquida conforme o ciclo sugerido na Figura 26 (Hernandez *et al.*, 2009b). Além disso, os efeitos deletérios sobre o sistema nervoso central das espécies Mn(II) e Mn(II)Citrato são estabelecidos. Ao mesmo tempo, são escassos os dados de toxicidade do Mn em sistemas aquáticos em função da especiação química (Howe *et al.*, 2004). Desta maneira, foram sintetizadas e caracterizadas química e toxicologicamente as espécies acima, conforme descrito a seguir.

4.2 Caracterização físico-química das espécies de Mn sujeitas a estudos toxicológicos.

A Figura 12A mostra os espectros de absorção eletrônica típicos das espécies de Mn(III) na região do visível, com máximos de absorção (λ_{max}) para o Mn(III)Cit em 430 nm e uma coloração amarela parda, e em 480 nm para Mn(III)PPi, complexo de cor vermelha intensa. Esses resultados estão de acordo com (Klewicki and Morgan, 1998), e os sinais podem ser atribuídos a transições centradas no metal do tipo *d-d*. Entretanto, espécies divalentes de Mn de alto

spin (d^5), como é o caso de MnCl_2 e Mn(II)Cit , não apresentaram absorbâncias significativas no visível (dados não mostrados), uma vez que a semi-ocupação de todos os orbitais d implica na inexistência de transições permitidas por spin (aquelas que não mudam a orientação relativa dos spins dos elétrons), o que se traduz em valores de absorvidade molar (ϵ) muito baixos no visível e, conseqüentemente, na ausência de cor (Atkins, 2006).

A caracterização dos complexos em estudo foi feita também mediante espectroscopia EPR, a fim de confirmar os estados de oxidação nos produtos de partida, e acompanhar possíveis mudanças sob as condições experimentais em que seriam desenvolvidos os ensaios toxicológicos, resultados que são apresentados na Figura 12B. Para a espécie MnCl_2 , que representa um sistema de alto spin Mn(II) (d^5 , $S = 5/2$), foram registrados vários espectros centrados em $g = 2$, com um característico padrão de desdobramento hiperfino de seis linhas equidistantes (70 gauss) como descrito por Schiemann e colab. (2003). Esse padrão não é alterado quando incubado em meio aquoso a 37°C por várias horas (Figura 12A, espectros 1-3). Entretanto, quando a mesma espécie foi incubada em meio de cultura, uma diminuição do sinal de EPR foi verificada (Figura 12A, espectros 4-6). Isto pode ser interpretado em termos de complexação do Mn(II) com moléculas de alto peso molecular presentes no meio de cultura (especialmente albumina), o que causa o alargamento dos espectros devido a processos de relaxamento de spin mais rápidos (Schiemann *et al.*, 2003), o que pode converter o Mn(II) em uma espécie não detectável.

Por outro lado, o Mn(III) é um sistema de alto spin (d^4 , $S = 2$), considerado EPR-silencioso em análises de EPR feitas com sistemas convencionais trabalhando com frequências abaixo de 35 GHz (bandas X ou bandas Q) (Goldberg *et al.*, 1997). De acordo com isto, os complexos de Mn(III) não apresentaram sinais em nenhuma das condições experimentais (Figura 12B, espectros 7-16). Para sistemas de EPR convencionais, transições do tipo $\Delta M_s = \pm 1$ não

podem ser resolvidas devido a uma significativa combinação de desdobramento do sinal de campo-zero com fenômenos desfavoráveis de relaxamento (**Mabbs and Collison, 1992**). Desta maneira, nós não podemos excluir a possibilidade que compostos de Mn(II) possam ser convertidos em espécies de Mn(III) em ambientes arejados e ricos em ligantes, como o meio de cultura. Adicionalmente, sabe-se que o Mn(III) pode se desproporcionar em espécies de Mn(II) e Mn(IV) (**Klewicki and Morgan, 1998**), mas nossas condições de trabalho em EPR não permitiram verificar esse fenômeno.

Do ponto de vista eletroquímico (Fig. 13), o íon livre Mn(II) apresentou dois processos oxidativos e dois processos redutivos distintos e reversíveis. O primeiro pico catódico (em cerca de 0,8 V) deve corresponder à redução Mn(II) – Mn(I), enquanto que o segundo pico catódico (~ 0,0 V) provavelmente corresponde à redução Mn(I) – Mn(0), segundo a atribuição de (**Habib et al., 2006**) nas mesmas condições, embora neste caso a potenciais ligeiramente mais positivos. Os processos de oxidação a ~ 0,3 V e 1,0 V devem corresponder, respectivamente, às oxidações Mn(0)/Mn(I) e Mn(I)/Mn(II). A formação do complexo Mn(II)Cit diminui a quantidade de Mn(II) disponível para a participação em processos redox, conforme demonstrado para complexantes como a leucina (**Habib et al., 2006**), daí que os picos de corrente estejam atenuados. No caso do Mn(III)Cit foi verificado um discreto processo de oxidação a ~ 0,9 V, atribuído ao par Mn(III)/Mn(IV), assim como um processo de redução ~ 0,55 V, atribuído ao par Mn(III)/Mn(II), o que é consistente com processo de desproporcionamento do Mn(III) ou que as formas Mn(II) e Mn(III) estão em equilíbrio (**Klewicki and Morgan, 1998**). Já a espécie Mn(III)PPi apresenta um comportamento inativo, similar ao ligante pirofosfato. O desproporcionamento dessa espécie deve ocorrer unicamente em baixas proporções de ligante (**Klewicki and Morgan, 1998**), contrário às nossas condições experimentais.

4.3 In-vitro: Espécies químicas do Mn induziram neurotoxicidade no desenvolvimento, especialmente a nível cerebelar, o que pode repercutir em perda de funções cognitivas e neuromusculares.

Em células de cerebelo (CGC), as espécies MnCl_2 , Mn(II)Cit e Mn(III)Cit mostraram uma toxicidade similar, porém superior ao Mn(III)PPi . Entretanto, nas células corticais (CTX) o Mn(III)PPi foi a espécie mais tóxica, com uma LC_{50} estatisticamente semelhante àquela obtida para CGC. Em CTX, ainda, as espécies restantes apresentaram toxicidades similares entre elas, porém foram estatisticamente menos tóxicas quando comparadas com as LC_{50} obtidas para CGC. Os nossos resultados em CTX são compatíveis com trabalhos prévios (**Reaney et al., 2002; HaMai and Bondy, 2004; Reaney and Smith, 2005**), os quais reportaram que, em neurônios dopaminérgicos (células PC12), o Mn(III) na forma de Mn(III)PPi , Mn(III)Acetato e $\text{Mn(III)transferrina}$ é mais tóxico do que o Mn(II) na forma de MnCl_2 . Esses resultados sugerem que em pH fisiológico o Mn(III)Cit é termodinamicamente mais estável do que Mn(III)PPi , como sugerido por **Klewicki e Morgan (1998)**. Isto poderia ser mais importante para neurônios GABAérgicos e dopaminérgicos, o qual precisa ser estudado. Segundo **Radio e Mundy (2008)**, um mesmo composto químico pode ter diferentes efeitos neurotóxicos em diferentes modelos celulares.

Para a neurotoxicidade no desenvolvimento induzida por Mn, verificamos que, independentemente da especiação química, o metal foi mais tóxico para células não diferenciadas do que para células diferenciadas.

Independentemente da especiação, o Mn induz neurotoxicidade durante o desenvolvimento, consistente com danos neuromotores e cognitivos.

Similares resultados foram encontrados com células-tronco neuronais expostas a MnCl_2 (**Tamm et al., 2008**). Isto poderia estar associado com alterações bioquímicas, particularmente do metabolismo energético, e a baixa taxa de regeneração dos neurônios, quando comparado com outras células tais como hepatócitos (**Claudio et al., 2000**). Adicionalmente, foi veri-

ficado que a exposição de neurônios ao Mn por curto tempo (efeitos agudos) é menos importante que a exposição prolongada (efeitos crônicos; dados não mostrados) como sugerido por **Rovetta e colob. (2007)**, e que os neurônios glutamatérgicos (CGC) são mais vulneráveis que os neurônios de GABAérgicos (CTX), o que é uma informação muito relevante, dado que perturbações nas funções cerebelares podem induzir perda de capacidades cognitivas e neuromusculares (**Hoppenbrouwers et al., 2008**), o que tem sido diagnosticado em crianças expostas ao Mn (**Wasserman et al., 2006; Erikson et al., 2007b**).

Durante o desenvolvimento, o cerebelo acumula mais Mn do que o córtex, provavelmente devido a uma maior expressão de transportadores de metais divalentes (DMT-1). A expressão dos receptores de transferrina (TfR) é inalterada para ambas regiões do cérebro (**Garcia et al., 2006b**). Isto justificaria parcialmente a maior sensibilidade de CGC, quando comparada com CTX (Tabela 8), pelo menos para as espécies divalentes de Mn.

Considerando que as espécies $MnCl_2$, $Mn(II)Cit$ e $Mn(III)Cit$ (ambientalmente tão relevantes quanto o $Mn(III)PPi$) já foram detectadas em fluidos biológicos de humanos mediante análises de especiação (**Michalke et al., 2007**), são candidatas para atravessar a barreira hematoencefálica (**Aschner et al., 2007**) e apresentam toxicidade maior para CGC (que é mais sensível do que CTX), nós continuamos os nossos estudos com o $MnCl_2$ e $Mn(III)Cit$. Desta maneira, verificamos o efeito do estado de oxidação do Mn na sua neurotoxicidade, o que ainda não é completamente compreendido. Por exemplo, tem sido sugerido que o $Mn(II)$ é mais tóxico do que $Mn(III)$ (**Saric and Lucchini, 2007**), mas considerando os resultados preliminares deste trabalho e os reportados (**Reaney et al., 2002; HaMai and Bondy, 2004; Reaney and Smith, 2005**), é possível argumentar que a toxicidade do Mn também depende da natureza do alvo biológico, como será discutido adiante. Neste sentido, foi avaliando o papel neuro-

toxicológico do Mn em cultura primária de neurônios de diferentes regiões do cérebro, posto que tal aproximação tem recebido escassa atenção.

4.3.1 A neurotoxicidade induzida pelo Mn é possivelmente mediada por inibição do metabolismo energético, disfunção mitocondrial e indução de estresse oxi-redutivo.

A diminuição da viabilidade celular em CGC e CTX, quando expostas às espécies de Mn (Fig. 18), em função da taxa de redução de MTT, sugere a perturbação de algumas das rotas do metabolismo energético dentro e fora das mitocôndrias (**Roth *et al.*, 2002; Malthankar *et al.*, 2004**), embora essa não seja a única explicação possível, dado que outros fenômenos podem contribuir para perda de viabilidade celular. Porém, o Mn é concentrado preferencialmente nas mitocôndrias, onde pode substituir o Ca^{2+} necessário à hidrólise do ATP e, portanto, inibir a produção de energia (**Gunter *et al.*, 2009**).

A recuperação parcial da viabilidade celular com d,l-lactato (*Lac*, 5 mM) (Figuras 18C e 18D e Figura 19B) é consistente com outros estudos (**Nakamichi *et al.*, 2005; Schober *et al.*, 2008**) e com a hipótese da depauperação do metabolismo energético celular como um mecanismo da neurotoxicidade do Mn (**Quintanar, 2008**). Isto implica que as espécies do Mn estão afetando o metabolismo celular do lactato, como sugerido por (**Zwingmann *et al.*, 2003**). Em ensaios preliminares, *Lac* 2,5 mM não ofereceu proteção, enquanto *Lac* 10 mM induziu uma significativa morte celular dos controles (dados não apresentados).

O lactato é o produto final da glicólise, e é usado pelos neurônios como principal substrato energético (**Schurr, 2006**). Adicionalmente, o lactato é transportado nos neurônios através do transportador de monocarboxilatos tipo 2 (MCT2), que durante todo o desenvolvimento neuronal é expressado em CTX, entretanto desaparece gradualmente em CGC (**Rafiki *et al.*, 2003**).

Isto poderia ser uma explicação plausível para a maior sensibilidade de CGC. Mas a perturbação do metabolismo de lactato não deve ser a única causa da neurotoxicidade do Mn, dado que a recuperação de viabilidade por lactato em CTX só foi efetiva quando estas células eram expostas ao MnCl_2 . Não obstante, a maior efetividade do lactato em CGC, quando comparado com CTX, poderia estar associada principalmente à reciclagem redox-sensível do lactato/piruvato (intermediário no metabolismo oxidativo da glicose e do lactato), sugerido como mais importante para neurônios glutamatérgicos do que para os neurônios GABAérgicos (Schousboe *et al.*, 2007).

Baseado no conhecimento acumulado acerca do metabolismo do lactato e os resultados apresentados até aqui, sugeriu-se que um possível mecanismo da neurotoxicidade do Mn pode envolver a inibição do metabolismo do lactato, conseqüentemente a disfunção mitocondrial seria reflexo de estresse oxi-redutivo. Ao mesmo tempo, verificou-se que o lactato, na dose certa, oferece uma neuroproteção parcial por um provável mecanismo em tandem (Figura 27), onde vários fatores podem estar trabalhando de maneira concertada tais como 1) *substrato energético* 2) *antioxidante* e 3) *agente quelante*, como será descrito a seguir. Recentemente, tem sido sugerido para neurônios um sistema de reciclagem não estequiométrica redox-sensível do lactato, onde ocorreria transferência contínua do lactato dos astrócitos aos neurônios, aproveitando-se da cinética de transportadores da membrana plasmática e das isoenzimas lactato desidrogenase (LDH). Além disso, nessas condições, a glicólise pode ser inibida, enquanto a oxidação do lactato é preferencialmente estimulada (Cerdán *et al.*, 2007). No nosso caso, a administração exógena do lactato pode simular a função dos astrócitos, contribuindo para a recuperação da viabilidade celular através do *fornecimento de energia*. Além disso, a reciclagem redox-sensível do lactato pode trabalhar como um sistema *antioxidante* (Groussard *et al.*, 2000) devido ao consumo de dois equivalentes de radicais hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) pelo lactato gerando o piruvato, um agente antioxidante que pode eliminar H_2O_2 e 2 OH^- na

sua decomposição a acetato e CO_2 (Herz *et al.*, 1997). Isto poderia conduzir a outro mecanismo indireto, onde o íon acetato pode remover os cátions metálicos mediante *quelação*. A eficiência deste mecanismo de neuroproteção estará limitada pela concentração exógena de lactato que não induz morte celular e pela baixa taxa de regeneração dos neurônios (Claudio *et al.*, 2000). Consistente com isto, a maior eficiência do mecanismo de neuroproteção promovido por lactato foi conseguida apenas em concentrações $\leq \text{LC50}$ das respectivas espécies de Mn.

Figura 27: Mecanismo de neurotoxicidade das espécies de Mn e mecanismo de neuroproteção mediante administração de lactato (Lac). 1- As espécies de Mn induzem inibição do metabolismo do Lac, seguido de estresse oxi-redutivo. 2- Co-administração de Lac contribui para a recuperação do metabolismo energético mitocondrial. 3- A reciclagem do Lac gera piruvato (Pyr), que sequestra espécies reativas de oxigênio. 4- A oxidação metabólica do Pyr gera acetato (AC), que poderia complexar íons de Mn e consequentemente bloquear os efeitos inicialmente induzidos pelas espécies desse metal. 5- Complexos Mn-AC poderiam ser removidos do espaço intramitocondrial e intracelular. Gli: Glicose; GLU: transportador de glicose; gli: glicólise; LDH1: lactato desidrogenase 1 (mitocondrial); LDH5: lactato desidrogenase 5 (citossólica); ROS: espécies reativas de oxigênio; MCT2: transportador de Lac tipo 2; Ca^{2+} : canal de cálcio, possível entrada de Mn(II) nas mitocôndrias; ?: via alternativa para o transporte de espécies de Mn(III) e complexos Mn-AC; DMT2: transportador de metais divalentes, possível via de acesso no espaço intracelular para o Mn(II). Barras (|) indicam inibição.

A neurotoxicidade induzida pelo Mn é associada com perdas no metabolismo energético e acompanhada de estresse oxidativo. A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo linear (γ -glutamylcysteinylglycine), que pode funcionar como um quelante de metal intracelular, um agente de desintoxicação de metal e um sumidouro de radicais livres (**HaMai and Bondy, 2004**). Nos neurônios a relação GSH:Ascorbato é 4:1 (**Rice, 2000**), e o cerebelo e neocórtex mostram níveis similares de GSH e ascorbato (**Rice et al., 2002**). Não obstante, neste estudo foi verificado que os níveis totais de glutathiona (GSht) nas células controles foram mais baixos nos neurônios granulares cerebelares do que nos neurônios corticais ($p < 0,01$), que poderia ser uma explicação para a diferença de sensibilidade encontrada entre ambos os modelos celulares quando expostos ao Mn. Porém, não foram encontradas alterações significativas, quando comparadas com os controles (Fig. 16), sendo verificada somente uma tendência oxidativa (**Ghyczy and Boros, 2001**). Essa tendência se manifesta por um lado na produção de GSht (estresse redutivo) para baixas concentrações do Mn, e por outro no consumo de GSht para concentrações mais elevadas de Mn, sugerindo estresse oxidativo, como proposto por **Quintanar (2008)**.

Para confirmar a hipótese sobre o estresse oxidativo, diversos sequestradores de radicais livres foram testados. Entretanto, apenas o ascorbato, um

Independentemente da especiação, o Mn inibe o metabolismo do lactato e do ascorbato em neurônios.

conhecido antioxidante requerido por todas as células de mamíferos (**Karaczyn et al., 2006**) foi eficaz, sugerindo que as espécies de Mn estão interferindo no metabolismo do ascorbato. Consistente com isto, a viabilidade celular em PC12 e a disfunção mitocondrial por exposição ao Mn foram recuperadas com ascorbato (**Desole et al., 1997a; Desole et al., 1997b; Zhang et al., 2004**). Contudo, os nossos resultados sugerem que o ácido ascórbico é muito menos eficaz na proteção de neurônios corticais do que de neurônios cerebelares para a neurotoxicidade induzida pelo Mn (Figuras 18A, 18B e 19A).

Sabe-se que o ascorbato e o GSH formam um sistema antioxidante acoplado, nas mitocôndrias e no citoplasma, que pode ser auxiliado pelas iso-formas da enzima glutaredoxina (isoforma 1: citoplasmática; isoforma 2: mitocondrial) (**Ehrhart and Zeevalk, 2003**). Desta maneira, uma perda de ascorbato deve ser compensada por GSH via reação redox e vice-versa, contribuindo para a reciclagem do dehidroascorbato (DHA) para ascorbato e estimulando a formação de complexos protéicos com a glutathione, tipo Pr-SSG (**Ehrhart and Zeevalk, 2003**). A formação desses compostos protéicos poderia explicar a não-detecção de GSSG, na nossa análises do estado redox celular por método do par GSH/GSSG. Porém, o menor conteúdo de GSHt em CGC, quando comparado com CTX, sugere que este mecanismo de defesa antioxidante seja menos efetivo em CGC.

Embora ambos os modelos celulares apresentem níveis basais de ascorbato similares (**Rice et al., 2002**), o tratamento com ácido ascórbico produz uma maior recuperação parcial da viabilidade celular em CGC do que em CTX, provavelmente porque CGC tem uma capacidade discretamente maior para obter e manter o ascorbato do que CTX (**Caprile et al., 2009**). Alternativamente, a manutenção dos níveis de GSH e da homeostase redox celular é uma função preliminar da rota metabólica da pentose fosfato (**Vaughn and Deshmukh, 2008**), mas o ascorbato e o dehidroascorbato podem utilizar a mesma via para produzir lactato e glicose (**Banhegyi et al., 1997**). Simultaneamente, o ácido ascórbico, tanto extracelular quanto intracelular, pode inibir o transporte da glicose, estimulando o transporte de lactato em neurônios (**Castro et al., 2009**). Segundo os resultados obtidos e os demais elementos elencados acerca do metabolismo do ascorbato e do lactato, sugeriu-se que as espécies de Mn também induziram neurotoxicidade pela inibição do metabolismo do ascorbato, o que pode acontecer paralelamente à afetação da rota metabólica do lactato e/ou exacerbando os danos produzidos nesta última. Um hipotético mecanismo de neurotoxicidade, assim como um alternativo mecanismo de neuroproteção com ascorbato é sugerido na Figura 28.

Figura 28: Mecanismo de neurotoxicidade das espécies de Mn e mecanismo de neuroproteção mediante administração de ácido ascórbico (AA) em CGC e CTX ou lactato-AA em CTX. 1- As espécies de Mn induzem inibição do metabolismo do lactato (Lac) e do AA, seguido de estresse oxi-redutivo. 2- Co-administração de AA e/ou Lac-AA contribui para a recuperação do metabolismo energético mitocondrial e reativa o sistema antioxidante GSH/AA via recuperação dos níveis de AA. Adicionalmente, o AA intracelular inibe a via glicolítica (gl) e estimula o transporte de Lac. 3- Síntese in loco de Lac a partir de dihidroascorbato (DHA) pela rota metabólica da pentose fosfato (ppp), que é uma alternativa à gl. Simultaneamente, a reciclagem do Lac gera piruvato (Pyr), que sequestra espécies reativas de oxigênio. 4- A oxidação metabólica do Pyr gera acetato (AC), que poderia complexar íons de Mn e conseqüentemente bloquear os efeitos inicialmente induzidos pelas espécies desse metal. 5- Complexos Mn-AC poderiam ser removidos do espaço intramitocondrial e intracelular. Gli: Glicose; GLU: transportador de glicose; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; GSS-pr: complexo glutatona-proteína; LDH1: lactato desidrogenase 1; ROS: espécies reativas de oxigênio; SVCT2: transportador de AA; MCT2: transportador de lactato tipo 2; DCT: transportador de dicarboxilatos; (Ca^{2+}): canal de cálcio, possível entrada de Mn(II) nas mitocôndrias; ?: via alternativa para o transporte de espécies de Mn(III) e complexos Mn-AC; DMT2: transportador de metais divalentes, possível via de acesso no espaço intracelular para o Mn(II). Barras (I) indicam inibição.

Desses mecanismos se depreende que, além do reconhecido potencial antioxidante do ascorbato, essa molécula também pode ser um suplemento energético para os neurônios (Banhegyi *et al.*, 1997). Adicionalmente, devemos destacar que as limitações discutidas no mecanismo

de neuroproteção com lactato são válidas para o ascorbato, já que o processo patofisiológico que envolve as espécies de Mn induz um forte detrimento energético, seguido de processos oxi-redutivos, que também geram altos requerimentos moleculares para compensar os danos celulares induzidos.

Por outro lado, a taxa de oxidação do ácido ascórbico é 10 vezes mais rápida sob Mn(II) do que sob Mn(III) (**Pelizzetti *et al.*, 1978**), o que poderia justificar parcialmente a maior eficiência do ascorbato para proteger CTX do MnCl₂, mas não dos efeitos induzidos pelo Mn(III)Cit, considerando que a captação de ácido ascórbico por essas células é relativamente limitada. Porém, para CGC a elevada sensibilidade destas células parece ser mais importante do que diferença cinética da interação do ascorbato com as espécies de Mn.

As observações realizadas acerca da eficiência do ácido ascórbico e do lactato, assim como o conhecimento do metabolismo dessas moléculas, podem justificar a pouca importância desses neuroprotetores em CTX quando testados de maneira separada. Neste sentido, sugeriu-se testar a co-administração lactato-ascorbato, procurando aperfeiçoar o mecanismo de neuroproteção em CTX. De fato, foi obtida recuperação total da viabilidade celular, anulando os efeitos adversos do MnCl₂ e do Mn(III)Cit (Figuras 19c e 28). De acordo com isso, sugerimos que ambas as espécies induziram inibição do metabolismo energético e mitocondrial, seguido de estresse oxi-redutivo, onde este último parece ser mais importante para a espécie Mn(III)Cit em CTX, desde que os neuroprotetores testados isoladamente foram ineficientes. Ao mesmo tempo, a neuroproteção alcançada neste caso sugere que ambos os neuroprotetores podem trabalhar sinergicamente de forma combinada por um mecanismo tal como apresentado na Figura 28.

Os nossos resultados, com apoio de outros já descritos (**Quintanar, 2008**), sugerem que o Mn induz uma cascata de eventos que podem ser iniciados na alteração do metabolismo energético mitocondrial e celular. Isto obriga a sofisticados mecanismos de defesa (Figuras 27 e 28), que devem ser uma das causas para a inexistência de terapias eficazes em casos de intoxicação com Mn. Porém, o presente estudo também sugere que sendo o cerebelo um alvo preferencial para neurotoxicidade do Mn, as chances de sucesso terapêutico podem ser razoáveis, ao menos pelas abordagens discutidas aqui. Mas cabe uma questão neste ponto: o Mn induziria semelhantes alterações *in vivo*? Para tentar responder essa questão foram desenvolvidos ensaios com embriões de paulistinha (*Danio rerio*), que oferecem informação de proliferação celular, diferenciação e maturação neuronal, assim como de comportamento, que é o efeito final do desenvolvimento neuronal (**Coecke et al., 2007**).

O Mn atinge preferencialmente o metabolismo mitocondrial e energético a nível cerebelar, porém as alternativas terapêuticas podem ter mais sucesso.

so terapêutico podem ser razoáveis, ao menos pelas abordagens discutidas aqui. Mas cabe uma questão neste ponto: o Mn induziria semelhantes alterações *in vivo*? Para tentar responder essa questão foram desenvolvidos ensaios com embriões de paulistinha (*Danio rerio*), que oferecem informação de proliferação celular, diferenciação e maturação neuronal, assim como de comportamento, que é o efeito final do desenvolvimento neuronal (**Coecke et al., 2007**).

4.4 In vivo: O Mn induz toxicidade no desenvolvimento de embriões de *Danio rerio*, que é dependente do grau do desenvolvimento embrionário, do tempo de exposição e da especiação química do metal.

Como abordado anteriormente, a especiação do metal é um fator importante na mediação da sua toxicidade (**Wilken, 1998**), mesmo em eventos de contaminação ambiental ou alterações naturais no ambiente ou nos organismos. Porém, somente poucos estudos consideraram o efeito da especiação na toxicidade do Mn para os organismos aquáticos (**Howe et al., 2004**). Por este motivo, no estudo atual, avaliamos a toxicidade de diferentes espécies de Mn nos embriões do peixe paulistinha (*Danio rerio*). Este modelo foi selecionado como uma alternativa ao teste em vertebrados adultos, pelas semelhanças que apresenta com modelos mamíferos e o próprio genoma humano (**Epstein and Epstein, 2005**) e para estudar os efeitos da especiação do Mn durante os primeiros estágios de vida, os quais são potencialmente mais suscetíveis à toxicidade do Mn (**Erikson et al., 2007b; Saric and Lucchini, 2007**). Foram anali-

sados os efeitos letais e sub-letais, que incluem a expressão de genes como potenciais biomarcadores de exposição ao Mn, sendo os resultados comparados com aqueles existentes para peixes e outros modelos experimentais, e foram tentadas algumas inferências para possíveis danos ecotoxicológicos e em humanos.

4.4.1 O Mn induz toxicidade em embriões de paulistinha.

A toxicidade do Mn em organismos aquáticos foi relatada na escala de 1 – 3350 mg/L (Howe *et al.*, 2004). Consistente com isto, no estudo atual, nós observamos os valores de LC50 em embrião de *Danio rerio* entre 3,34 mM a 80 mM (187 - 4400 mg/L). Os embriões de paulistinha parecem ser menos sensíveis, particularmente quando comparados com outros estudos que também usaram peixes em estágios embrio-larval. Por exemplo, uma LC50 de 8,2 mg/L foi reportada no peixe dourado (*Carassius auratus*) exposto a MnCl₂ por 7 dias, que cobre os estágios embrionários e larval pós-eclosão (Birge, 1978). Uma vez que dados de toxicidade do Mn no paulistinha adulto não estão disponíveis, nós não podemos excluir que a baixa sensibilidade do paulistinha esteja limitada aos primeiros estágios de vida. A sensibilidade em embriões do paulistinha depende fortemente do período em que ocorre a exposição do Mn. O MnCl₂ é aproximadamente 8 vezes menos tóxico (em termos de LC50) para embriões antes da eclosão dos ovos, quando comparados com embriões pós-eclosão (72 – 120 hpf), para o mesmo tempo de exposição (48 h). Semelhantes resultados foram obtidos por Stubblefield e colab. (1997), quando estudaram embriões da truta marrom expostos a MnCl₂. Para os embriões do paulistinha, estas diferenças podem primeiramente ser associadas ao processo de eclosão e à perda subsequente do ovo. Se o ovo é removido manualmente, os embriões de 24 hpf exibem uma sensibilidade semelhante à dos estados mais avançados do desenvolvimento embrionário.

Ao mesmo tempo, uma análise comparativa entre embriões de 72 – 120 hpf e de 2 – 122 hpf expostos ao MnCl₂ sugere que, preliminarmente, não devemos excluir totalmente o hipótese

de que a toxicidade do Mn possa ser limitada pelo ovo, como sugerido para outros xenobióticos (**Braunbeck et al., 2005; Scholz et al., 2008**). O aumento da sensibilidade dos embriões (4 vezes) neste estudo quando o ovo é removido pode indicar uma função de barreira elétrica, que poderia ser associada com a carga elétrica de Mn ou poderia estar associado com a limitação de processo de distribuição do Mn nos embriões. Entretanto, a análise comparativa de íons diferentes, bem como a quantificação de Mn intraembrionário seria necessária para apoiar ou rejeitar essas hipóteses.

De acordo com a Tabela 9, o Mn não parece ser bioconcentrado pelos embriões do paulistinha em nenhuma das situações experimentais testadas. Por tanto, o incremento da toxicidade do Mn nos embriões de paulistinha não deve estar associado a fenômenos de bioacumulação. Certamente, a toxicidade não depende da concentração total do metal no organismo teste, mas sim da concentração metabolicamente disponível do metal (**Rainbow, 2007**), ou seja, depende da especiação do metal no organismo. Por exemplo, em ratas expostas prenatalmente para Mn, o acúmulo do metal não induz alterações no metabolismo da dopamina, da noradrenalina nem neurotoxicidade (**Kontur and Fechter, 1985**).

A exposição prolongada a MnCl_2 a 120 h conduz a um aumento na toxicidade se comparado a uma exposição de 48 h em estágios pós-eclosão. Isto pode ser explicado pela instabilidade das soluções durante exposição. A mudança na coloração dos meios de exposição para concentrações elevadas do Mn, observada após 72 horas de exposição, sugere que Mn^{2+} possa ser oxidado a Mn^{3+} , aumentando a capacidade pró-oxidante do Mn^{2+} pela presença de traços de Mn^{3+} , como sugerido por **HaMai e Bondy (2004)**. Certamente, a oxidação do Mn(II)Cit ao Mn(III)Cit pode ocorrer *in situ*, embora complexos do Mn(III) com ligantes tais como o citrato e o pirofosfato tenham tempos de conservação na escala de alguns dias antes de começar a desproporcionar-se no meio aquoso (**Klewicky and Morgan, 1998**). Assim, nós não podemos

excluir que a conversão à espécie de Mn^{3+} e/ou ciclo redox entre o $Mn(II)Cit/Mn(III)Cit$ possa propiciar uma cascata de processos redox-ativos deletérios, para uma exposição prolongada, de acordo com o aumento de toxicidade do citrato do $Mn(II)$ em 120 h, no que diz respeito a todas as espécies testadas do Mn, e os tempos de exposição. Embora o modelo da atividade do íon livre (FIAM) sugira que os íons

O $Mn(II)Cit$ é potencialmente mais tóxico do que o $MnCl_2$, para exposições prolongadas ou crônicas.

complexados sejam menos biodisponíveis e menos tóxicos (**Morel, 1983**), nossos resultados aparecem como uma exceção desse modelo, sendo entretanto concordes com casos observados em outros organismos aquáticos (**Campbell, 1995; Wenger et al., 2005**). Segundo **Campbell (1995)**, tais exceções poderiam ser explicadas por:

- i) diminuição da concentração de Ca^{2+} livre no meio e conseqüente diminuição do seu efeito protetor, devido a fenômenos de complexação na presença de excesso de ligante, já que geralmente a toxicidade do Mn cresce quando a dureza da água diminui (**Howe et al., 2004**),
- ii) “transporte acidental”, porque a membrana não conseguiria distinguir entre o ligante livre e o complexo do metal com esse ligante (particularmente com ligantes fisiológicos tais como aminoácidos e citrato), sendo o metal transportado para o interior da célula e causando efeitos deletérios e,
- iii) a formação de complexos ternários de superfície (L–M–X–célula), onde “X” é um local sensível para o metal, e a “resposta biológica” variará em função da concentração de ML (complexo metálico).

Além disso, a redução da absorção de íons metálicos devido a efeitos de complexação com matéria orgânica deve ser mais importante para eventos agudos do que para exposições crônicas (**Finn, 2007**).

Embora estudos in vitro sugiram que o $Mn(III)$ complexado com pirofosfato ou acetato possa ser mais tóxico do que $MnCl_2$ (**Reaney et al., 2002; HaMai and Bondy, 2004**), nossos resul-

tados não indicam uma toxicidade realçada para o Mn(III) em embriões do paulistinha. Consistente com isto, foi demonstrado recentemente que o MnCl_2 é mais neurotóxico do que o Mn(III)PPI e do que o Mn(III)Cit (**Hernandez *et al.*, 2009a**). Adicionalmente, os complexos trivalentes do metal são cineticamente mais inertes do que seus análogos divalentes (**Atkins, 2006**), de modo que os complexos pré-formados de Mn(III) devem liberar lentamente o metal aos sítios-alvo dos organismos. Conseqüentemente, a toxicidade efetiva do Mn(III) vai depender criticamente da natureza dos complexos reais que possam ser formados no ambiente, o que corrobora o valor de nossos esforços para apresentar o metal em uma espécie química bem definida.

4.4.2 O Mn afeta as funções neuromusculares no paulistinha.

Foram analisados diversos efeitos subletais nos embriões do paulistinha exposto às espécies de Mn (Fig. 22). Independentemente da especiação química, o efeito mais relevante foi uma diminuição da mobilidade estimulada (Fig. 23). Os valores de EC50 para estes efeitos ocorreram na ordem de 4 a 17 vezes menores que as respectivas LC50 (Figura 24), dependendo da duração da exposição. Em contraste com a avaliação das taxas de sobrevivência, os efeitos do Mn(II)Cit foram obtidos igualmente para períodos de 48 h de exposição (devido à toxicidade exibida pelo citrato livre a concentrações ≥ 10 mM, a máxima concentração testada para o Mn(II)Cit foi limitada a 6 mM). O MnCl_2 e o Mn(II)Cit mostraram valores similares de EC50 (em termos de decréscimo da mobilidade estimulada), com exceção dos embriões expostos de 72 a 120 hpf, onde o MnCl_2 mostrou-se mais tóxico, quando comparados com outros períodos, incluindo a exposição 2-122 hpf, onde nenhuma diferença foi encontrada entre essas espécies de Mn. Estas divergências poderiam estar relacionadas com o metabolismo energético, especialmente o metabolismo do citrato. Por exemplo, embriões antes da eclosão dos ovos têm uma elevada reserva de energia, devido aos aportes energéticos feitos pelo vitelo e o pouco investimento dessas reservas nos processos metabólicos (**Gündel *et al.*, 2007; Kamler,**

2008). Entretanto, durante e após o processo de eclosão, é constatado um dramático aumento da atividade metabólica, o que é altamente dependente de energia (Gündel *et al.*, 2007; Kamler, 2008; Lucitt *et al.*, 2008). Neste caso, o citrato, que é usado como um precursor dos neurotransmissores no funcionamento normal do cérebro, também pode ser usado por embriões como uma fonte de energia, mesmo sob circunstâncias patológicas (Mycielska *et al.*, 2009). Assim, o Mn(II)Cit deve ser menos tóxico do que MnCl₂ no estágio de elevado requerimento energético (72–120 hpf), o que parece viável somente para uma exposição curta, porque para uma exposição longa a toxicidade do Mn(II)Cit é realçada, como observado neste estudo e sugerido por Campbell (1995).

A perda da mobilidade estimulada pode ser considerado como indicador de afetação da função neuromuscular ou do desenvolvimento (Ton *et al.*, 2006). Nossas observações em embriões do paulistinha confirmam resultados precedentes do efeito neurotóxico do Mn em organismos aquáticos. Por exemplo, Herrera e Catap (1992) encontraram alterações neuromorfológicas

O Mn induz danos neuromusculares em paulistinha consistentes com as observações in vitro, o que pode indicar um maior risco de intoxicação com esse metal.

nos cérebros do *Oreochromis niloticus* exposto ao MnCl₂. Baden e Neil (1998) relataram um desempenho neuromuscular perturbado em lagostas da Noruega (*Nephrops norvegicus*) expostas ao Mn(II). Esses efeitos provavelmente foram causados por interferência no sistema dopaminérgico, como demonstrado em platelmintos (Palladini *et al.*, 1980) e moluscos (p. ex. *Crassostrea virginica*; (Martín *et al.*, 2008). Adicionalmente, em modelos mamíferos, tem se sugerido que o Mn pode induzir a neurotoxicidade devido à alteração mitocondrial e do metabolismo energético, ativação de proteases (Quintanar, 2008) e alteração da homeostase do Fe e subsequente aumento do estresse oxidativo (Li *et al.*, 2006). Os efeitos observados não são provavelmente específicos do Mn isoladamente. Outros metais também mostraram provocar efeitos neuromusculares nos peixes. A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), o

guaru (*Gambusia affinis*), o peixe-verde (*Thalassoma pavo*) e o lebiste (*Poecilia reticulata*), quando expostos ao cobre, mercúrio e cádmio mostraram capacidade natatória anormal ou reduzida, juntamente com alterações neurológicas (Handy, 2003; Yilmaz *et al.*, 2004; Giusi *et al.*, 2005; Jakka *et al.*, 2007).

O conjunto de eventos discutidos até o momento é resumido na Figura 29, onde pode ser apreciado com clareza que os embriões pós-eclosão são mais sensíveis para a neurotoxicidade induzida pelo Mn, o que também pode ser associado com déficit energético.

Figura 29: O Mn induz neuro-toxicidade durante o desenvolvimento dos embriões de paulistinha (*Danio rerio*) dependente da especiação química, idade dos embriões e situação energética: 1) embriões antes da eclosão são tolerantes ou apresentam baixa neuro-toxicidade (ovo + elevado conteúdo energético); 2) incremento da neuro-toxicidade pós-eclosão (ovos removidos + diminuição do conteúdo energético (Jezierska and Witeska, 2004; Gündel *et al.*, 2007; Lucitt *et al.*, 2008). Intensificação da cor das setas horizontais = incremento da toxicidade das espécies de Mn; $Mn(II)Cit > MnCl_2 > Mn(III)Cit$. O $MnCl_2$ foi a espécie mais tóxica para todas as exposições de 48 h (mais detalhes Figuras 18-22). Setas verticais em preto: início dos ensaios; setas de 48h: avaliação toxicológica. Em 122h: avaliação tóxico-genômica. O: ovo; E: conteúdo energético.

4.4.3 O efeito da exposição ao Mn na expressão de genes-alvo potencialmente sensíveis sugere que a toxicidade do Mn pode ser mediada por disfunção mitocondrial.

Foi selecionado um conjunto de genes potencialmente sensíveis que, se tivessem alterado seus padrões de expressão alterados poderiam indicar efeitos subagudos e fornecer informação a respeito do modo de ação ou mecanismo de toxicidade das espécies de Mn. Esses genes (Tabela 4) foram selecionados considerando-se que: (1) foram expressos em outros modelos de exposição ao Mn; (2) são indicadores dos efeitos no funcionamento e no desenvolvimento neuromuscular, (3) são indicadores da interferência no metabolismo energético mitocondrial, (4) são biomarcadores de exposição a metais, e/ou (5) indicam resposta de estresse oxidativo e estresse geral.

Quando observada, a expressão dos genes candidatos foi alterada ligeiramente, basicamente para concentrações capazes de induzir toxicidade nos embriões do paulistinha, porém com algumas diferenças. O gene *mt-co1* foi significativamente alterado tanto por MnCl_2 como por Mn(II)Cit nas suas respectivas LC10; o MnCl_2 reprime a expressão deste gene em 1,35 mM (2 e ~ 5 vezes menor que suas LC10 e LC50 respectivas). Porém, o gene *hspb11* foi afetado significativamente pelo Mn(II)Cit na LC10 e somente para a LC50 do MnCl_2 . Esses resultados sugerem que o *mt-co1* é mais sensível aos danos induzidos pelas espécies do Mn, e confirmam a quase maior toxicidade do Mn(II)Cit . Entretanto, a maioria dos genes não apresentaram alterações significativas nos seus padrões de expressão.

Os genes que provocaram uma resposta significativa (*mt-co1* e *hspb11*) são indicadores da interferência na respiração e no metabolismo mitocondrial e à resposta geral ao estresse, respectivamente (Baden *et al.*, 2007; Marvin *et al.*, 2008). A indução do *mt-co1* já foi reportada para paulistinhas machos adultos expostos ao metilmercúrio, o que foi acompanhado de alte-

rações morfológicas mitocondriais e distúrbios no metabolismo energético (**Cambier *et al.*, 2009**). Ao contrário, a expressão do *mt-col* foi reprimida nas brânquias de paulistinhas adultos expostos a CdCl_2 (**Gonzalez *et al.*, 2006**). O gene *mt-col* regula a citocromo c oxidase do complexo IV mitocondrial, que desempenha um papel fundamental na função da cadeia respiratória e na bioenergética celular. Os defeitos na função do complexo IV afetam a fosforilação oxidativa. Nos seres humanos, é sabido que isto pode conduzir a severas desordens nos estágios primários do desenvolvimento (**Baden *et al.*, 2007**). Considerando que a indução do *mt-col* foi observada somente para o Mn(II)Cit , é improvável que a mortalidade e a redução da função neuromuscular no embrião do paulistinha, sob os efeitos do Mn(II)Cit e o MnCl_2 , esteja unicamente justificadas pela alteração da citocromo c oxidase, como sugerido por (**Baden *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2009**). Não obstante, o MnCl_2 , para concentrações ~ 5 vezes menores que a LC_{50} , reprime a expressão deste gene; conseqüentemente outros autores sugerem que a expressão de genes pode ser alterada em modos diferentes por diferentes espécies químicas de um mesmo elemento, tendo como resultado a mesma afetação fisiológica (**Neumann and Galvez, 2002; Tyler *et al.*, 2008**). Além disso, o sistema nervoso, o cardíaco e o muscular são altamente dependentes de energia, conseqüentemente esses tecidos são estreitamente associados com disfunções mitocondriais, que podem induzir até a morte embrionária (**Gershoni *et al.*, 2009**). Portanto, estudos adicionais nesse sentido são necessários.

O *hspb11*, que foi também significativamente induzido no estudo atual, pertence à família de proteínas pequenas de choque térmico (hsp) (**Elicker and Hutson, 2007**). As hsps estão envolvidas em diversas funções celulares, entre elas a resposta ao estresse físico e químico (**Beere, 2004**). Adicionalmente, as hsps fornecem respostas adaptativas para uma ampla variedade de fatores de estresse através da sua função como chaperonas moleculares. Diferentes formas de estresse agudo ou crônico podem induzir a produção anormal ou enovelamento incorreto de proteínas, o que é neutralizado por chaperonas moleculares (**Vogt *et al.*, 2007**). A

ativação transcricional acontece através do fator de choque térmico (HSF) e do elemento de resposta ao choque térmico (HSE) (**Goering and Fisher, 1995**). A indução da expressão do *hspb11* em concentrações elevadas de Mn poderia ter por finalidade compensar efeitos apoptóticos, como foi sugerido por Beere (**2004**). Consistente com isto, uma indução de *hspb11* foi relatada em resposta a gradientes térmicos positivos no paulistinha em órgãos tais como o coração e na parte dorsal, central e posterior do cérebro (**Marvin et al., 2008**). Além disso, também é induzido em diferentes modelos celulares de mamíferos sob estresse oxidativo (**Bellyei et al., 2007**).

A ausência de expressão diferenciada para a maioria dos genes selecionados em embriões do paulistinha pode ter diversas razões. *Primeiramente*, a maioria dos genes foi sugerida em função de limitados estudos in vitro e in vivo com modelos de mamíferos. Por exemplo, **Sengupta e colab. (2007)** identificaram 28 genes sensíveis ao Mn mediante estudos de microarray, usando astrócitos humanos. Assim, a resposta do gene pode ter sido específica para o modelo celular proposto, sem entretanto representar necessariamente um marcador apropriado para peixes ou embriões dos peixes. *Em segundo lugar*, a análise da expressão de genes em animais adultos tem usado freqüentemente órgãos ou tipos de células específicos, tais como no estudo de **Gallagher e colab. (2008)**, que foi executado no fígado de salmões do Coho (*Oncorhynchus kisutch*). Porém, uma análise tecido-específica é difícil de executar em embriões de peixes devido ao seu pequeno tamanho. Caso a expressão diferencial de um gene seja restrita a um determinado órgão, esta pode ser mascarada por outros tecidos. *Terceiro*, a resposta transcricional embrionária pode exibir particularidades estágio-específicas, que diferem dos animais adultos, embora os genes propostos sejam reconhecidamente expressos ao longo de todo o desenvolvimento embrionário do paulistinha. E *quarto*, trabalhos prévios têm sugerido que o Mn afeta preferencialmente as mitocôndrias (**Gunter et al., 2009**), e o genoma mitocondrial é muito mais sensível do que genoma nuclear (**Gershoni et al., 2009**), consis-

te com a alteração de genes preferencialmente co-localizados nesta organela. Assim, investigações adicionais são necessárias para identificar com mais clareza os genes que possam ser biomarcadores da toxicidade do Mn no embrião do paulistinha. Por exemplo, a análise de microarranjos permitiria identificar genes específicos modificados ou alterados, adequadamente sensíveis para o teste.

Um resultado que merece ser destacado refere-se à expressão inalterada de genes relacionados com o metabolismo de neurotransmissores (*gad1*, *gad* e *th*), o que pode estar sugerindo que a neurotoxicidade do Mn não é mediada por eventos de excitotoxicidade. Esses resultados são compatíveis com os estudos de captação de GABA e glutamato em neurônios, apresentados aqui (Fig. 17), onde as espécies de Mn não induziram mudanças significativas, ao menos a concentrações $\leq$ LC50. Desta maneira, o prejuízo energético deve ser mais importante. Conforme isso, os nossos resultados conjuntamente, com outros que serão elencados a seguir, permitem sugerir que as espécies de Mn induziram neuro-toxicidade via alteração do complexo IV mitocondrial, gerando uma cascata de eventos deletérios que conduziriam à falência mitocondrial e celular (Figura 30).

O gene *mt-co1* é localizado na membrana interna mitocondrial, especificamente no complexo IV da cadeia respiratória (Baden *et al.*, 2007; Fontanesi *et al.*, 2008), enquanto o gene *hspb11* pode ser encontrado no núcleo, no citoplasma e nas mitocôndrias (Bellyei *et al.*, 2007), assim como em regiões tais como a parte dorsal, central e posterior do cérebro (Marvin *et al.*, 2008), que envolvem o cerebelo e o córtex. A expressão desses genes, após exposição a espécies do Mn, é compatível com os nossos estudos *in vitro*, os quais apontam para alterações no metabolismo mitocondrial em neurônios corticais e granulares do cerebelo.

Figura 30: Espécies de Mn induzem toxicidade em embriões de paulistinha (*Danio rerio*) provavelmente por uma cascata de eventos deletérios intra-mitocondriais. 1) As espécies de Mn induzem disfunção do gene *mt-co1* e inibição da atividade do complexo IV mitocondrial. 2) O desregulamento do gene *mt-co1* conduz a alterações na expressão de genes da família citocromo c oxidase (Baden et al., 2007; Fontanesi et al., 2008), perda de atividade dos complexos II e III (Hargreaves et al., 2007), estresse oxi-redutivo (ROS) liberação do citocromo c, ativação de caspase e, finalmente, apoptose (Zhang et al., 2003; Choi et al., 2007; Farina et al., 2008; Quintanar, 2008; Hernandez et al., 2009a). 3) Todos esses eventos podem ser abolidos parcialmente pela super-expressão do gene *hspb11*, conforme (Beere, 2004; Bellyei et al., 2007). Inclui-se também uma representação simplificada da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Complexos I-IV) e da produção de ATP (complexo V). *mt-co1-3*, família de genes mitocondriais da citocromo c oxidase; Cyt C: Citocromo C; CoQ: co-enzima Q redutase; n-DNA: DNA nuclear; mt-DNA: DNA mitocondrial. A inibição sugerida por dados deste estudo é representada por barras (/) cheias; inibição sugerida por outros estudos é representada por barras tracejadas. (-) repressão e (+) indução dos genes estudados.

Embora a regulação do gene *mt-co1* não tenha sido totalmente caracterizada (Sun et al., 2008), é sabido que a biogênese da citocromo c oxidase (COX) é complexa e depende da expressão de todas as suas unidades estruturais e de mais de duas dúzias de genes de acoplamento COX-específicos de origem nuclear e mitocondrial, onde a expressão do gene *mt-co1* é essencial para catalisar o acoplamento das múltiplas subunidades de COX (Baden et al., 2007; Fontanesi et al., 2008). Além disso, outros trabalhos têm sugerido que o Mn afeta o complexo I-IV mitocondrial (Zhang et al., 2003; Hargreaves et al., 2007), onde a inibição do complexo IV induz perda secundária de atividade dos complexos II-III (Hargreaves et al.,

2007), geração de estresse oxi-redutivo (Zhang *et al.*, 2003; Farina *et al.*, 2008; Quintanar, 2008; Hernandez *et al.*, 2009a), liberação de citocromo c, ativação de caspases e apoptose (Choi *et al.*, 2007). Todos esses eventos podem ser parcialmente abolidos pela indução de genes da família das hsps, tais como o *hspb11* (Beere, 2004; Bellyei *et al.*, 2007). A total validade do esquema proposto estaria sujeita a estudos adicionais de expressão de genes mitocondriais sob a influência de espécies de Mn.

4.5 Integração dos resultados: considerações para a avaliação de risco ecotoxicológico e neurotoxicológico do Mn durante o desenvolvimento.

A avaliação de risco ecotoxicológico e neurotoxicológico em humanos “avalia a probabilidade de que efeitos adversos possam ocorrer ou estejam ocorrendo em consequência da exposição a uns ou vários fatores de estresse” (WHO, 2001; Azevedo and Chasin, 2004). Particularmente, a avaliação de risco neurotoxicológico tem se baseado em concentrações para as quais não há efeito observável ou existe baixa probabilidade de que aconteça, porém o maior sucesso dessa avaliação estará sujeito à consideração de toda a informação disponível (WHO, 2001).

4.5.1 Estimativa de risco de danos induzidos por espécies de Mn

O resumo de resultados apresentados na Tabela 10 permitiu confirmar que a ocorrência de frações biodisponíveis do Mn nos sedimentos da bacia ALPA está associada a ~ 30% de risco ecotoxicológico (Prêmio Mapfre 2006, ver Súmula Curricular), como estimado através do cálculo do RAC. Desta maneira, o Mn poderia induzir neurotoxicidade e desregulamento de genes associados com a integridade mitocondrial e celular no paulistinha. Isso pode acontecer em concentrações até 6 vezes menores que as consideradas como mínimas para afetar a vida aquática (LEL = 460 mg/kg, MEE0, 1993). Ao mesmo tempo, quando considerado o valor mínimo estabelecido como seguro para o Mn (0,1 ppm) (CETESB, 2006), encontramos que a

fração de metais biodisponível (II_a) da coluna líquida dessa bacia também poderia induzir danos toxicológicos (Tabela 10). A perpetuidade desses eventos toxicológicos, na bacia AL-PA, pode ser potenciado pela constante troca de espécie de Mn entre os sedimentos e a coluna líquida (Hernandez *et al.*, 2009b).

Tabela 10: Principais resultados toxicológicos in vitro e in vivo, parâmetros observados em campo e valores declarados pelas agências brasileiras e internacionais relacionados ao Mn.

Parâmetros de risco	Média (ppm)	sd	n
LC50-CGC (neurotoxicidade) ^a	1,9	0,6	23
LC50-CTX (neurotoxicidade) ^a	8,8	4	12
Gene-DarT ^a	186	116	6
LC50-DarT (mortalidade) ^a	267	117	6
EC50-DarT (neurotoxicidade) ^a	42	6	6
I _s + II _s -ALPA (RAC) ^a	76,7	30	12
II _a -ALPA ^a	0,08	0,06	12
H ₂ O-CETESB ^b	0,1-0,5		
H ₂ O-WHO ^c	0,4		
LEL ^d	460		

a: resultados do presente estudo, b: (CETESB, 2006), c: (WHO, 2004), d: (MEEQ, 1993)

Para a toxicidade do Mn por exposição hídrica (96-120 h), espécies aquáticas em desenvolvimento tais como algas (*Ditylum brightwellii*, *Pseudokirchneriella subcapitata*), invertebrados (*Daphnia magna*, *Hyalella azteca*), peixes (*Oncorhynchus kisutch*, *Carassius auratus*, *Oncorhynchus mykiss*) e anfíbios (*Gastrophryne carolinensis*) com LC50 1-30 mg/L (Howe *et al.*, 2004) podem apresentar sensibilidade similar às das culturas primárias de neurônios granulares do cerebelo e do córtex (LC50 2-9 mg/L), sendo porém mais sensíveis do que o ensaio com *Danio rerio* (DarT) (EC50 42 mg/L e LC50 -267 mg/L). No entanto, para o Mn o DarT pode ter uma sensibilidade similar ou superior a ensaios com outras espécies tais como invertebrados (*Canthocamptus spp.*, *Asellus aquaticus*) e peixes em estados mais avançados do desenvolvimento (*Colisa fasciatus*, *Heteropneustes fossilis*), que apresentam LC50 54-3350 mg/L (Howe *et al.*, 2004). Os resultados elencados e discutidos neste trabalho sugerem que os valores de referência de Mn em sedimentos devem ser revistos para considerar a contribuição

Os valores de referência de Mn em sedimentos devem ser revistos para considerar a contribuição das frações biodisponíveis, especialmente na bacia ALPA.

das frações biodisponíveis. Ao mesmo constituiu uma alerta para a bacia ALPA, a qual é parcialmente uma área de proteção ambiental.

4.5.2 Descrição dos riscos de danos induzidos por espécies de Mn.

A complexidade do longo processo do desenvolvimento pós-natal do sistema nervoso central (SNC), a reduzida plasticidade e capacidade compensatória durante o envelhecimento do SNC (WHO, 2001) e a baixa taxa de regeneração dos neurônios (Claudio *et al.*, 2000), faz com que essas etapas do desenvolvimento sejam altamente vulneráveis a agentes neurotóxicos, porém a compreensão acerca desse fenômeno ainda é limitada (WHO, 2001).

Figura 31: O Mn induz neurotoxicidade no desenvolvimento in vitro (neurônios granulares cerebelares e neurônios corticais) e in vivo (paulistinha, *Danio rerio*), provavelmente mediado por disfunção mitocondrial, inibição do metabolismo energético e indução de estresse oxi-redutivo: (-1) inibição, (+1) indução e (0) não alterado.

Neste sentido, a avaliação integrada da neurotoxicidade do Mn no desenvolvimento descrita neste estudo (Fig. 31), através de estudos in vitro (Fig. 27 e 28) e dos estudos toxicogenômicos e de neurocomportamento com o paulistinha (Fig. 30), tem permitido avaliar parcialmente

as manifestações clínicas da neurotoxicidade induzida por essas espécies do Mn, assim como as possíveis causas celulares e moleculares, como sugerido em (WHO, 2001).

Estes resultados são coerentes com relatos anteriores que apontaram para perda de capacidades cognitivas e neuromusculares devido a perturbações nas funções mitocondriais e cerebelares (Sas *et al.*, 2007; Hoppenbrouwers *et al.*, 2008), assim como poderiam ajudar a compreender a relação de desordens neurológicos em crianças com a ocorrência inadequada do Mn em águas de consumo (Ljung and Vahter, 2007).

Adicionalmente, a alteração na expressão dos genes *mt-col* e *hspb11* em *Danio rerio* pelas espécies de Mn permite estimar prováveis efeitos da exposição ao Mn em outras espécies, como sugerido por (Boverhof and Zacharewski, 2006), dado que esses genes apresentam ortólogos (a mesma função) em outras espécies viventes. Por exemplo, o *hspb11* pode ser encontrado em peixes, anfíbios, aves, mamíferos e humanos (Bellyei *et al.*, 2007; Elicker and Hutson, 2007). Entretanto, o gene *mt-col* é, localizado na membrana interna mitocondrial, especificamente no complexo IV da cadeia respiratória dessa organela, e está presente em todas as células eucariotas e procariotas (Fontanesi *et al.*, 2008). Se confirmado com estudos adicionais, este gene poderia ser um biomarcador na avaliação de risco ecotoxicológico e humano de exposição ao Mn, considerando que:

- a) O Mn é bio-concentrado preferencialmente na mitocôndria (Gunter *et al.*, 2009).
- b) O Mn afeta diretamente o complexo IV mitocondrial, danificando o metabolismo mitocondrial e energético, e é um efeito comumente observado para derivados desse metal em vários modelos (Zhang *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2007; Farina *et al.*, 2008; Quintanar, 2008; Hernandez *et al.*, 2009a).
- c) Conforme os resultados deste estudo, o gene *mt-col* pode responder de maneira diferenciada aos efeitos do Mn, conforme a especiação do metal.

CONCLUSÕES

O presente estudo é um dos poucos que considerou o papel da especiação química do Mn nos ecossistemas aquáticos do Estado de São Paulo na indução de eventos neuro-toxicológicos em organismos em desenvolvimento. A seguir são elencados os principais resultados deste trabalho:

1. Na bacia ALPA, o Mn ocorre basicamente nos sedimentos, porém em constante troca com a coluna líquida, o que pode ser uma explicação plausível para as observações feitas pela **CETESB (2006)**, indicando um aumento dos níveis deste metal nas águas desta bacia, ao longo dos últimos anos. A esse respeito deve-se destacar que:
 - a) O Mn na coluna líquida está presente principalmente como metal particulado, e em menor proporção como metal lábil, e nos sedimentos apresenta a seguinte ordem: Mn ligado a hidr(óxidos) de Fe e Mn > Mn ligado a carbonatos $\approx$ Mn intercambiável $\approx$ Mn ligado a silicatos > Mn ligado a matéria orgânica.
 - b) Embora os resultados sugiram uma origem natural do Mn, a ocorrência de frações bi-odisponíveis nos sedimentos representa $\sim 30\%$ de riscos ecotoxicológicos.
2. Independentemente da especiação química, o Mn induz neuro-toxicidade em modelos de organismos em desenvolvimento, porém:
 - a) Neurônios glutamatérgicos do cerebelo, em diferenciação, foram mais sensíveis do que neurônios gabaérgicos do córtex.
 - b) O período embrio-larval de *Danio rerio* de 72 a 122 hpf foi o mais sensível.
3. Estudos in vitro (modelos de neurônios) e in vivo (paulistinha, *Danio rerio*) sugerem que o Mn divalente é mais tóxico que o Mn trivalente, mas:
 - a) Entre o MnCl_2 e as espécies de Mn complexado com citrato as diferenças foram discretas, nos estudos in vitro.

- b) O MnCl_2 foi a espécie mais tóxica para embriões expostos 48 h, entretanto para 120 h o Mn(II)Cit foi o mais tóxico, sugerindo que o citrato está mediando a toxicidade do Mn, o qual é uma exceção do “Free Ion Activity Model” (FIAM).
 - c) Embriões expostos a espécies do Mn durante 120 h (longos períodos) apresentaram mais danos do que embriões expostos 48 h (curtos períodos).
4. Os eventos de letalidade e neurotoxicidade induzidos pelas espécies de Mn tanto in vitro como in vivo parecem estar associados com distúrbios mitocondriais, inibição do metabolismo energético e estresse oxi-redutivo.
5. Os mecanismos sugeridos de neuroproteção com lactato e/ou ascorbato poderiam estimular futuras alternativas para a terapia da neurotoxicidade induzida pelo Mn.
6. A integração de resultados dos estudos de campo, in vitro e in vivo permitiu:
- a) Confirmar com precisão os riscos ecotoxicológicos por exposição ao Mn, estimados através do RAC.
 - b) Avaliar parcialmente as manifestações clínicas da neurotoxicidade deste metal no desenvolvimento, assim como as possíveis causas moleculares e celulares. Tais resultados foram compatíveis com distúrbio mitocondrial e cerebelar, e dependentes da especiação do metal.
 - c) Sugerir que os valores de referência de Mn em sedimentos devem ser reconsiderados, baseado na contribuição das frações biodisponíveis.
 - d) Sugerir que a exposição ao Mn pode gerar danos em diferentes níveis tróficos, utilizando um modo de ação comum, considerando que os genes *hspb11* e *mt-co1*, especialmente este último, apresentam ortólogos desde organismos procariotos até eucariotos, incluindo o homem, o que aponta esse gene como um potencial biomarcador na avaliação da toxicidade de espécies do Mn.

RECOMENDAÇÕES

1. Recomenda-se que os resultados deste trabalho sejam considerados pelas agências ambientais do Estado de São Paulo, nos seus programas de avaliação e gerenciamentos de riscos.
2. Ampliar o estudo do Mn na bacia ALPA quanto a tempo, pontos de coletas e inclusão de análises químico-toxicológicas de organismos bentônicos.
3. Quantificar o lactato e ascorbato intracelulares nos modelos in vitro sugeridos sob efeito das espécies do Mn, a fim de confirmar as rotas metabólicas de toxicidade e neuroproteção sugeridas neste estudo.
4. Quantificar o Mn intraembrionário, a fim de desvendar o papel do ovo como mecanismo de proteção na toxicidade induzida por espécies do Mn.
5. Aperfeiçoar ainda mais a avaliação de risco ecotoxicológica e neurotoxicológica em humanos em desenvolvimento, com respeito ao Mn, através de:
 - a) Desenvolvimento de uma análise espaço-temporal do transcrito mitocondrial de neurônios granulares do cerebelo e dos embriões de paulistinha, sob os efeitos de espécies de Mn, a fim de completar e confirmar os mecanismos de toxicidade e neuroproteção propostos neste estudo, tentando inclusive identificar outros potenciais biomarcadores da toxicidade ao Mn.
 - b) Desenvolvimento de estudos específicos do gene *mt-co1* em diferentes níveis tróficos sob a influência de espécies químicas de Mn, a fim de validar a nossa proposta de biomarcador de toxicidade ao Mn.
 - c) Estabelecer parcerias em análises de avaliação de risco ecotoxicológico, a fim de ampliar a base de dados da toxicidade do Mn em sistemas aquáticos e verificar a sugestão de mudanças nos níveis “seguros” do Mn nos sedimentos.

BIBLIOGRAFIA

- Abreu, C. L. C. (2008). Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3t3. In *Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde*, pp. 122. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Adam, C., GarnierLaplace, J., and Baudin, J. P. (1997). Uptake from water, release and tissue distribution of Mn-54 in the rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss walbaum*). *Environmental Pollution* **97**, 29-38.
- Agrawal, N. K., and Mahajan, C. L. (1980). Hematological changes due to vitamin C deficiency in *Channa punctatus* Bloch. *Journal of Nutrition* **110**, 2172-2181.
- Al-Akel, A. S., Shamsi, M. J. K., Al-Kahem, H. F., and Ahmed, Z. (1998). Haematological effects of manganese toxicity on freshwater fish, *Oreochromis niloticus* (Perciformes; Cichlidae). *Pakistan Journal of Zoology* **30**, 179-183.
- Arnaud, E., Ferri, K., Thibaut, J., Haftek-Terreau, Z., Aouacheria, A., Le Guellec, D., Lorca, T., and Gillet, G. (2006). The zebrafish bcl-2 homologue Nr2 controls development during somitogenesis and gastrulation via apoptosis-dependent and -independent mechanisms. *Cell Death and Differentiation* **13**, 1128-1137.
- Aschner, M. (2000). Manganese: Brain transport and emerging research needs. *Environmental Health Perspectives* **108**, 429-432.
- Aschner, M., Erikson, K. M., and Dorman, D. C. (2005). Manganese dosimetry: Species differences and implications for neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology* **35**, 1-32.
- Aschner, M., Guilarte, T. R., Schneider, J. S., and Zheng, W. (2007). Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **221**, 131-147.
- Atessahin, A., Karahan, I., Yilmaz, S., Ceribasi, A. O., and Princci, I. (2003). The effect of manganese chloride on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological Research* **48**, 637-642.
- Atkins, P., Shriver, D.F., (2006). *Inorganic chemistry*. Freeman, W.H. & Company, New York, US.
- Azevedo, F. A., and Chasin, A. A. M. (2004). *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. Rima, São Carlos. Brasil.
- Baden, K. N., Murray, J., Capaldi, R. A., and Guillemín, K. (2007). Early developmental pathology due to cytochrome c oxidase deficiency is revealed by a new zebrafish model. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 34839-34849.
- Baden, S. P., and Neil, D. M. (1998). Accumulation of manganese in the haemolymph, nerve and muscle tissue of *Nephrops norvegicus* (L.) and its effect on neuromuscular performance. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **119**, 351-359.
- Bae, Y. K., Shimizu, T., and Hibi, M. (2005). Patterning of proneuronal and inter-proneuronal domains by hairy- and enhancer of split-related genes in zebrafish neuroectoderm. *Development* **132**, 1375-1385.
- Banhegyi, G., Braun, L., Csala, M., Puskas, F., and Mandl, J. (1997). Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radical Biology and Medicine* **23**, 793-803.
- Banta, R. G., and Markesbery, W. R. (1977). Elevated Manganese Levels Associated with Dementia and Extrapyrmidal Signs. *Neurology* **27**, 213-216.
- Barceloux, D. G. (1999). Manganese. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology* **37**, 293-307.
- Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., and Zhang, X. (1993). Timetables of Neurogenesis in the Human Brain Based on Experimentally Determined Patterns in the Rat. *Neurotoxicology* **14**, 83-144.

- Beere, H. M. (2004). 'The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science* **117**, 2641-2651.
- Bellyei, S., Szigeti, A., Pozsgai, E., Boronkai, A., Gomori, E., Hocsak, E., Farkas, R., Sumegi, B., and Gallyas, F. (2007). Preventing apoptotic cell death by a novel small heat shock protein. *European Journal of Cell Biology* **86**, 161-171.
- Bennett, D. A., and Waters, M. D. (2000). Applying Biomarker Research. *Environmental Health Perspectives* **108**, 907-910.
- Birge, W. J. (1978). Aquatic toxicology of trace elements of coal and fly ash. In *Energy and environmental stress in aquatic systems* (J. H. Thorp, Gibbons, J.W., Ed.), pp. 219-240. US Department of Energy Symposium, Augusta, GA,.
- BMY (2006). Brazilian Mineral Yearbook . Part III: Statistics by Commodities. http://www.dnpm.gov.br/assets/galeriaDocumento/AMB2006/III_2006.pdf. Accessed on August 21, 2008.
- Bouchard, M., Laforest, F., Vandelac, L., Bellinger, D., and Mergler, D. (2007). Hair manganese and hyperactive behaviors: Pilot study of school-age children exposed through tap water. *Environmental Health Perspectives* **115**, 122-127.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Braunbeck, T., Bottcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., and Seitz, N. (2005). Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - an update. *Altex-Alternativen Zu Tierexperimenten* **22**, 87-102.
- Brurok, H., Schjott, J., Berg, K., Karlsson, J. O. G., and Jynge, P. (1997). Effects of MnDPDP, DPDP--, and MnCl2 on cardiac energy metabolism and manganese accumulation - An experimental study in the isolated perfused rat heart. *Investigative Radiology* **32**, 205-211.
- Buat-menard, P., and Chesselet, R. (1979). Variable Influence of the Atmospheric Flux on the Trace-Metal Chemistry of Oceanic Suspended Matter. *Earth Planet. Sci. Lett.* **42**, 399-411.
- Buffle, J., and DeVitre, R. R. (1994). *Chemical and biological regulation of aquatic systems*. Lewis,, Boca Raton.
- Butcher, D. J., Zybin, A., Bolshov, M. A., and Niemax, K. (1999). Speciation of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl by high-performance liquid chromatography-diode laser atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry* **71**, 5379-5385.
- Cambier, S., Benard, G., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Rossignol, R., Brethes, D., and Bourdineaud, J. P. (2009). At environmental doses, dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (Danio rerio). *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**, 791-799.
- Campbell, P. (1995). Interactions between Trace Metals and Aquatic Organisms: A Critique of the Free-Ion Activity Model. In *Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (A. Tessier, Turner, D.R., Ed.), pp. 45-102. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Caprile, T., Salazar, K., Astuya, A., Cisternas, P., Silva-Alvarez, C., Montecinos, H., Millan, C., Garcia, M. D., and Nualart, F. (2009). The Na+-dependent l-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons, and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids. *Journal of Neurochemistry* **108**, 563-577.
- Casalino, E., Calzaretto, G., Landriscina, M., Sblano, C., Fabiano, A., and Landriscina, C. (2007). The Nrf2 transcription factor contributes to the induction of alpha-class GST isoenzymes in liver of acute cadmium or manganese intoxicated rats: Comparison with the toxic effect on NAD(P)H : quinone reductase. *Toxicology* **237**, 24-34.

- Castro, M. A., Beltran, F. A., Brauchi, S., and Concha, II (2009). A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. *Journal of Neurochemistry* **110**, 423-440.
- Castro, R. M. C., Casatti, L., Santos, H. F., Ferreira, K. M., Ribeiro, A. C., Benine, R. C., Dardis, G. Z. P., Melo, A. L. A., Stopiglia, R., Abreu, T. X., Bockmann, F. A., Carvalho, M., Gibran, F. Z., Lima, F. C. T. (2003). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste do Brasil. In *Biota Neotrop.*, Sao Paulo.
- CETESB (2006). Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo - 2005. CETESB, Sao Paulo.
- Chatterjee, S., Chattopadhyay, B., and Mukhopadhyay, S. K. (2006). Trace metal distribution in tissues of cichlids (*Oreochromis niloticus* and *O. mossambicus*) collected from wastewater-fed fishponds in east Calcutta wetlands, a Ramsar site. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* **36**, 119-125.
- Chattopadhyay, S., and Bielinsky, A. K. (2007). Human Mcm10 regulates the catalytic subunit of DNA polymerase- α and prevents DNA damage during replication. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 4085-4095.
- Choi, C. J., Anantharam, V., Saetveit, N. J., Houk, R. S., Kanthasamy, A., and Kanthasamy, A. G. (2007). Normal cellular prion protein protects against manganese-induced oxidative stress and apoptotic cell death. *Toxicological Sciences* **98**, 495-509.
- Choi, S. H., Aid, S., and Bosetti, F. (2009). The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends in Pharmacological Sciences* **30**, 174-181.
- Claudio, L., Kwa, W. C., Russell, A. L., and Wallinga, D. (2000). Testing methods for developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology* **164**, 1-14.
- Coecke, S., Goldberg, A. M., Allen, S., Buzanska, L., Calamandrei, G., Crofton, K., Hareng, L., Hartung, T., Knaut, H., Honegger, P., Jacobs, M., Lein, P., Li, A., Mundy, W., Owen, D., Schneider, S., Silbergeld, E., Reum, T., Trnovec, T., Monnet-Tschudi, F., and Bal-Price, A. (2007). Workgroup report: Incorporating in vitro alternative methods for developmental neurotoxicity into international hazard and risk assessment strategies. *Environmental Health Perspectives* **115**, 924-931.
- Colombini, M. P., and Fuoco, R. (1983). Determination of Manganese at Ng Ml Levels in Natural-Waters by Differential Pulse Polarography. *Talanta* **30**, 901-905.
- Connel, D. W., and Miller, G. J. (1984). *Chemistry and ecotoxicology of pollution*. John Wiley and Sons, New York.
- Cornelis, R., and Nordberg, M. (2007). General Chemistry, Sampling, Analytical Methods, and Speciation. In *Handbook on Toxicology of Metals* (G. F. Nordberg, Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg L., Ed.), pp. 29-38. Elsevier, New York, United States.
- Cossarinidunier, M., Demail, A., Lepot, D., and Guerin, V. (1988). Effect of Manganese Ions on the Immune-Response of Carp (*Cyprinus-Carpio*) against *Yersinia-Ruckeri*. *Developmental and Comparative Immunology* **12**, 573-579.
- Cowan, D. M. (2008). Exploring biomarkers of manganese exposure in humans and animals: the manganese-iron ratio as a potential tool for identification of early-onset manganese. In *GRADUATE SCHOOL*, pp. 186. Purdue University's, West Lafayette, Indiana.
- Crossgrove, J. S., Allen, D. D., Bukaveckas, B. L., Rhineheimer, S. S., and Yokel, R. A. (2003). Manganese distribution across the blood-brain barrier I. Evidence for carrier-mediated influx of manganese citrate as well as manganese and manganese transferrin. *Neurotoxicology* **24**, 3-13.
- Dau, H., Iuzzolino, L., and Dittmer, J. (2001). The tetra-manganese complex of photosystem II during its redox cycle - X-ray absorption results and mechanistic implications. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1503**, 24-39.

- Davidson, C. M., Duncan, A. L., Littlejohn, D., Ure, A. M., and Garden, L. M. (1998). A critical evaluation of the three-stage BCR sequential extraction procedure to assess the potential mobility and toxicity of heavy metals in industrially-contaminated land. *Analytica Chimica Acta* **363**, 45-55.
- Desole, M. S., Esposito, G., Migheli, R., Sircana, S., Delogu, M. R., Fresu, L., Miele, M., DeNatale, G., and Miele, E. (1997a). Glutathione deficiency potentiates manganese toxicity in rat striatum and brainstem and in PC12 cells. *Pharmacological Research* **36**, 285-292.
- Desole, M. S., Sciola, L., Delogu, M. R., Sircana, S., Migheli, R., and Miele, E. (1997b). Role of oxidative stress in the manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurochemistry International* **31**, 169-176.
- DNPM (2001). Anuário Mineral Brasileiro 2001. Departamento Nacional de Produção Mineral, Brasil.
- Donaldson, J. (1987). The Physiopathological Significance of Manganese in Brain - Its Relation to Schizophrenia and Neurodegenerative Disorders. *Neurotoxicology* **8**, 451-462.
- EFSA (2005). Opinion on the "Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes". *The EFSA Journal* **292**, 1-46.
- Ehrhart, J., and Zeevalk, G. D. (2003). Cooperative interaction between ascorbate and glutathione during mitochondrial impairment in mesencephalic cultures. *Journal of Neurochemistry* **86**, 1487-1497.
- Elicker, K. S., and Hutson, L. D. (2007). Genome-wide analysis and expression profiling of the small heat shock proteins in zebrafish. *Gene* **403**, 60-69.
- Epstein, F. H., and Epstein, J. A. (2005). A perspective on the value of aquatic models in biomedical research. *Experimental Biology and Medicine* **230**, 1-7.
- Ergin, M., Saydam, C., Basturk, O., Erdem, E., and Yoruk, R. (1991). Heavy-Metal Concentrations in Surface Sediments from the 2 Coastal Inlets (Golden Horn Estuary and Izmit Bay) of the Northeastern Sea of Marmara. *Chemical Geology* **91**, 269-285.
- Erikson, K. M., Dorman, D. C., Lash, L. H., and Aschner, M. (2007a). Manganese inhalation by rhesus monkeys is associated with brain regional changes in biomarkers of neurotoxicity. *Toxicological Sciences* **97**, 459-466.
- Erikson, K. M., Syversen, T., Aschner, J. L., and Aschner, M. (2005). Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **19**, 415-421.
- Erikson, K. M., Thompson, K., Aschner, J., and Aschner, M. (2007b). Manganese neurotoxicity: A focus on the neonate. *Pharmacology & Therapeutics* **113**, 369-377.
- Ezoe, Y., Lin, C.-H., Mochioka, N., and Yoshimura, K. (2001). The Distribution of Trace Elements in Tissues of Fish Living in Acid Environments of Yangmingshan National Park, Taiwan. *Analytical Sciences* **17**, 813-816.
- Farina, M., Bonne, R., Vendrell, I., Campos, F., Pannia, B., and Suno, C. (2008). Oxidative stress in cerebellar granule neurons exposed to methylmercury and manganese. *Toxicology Letters* **180**, S41-S41.
- Feng, B., Bulchand, S., Yaksi, E., Friedrich, R. W., and Jesuthasan, S. (2005). The recombination activation gene 1 (Rag1) is expressed in a subset of zebrafish olfactory neurons but is not essential for axon targeting or amino acid detection. *Bmc Neuroscience* **6**.
- Finn, R. N. (2007). The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria. *Aquatic Toxicology* **81**, 337-354.
- Fitsanakis, V. A., Zhang, N., Anderson, J. G., Erikson, K. M., Avison, M. J., Gore, J. C., and Aschner, M. (2008). Measuring brain manganese and iron accumulation in rats following 14 weeks of low-dose manganese treatment using atomic absorption spectroscopy and magnetic resonance imaging. *Toxicological Sciences* **103**, 116-124.

- Fitzpatrick, M. J., Ben-Shahar, Y., Smid, H. M., Vet, L. E. M., Robinson, G. E., and Sokolowski, M. B. (2005). Candidate genes for behavioural ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 96-104.
- Fontanesi, F., Soto, I. C., and Barrientos, A. (2008). Cytochrome c oxidase biogenesis: New levels of regulation. *Iubmb Life* **60**, 557-568.
- Friedl, G., Wehrli, B., and Manceau, A. (1997). Solid phases in the cycling of manganese in eutrophic lakes: New insights from EXAFS spectroscopy. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **61**, 275-290.
- Gallagher, E. P., LaVire, H. M., Bammler, T. K., Stapleton, P. L., Beyer, R. P., and Farin, F. M. (2008). Hepatic expression profiling in smolting and adult coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*). *Environmental Research* **106**, 365-378.
- Gallo, V., Ciotti, M. T., Coletti, A., Aloisi, F., and Levi, G. (1982). Selective Release of Glutamate from Cerebellar Granule Cells Differentiating in Culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **79**, 7919-7923.
- Garcia, D. A., Bujons, J., Vale, C., and Sunol, C. (2006a). Allosteric positive interaction of thymol with the GABA(A) receptor in primary cultures of mouse cortical neurons. *Neuropharmacology* **50**, 25-35.
- Garcia, S. J., Gellein, K., Syversen, T., and Aschner, M. (2006b). A manganese-enhanced diet alters brain metals and transporters in the developing rat. *Toxicological Sciences* **92**, 516-525.
- Gerbaldi, C., Bodoardo, S., Fiorilli, S., Piana, M., and Penazzi, N. (2005). Characterization of Mn species in mesoporous systems: An electrochemical study. *Electrochim. Acta* **50**, 5539-5545.
- Gershoni, M., Templeton, A. R., and Mishmar, D. (2009). Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation. *Bioessays* **31**, 642-650.
- Ghanmi, Z., Rouabhia, M., Alifuddin, M., Troutaud, D., and Deschaux, P. (1990). Modulatory Effect of Metal-Ions on the Immune-Response of Fish - In vivo and In vitro Influence of MnCl₂ on Nk Activity of Carp Pronephros Cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **20**, 241-245.
- Ghrefat, H., and Yusuf, N. (2006). Assessing Mn, Fe, Cu, Zn, and Cd pollution in bottom sediments of Wadi Al-Arab Dam, Jordan. *Chemosphere* **65**, 2114-2121.
- Ghyczy, M., and Boros, M. (2001). Electrophilic methyl groups present in the diet ameliorate pathological states induced by reductive and oxidative stress: a hypothesis. *British Journal of Nutrition* **85**, 409-414.
- Giusi, G., Facciolo, R. M., Alo, R., Carelli, A., Madeo, M., Brandmayr, P., and Canonaco, M. (2005). Some environmental contaminants influence motor and feeding behaviors in the ornate wrasse (*Thalassoma pavo*) via distinct cerebral histamine receptor subtypes. *Environmental Health Perspectives* **113**, 1522-1529.
- Goering, P. L., and Fisher, B. R. (1995). Metals and Stress Proteins. In *Toxicology of Metals: Biochemical Aspects* (R. A. Goyer, Cherian, M.G., Ed.), pp. 228-266. Springer, Berlin, Germany.
- Goldberg, D. P., Telser, J., Krzystek, J., Montalban, A. G., Brunel, L. C., Barrett, A. G. M., and Hoffman, B. M. (1997). EPR spectra from "EPR-silent" species: High-field EPR spectroscopy of manganese(III) porphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 8722-8723.
- Gomaa, M. N. E., Abouarab, A. A. K., Badawy, A., and Khayria, N. (1995). Distribution Pattern of Some Heavy-Metals in Egyptian Fish Organs. *Food Chem.* **53**, 385-389.
- Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., and Bourdineaud, J. P. (2006). Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biometals* **19**, 225-235.

- Groussard, C., Morel, I., Chevanne, M., Monnier, M., Cillard, J., and Delamarche, A. (2000). Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *Journal of Applied Physiology* **89**, 169-175.
- Gündel, U., Benndorf, D., vonBergen, M., Altenburger, R., and Küster, E. (2007). Vitellogenin cleavage products as indicators for toxic stress in zebra fish embryos: a proteomic approach. *Proteomics* **7**.
- Gunter, K. K., Aschner, M., Miller, L. M., Eliseev, R., Salter, J., Anderson, K., Hammond, S., and Gunter, T. E. (2005). Determining the oxidation states of manganese in PC12 and nerve growth factor-induced PC12 cells. *Free Radical Biology and Medicine* **39**, 164-181.
- Gunter, T. E., Gavin, C. E., and Gunter, K. K. (2009). The case for manganese interaction with mitochondria. *Neurotoxicology* **30**, 727-729.
- Gupta, V. K., Ali, I., and Aboul-Enein, H. Y. (2007). Chapter 3: Metal ions speciation in the environment: Distribution, toxicities and analyses. In *Developments in Environmental Science* (D. Sarkar, Datta R., and Hannigan, R., Ed.), pp. 33-56. Elsevier.
- Habib, A., Shireen, T., Islam, A., Begum, N., and Alam, A. M. S. (2006). Cyclic voltammetric studies of copper and manganese in the presence of L-leucine using glassy carbon electrode. *Pak. J. Anal. & Envir. Chem.* **7**, 96 - 102.
- Hafeman, D., Factor-Litvak, P., Cheng, Z. Q., van Geen, A., and Ahsan, H. (2007). Association between manganese exposure through drinking water and infant mortality in Bangladesh. *Environmental Health Perspectives* **115**, 1107-1112.
- HaMai, D., and Bondy, S. C. (2004). Oxidative basis of manganese neurotoxicity. *Redox-Active Metals in Neurological Disorders* **1012**, 129-141.
- Handy, R. D. (2003). Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **135**, 25-38.
- Hargreaves, I. P., Duncan, A. J., Wu, L., Agrawal, A., Land, J. M., and Heales, S. J. R. (2007). Inhibition of mitochondrial complex IV leads to secondary loss complex II-III activity: Implications for the pathogenesis and treatment of mitochondrial encephalomyopathies. *Mitochondrion* **7**, 284-287.
- Hart, B. T., and Davies, S. H. R. (1977). New Dialysis-Ion Exchange Technique for Determining Forms of Trace-Metals in Water. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* **28**, 105-112.
- Hass, U. (2006). The need for developmental neurotoxicity studies in risk assessment for developmental toxicity. *Reproductive Toxicology* **22**, 148-156.
- Herbert, M. R., Russo, J. P., Yang, S., Roohi, J., Blaxill, A., Kahler, S. G., Cremer, L., and Hatchwell, E. (2006). Autism and environmental genomics. *Neurotoxicology* **27**, 671-684.
- Hernandez, R. B., Farina, M., Espósito, B. P., and Suñol, C. (2009a). Development neurotoxicological risk assessment of the manganese (DNTRAM): Role of chemical speciation and cell type. In: 9th International Conference on Alzheimer`s and Parkinson`s Diseases - ADPD, pp. 2132-2132.
- Hernandez, R. B., Oliveira, E., and Espósito, B. P. (2009b). Distribution and behavior of manganese in the Alto do Paranapanema Basin. *Journal of Environmental Monitoring* **11**, 1236-1243.
- Herrera, A. A., and Catap, E. S. (1992). Manganese Neurotoxicity in *Oreochromis niloticus*. *Science Diliman*. **1**, 57-70.
- Herz, H., Blake, D. R., and Grootveld, M. (1997). Multicomponent investigations of the hydrogen peroxide- and hydroxyl radical-scavenging antioxidant capacities of biofluids: The roles of endogenous pyruvate and lactate - Relevance to inflammatory joint diseases. *Free Radical Research* **26**, 19-35.

- Hoppenbrouwers, S. S., Schutter, D., Fitzgerald, P. B., Chen, R., and Daskalakis, Z. J. (2008). The role of the cerebellum in the pathophysiology and treatment of neuropsychiatric disorders: A review. *Brain Research Reviews* **59**, 185-200.
- Howe, P., Malcolm, H., and Dobson, S. (2004). *Manganese and its compounds: Environmental aspects*. World Health Organization, Geneva.
- Hsu, J. H., and Lo, S. L. (2001). Effect of composting on characterization and leaching of copper, manganese, and zinc from swine manure. *Environmental Pollution* **114**, 119-127.
- ICATM (2009). Memorandum of Cooperation. International Cooperation on Alternative Test Methods. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/about_docs/ICATM-MOC.pdf.
- Jakka, N. M., Rao, T. G., and Rao, J. V. (2007). Locomotor behavioral response of mosquito-fish (*Gambusia affinis*) to subacute mercury stress monitored by video tracking system. *Drug and Chemical Toxicology* **30**, 383-397.
- Jee, S., Hwang, D., Seo, S., Kim, Y., Kim, C., Kim, B., Shim, S., Lee, S., Sin, J., Bae, C., Lee, B., Jang, M., Kim, M., Yim, S., Jang, I., Cho, J., and Chae, K. (2007). Microarray analysis of insulin-regulated gene expression in the liver: The use of transgenic mice co-expressing insulin-siRNA and human IDE as an animal model. *International Journal of Molecular Medicine* **20**, 829-835.
- Jeziarska, B., and Witeska, M. (2004). The effect of metals on fish gill functions - Gas and ion exchange (review). *Fresenius Environmental Bulletin* **13**, 1370-1378.
- Jiang, Y. M., Mo, X. A., Du, F. O., Fu, X., Zhu, X. Y., Gao, H. Y., Xie, J. L., Liao, F. L., Pira, E., and Zheng, W. (2006). 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* **48**, 644-649.
- Jiang, Y. M., and Zheng, W. (2005). Cardiovascular toxicities upon manganese exposure. *Cardiovascular Toxicology* **5**, 345-354.
- Kakkar, P., and Jaffery, F. N. (2005). Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **19**, 335-349.
- Kamler, E. (2008). Resource allocation in yolk-feeding fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **18**, 143-200.
- Karaczyn, A., Ivanov, S., Reynolds, M., Zhitkovich, A., Kasprzak, K. S., and Salnikow, K. (2006). Ascorbate depletion mediates up-regulation of hypoxia-associated proteins by cell density and nickel. *Journal of Cellular Biochemistry* **97**, 1025-1035.
- Kazakova, N., Li, H. L., Mora, A., Jessen, K. R., Mirsky, R., Richardson, W. D., and Smith, H. K. (2006). A screen for mutations in zebrafish that affect myelin gene expression in Schwann cells and oligodendrocytes. *Developmental Biology* **297**, 1-13.
- Kim, Y. H. (2004). High signal intensities on T1-weighted MRI as a biomarker of exposure to manganese. *Industrial Health* **42**, 111-115.
- Kitao, M., Lei, T. T., and Koike, T. (1997). Comparison of photosynthetic responses to manganese toxicity of deciduous broad-leaved trees in northern Japan. *Environmental Pollution* **97**, 113-118.
- Klewicki, J. K., and Morgan, J. J. (1998). Kinetic behavior of Mn(III) complexes of pyrophosphate, EDTA, and citrate. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 2916-2922.
- Kondakis, X. G., Makris, N., Leotsinidis, M., Prinou, M., and Papapetropoulos, T. (1989). Possible Health-Effects of High Manganese Concentration in Drinking-Water. *Archives of Environmental Health* **44**, 175-178.
- Kontur, P. J., and Fechter, L. D. (1985). Brain Manganese, Catecholamine Turnover, and the Development of Startle in Rats Prenatally Exposed to Manganese. *Teratology* **32**, 1-11.
- Krishnani, K. K., Azad, I. S., Kailasam, M., Thirunavukkarasu, A. R., Gupta, B. P., Joseph, K. O., Muralidhar, M., and Abraham, M. (2003). Acute toxicity of some heavy metals

- to Lates calcarifer fry with a note on its histopathological manifestations. *J. Environ. Sci. Health Part A-Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* **38**, 645-655.
- Lanza, V., and Vecchio, G. (2009). New conjugates of superoxide dismutase/catalase mimetics with cyclodextrins. *Journal of Inorganic Biochemistry* **103**, 381-388.
- Lazerte, B. D., and Burling, K. (1990). Manganese Speciation in Dilute Waters of the Precambrian Shield, Canada. *Water Research* **24**, 1097-1101.
- Leeuwen, H. P., Town, R. M., Buffle, J., Cleven, R., Davison, W., Puy, J., van Riemsdijk, W. H., and Sigg, L. (2005). Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 8545-8556.
- Li, G. J., Choi, L. S., Wang, X., Liu, J., Waalkes, M. P., and Zheng, W. (2006). Molecular mechanism of distorted iron regulation in the blood-CSF barrier and regional blood-brain barrier following in vivo subchronic manganese exposure. *Neurotoxicology* **27**, 737-744.
- Ljung, K., and Vahter, M. (2007). Time to re-evaluate the guideline value for manganese in drinking water? *Environmental Health Perspectives* **115**, 1533-1538.
- Ljung, K., Vahter, M., and Berglund, M. (2007). Manganese in drinking water, Stockholm.
- Loska, K., Wiechula, D., Barska, B., Cebula, E., and Chojnecka, A. (2003). Assessment of arsenic enrichment of cultivated soils in southern Poland. *Polish Journal of Environmental Studies* **12**, 187-192.
- Lu, L., Zhang, L. I., Li, G. J., Guo, W. R., Liang, W. N., and Zheng, W. (2005). Alteration of serum concentrations of manganese, iron, ferritin, and transferrin receptor following exposure to welding fumes among career welders. *Neurotoxicology* **26**, 257-265.
- Lucitt, M. B., Price, T. S., Pizarro, A., Wu, W., Yocum, A. K., Seiler, C., Pack, M. A., Blair, I. A., FitzGerald, G. A., and Grosser, T. (2008). Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**, 981-994.
- Mabbs, F. E., and Collison, D. (1992). *Electron Paramagnetic Resonance of d Transition Metal Compounds*. Elsevier, Amsterdam.
- Malthankar, G. V., White, B. K., Bhushan, A., Daniels, C. K., Rodnick, K. J., and Lai, J. C. K. (2004). Differential lowering by manganese treatment of activities of glycolytic and tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes investigated in neuroblastoma and astrocytoma cells is associated with manganese-induced cell death. *Neurochemical Research* **29**, 709-717.
- Manahan, S. E. (2001). *Fundamentals of Environmental Chemistry*. CRC Press LLC, Boca Raton.
- Martin, K., Huggins, T., King, C., Carroll, M. A., and Catapane, E. J. (2008). The neurotoxic effects of manganese on the dopaminergic innervation of the gill of the bivalve mollusc, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **148**, 152-159.
- Martin, S. C., Heinrich, G., and Sandell, J. H. (1998). Sequence and expression of glutamic acid decarboxylase isoforms in the developing zebrafish. *Journal of Comparative Neurology* **396**, 253-266.
- Marvin, M., O'Rourke, D., Kurihara, T., Juliano, C. E., Harrison, K. L., and Hutson, L. D. (2008). Developmental expression patterns of the zebrafish small heat shock proteins. *Developmental Dynamics* **237**, 454-463.
- McEachern, G., Kassovska-Bratinova, S., Raha, S., Tarnopolsky, M. A., Turnbull, J., Bourgeois, J., and Robinson, B. (2000). Manganese superoxide dismutase levels are elevated in a proportion of amyotrophic lateral sclerosis patient cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **273**, 359-363.
- MEEQ (1993). Guidelines for the Protection and Management of Aquatic Sediment Quality in Ontario. Ministry of Environment and Energy of Ontario.
- Michalke, B. (2003). Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**, 122-139.

- Michalke, B. (2004). Manganese speciation using capillary electrophoresis-ICP-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1050**, 69-76.
- Michalke, B., Halbach, S., and Nischwitz, V. (2007). Speciation and toxicological relevance of manganese in humans. *Journal of Environmental Monitoring* **9**, 650-656.
- Michalke, B., Halbach, S., and Nischwitz, V. (2009). JEM Spotlight: Metal speciation related to neurotoxicity in humans. *Journal of Environmental Monitoring* **11**, 939-954.
- Morel, F. M. M. (1983). *Principles of Aquatic Chemistry*. Wiley, New York.
- Mosman, T. (1983). Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Muller, G. (1969). Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine River. *GeoJournal* **2**, 108-118.
- Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A.R., Dobbie, Z., (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* **32**, 2-7.
- Mycielska, M. E., Patel, A., Rizaner, N., Mazurek, M. P., Keun, H., Ganapathy, V., and Djamgoz, M. B. A. (2009). Citrate transport and metabolism in mammalian cells Prostate epithelial cells and prostate cancer. *Bioessays* **31**, 10-20.
- Nagel, R. (1988). Der vollständige Life-Cycle Test mit Fischen - Verfahrensvorschlag. In *UBA - Texteband* (W. Heger, Jung, S., Martin, S., Raennefahrt, I., Schiecke, U., Schmitz, S., Teichmann, H., Peter, H. . Ed.), pp. 58-98. Umweltbundesamt, Berlin.
- Nagel, R. (2002). DarT: the embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*-a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex-Alternativen Zu Tierexperimenten* **19**, 38-48.
- Nakamichi, N., Kambe, Y., Oikawa, H., Ogura, M., Takano, K., Tamaki, K., Inoue, M., Hinoi, E., and Yoneda, Y. (2005). Protection by exogenous pyruvate through a mechanism related to monocarboxylate transporters against cell death induced by hydrogen peroxide in cultured rat cortical neurons. *Journal of Neurochemistry* **93**, 84-93.
- Nath, K., and Kumar, N. (1988). Impact of Manganese Intoxication on Certain Parameters of Carbohydrate-Metabolism of a Fresh-Water Tropical Perch, *Colisa-Fasciatus*. *Chemosphere* **17**, 617-624.
- Nayak, S. B., Jena, B. S., and Patnaik, B. K. (1999). Effects of age and manganese (II) chloride on peroxidase activity of brain and liver of the teleost, *Channa punctatus*. *Experimental Gerontology* **34**, 365-374.
- Neumann, N. F., and Galvez, F. (2002). DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? *Biotechnology Advances* **20**, 391-419.
- Nordberg, G. F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg L, (2007). *Handbook on Toxicology of Metals*. Elsevier, New York, United States.
- NRC (2005). Manganese. In *Mineral Tolerance of Domestic Animals*. (N. R. Council, Ed.), pp. 335-347. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Nyberg, P., Andersson, P., Degerman, E., Borg, H., and Olofsson, E. (1995). Labile inorganic manganese - An overlooked reason for fish mortality in acidified streams? *Water Air and Soil Pollution* **85**, 333-340.
- Paixão, R. L. (2001). Experimentação animal: razões e emoções para uma ética. In *Escola Nacional de Saúde Pública*, pp. 151. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Palladini, G., Margotta, V., Carolei, A., and Hernandez, M. C. (1980). Dopamine Agonist Performance in *Planaria* after Manganese Treatment. *Experientia* **36**, 449-450.
- Parker, D. L., Sposito, G., and Tebo, B. M. (2004). Manganese(III) binding to a pyoverdine siderophore produced by a manganese(II)-oxidizing bacterium. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **68**, 4809-4820.
- Partridge, G. J., and Lymbery, A. J. (2009). Effects of manganese on juvenile mullet (*Argyrosomus japonicus*) cultured in water with varying salinity-Implications for inland mariculture. *Aquaculture* **290**, 311-316.

- Pearson, G. F., and Greenway, G. M. (2005). Recent developments in manganese speciation. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **24**, 803-809.
- Pelizzetti, E., Mentasti, E., and Pramauro, E. (1978). Kinetics and Mechanism of Oxidation of Ascorbic-Acid by Manganese(III) in Aqueous Acidic Perchlorate Media. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 61-63.
- Peterson, R. T., Nass, R., Boyd, W. A., Freedman, J. H., Dong, K., and Narahashi, T. (2008). Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology* **29**, 546-555.
- Pizarro, J., Rubio, M. A., and Castillo, X. (2003). Study of chemical speciation in sediments: An approach to vertical metals distribution in Rapel reservoir (Chile). *J. Chil. Chem. Soc.* **48**, 45-50.
- Ponnappakkam, T., Iszard, M., and Henry-Sam, G. (2003). Effects of oral administration of manganese on the kidneys and urinary bladder of Sprague-Dawley rats. *International Journal of Toxicology* **22**, 227-232.
- Popescu, B. F. G., Robinson, C. A., Rajput, A., Rajput, A. H., Harder, S. L., and Nichol, H. (2009). Iron, Copper, and Zinc Distribution of the Cerebellum. *Cerebellum* **8**, 74-79.
- Quintanar, L. (2008). Manganese neurotoxicity: A bioinorganic chemist's perspective. *Inorganica Chimica Acta* **361**, 875-884.
- Radio, N. M., and Mundy, W. R. (2008). Developmental neurotoxicity testing in vitro: Models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. *Neurotoxicology* **29**, 361-376.
- Rafiki, A., Boulland, J. L., Halestrap, A. P., Ottersen, O. P., and Bergersen, L. (2003). Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. *Neuroscience* **122**, 677-688.
- Rahman, I., Kode, A., and Biswas, S. (2006). Assay for quantitative determination of luteathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols* **1**, 3159-3165.
- Rainbow, P. S. (2007). Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environment International* **33**, 576-582.
- Reaney, S. H., Bench, G., and Smith, D. R. (2006). Brain accumulation and toxicity of Mn(II) and Mn(III) exposures. *Toxicological Sciences* **93**, 114-124.
- Reaney, S. H., Kwik-Urbe, C. L., and Smith, D. R. (2002). Manganese oxidation state and its implications for toxicity. *Chemical Research in Toxicology* **15**, 1119-1126.
- Reaney, S. H., and Smith, D. R. (2005). Manganese oxidation state mediates toxicity in PC12 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **205**, 271-281.
- Repetto, G., del Peso, A., Salguero, M., Repetto, M. (1999). Inventory of the Spanish Institutions and Scientists Involved in Alternatives to the use of Laboratory Animals (Refinement, Reduction or Replacement). *Rev Toxicol* **16**, 50-127.
- Rice, M. E. (2000). Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends in Neurosciences* **23**, 209-216.
- Rice, M. E., Forman, R. E., Chen, B. T., Avshalumov, M. V., Cragg, S. J., and Drew, K. L. (2002). Brain antioxidant regulation in mammals and anoxia-tolerant reptiles: balanced for neuroprotection and neuromodulation. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **133**, 515-525.
- Ro, H., Kim, K. E., Huh, T. L., Lee, S. K., and Rhee, M. (2003). Expression pattern of Siaz gene during the zebrafish embryonic development. *Gene Expression Patterns* **3**, 483-488.
- Robblee, J. H., Cinco, R. M., and Yachandra, V. K. (2001). X-ray spectroscopy-based structure of the Mn cluster and mechanism of photosynthetic oxygen evolution. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1503**, 7-23.
- Roth, J. A., Feng, L., Dolan, K. G., Lis, A., and Garrick, M. D. (2002). Effect of the iron chelator desferrioxamine on manganese-induced toxicity of rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Journal of Neuroscience Research* **68**, 76-83.

- Rouleau, C., Tjalve, H., and Gottofrey, J. (1996). Effects of low pH on the uptake and distribution of Mn-54(II) in brown trout (*Salmo trutta*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**, 708-710.
- Rovetta, F., Catalani, S., Steimberg, N., Bonlotti, J., Gilberti, M. E., Mariggio, M. A., and Mazzoleni, G. (2007). Organ-specific manganese toxicity: a comparative in vitro study on five cellular models exposed to MnCl₂. *Toxicology in Vitro* **21**, 284-292.
- Sansam, C. L., Shepard, J. L., Lai, K., Ianari, A., Danielian, P. S., Amsterdam, A., Hopkins, N., and Lees, J. A. (2006). DTL/CDT2 is essential for both CDT1 regulation and the early G2/M checkpoint. *Genes & Development* **20**, 3117-3129.
- Santamaria, A. B. (2008). Manganese exposure, essentiality & toxicity. *Indian Journal of Medical Research* **128**, 484-500.
- Saric, M., and Lucchini, R. (2007). Manganese. In *Handbook on the Toxicology of Metals* (G. F. Nordberg, Ed.), pp. 645-674. Elsevier, San Diego, California.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., and Vecsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences* **257**, 221-239.
- Schiemann, O., Fritscher, J., Kisseleva, N., Sigurdsson, S. T., and Prisner, T. F. (2003). Structural investigation of a high-affinity Mn-II binding site in the hammerhead ribozyme by EPR spectroscopy and DFT calculations. Effects of neomycin B on metal-ion binding. *Chembiochem* **4**, 1057-1065.
- Schober, M. S., Chidlow, G., Wood, J. P. M., and Casson, R. J. (2008). Bioenergetic-based neuroprotection and glaucoma. *Clinical and Experimental Ophthalmology* **36**, 377-385.
- Scholz, S., Fischer, S., Gundel, U., Kuster, E., Luckenbach, T., and Voelker, D. (2008). The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research* **15**, 394-404.
- Schousboe, A., Bak, L. K., Sickmann, H. M., Sonnewald, U., and Waagepetersen, H. S. (2007). Energy substrates to support glutamatergic and GABAergic synaptic function: Role of glycogen, glucose and lactate. *Neurotox. Res.* **12**, 263-268.
- Schulte, C., and Nagel, R. (1994). Testing Acute Toxicity in the Embryo of Zebrafish, *Brachydanio-Rerio*, as an Alternative to the Acute Fish Test - Preliminary-Results. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **22**, 12-19.
- Schurr, A. (2006). Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **26**, 142-152.
- Sengupta, A., Mense, S. M., Lan, C. G., Zhou, M., Mauro, R. E., Kellerman, L., Bentsman, G., Volsky, D. J., Louis, E. D., Graziano, J. H., and Zhang, L. (2007). Gene expression profiling of human primary astrocytes exposed to manganese chloride indicates selective effects on several functions of the cells. *Neurotoxicology* **28**, 478-489.
- Silbergeld, E. K. (1991). Lead in Bone - Implications for Toxicology During Pregnancy and Lactation. *Environmental Health Perspectives* **91**, 63-70.
- Singh, S. P., Kashyap, A. K. (1978). Manganese toxicity and mutagenesis in two blue-green algae. *Environmental and Experimental Botany* **18**, 47-53.
- Smargiassi, A., and Mutti, A. (1999). Peripheral biomarkers and exposure to manganese. *Neurotoxicology* **20**, 401-406.
- Sonnewald, U., Risan, A. G., Hole, H. B., Westergaard, N., and Qu, H. (2002). Citrate, beneficial or deleterious in the CNS? *Neurochemical Research* **27**, 155-159.
- Sotogaku, N., Oku, N., and Takeda, A. (2000). Manganese concentration in mouse brain after intravenous injection. *Journal of Neuroscience Research* **61**, 350-356.
- Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S., Wagner, L., Shenmen, C. M., Schuler, G. D., Altschul, S. F., Zeeberg, B., Buetow, K. H., Schaefer, C. F., Bhat, N. K., Hopkins, R. F., Jordan, H., Moore, T., Max, S. I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A. A., Rubin, G. M., Hong,

- L., Stapleton, M., Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Casavant, T. L., Scheetz, T. E., Brownstein, M. J., Usdin, T. B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S. S., Loquellano, N. A., Peters, G. J., Abramson, R. D., Mullahy, S. J., Bosak, S. A., McEwan, P. J., McKernan, K. J., Malek, J. A., Gunaratne, P. H., Richards, S., Worley, K. C., Hale, S., Garcia, A. M., Gay, L. J., Hulyk, S. W., Villalon, D. K., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Lu, X. H., Gibbs, R. A., Fahey, J., Helton, E., Ketteman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Young, A. C., Shevchenko, Y., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Touchman, J. W., Green, E. D., Dickson, M. C., Rodriguez, A. C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R. M., Butterfield, Y. S. N., Kryzyswinski, M. I., Skalska, U., Smailus, D. E., Schnerch, A., Schein, J. E., Jones, S. J. M., Marra, M. A., and Mammalian Gene Collection, M. G. C. P. (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16899-16903.
- Stubblefield, W. A., Brinkman, S. E., Davies, P. H., and Garrison, T. D. (1997). Effects of water hardness on the toxicity of manganese to developing brown trout (*Salmo trutta*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**, 2082-2089.
- Stueben, B. L., Cantrelle, B., Sneddon, J., and Beck, J. N. (2004). Manganese K-edge XANES studies of Mn speciation in Lac des Allemands as a function of depth. *Microchemical Journal* **76**, 113-120.
- Suarez, N., Walum, E., and Eriksson, H. (1995). Cellular Neurotoxicity of Trivalent Manganese Bound to Transferrin or Pyrophosphate Studied in Human Neuroblastoma (Sh-Sy5y) Cell-Cultures. *Toxicology in Vitro* **9**, 717-721.
- Sun, H., Sheveleva, E., and Chen, Q. M. (2008). Corticosteroids induce cyclooxygenase 1 expression in cardiomyocytes: Role of glucocorticoid receptor and Sp3 transcription factor. *Molecular Endocrinology* **22**, 2076-2084.
- Sunda, W. G. (1984). Measurement of Manganese, Zinc and Cadmium Complexation in Seawater Using Chelex Ion-Exchange Equilibria. *Marine Chemistry* **14**, 365-378.
- Suñol, C., Babot, Z., Fonfria, E., Galofre, M., Garcia, D., Herrera, N., Iraola, S., and Vendrell, I. (2008). Studies with neuronal cells: From basic studies of mechanisms of neurotoxicity to the prediction of chemical toxicity. *Toxicology in Vitro* **22**, 1350-1355.
- Tack, F. M. G., and Verloo, M. G. (1995). Chemical Speciation and Fractionation in Soil and Sediment Heavy-Metal Analysis - a Review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **59**, 225-238.
- Tamm, C., Sabri, F., and Ceccatelli, S. (2008). Mitochondrial-mediated apoptosis in neural stem cells exposed to manganese. *Toxicological Sciences* **101**, 310-320.
- Tandon, S. K., and Chandra, S. V. (1978). Regional Distribution of Manganese in Brain of Experimentally Poisoned Rabbits. *Chemosphere* **7**, 185-191.
- Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L. G., Muntau, H., Van Leeuwen, H. P., and Lobinski, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* **72**, 1453-1470.
- Tessier, A., Campbell, P. G. C., and Bisson, M. (1979). Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace-Metals. *Analytical Chemistry* **51**, 844-851.
- Tessier, A., Turner, D.R. (1996). *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Thomas, D. J., Sadler, A., Subrahmanyam, V. V., Siegel, D., Reasor, M. J., Wierda, D., and Ross, D. (1990). Bone-Marrow Stromal Cell Bioactivation and Detoxification of the Benzene Metabolite Hydroquinone - Comparison of Macrophages and Fibroblastoid Cells. *Molecular Pharmacology* **37**, 255-262.

- Thomas, W. E. (1985). Synthesis of Acetylcholine and Gamma-Aminobutyric Acid by Dissociated Cerebral Cortical-Cells Invitro. *Brain Research* **332**, 79-89.
- Tietze, F. (1969). Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione - Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. *Analytical Biochemistry* **27**, 502-&.
- Tomazelli, A. C., and Martinelli, L. A. (2003). Heavy metals in six Brazilian watersheds: Levels of contamination in the state of Sao Paulo. *Journal De Physique Iv* **107**, 1305-1308.
- Ton, C., Lin, Y. X., and Willett, C. (2006). Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Research Part a-Clinical and Molecular Teratology* **76**, 553-567.
- Twining, J. R., Zaw, M., Russell, R., and Wilde, K. (2004). Seasonal changes of redox potential and microbial activity in two agricultural soils of tropical Australia: some implications for soil-to-plant transfer of radionuclides. *Journal of Environmental Radioactivity* **76**, 265-272.
- Tyler, C. R., Filby, A. L., Aerle, R. V., Lange, A., Ball, J., and Santos, E. M. (2008). Fish toxicogenomics. In *Advances In Experimental Biology* (C. Hogstrand, Peter, K., Ed.), pp. 75-132. ELSEVIER.
- Vale, C., Vilaro, M. T., Rodriguez-Farre, E., and Sunol, C. (1999). Effects of the conformationally restricted GABA analogues, cis- and trans-4-aminocrotonic acid, on GABA neurotransmission in primary neuronal cultures. *Journal of Neuroscience Research* **57**, 95-105.
- Vaughn, A. E., and Deshmukh, M. (2008). Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nature Cell Biology* **10**, 1477-U1228.
- Vink, J. P. M. (2009). The origin of speciation: Trace metal kinetics over natural water/sediment interfaces and the consequences for bioaccumulation. *Environmental Pollution* **157**, 519-527.
- Voelker, D., Vess, C., Tillmann, M., Nagel, R., Otto, G. W., Geisler, R., Schirmer, K., and Scholz, S. (2007). Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquatic Toxicology* **81**, 355-364.
- Vogt, S., Troitzsch, D., Abdul-Khaliq, H., and Moosdorf, R. (2007). Heat stress attenuates ATP-depletion and pH-decrease during cardioplegic arrest. *Journal of Surgical Research* **139**, 176-181.
- Walton, A. P., Wei, G. T., Liang, Z., Michel, R. G., and Morris, J. B. (1991). Laser-Excited Atomic Fluorescence in a Flame as a High-Sensitivity Detector for Organomanganese and Organotin Compounds Following Separation by High-Performance Liquid-Chromatography. *Analytical Chemistry* **63**, 232-240.
- Wasserman, G. A., Liu, X. H., Parvez, F., Ahsan, H., Levy, D., Factor-Litvak, P., Kline, J., van Geen, A., Slavkovich, V., Lolacono, N. J., Cheng, Z. Q., Zheng, Y., and Graziano, J. H. (2006). Water manganese exposure and children's intellectual function in Arai-hazar, Bangladesh. *Environmental Health Perspectives* **114**, 124-129.
- Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., and Duis, K. (2009). Gene Expression Analysis in Zebrafish Embryos: A Potential Approach to Predict Effect Concentrations in the Fish Early Life Stage Test. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**, 1970-1978.
- Weiss, B. (2006). Economic implications of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* **27**, 362-368.
- Wenger, K., Tandy, S., and Nowack, B. (2005). Effect of chelating agents on trace metal speciation and bioavailability. In *ACS Symposium #910: Biogeochemistry of Chelating Agents* (J. Vanbriesen, Ed.). American Chemical Society.
- WHO (2001). Neurotoxicity risk assessment for human health: principles and approaches. In *Environmental health criteria*. World Health Organization, Geneva.

- WHO (2004). Manganese in Drinking Water—Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. (WHO/SDE/WSH/03.04/104., Ed.). World Health Organization, Geneva.
- Wilken, R. D. (1998). Speciation of chemical elements in the environment. In *Ecotoxicology* (S. G. a. B. Markert, Ed.), pp. 223–235. Wiley,, New York.
- Xu, B., Xu, Z.-f., Deng, Y., Guan, K., Wang, F., and Feng, X.-y. (2008). Effects of melatonin and aminoguanidin on liver induced by manganese in rat. *Angang Laodong Weisheng Yanjiuso* **34**, 352-355.
- Yang, H. J., Wang, T. N., Li, J. Y., Gu, L., and Zheng, X. X. (2006). Decreasing expression of alpha(1c) calcium L-type channel subunit mRNA in rat ventricular myocytes upon manganese exposure. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **20**, 159-166.
- Yilmaz, M., Gul, A., and Karakose, E. (2004). Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride (CdCl₂ center dot H₂O) metal salt on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*). *Chemosphere* **56**, 375-380.
- Yokel, R. A., Lasley, S. M., and Dorman, D. C. (2006). The speciation of metals in mammals influences their toxicokinetics and toxicodynamics and therefore human health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* **9**, 63-85.
- Zhang, S. R., Fu, J. L., and Zhou, Z. C. (2004). 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* **18**, 71-77.
- Zhang, S. R., Zhou, Z. C., and Fu, J. L. (2003). Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. *Environmental Research* **93**, 149-157.
- Zwingmann, C., Leibfritz, D., and Hazell, A. S. (2003). 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. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 756-771.

Súmula Curricular***Dados Pessoais***

Nome Raúl Bonne Hernández
 Nascimento 11/06/1975 - Santiago de Cuba/ - Cuba

Formação Acadêmica/Titulação

- 2006-2009** Doutorado em Química (Química Inorgânica).
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Especificação do manganês como determinante de sua toxicidade.
 Orientador: Prof. Dr. Breno Pania Esposito
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2002 - 2003** Mestrado em Manejo Integrado de Zonas Costeiras.
 Universidad de Oriente, UO, Cuba
 Título: Manejo Integrado de la contaminación de las Aguas Costeiras de la Cuenca del Rio Sevilla, Año de obtención: 2003
 Orientador: Prof Dr. Oscar Reyes Yola, Prof. MSc. Mario Paneque Vázquez
- 1995 - 2000** Graduação em Licenciatura Em Química.
 Universidad de Oriente, UO, Cuba
 Título: Síntesis y Caracterización de Complejos de Cu(II) con Aminoximas
 Orientador: Lic Bernardino Soto Govea e Dra Magalys Casals Hung

Formação complementar

- 2001 - 2001** Curso de curta duração em Introducción a La HPLC.
 Universidad de Oriente, UO, Cuba
- 2001 - 2001** Curso de curta duração em Introducción a La Toxicología Ambiental.
 Universidad de Oriente, UO, Cuba
- 2001 - 2001** Curso de curta duração em Cursos Básico de Inmunología.
 Centro de Toxicología y Biomedicina, TOXIMED, Cuba
- 2001 - 2001** Curso de curta duração em Buenas Prácticas de Laboratorio y Calidad En Los Estudios Toxicológicos.
 Centro de Toxicología y Biomedicina, TOXIMED, Cuba
- 2001 - 2001** Curso de curta duração em Toxicología Analítica.
 Centro Nacional de Toxicología, CENATOX, Cuba
- 2002 - 2002** Curso de curta duração em Impactos Ambientales Sobre El Medio Marino.
 Universidad de Oriente, UO, Cuba
- 2002 - 2002** Curso de curta duração em Gestion de Recursos Costeros.
 Universidad de Oriente, UO, Cuba
- 2002 - 2002** Determinación de Residuos de Plaguicidas.
 Instituto Nacional de Sanidad Vegetal, INISAV, Cuba
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Gestion de Proyectos.
 Universidad de Oriente, UO, Cuba
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Competencia Técnica Según Nc Iso Iec 17025.
 Oficina Territorial Normalización, OTN. SANTIAGO DE Cuba, Cuba
- 2005 - 2005** Métodos Analíticos Aplic. à Determinação de Traços.
 Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil
- 2005 - 2005** Sinalização Intracelular.
 Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil
- 2005 - 2005** Práctica de Docência em Química I.
 Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil
- 2005 - 2005** Introdução à Química de Organometálicos.
 Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil

- 2006 - 2006** Prática de Ensino de Química e Bioquímica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Termodinâmica de Processos Químico-Biológicos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Metalotioneínas, metais e neurotoxicidade.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Curso de curta duração em Evolução e Desenvolvimento.
- 2008 - 2008** Sociedade Brasileira de Biologia Celular, SBBC, São Paulo, Brasil
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Treinamento em Técnicas Imunohistoquímicas.
- 2008 - 2008** UPC-Centro de Investigación e Inovação em Toxicologia, CRIT-UPC, Espanha
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Neurotoxicologia (neurotoxicidade do manganês).
- 2007 - 2008** INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE BARCELONA - IDI-BAPS, IIBB-IDIBAPS, Espanha
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Toxicogenomic study about Mn using Zebrafish.
- 2009 - 2009** Helmholtz Centre for Environmental Research, UFZ, Alemanha
Bolsista do(a): FAPESP-Brazil and DAAD-Germany

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

- 2006 - Atual Vínculo: Aluno de Pós Graduação , Enquadramento funcional: Aluno de Pós Graduação, Regime: Integral

Atividades

- 02/2006 - Atual** Projetos de pesquisa, Instituto de Química
Participação em projetos: Especiação do manganês em sistemas aquáticos como determinante da sua toxicidade: Estudo do caso da Bacia do Alto Paranapanema (SP)

- 02/2006 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Química
Linhas de Pesquisa: Bio-inorgânica, Química e Toxicologia Ambiental

2. Centro de Toxicología y Biomedicina - TOXIMED

Vínculo institucional

- 2001 - 2006** Vínculo: Especialista , Enquadramento funcional: Especialista , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

- 12/2004 - 04/2006** Pesquisa e Desenvolvimento
Linhas de Pesquisa: Especiación y toxicidad de metales pesados en sistemas acuáticos

- 12/2004 - 04/2006** Projetos de pesquisa, Minsap
Participação em projetos: Especiación y toxicidad de metales pesados en el sistema acuático de la cuenca del río cobre. Pautas para su manejo integrado. (ETOMSA).

- 10/2004 - 04/2006** Conselhos, Comissões e Consultoria
Especificação: Miembro del Consejo Científico

- 09/2004 - 04/2006** Projetos de pesquisa, Minsap
Participação em projetos: Desarrollo de un servicio de información y análisis toxicológico de micotoxinas

- 05/2004 - 04/2006** Direção e Administração, Minsap
Cargos Ocupados: Jefe de Laboratorio de Química

- 01/2004 - 12/2004** Outra atividade técnico-científica

- Especificação: Asesoria en asuntos de Manejo Integrado de Zonas Costeras al Gobierno del Municipio Guamá en la provincia de Santiago de Cuba*
- 06/2002 - 12/2004** Projetos de pesquisa, Minsap
Participação em projetos: Zona costera y Calidad del agua (ZOCA)
- 06/2002 - 12/2004** Pesquisa e Desenvolvimento
Linhas de Pesquisa: Monitoreo y Propuesta de gestión de la calidad de las aguas superficiales en la zona costera de la cuenca del río Sevilla
- 02/2002 - 06/2003** Especialização
Especificação: Química General
- 02/2002 - 12/2002** Pesquisa e Desenvolvimento, Minsap
Linhas de Pesquisa: Aplicación de la Espectroscopia Infrarroja en análisis cualitativo de fármacos en fluidos biológicos
- 11/2001 - 12/2005** Graduação, Licenciatura em Química
Disciplinas Ministradas: Prácticas de laboratorio de Química Inorgánica IV, Espectroscopía
- 10/2001 - 03/2002** Pesquisa e Desenvolvimento
Linhas de Pesquisa: Estudio de Trabajadores ocupacionalmente expuestos a plomo en la provincia de Santiago de Cuba.
- 06/2001 - 10/2001** Outra atividade técnico-científica
Especificação: Asesoria de Riesgo Laboral
- 05/2001 - 04/2006** Serviço Técnico Especializado
Especificação: Diagnóstico Químico Analítico Toxicológico
- 04/2001 - 12/2001** Pesquisa e Desenvolvimento, Minsap
Linhas de Pesquisa: Grupo Antitóxico: Un servicio indispensable
- 01/2001 - 12/2003** Projetos de pesquisa, Minsap
Participação em projetos: Desarrollo de un servicio de diagnostico químico analítico toxicológico para las provincias orientales

Prêmios e títulos

- 2007** Melhor Painel (Especiação de metais como determinante da sua fitotoxicidade na bacia Alto do Paranapanema. SP-Brasil, XI Congresso Brasileiro de Geoquímica)
- 2007** Menção Honrosa (Especiação, Distribuição e Avaliação do Potencial Toxicológico dos Metais Presentes na Baixada Santista do Estado de São Paulo), MAPFRE
- 2007** Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis (Melhor Painel Apresentado), II Workshop de Ecotoxicologia
- 2006** Menção Honrosa (Avaliação de risco ecotoxicológico por exposição a traços de mangânês na Bacia do Alto Paranapanema (SP), Fundação MAPFRE)
- 2004** Premio de impacto ambiental y al rigor científico-XI Exposición Provincial Forjadores del Futuro a nivel de Base., BTJ-TOXIMED
- 2003** Premio Nacional-Ecojovent 2003, Brigadas Técnicas Juveniles de la UJC (BTJ-UJC)
- 2003** Vanguardia Nacional, Sindicato Nacional de Trabajadores de la Ciencia
- 2002** Sello Forjadores del Futuro, Brigadas Técnicas Juveniles de la UJC (BTJ-UJC)
- 2001** Diploma Especial-XV Forum Nacional de Estudiantes Universitarios de Ciencias Sociales, Naturales y Exactas., Ministerio de Enseñanza Superior de Cuba
- 2001** Vanguardia Nacional, Sindicato Nacional de Trabajadores de la Ciencia

Artigos completos publicados em periódicos

1. Bonne Hernandez R., Oliveira, E., Espósito, B. P. Distribution and behavior of manganese in the Alto do Paranapanema Basin. *Journal of Environmental Monitoring*. , v.11, p.1236 - 1243, 2009.
2. Bonne Hernandez R., Ana Paula Franco, YOLA, O. R., DELGADO, A. L., RECIO, A. L., Judith Felcman, MERCÊ, A. L. R. Coordination study of chitosan and Fe³⁺. *Journal of Molecular Structure*. , v.877, p.89 - 99, 2008.
3. Bonne Hernandez R., OSCAR, Reyes Yola, MERCÊ, A. L. R. Chemical equilibrium in the complexation of first transition series divalent cations Cu²⁺, Mn²⁺ and Zn²⁺ with chitosan. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Online)*. , v.18, p.1388 - 1396, 2007.
4. Bonne Hernandez R., I, Rojas Vázquez Evelyn, LIZETT, Pérez Infante, MARÍN, Dayana Intoxicación inhalatoria con Cipermetrina. *MEDISAN*. , v.7, p.57 - 61, 2003.
5. PUSCHMANN, H., HOWARD, J. A. K., SOTO, B., R., Bonne, ALVAREZ, O. Au Di--chloro-bis{chloro[1,2-diphenyl-2-(4-methylphenylamino)ethanoximato]copper(II)}. *Acta Crystallographica. Section E*. , v.57, p.581 - 583, 2001.
6. HOWARD, J. A. K., BATSANOV, A. S., PUSCHMANN, H., SOTO, B., R., Bonne, AU-ALVAREZ, O. Di--chloro-bis{chloro[1,2-diphenyl-2-(phenylamino)ethanoximato]copper(II)}. *Acta Crystallographica. Section E*. , v.57, p.524 - 526, 2001.
7. PUSCHMANN, H., HOWARD, J. A. K., SOTO, B., R., Bonne, AU-ALVAREZ, O. Di--chloro-bis{chloro[1,2-diphenyl-2-(4-chlorophenylamino)ethanoximato]copper(II)}. *Acta Crystallographica. Section E*. , v.57, p.551 - 552, 2001.
8. SOTO, B., Bonne Hernandez R., MENÉNDEZ, W., M., Casals Hung. Oxidación aeróbica de substratos orgánicos catalizada por el complejo de Cu(II) con la 1,2-difenil-2-(4-metilfenilamino) etanoxima.. *Revista Cubana de Química*. , v.XII, p.66 - 67, 2000.

Capítulos de livros publicados

1. Ana Lucia Ramalho Mercê, Ana Paula Franco, Aurora López Delgado, Bonne Hernandez R., RECIO, A. L., FELCMAN, J. Metal Ions and Biopolymers Complexes for Protecting and Improving the Environment. Complexation, speciation and remediation studies of Ni and Mo with chitosan and carboxymethylcellulose. In: *Reactive and Functional Polymers Research Advances*. 1 ed. New York : Nova Science Publishers, Inc, 2007, v.1, p. 149-173.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. Bonne Hernandez R., OLIVEIRA, Elisabeth de, ESPÓSITO, Breno Pannia
Especiação de metais como determinante da sua fitotoxicidade na bacia Alto do Paranapanema em São Paulo. In: XI Congresso Brasileiro de Geoquímica, 2007, Ativaia.
XI Congresso Brasileiro de Geoquímica. , 2007.
2. Bonne Hernandez R., ODIO, Anibal Dominguez, DÍAZ, Raidelis Ávila, DOMÉNECH, Raisa Escalona, AGUILERA, Petra, PÉREZ, Irela
Potencialidades fitotóxicas y genotóxicas de residuales acuícolas In: I Simposio Internacional de Ciencias Biológicas Carles T. Ramsden in Memoriam, 2004, Santiago de Cuba.
I Simposio Internacional de Ciencias Biológicas Carles T. Ramsden in Memoriam. , 2004.
p.BET-BCM -04 - BET-BCM -04
3. RAÚL, Bonne Hernández, OSCAR, Reyes Yola
Estrategia para el control integrado de la calidad de las aguas superficiales en la desembocadura del río Sevilla. In: I Conferencia Internacional de Manejo Integrado de Zonas Costeras, Caricostas 2003., 2003, Santiago de Cuba.
I Conferencia Internacional de Manejo Integrado de Zonas Costeras, Caricostas 2003.Trabajo t43. , 2003.

4. A, González, C., Rodríguez J., D., Marín, N., Pérez, R., Bonne, M, Fernández
Experiencias del servicio de diagnóstico químico analítico. In: XVII Conferencia de Química.,
2002, Santiago de Cuba.
Memorias de la XVII Conferencia de Química.Trabajo QA-P3 del CD rom. , 2002.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Bonne Hernandez R., Farina M, Breno pania Espósito, Suñol C. DEVELOPMENT NEUROTOXICOLOGICAL RISK ASSESSMENT OF THE MANGANESE (DNTRAM): ROLE OF CHEMICAL SPECIATION AND CELL TYPE In: 9th International Conference on Alzheimer`s and Parkinson`s Diseases - ADPD 2009, 2009, Praha. **9th International Conference on Alzheimer`s and Parkinson`s Diseases - ADPD 2009**. Basel: KARGER, 2009. v.6. p.2132 - 2132
2. Hernandez RB, Espósito, B. P., Stefan Scholz. Role of chemical speciation and development stage for the toxicity of the manganese in danio rerio: considerations for Mn risk assessment In: Ist Ibero-American Meeting on Toxicology and Environmental Health, 2009, Riberão Preto. **Ist Ibero-American Meeting on Toxicology and Environmental Health. , 2009.**
3. R, Bonne Hernández, Farina M, ESPÓSITO, Breno Pannia, Suñol C. Manganese oxidation state mediates toxicity in Primary Neuronal Cortical culture: role of protector agents such as Ascorbic Acid and d,l-Lactate. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008, São Paulo. **XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular. , 2008.**
4. Farina M, Bonne R., Campos Francisco, ESPÓSITO, Breno Pannia, Suñol C. Oxidative stress in cerebellar granule neurons exposed to methylmercury and manganese In: 45th Congress of the European Societies of Toxicology, 2008, Rhodes. **Toxicology Letters**. Ireland: Elsevier, 2008. v.180. p.S41 - S41
5. Bonne Hernandez R., OLIVEIRA, Elisabeth de, Borella M.I, Breno pania Espósito. Especiación de metales como determinante de su potencial ecotoxicológico para los ecosistemas acuáticos de la cuenca hidrográfica Alto del Paranapanema San Paulo-Brasil. In: XV Congreso Argentino de Toxicología, 2007, Neuquén. **Acta Toxicológica Argentina**. Buenos Aires: Asociación Toxicológica Argentina, 2007. v.15. p.28 - 28
6. RAÚL, Bonne Hernández, OSCAR, Reyes Yola, A, Planas Fajardo José, MARIO, Vazquez Paneque Acciones para el manejo integrado de la calidad del agua en la zona costera de la cuenca del río Sevilla. In: VI CONGRESO DE CIENCIAS DEL MAR, MARCuba 2003., 2003, La Habana. Cuba. **VI CONGRESO DE CIENCIAS DEL MAR, MARCuba 2003 (Trabajo 121 del CD). , 2003.**
7. R. Bonne Hernández. Síntesis, Estructura y Propiedades Espectroscópicas de complejos Dinucleares de Cu(II) con Aminoximas. In: IV Congreso Internacional de Química. XIII Conferencia del Caribe de Química e Ingeniería Química, 2001, Habana. **Revista Cubana de Química. . Vol. , , 2001.. , 2001. v.XIII. p.220 - 220**

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. R, Bonne Hernández, OLIVEIRA, Elisabeth de, ESPÓSITO, Breno Pannia. Especiación de metales na bacia Alto do Paranapanema em São Paulo In: 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindoia. **30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2007.**
2. Bonne Hernandez R., Ana Paula Franco, YOLA, O. R., DELGADO, A. L., FELCMAN, J., MERCÊ, A. L. R. Contribuição à química de coordenação de quitosana com os íons Fe(III): uma via de otimização dos processos de remoção de íons férricos In: III Encontro Nacional de Química Ambiental, 2006, Cabo Frio-RJ. **III Encontro Nacional de Química Ambiental. , 2006.**

3. Bonne Hernandez R., DELGADO, A. L., YOLA, O. R., FELCMAN, J., MERCÊ, A. L. R. ESTUDO POTENCIOMÉTRICO E ESPECTROSCÓPICO DOS COMPLEXOS DE QUITOSANA COM OS ÍONS Cu^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} In: 29ª Reunião Anual da SBQ, 2006, água de Lindoias. **29ª Reunião Anual da SBQ.**, 2006. v.Qi. p.152 – 152
4. B., Soto Govea, R, Bonne Hernández, M., Casals Hung, O., Au, F, Lloret. Síntesis, estructura, propiedades espectroscópicas y propiedades magnéticas de nuevos complejos dinucleares de cobre (II) con aminoximas. In: XVII Conferencia de Química., 2002, Santiago de Cuba. **Memorias de la XVII Conferencia de Química. Trabajo QI-P4 del CD rom.**, 2002.
5. R, Bonne Hernández, C, Rodríguez Tito J., M., Fernández Boizán, D., Marín Sánchez, D, Ferrer Salas. Trabajadores ocupacionalmente expuestos a plomo en la provincia de Santiago de Cuba. In: XVII Conferencia de Química., 2002, Santiago de Cuba. **Memorias de la XVII Conferencia de Química. Trabajo QMA-P20 del CD rom.**, 2002.

Orientação de Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Raisal Escalaona Domenech y Raidelys Avila Diez. **Potencialidades fitotóxicas y genotóxicas de residuales acuícolas.** 2003. Curso (Licenciatura En Biología) - Universidad de Oriente

Orientações de Iniciação científica

1. Zenia Cedeño. **Propiedades Espectroscopicas de Complejos de Metales con Quitosana.** 2005. Iniciação científica (Licenciatura En Química) - Universidad de Oriente
2. Ronald Restre. **Calidad del agua en la zona costera de la cuenca del río Sevilla.** 2003. Iniciação científica (Licenciatura En Química) - Universidad de Oriente

Citações em bases bibliográficas

Web of Science Número total de citações : 12; Número de trabalhos : 7 Data : 27/09/2009;
Fator H: 2;
Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações:
Hernandez RB; Bonne R