



Samantha Faim Ferreira

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO SUB-AGUDA DE MANGANÊS SOBRE A MARCHA EM RATOS.

Campinas
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Samantha Faim Ferreira

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO SUB-AGUDA DE MANGANÊS SOBRE A MARCHA EM RATOS.

Orientador: Prof. Dr. Alan Stewart Hazell

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA SAMANTHA FAIM FERREIRA E ORIENTADA PELO
PROF.DR. ALAN S. HAZELL.

Assinatura do Orientador

Campinas
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F149e Faim Ferreira, Samantha, 1985-
Efeitos da exposição sub-aguda de manganês sobre
a marcha em ratos / Samantha Faim Ferreira. --
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Alan Stewart Hazell.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Manganês. 2. Síndromes neurotóxicas . 3. Ácido
glutâmico. 4. Marcha. I. Hazell, Alan Stewart. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of sub-acute manganese exposure on gait in the rats

Palavras-chave em inglês:

Manganese

Neurotoxicity syndromes

Glutamic acid

Gait

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Alan Stewart Hazell [Orientador]

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

João Pereira Leite

Data de defesa: 18-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

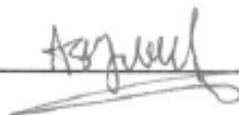
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

SAMANTHA FAIM FERREIRA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ALAN STEWART HAZELL

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). ALAN STEWART HAZELL



2. PROF(A). DR(A). ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA



3. PROF(A). DR(A). JOÃO PEREIRA LEITE



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 16 de junho de 2014

“Dedico este trabalho a minha família, meus pais, João Carlos e Célia Dulce, que foram e sempre serão meus maiores exemplos e me apoiaram todos os dias da minha vida. E ao meu marido Tiago, meu companheiro, apoio e amigo, que tem estado ao meu lado, o tempo todo me incentivando a cada dia”.

Agradecimentos

A todas as pessoas que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, para minha formação como pesquisadora e para minha vida, que foram meus guias desde o começo, família, amigos, professores.

Ao meu orientador Dr. Alan Stewart Hazell, pelas oportunidades que me proporcionou durante esse período de aprendizado.

A Silvana Lourenço, que desde o começo me ajudou a fazer as coisas funcionarem e resolver todos os problemas que surgiam, uma amiga e conselheira. Sem ela não teria chegado até aqui.

Ao pessoal do laboratório, Amanda Almeida, que aguentou minhas crises e me incentivou a não desistir, que me auxiliou em todo desenvolvimento desse trabalho. A Thatiane Moura, companheira de laboratório, que sempre esteve pronta a ouvir e discutir todas minhas dúvidas e pensamentos. A Aline Spejo, Gabriela Chiarotto por toda a ajuda com o Catwalk. A Karina por toda ajuda no laboratório.

A minha família, meu pai João Carlos Gomes Faim, que sempre acreditou em mim, me apoiou desde o começo, confiou em minha capacidade, meu melhor amigo e o melhor pai do mundo. A minha mãe Célia Dulce Pereira de Souza Faim, que nunca me deixou desistir, mesmo em meio às crises, que sempre foi meu apoio, minha amiga e confidente. Aos meus irmãos Sabrina Faim e Victor Hugo Faim, que muitas vezes aguentaram as minhas loucuras e exigências, mas sempre estiveram ao meu lado. Amo muito todos vocês.

Ao meu amado marido, Tiago da Silva Ferreira, o meu eterno companheiro, que está constantemente ao meu lado, meu amor e amigo. Que me apoiou nos finais de semana e feriados passados no laboratório. Esteve sempre ao meu lado durante a conclusão desse trabalho. Te amo demais.

A Deus por sempre me dar forças para resistir aos desafios que surgiram, por ser meu guia e Pai Eterno.

*“Uma jornada de mil milhas começa
com o primeiro passo”.
Jeffrey R. Holland*

RESUMO

A neurotoxicidade por manganês (Manganismo) leva a uma disfunção neurológica caracterizada pelo desenvolvimento de ataxia, hipocinesia, rigidez e tremores. Evidências sugerem que os astrócitos desempenham um papel importante na disfunção cerebral nesta desordem, pois acumulam manganês e sequestram o metal na mitocôndria, o que inibe a oxidação fosforilativa. A exposição aguda ao manganês leva ao acúmulo focal do metal e perda neuronal no cerebelo. No entanto, a relação entre esta deposição localizada de manganês e as manifestações neurológicas não são claras. Neste estudo, foram caracterizados os efeitos do manganês na marcha e no equilíbrio após um tratamento subagudo em ratos adultos da linhagem Sprague-Dawley (CEMIB – UNICAMP). Os animais foram divididos em três grupos: Controle; tratado com Mn e tratado com Mn + NAC (N - acetilcisteína), um anti-oxidante. Os ratos do grupo Mn receberam cloreto de manganês (II) (50 mg/kg de peso corporal, i.p.) diariamente durante 4 dias, enquanto os ratos do grupo Mn + NAC foram co-tratados diariamente com o cloreto de manganês (II) e NAC (163 mg/kg, i.p.). Na análise da marcha o grupo tratado com Mn demonstrou alteração na marcha, visualizados pela diminuição da área da impressão plantar (comprimento x largura), do comprimento da passada e da base de suporte. Apesar das alterações observadas nesses parâmetros, os animais não apresentaram mudanças na pressão exercida pela pata durante a marcha. O grupo co-tratado com NAC não demonstrou essas alterações, apresentando-se semelhante ao controle. Nos estudos de imonohistoquímica, imunofluorescência, histoquímica e Western blotting o grupo tratado com Mn apresentou morte neuronal, aumento da reatividade astrocítica na camada granular, desarranjo na camada das células de Purkinje e aumento na expressão do transportador de glutamato GLT-1a. Estes resultados corroboram com as importantes alterações na função motora de animais tratados com Mn. O co-tratamento com o antioxidante NAC foi capaz de impedir parcialmente esses danos, exercendo uma ação protetora na área do cerebelo e na função motora. Em conclusão, demonstramos que a intoxicação por manganês gera alterações morfo-funcionais no cerebelo, as quais podem ser principalmente revertidos pelo uso do antioxidante NAC.

ABSTRACT

Manganese (Mn) neurotoxicity (Manganism) leads to a neurological disorder characterized by the development of ataxia, hypokinesia, rigidity and tremors. Evidence suggests that astrocytes play an important role in brain dysfunction in this disorder because accumulate manganese and sequester metal in the mitochondria, where it inhibits oxidative phosphorylation. Acute exposure to manganese leads to focal accumulation of the metal and neuronal loss in the cerebellum. However, the relationship between this localized deposition of manganese and neurological manifestations are unclear. In this study, we characterized the effects of manganese in gait and balance after a subacute treatment in Sprague - Dawley rats (CEMIB - UNICAMP). The animals were divided into three groups: control, treated with Mn and Mn + treated with NAC (N - acetylcysteine). The rats from manganese group were administered with manganese (II) chloride (50 mg / kg body weight , ip) daily for 4 days, whereas rats of the group Mn + NAC daily were co- treated with manganese chloride (II) and NAC (163 mg / kg , ip). In Catwalk test group treated with manganese showed changes in gait and balance, leading to a reduction of the area of the paw (length and width), the stride length and the base of support. Despite the changes observed in these parameters, the animals showed no changes in pressure exerted by the leg during gait. The group co-treated with NAC showed no such changes, keeping similar to the control group. In studies of immunohistochemistry, immunofluorescence, western blotting and histochemistry group treated with showed neuronal death, an increase in signal astrocytic reactivity in the granular layer, a derangement in the Purkinje cell layer and an increase in the expression of glutamate transporter GLT - 1a. These results suggest significant changes in motor function in animals treated with Mn. The co - treatment with the antioxidant NAC was able to partially prevent this damage, exerting a protective action in the area of the cerebellum and motor function. In conclusion, we demonstrated that manganese poisoning produces morphological and functional changes in the cerebellum, which can principally be reversed by the use of the antioxidant NAC.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CG – Camada Granular

CM – Camada molecular

CP – Células de Purkinje

GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein

GLT-1 – transportador de glutamado 1

GLAST – Transportador de glutamato/aspartato

GSH – Glutamato Sintetase

MMT – Manganês Tricarbonil metilciclopentadienil

Mn – Manganês

Mn-SOD – Superoxido dismutase de manganês

NAC – N-Acetilcisteína

NeuN – marcador de núcleos neurais

ROS – Espécies reativas de oxigênios

SNC – Sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a: Impressões das patas. Comparação entre as impressões das patas dos animais dos 3 grupos.

Figura 1b: Gráficos do Catwalk demonstrando os diferentes parâmetros entre os grupos.

Figura 2a: Análise de imunoflorescência na região do vermis cerebelar (camada granular) com o anticorpo GFAP

Figura 2b: Western blotting utilizando anticorpo GFAP. Região do vérmis cerebelar.

Figura 3a: Análise da região do vermis cerebelar com o marcador nuclear DAPI

Figura 3b: Gráfico quantitativo do marcador nuclear DAPI.

Figura 4a: Cortes histológicos da região do vermis cerebelar, observando a camada molecular, tratados com anticorpo NeuN.

Figura 4b: Gráfico de números de células.

Figura 5a: Secções da região do vermis cerebelar, observando a camada granular, com o marcador Fluoro-Jade C.

Figura 6: Secções da região do vermis cerebelar com a coloração com cresil violeta para visualização das células neurais, observando a camada das células de Purkinje.

Figura 7a: Western blotting utilizando anticorpo GFAP da região do vérmis cerebelar.

Figura 7b: Western blotting utilizando anticorpo GLAST da região do vérmis cerebelar

Figura 7c: Western blotting utilizando anticorpo GLT-1a da região do vérmis cerebelar

SUMÁRIO

Pág.

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Manganês.....	16
1.2 Manganismo.....	18
1.3 Cerebelo.....	19
1.4 Glutamato.....	22
1.5 N-Acetilcisteína.....	25
1.6 Justificativa.....	26
2. OBJETIVO.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Animais.....	30
3.2 Sistema de análise da marcha.....	30
3.3 Western Blotting.....	31
3.4 Imunohistoquímica.....	32
3.5 Imunofluorescência.....	33
3.6 Fluorescência.....	33
3.7 Histoquímica.....	33
3.8 Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1 Análises Catwalk.....	36
4.2 GFAP (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>).....	38
4.3 DAPI.....	39
4.4 Análise de histoquímica.....	40
4.5 Fluoro-Jade C	42
4.6 Cresil Violeta.....	42
4.7 Análise de Western blotting.....	43

4.7.1	GFAP.....	44
4.7.2	GLAST.....	44
4.7.3	GLT-1 a.....	45
5.	DISCUSSÃO.....	47
6.	CONCLUSÃO.....	54
7.	REFERENCIAS.....	57

1.INTRODUÇÃO

1.1 Manganês

O Manganês (Mn) é o 12º elemento mais abundante da crosta terrestre e o quarto metal pesado mais usado no mundo. O Mn não é encontrado na forma pura, mas faz parte da composição de mais de cem minérios, os principais pitolusita, rodocrosita e braunita. Na industrial é utilizado para a fabricação de ligas metálicas, vidro, cerâmica, adesivos, solda, pintura, aditivos *anti-knock* (tricarbonil metilciclopentadienil manganês - MMT), dentre outros. As maiores jazidas estão localizadas na África do Sul, Brasil, Ucrânia, Austrália, Índia, China e Gabão (1).

No Brasil, o Mn foi o principal minério exportado até 1957 quando foi ultrapassado pelo ferro. Das catorze milhões de toneladas produzidas até a época, treze foram exportadas tendo como principal destino os Estados Unidos. A partir da década de 1970 o consumo interno aumentou e em média 50% do minério extraído foram consumidos pela indústria siderúrgica nacional. As principais reservas brasileiras estão localizadas em Serra dos Carajás (Pará), e nos municípios de Mariana (Minas Gerais) e Corumbá (Mato Grosso do Sul), sendo a região Sudeste a principal consumidora. A produção média brasileira representa 20% da produção mundial. O consumo interno em função do uso na indústria siderúrgica passou a ter importância significativa, incentivado pelo crescimento da produção siderúrgica nacional. Tido como indispensável na produção de ferro gusa e ferroliga, o Mn deve continuar no futuro como um insumo de grande demanda na siderurgia (2).

O Mn normalmente é beneficiado próximo ao local de extração. O processo de beneficiamento envolve etapas de britagem, lavagem, peneiramento que resultam em três produtos distintos para venda com granulométricas diferentes.

Uma importante característica do minério de Mn é ser utilizado como agente dessulfurante e deoxidante para a produção do aço. O uso do Mn é feito na forma de minério natural com adição no alto forno de gusa, e como adição nos fornos para a produção de ferroligas a base de Mn. As ferroligas posteriormente são consumidas na

indústria siderúrgica, em praticamente todos os tipos de aço e fundidas de ferro, devido à sua propriedade de dessulfurização (retirada do enxofre) (1).

O setor siderúrgico absorve pouco mais de 85% do minério de Mn, seja em forma natural ou transformada em ligas a base de Mn, os 15% restantes sob a forma de bióxido de Mn, sendo 10% são utilizados como componente de pilhas e 5% como insumo da indústria química (adubos, ração) (2).

O Mn é um oligoelemento para todas as formas de vida, nas quais tem funções tanto estruturais quanto enzimáticas. As classes de enzimas que possuem o Mn como cofator são amplas e incluem oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, lectinas e integrinas. A transcriptase reversa de muitos retrovirus contém Mn. Entre as enzimas de proteção, destacam-se a superóxido dismutase de manganês (Mn-SOD), que catalisa a falta de superóxidos, O_2^- , e a Mn-catalase, a falta do peróxido de hidrogênio, H_2O_2 . Na concavanila A (da família das lectinas), o Mn tem um papel estrutural. Uma importante manganoproteína é glutamina sintetase, encontrada exclusivamente nos astrócitos, e catalisa a conversão do glutamato a glutamina (3).

O corpo humano contém aproximadamente 12 mg de Mn, das quais a maioria está armazenada nos ossos. Nos tecidos é encontrado no fígado e rins. No cérebro, está ligado a metaloproteínas como a síntese de glutamina em astrócitos. Em uma dieta regular consumimos de 0,9-10 mg Mn/ dia (4,5) cerca de 7% do elemento é absorvido por meio do trato gastrointestinal, podendo esta concentração ser afetada pela ingestão de ferro ou cálcio. O Mn é transportado no sangue pela β -glubulina, metabolizado pelo sistema excretor biliar e excretado através das fezes junto com o excedente ingerido. Uma vez que o sistema excretor biliar não está completamente desenvolvido em crianças, estas possuem uma quantidade superior de Mn em sua constituição e são mais suscetíveis a intoxicações pelo elemento. Por outro lado, a deficiência deste metal pode provocar anomalias no sistema locomotor, defeitos de desenvolvimento, incluindo má-formação dos ossos, metabolismo e fertilidade reduzida (6).

No corpo humano o Mn desempenha um papel importante na formação dos ossos, metabolismo de carboidratos, regulação do açúcar no sangue, e absorção de cálcio, como também exerce funções como cofator necessário para o funcionamento de várias enzimas neuronal e glial, assim como em enzimas envolvidas na síntese do neurotransmissor e metabolismo (7). As vias de exposição ao Mn ocorrem através da ingestão de alimentos (4), suplementos dietéticos (8), água (9) leite materno (10), inalação de fumos, aerossóis ou partículas em suspensão (4), aditivo de combustível em gasolina sem chumbo (11), nutrição parenteral (12), drogas ilícitas, efedrona (13).

A doença hepática é um conhecido fator de risco para o aumento da acumulação de Mn no cérebro, tanto em humanos como em modelos animais (14-16). Doenças do fígado estão associadas à diminuição da excreção biliar do Mn (17-19). A encefalopatia hepática é uma complicação neuropatológica que causa cirrose, e os pacientes afligidos por esta doença sofrem hiperintensidade no sinal bilateral no globo pálido devido à deposição de Mn. Como demonstrado em alguns estudos, às alterações psiquiátricas associadas com esta condição neuropatológica são provavelmente causada pela alteração no metabolismo do glutamato devido ao aumento de Mn no cérebro (20-21). A deficiência de ferro está associada ao aumento da absorção dietética do Mn em seres humanos e animais (5,22) e ao acúmulo de Mn no cérebro (23-24).

Embora o Mn seja essencial para o bom desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), a exposição excessiva ao Mn pode levar a neurotoxicidade. Este excesso de Mn pode acumular no cérebro e tem sido associada à disfunção do sistema dos gânglios da base que provoca uma doença neurológica grave semelhante à Doença de Parkinson (25). Estudos anteriores comprovam que as principais áreas de concentração do manganês no cérebro são o globo pálido, cerebelo e córtex cerebral (26). A concentração de Mn nos astrócitos é 50-60 vezes mais elevada do que em neurônios (27).

1.2 Manganismo

O manganismo, nome associado à neurotoxicidade de superexposição ao Mn, foi observado pela primeira vez em 1837 por Couper e sua descrição clínica caracterizada

em 1955 por Rodier, descrevendo-a como uma Síndrome Neurocomportamental (28). As características clínicas declaradas como “normal” de parkinsonismo induzido por Mn incluem no início das manifestações neurocomportamentais, psicose, baixa amplitude, rápido tremor postural, hipocinético e disartria hipofonéticas, marcha precoce e anormalidade no equilíbrio, distonia, mioclonia e sinais piramidais (29). Estudos em ratos em desenvolvimento exposto a Mn demonstrou déficits motores expressivos e alteração nas vias de sinalização intracelular associados à regulação da proliferação, plasticidade e morte celular, parcialmente dependente de estresse oxidativo (30).

O aumento na concentração de Mn está associado com as alterações nos neurotransmissores e na concentração de glutamato, que estão ligados a distúrbios psicológicos e motor (31-32).

Além das alterações de sinalização celular, a intoxicação por Mn avaliada em alguns estudos *in vivo* evidenciou um declive significativo na coordenação motora, diminuição da distância percorrida e na velocidade na tarefa de campo aberto (33), mostrando uma correlação direta entre os níveis de Mn no núcleo caudado, putâmen e globo pálido, e a gravidade dos déficits comportamentais (32). O Mn no cérebro está preferencialmente acumulado em astrócitos e é conhecido por estimular a produção de espécies reativas de oxigênio e espécies de nitrogênio, resultando em estresse oxidativo/nitrosativo (34-35).

1.3 Cerebelo

O cerebelo é conhecido por desempenhar um papel fundamental na coordenação motora e no ajuste fino das habilidades motoras (36-38). Estudos anteriores demonstram que grupos expostos ao Mn apresentam uma diminuição do volume cerebelar, e essas reduções de volume estão correlacionadas com déficits neurocomportamentais e motores (39).

O cerebelo exerce uma influência reguladora sobre a atividade muscular, recebendo impulsos originados em receptores das articulações, tendões, músculos, pele e também de órgãos terminais do sistema visual, auditivo e vestibular, sendo estes impulsos

inconscientes, porém são estímulos essenciais para o controle do movimento (40). O cerebelo possui três funções: equilíbrio, tônus postural e movimento. O tônus postural atua juntamente com a regulação do equilíbrio e o controle dos reflexos posturais. O movimento também tem íntima relação com o cerebelo (41).

A participação do cerebelo na função de ordem superior do cérebro é provavelmente mediada por amplas conexões com centros corticais e sub-corticais. Além disso, a implicação de danos aos circuitos cerebelares causa certas desordens do desenvolvimento neurológico sugerindo que o processamento do cerebelo pode ser necessário durante o desenvolvimento para a conexão adequada em outras áreas do cérebro (42).

As células de Purkinje são a principal unidade celular dos circuitos do cerebelo; durante a fase do desenvolvimento do SNC eles orquestram a morfogênese, e no adulto cada célula computa centenas de milhares de sinais. O dendrito de cada célula de Purkinje é diretamente inervado por uma única fibra de excitação que vem do tronco inferior cerebral. As células de Purkinje também recebem *input* excitatório indiretamente de fibras musgosas, que se originam em dezenas de núcleos do cérebro e da medula espinal. (43-44). Células granulares, as menores células do corpo humano, convergem sobre os dendritos das células de Purkinje, formando uma rede neuronal. A expansão de fibras musgosas para células granulares ocorre igualmente das células granulares para os dendritos das células de Purkinje proporcionando um benefício computacional, sendo a capacidade do cerebelo para discriminar um grande número de diferentes padrões (45-47).

Os interneurônios, também chamados de neurônio *relay*, é um neurônio multipolar, estando presentes em toda a medula espinal (substância cinzenta). São mais abundantes que os próprios neurônios motores realizando diversas interconexões – funções medulares. Responsáveis pelo processamento dos sinais desde o momento que entram na medula até a sua saída pelo neurônio motor anterior. Recebem sinais também de centros superiores (tronco e córtex cerebral) influenciados pelo trato corticoespinal. Vários interneurônios inibitórios regulam as entradas excitatórias em células de Purkinje e astrócitos especializados chamados glia de Bergmann mantém a sinalização sináptica

eficiente. As células de Purkinje enviam sinais exclusivamente inibitórios para os núcleos do cerebelo, os quais controlam a saída final dos sinais cerebelares (48).

Os astrócitos, glia de Bergmann, posicionam-se em torno do perímetro de sinapses entre os axônios das fibras paralelas e das células de Purkinje, com extensões que contactam sinapses individuais e formam 90% da área de superfície da membrana. Glia de Bergmann expressam elevadas densidades de transportadores de glutamato, também desempenha um papel importante na sinapse neuronal (49).

A lesão cerebelar provoca uma série de sintomas motores, incluindo dismetria, hipotonia, tremor. No entanto, a principal descrição de doenças do cerebelo, e, em particular, aquelas que afetam o desenvolvimento e/ou a função das células de Purkinje, geralmente interrompem a precisão e a coordenação do movimento, condições que muitas vezes são cumulativamente referidas como "ataxia" (50).

Como um sintoma, ataxia refere-se ao movimento descoordenado e como uma desordem refere-se a uma família de doenças neurológicas que geralmente envolvem a neurodegeneração (51). Os pacientes com ataxia tem controle muscular pobre, problemas de movimentos nos membros e falta de equilíbrio e coordenação, em última análise uma perturbação da marcha, um sintoma frequentemente associado com distúrbios no cerebelo (50).

Uma ataxia que ocorre é a grande degeneração das células de Purkinje. No entanto, enquanto a degeneração neuronal pode ser essencial para as características fisiopatológicas em ataxias graves (50-51), a eletrofisiologia e dados de imagem de cálcio mostram que as células de Purkinje são disfuncionais antes da degeneração em modelos ataxia mais leves (52-56).

A eletrofisiologia de modelos vivos revela que as células de Purkinje perdem seus padrões de disparo regulares (57). Curiosamente, em ratos com ataxia tem sido sugerido que a morte das células de Purkinje é a principal alteração que ocorre onde apresenta defeitos motores (58).

1.4 Glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central dos mamíferos, desempenhando um papel importante em processos fisiológicos e patológicos (59), e está envolvido em várias funções do cérebro, tais como a aprendizagem e a memória (60). Toxicidade do glutamato desempenha um papel crucial na disfunção neuronal e morte celular em muitas doenças neurológicas agudas e crônicas (61). O glutamato está relacionado com a produção de radicais livres.

O glutamato não é metabolizado no ambiente extracelular, a manutenção da neurotransmissão glutamatérgica normal ou a prevenção de doenças neurodegenerativas induzida por glutamato depende da presença de sistemas de transporte de glutamato ativo nas células gliais e neurônios (62). O glutamato sintetizado por astrócitos é convertido em glutamina através da enzima glutamina sintetase e exportado para os neurônios através de múltiplos transportadores (63). A liberação de glutamato inicia os eventos sinalizadores na neurotransmissão excitatória. Este ciclo global de síntese, liberação e recuperação de glutamato é referido como o ciclo de glutamato-glutamina (64).

O glutamato é reconhecido como uma potente neurotoxina por mais de meio século (65). Mesmo em concentrações ambientais normais o glutamato pode ser neurotóxico em células privadas de energia (66). Esta ação foi denominada excitotoxicidade e ocorre como consequência de uma prolongada ou uma forte ativação de receptores pós-sinápticos de glutamato (67).

Embora haja resposta ao glutamato através de vários receptores de glutamato, cinco isoformas diferentes de transportadores de glutamato (ou transportadores de aminoácidos excitatórios) já foram identificados: GLAST (EAAT1), GLT-1 (EAAT2), EAAC-1 (EAAT3), EAAT4, e EAAT5 (68-72). Estudos de imunolocalização revelaram que GLT-1 e GLAST são expressos principalmente em células gliais (astrócitos), e EAAC1 e EAAT4 estão presentes principalmente em neurônios (69, 71, 73-75). Os astrócitos retiram o glutamato extracelular via alta afinidade dos transportadores de glutamato, transportador de glutamato / aspartato (GLAST) e glutamato transportador 1 (GLT-1) (76).

O transportador GLT-1 é o subtipo quantitativamente dominante dos transportadores glutamato no cérebro (77). Estudos têm demonstrado que os transportadores astrogliais GLT-1 e GLAST desempenham o papel mais importante na manutenção dos níveis fisiológicos de glutamato extracelular (78), e, devido ao seu papel crucial na proteção dos neurónios contra excitotoxicidade, a sua expressão e atividade deve ser estritamente regulamentada.

Estudos demonstram que os neurônios estão diretamente envolvidos na regulação da expressão de GLT-1 e GLAST (79-81), sustentando assim a hipótese de que o complexo circuito regulador é estabelecido entre os neurônios e células gliais para controlar as concentrações de glutamato extracelular. A expressão da GLT-1 é induzida, enquanto que a do GLAST só é aumentada (80-81), e fatores neuronais demonstram regular apenas GLT-1 (79,81), apesar de o próprio glutamato estar envolvido na regulação positiva tanto do GLT-1 como do GLAST (82-83). Além disso, as mortes neuronais desencadeadas por concentrações neurotóxicas de glutamato conduzem para a regulação da GLT-1 (81).

GLAST e GLT-1 são 65% idênticos no aminoácido e têm parcelas hidropáticas semelhantes (84), no entanto, a determinação de uma estrutura comum do transportador ainda é indescritível. GLAST está presente no cérebro anterior e cerebelo de ratos no nascimento, GLT-1 é indetectável no cérebro pós-natal até a terceira semana, e atinge padrões adultos por volta da quinta semana (85). Vários estudos têm detectado a existência de GLT-1 (86-89) ou GLAST (90) nas culturas de neurônios primários, e há evidências que sugerem que GLT-1 pode ser expressa por neurônios no cérebro em desenvolvimento (91). GLT-1 também pode ser expressa por neurônios após uma lesão (92).

O GLT-1 possui três *splicing* alternativos: estes são referidos como GLT-1a, GLT-1b e GLT-1c (93), GLT-1a é uma forma "normal" de GLT-1 e contém 11 exons, enquanto GLT-1b e GLT-1c possuem 10 exons. Em astrócitos individuais, GLT-1a e GLT-1b são frequentemente co-expressos (94), ainda que em diferentes compartimentos da membrana em relação à localização de sinapses. Estudos anatômicos mostram que GLT-1a está frequentemente presente nas membranas em locais de recepção de sinapses e, portanto, provavelmente modula os níveis pré-sinápticos do glutamato. Por outro lado, GLT-1b,

como GLAST, é preferencialmente expressa em zonas dos astrócitos, que são mais centrais e longe das sinapses (95). Assim GLAST e GLT-1b pode permitir aos astrócitos regular os níveis extracelulares do glutamato.

As mitocôndrias são organelas especiais para a geração de ATP celular pelo sistema de transporte de elétrons e sequestro de íons de cálcio intracelular. Por causar, o acúmulo de íons de cálcio excessivo na mitocôndria desacopla a transferência de elétrons a partir de síntese de ATP, e considerando-se que o comprometimento do metabolismo energético aumenta geração de radicais livres, mitocôndrias emergem como uma ligação plausível entre a elevação de $[Ca^{2+}]$ e a neurotoxicidade por glutamato (96-97). O papel fundamental das mitocôndrias na excitotoxicidade foi destacado recentemente pela influência determinística da função mitocondrial na decisão entre a morte celular por apoptose ou necrose e pela ação de proteção de transformar fatores de crescimento presumivelmente conferidos pela melhoria energética mitocondrial (98).

Estudos tem sido observado a acumulação de glutamato extracelular com a neurotoxicidade induzida pelo Mn (99). Suspeita-se que o glutamato excessivo pode ser uma das razões indiretas de neurotoxicidade induzida pelo Mn. O estresse oxidativo tem sido proposto em desempenhar um papel no dano neuronal induzido por Mn (100). Neurônios catecolaminérgicos parecem particularmente suscetíveis a Mn catalisando dano oxidativo (101). A Glutathione reduzida (GSH) é o mais abundante tiol de baixo peso molecular intracelular no sistema nervoso central agindo como um importante antioxidante celular. O GSH é sintetizado exclusivamente no citoplasma, a partir dos ácidos aminados glutamato, glicina e cisteína e é transportada para a mitocôndria.

É importante distinguir a excitotoxicidade que é iniciada por ativação de receptores de outras ações gliotóxicas do glutamato. Tem sido demonstrado que, em astrócitos, a breve exposição ao glutamato resulta em inchaço celular, enquanto que a incubação prolongada fere estas células através de estresse oxidativo (102). Em vez de um mecanismo excitatório, excitotoxicidade induzida por glutamato é mediada predominantemente por uma redução no conteúdo de GSH e os seus efeitos são quase

completamente bloqueados por antioxidantes e os inibidores de transportadores de glutamato.

É bem conhecido que, quando as células são desafiadas oxidativamente, a síntese de GSH aumenta como um mecanismo de proteção, mas o aumento da geração de ROS torna os sistemas de defesa comprometidos e síntese de GSH não é capaz de competir com o estresse oxidativo, e os seus níveis diminuem. Os níveis celulares de GSH podem ser substancialmente menor com a administração de agentes oxidantes, irradiação, ou tratamento com compostos que interagem com o grupo tiol de GSH (103).

1.5 N-Acetilcisteína (NAC)

A N-acetilcisteína (NAC) é um aminoácido que contém enxofre, é um antioxidante lipossolúvel que pode permear as membranas celulares e ao entrar em uma célula é rapidamente hidrolisado para libertar a cisteína. Ao longo dos anos tem sido usado no tratamento de doenças congestivas e obstrutivas e intoxicação por paracetamol. A NAC pode atuar através de vários mecanismos contra degeneração celular. A NAC atua como um precursor de síntese de GSH (104), e tem vantagens potenciais como um agente antiapoptótico e anti-inflamatório (105-107). A NAC estimula as atividades das enzimas citosólicas envolvidas no ciclo da glutathione, tais como a glutathione reductase, aumentando a taxa de regeneração de GSH. A GSH é um dos principais compostos tiolico que desempenham um papel fundamental na homeostase celular, uma vez que a sua perda é acompanhada pela morte celular causada pelo estresse oxidativo (108). A NAC também atua por meio de reação direta entre a sua redução de grupo tiol e ROS protegendo contra danos oxidativos *in vitro* e *in vivo* (109). Além disso, a NAC pode atuar no próprio metabolismo mitocondrial e influência da fosforilação oxidativa (110-111).

A NAC pode aumentar complexos I e IV nas atividades mitocondriais sinápticas de ratos idosos, sugerindo uma ação direta por este antioxidante na cadeia respiratória mitocondrial (112). Recentemente tem sido utilizada em severas doenças neurodegenerativas. Assim, a NAC é um antioxidante e um agente de radical livre que aumenta GSH intracelular, um componente importante da via através da qual as células são

protegidas contra o estresse oxidativo. A eficácia de NAC na proteção das células em apoptose tem sido geralmente interpretada dentro do contexto envolvendo o estresse oxidativo (113).

A NAC tem sido relatada como sendo eficaz contra o dano oxidativo em doenças neurodegenerativas, tais como a isquemia cerebral e doença de Parkinson (112, 114-115).

1.6 Justificativa

Os metais são fundamentais para as funções biológicas e seus impactos nas atividades em células neurais estão atualmente sob investigação. A exposição humana ao Mn é uma preocupação crescente, devido à sua prevalência, não só no ambiente de trabalho, mas também no meio da população em geral. Embora os mecanismos celulares e moleculares da neurotoxicidade por Mn ainda não sejam totalmente compreendidos, os estudos recentes destacam a ligação entre estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, inflamação e neurodegeneração com a exposição a este metal (117, 119). Justificando assim a necessidade de estudos para melhor compreensão das consequências da exposição ao Mn.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo foi caracterizar os efeitos do manganês na marcha após um tratamento subagudo em ratos. Investigar se Mn tem a capacidade de perturbar o movimento natural de marcha utilizando o sistema de Catwalk e estudar se o cerebelo (região responsável pelo movimento) é afetado por Mn.

2.2 Objetivos Específicos

- Demonstrar a marcha dos animais tratados com Mn e com NAC utilizando o sistema de análise da marcha.
- Avaliar as camadas cerebelares (camada granular, camada células de Purkinje e camada molecular) através de imuno blotting, imunohistoquímica e histologia.
- Identificar a alteração na atividade astrocítica no cerebelo através de imuno blotting, imunohistoquímica.
- Avaliar os transportadores de glutamato GLAST e GLT-1 a através de imuno blotting.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos machos Sprague-Dawley (NTacUnib:SD Taconic, USA, 1999), pesando aproximadamente 170-200g com 5 semanas de vida provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em animais de Laboratório – CEMIB da Unicamp, Campinas, SP. Os animais foram mantidos em sala fechada com temperatura controlada, iluminação artificial com foto período de 12 horas, com ingestão de ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em consonância com os princípios éticos na experimentação animal, sendo a pesquisa submetida e aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animais – CEUA/UNICAMP, protocolo nº 2505/(A).

Os animais foram alocados em três grupos: (A) grupo Controle (n=10), (B) grupo tratado com Mn (n=10) e (C) grupo tratado com Mn + NAC (N-acetilcisteína) (n=10). Os animais do grupo A foram tratados apenas com o veículo (0,2 ml de solução salina, i.p.), os do grupo B foram administrados com cloreto de manganês (II) (50 mg/kg de peso corporal, i.p.) e os do grupo C foram co-tratados diariamente com o cloreto de manganês (II) (50 mg/kg de peso corporal, i.p.) mais NAC antioxidante (163 mg/kg, i.p.). As doses foram injetadas diariamente por 4 dias (116) e os animais foram mantidos nas condições citadas anteriormente. As administrações de Mn e NAC tiveram um intervalo de 1 hora. Após 24 horas da última dose injetada, os animais foram submetidos à análise de sistema de análise da marcha, immunoblotting, histoquímica, imunohistoquímica e imunofluorescência.

3.2 Sistema de análise da marcha

Sistema de análise da marcha, utilizando o sistema de Catwalk (Noldus Inc., Wageningen, Holanda). Nesta configuração, o animal atravessa uma passarela com um piso de vidro iluminado a partir da borda longa. A aquisição de dados foi adquirida através de uma câmara de alta velocidade e as impressões das patas foram classificadas automaticamente pelo software. As impressões dos animais de cada grupo (n=10) foram obtidas antes e após o tratamento. Os parâmetros utilizados para analisar a marcha foram o

comprimento, a largura e a área de impressão das patas traseiras, comprimento da passada e a base de apoio. Os dados foram expressos como a razão percentual entre o antes e o pós-tratamento.

3.3 Western Blotting

Os animais (n=6) foram sacrificados e os cérebros removidos, seguindo-se a dissecação do cerebelo. O tecido foi armazenado a -80 °C até o estudo. Os tecidos dissecados foram homogeneizados em tampão contendo Tris 50 mM, NaCl 150 mM, dodecilsulfato de sódio a 0,1 % (SDS), 1 % de NP - 40 0,5 % de desoxicolato de sódio (pH 8,0) mais coquetel inibidor de protease (AMRESCO, Solon, OH, EUA) e centrifugado a 10.000g durante 10 min, 4 °C. O teor de proteína das amostras foi determinado usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Tampão de amostra foi adicionado às alíquotas de tecido (30µg) e as amostras fervidas durante 5 min.

A eletroforese foi realizada em cuba de mini gel da *BioRad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 70 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 100 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). As proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de mini gel da *BioRad*, e a solução tampão para transferência que consistia de 48 mM Tris (pH 8,3), 39 mM de glicina, 0,037 % de SDS, e 20% de metanol mantida em voltagem constante de 25 volts por 12 horas, sob refrigeração contínua com gelo. As membranas foram subsequentemente incubadas em tampão de bloqueio (Tris 10 mM, 100 mM NaCl, 5 % de leite em pó desnatado, e 0,1 % de Tween-20), seguido de incubação com anticorpo monoclonais dirigidos contra GFAP (1:1.000), GLAST (1:1.000), GLT-1 (1:1.000) ou b-actina (1:10.000). Em seguida, incubação com peroxidase conjugada AffiniPure de rato, IgG anti-goat (1:10.000), acoplado a HRP anti-habbit IgG (1:10.000) e acoplado a HRP anti-mouse IgG (1:10.000) anticorpo secundário .

Cada etapa de incubação foi de 1 hora de duração, entre as transferências as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos (Tris 10 mM, NaCl 100 mM e 0,1 % de

Tween- 20). Para a detecção do anticorpo específico de ligação, as membranas foram tratadas de acordo com as instruções do kit ECL e transformada num filme fotossensível para X-OMAT. Intensidades de sinal foram posteriormente medidos por densitometria usando o Un-Scan-It (Silk Scientific Inc. Orem, UT, USA). Linearidade da relação entre a densidade óptica e concentração de proteína foi verificada utilizando curvas padrão apropriadas.

3.4 Imunohistoquímica

Os animais (n=4) foram anestesiados com ketamina 60mg/kg e xilazina 10mg/kg e perfundidos transcardialmente como descrito anteriormente (117). Os cérebros foram removidos e pós-fixados durante a noite em formalina neutra tamponada contendo 4 % de formaldeído, tampão fosfato de sódio a 0,5%, e 1,5% de metanol, pH 7.0. Secções sagitais de espessura de 60 µm foram cortadas ao nível do cerebelo usando um vibrátomo (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch Germany) de acordo com o atlas de cérebro de rato (118).

A imunohistoquímica foi realizada conforme descrita anteriormente (117). Resumidamente, secções do cerebelo foram incubadas durante 10 min em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,3% de peróxido de hidrogénio para bloquear a atividade da peroxidase endógena. As secções de tecido foram lavadas com PBS (3x10 minutos) bloqueadas durante 1 hora em 0,5% de Triton X-100 e 1% anti-donkey e posteriormente incubada com anticorpo primário biotinilado MsxNeuronal Núcleos NeuN (1:250) a 4°C durante a noite. As secções foram então lavadas (3x10min). As secções foram em seguida incubadas durante 1h em estreptavidina - HRP (1:100), seguido por lavagem (3x10 min), e depois de incubação com DAB (0,05%) em PBS contendo sulfato de amónio de níquel de 25 mg/ml para o aumento do sinal e na presença de H₂O₂ (0,03 %) durante 1 min. Os cortes foram então montados em lâminas revestidas com polilisina (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canadá), desidratadas em álcoois, lavadas em xilol, e cobertas com Permunt e lamínulas. O número de células foi contado utilizando-se do programa ImageJ (Center for Information Technology, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) com uma ampliação de 200x utilizando um microscópio Olympus BX51.

3.5 Imunofluorescência

Imunofluorescência, onde as secções do cérebro foram lavadas com PBS (3x10 minutos) bloqueadas durante 30 min em 0,5% de Triton X-100 e 1% anti-donkey e incubou-se com 0,5% de Triton X-100, juntamente com 1% soro de burro e anticorpo primário GFAP (Santa cruz, (C-19): sc-6170) (1:250) a 4°C durante a noite. As secções foram então lavadas (3x5min). As secções foram em seguida incubadas durante 2h com anticorpo secundário fluorescente-conjugado, i.e. FITC, (Texas Red Alexa Fluor), (1:200) in PBS (0.5% Triton X-100) no escuro. As secções foram então lavadas (3x5min). Os cortes foram então montados em lâminas revestidas com polilisina (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canadá), colocadas 2-3 gotas de solução Prolong gold anti-fade. A reatividade astrocítica foram analisadas utilizando programa ImageJ (Center for Information Technology, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) com uma ampliação de 200x utilizando um microscópio Olympus BX51 e ligado ponto RT câmera digital.

3.6 Fluorescência

Utilizando o marcador de núcleo DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindole) as secções foram cobertas com solução DAPI 1µg/ml por 10 min. Lavadas 3 vezes por 10 min com PBS e deixadas por 1 hora para secar. Os cortes foram então montadas em lâminas revestidas com polilisina (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canadá), colocadas 2-3 gotas de solução Prolong gold anti-fade. Os núcleos foram analisadas utilizando programa Image ImageJ (Center for Information Technology, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) com uma ampliação de 200x utilizando um microscópio Olympus BX51 e ligado ponto RT câmera digital.

3.7 Histoquímica

A histoquímica foi realizada com cresil violeta e Fluoro-Jade C (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), no protocolo de cresil violeta, as secções do cérebro foram reidratadas em água destilada. Cobrindo o tecido com uma solução de cresil violeta por 10 min, aspirando a solução e desidratadas em alcoóis, lavadas em xilol e cobertas com PermOUNT e lamínulas. Células de Purkinje foram observadas usando a ampliação de 200x e

400x, em microscópio Olympus BX51 e a imagem foi capturada pela câmera digital SPOT RT.

No Fluoro-Jade C as secções do cérebro foram desidratadas em etanol 100% por 3 min e em etanol 70% por 1 min. Reidratada em água destilada por 1 min. Cobrindo a seção com solução 0.06% de permanganato de potássio por 15 min, em agitação suave. Em seguida, as seções foram cobertas com solução 0,001% de Fluoro-Jade C dissolvido em 0,1% solução ácido acético como veículo por 30 min. As secções foram lavadas 3 vezes por 1min. Deixadas por 1 hora a temperatura ambiente para secar, apuradas em xilol e cobertas com PermOUNT e lamínulas. Os dendritos degenerados foram observados em ampliação de 200x e 400x utilizando um microscópio Olympus BX51 a imagem foi capturada pela câmera digital SPOT RT.

3.8. Análise Estatística

Para a análise estatística foi empregada a Análise de Variância (ANOVA) com *post-hoc* pelo Teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP). Toda a análise foi realizada com o programa GraphPad Prism 4.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($P < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1. Sistema de análise da marcha

Os animais do grupo Mn demonstraram nas patas posteriores - principais responsáveis pela locomoção do animal – uma diminuição do comprimento e largura nas impressões das patas apoiadas na plataforma, com consequente diminuição da impressão da área, redução do comprimento da passada e da base de suporte. Os animais do grupo Mn + NAC demonstram um restabelecimento do tamanho do comprimento e largura da impressão das patas, chegando a valores semelhantes ao do controle e apresentando tendência a melhora na impressão da área das patas e base de suporte, porém não foi significativa (figuras 1a e 1b).

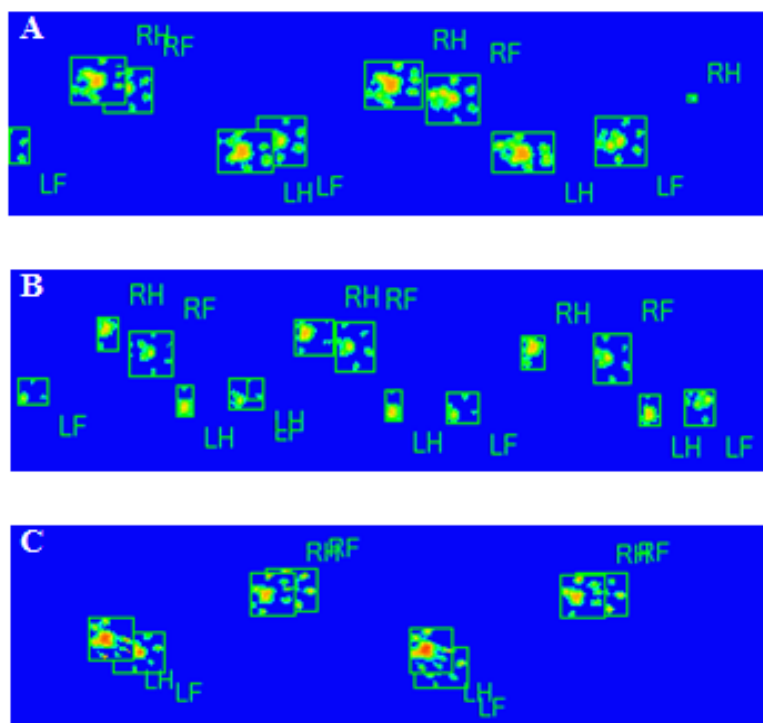


Figura 1a: Impressões das patas. Comparação entre as impressões das patas dos animais dos grupos Controle, Mn e Mn + NAC. n=10. A – grupo Controle; B – grupo Mn; C – grupo Mn + NAC.

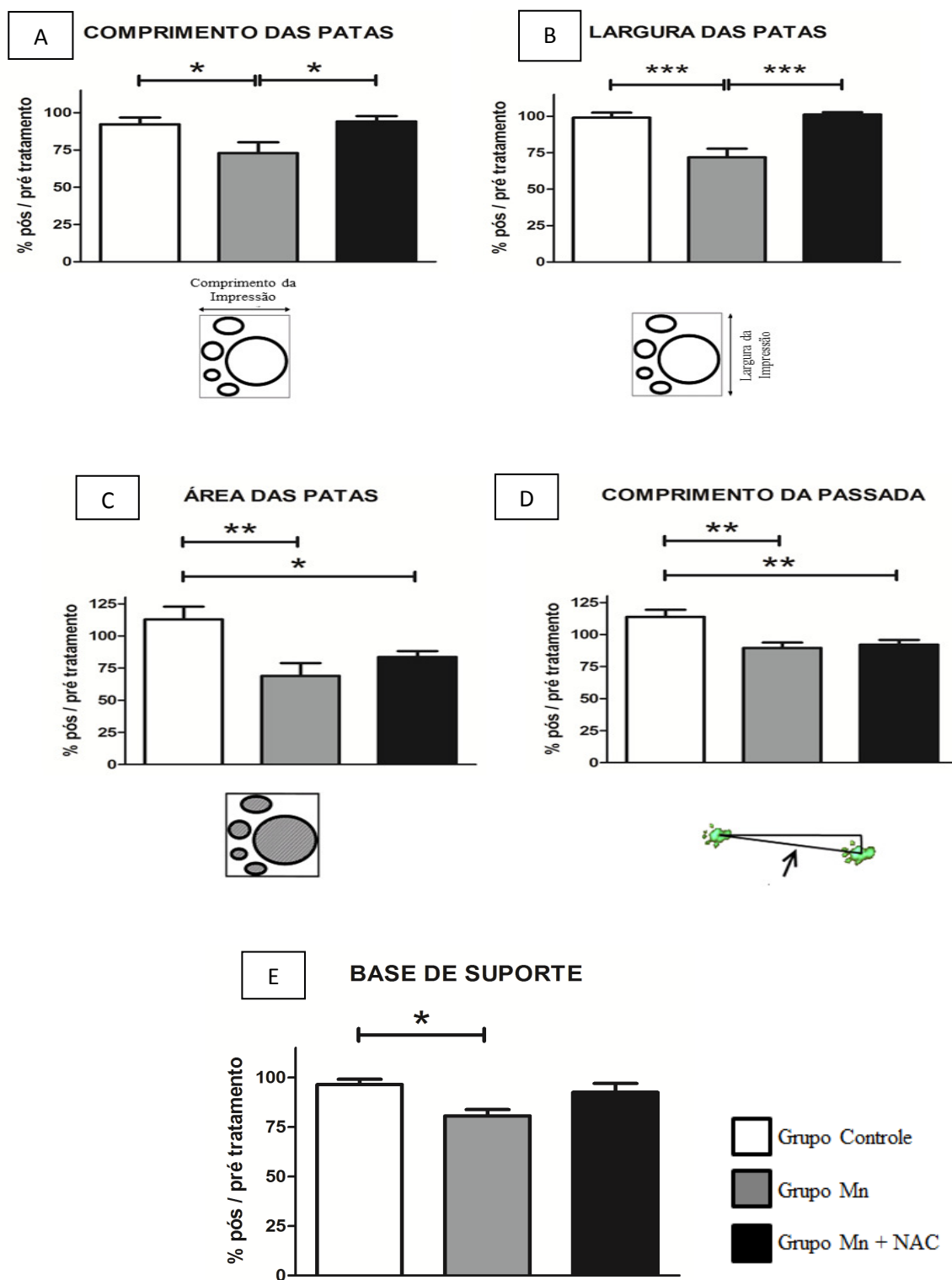


Figura 1b: Gráficos do Catwalk demonstrando os diferentes parâmetros entre os grupos Controle, Mn e Mn + NAC. n=10. A – Comprimento das patas; B – Largura das

patas; C – Área das patas; D – Comprimento da passada; E – Base de suporte. Os resultados estão expressos em média $\pm$ DP. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

4.2 GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*)

As análises de imunofluorescência indicaram um aumento na reatividade astrocítica no grupo Mn, em comparação com o grupo Controle. Já o grupo Mn + NAC, apresentou uma diminuição em relação ao grupo Mn (figuras 2a e 2b).

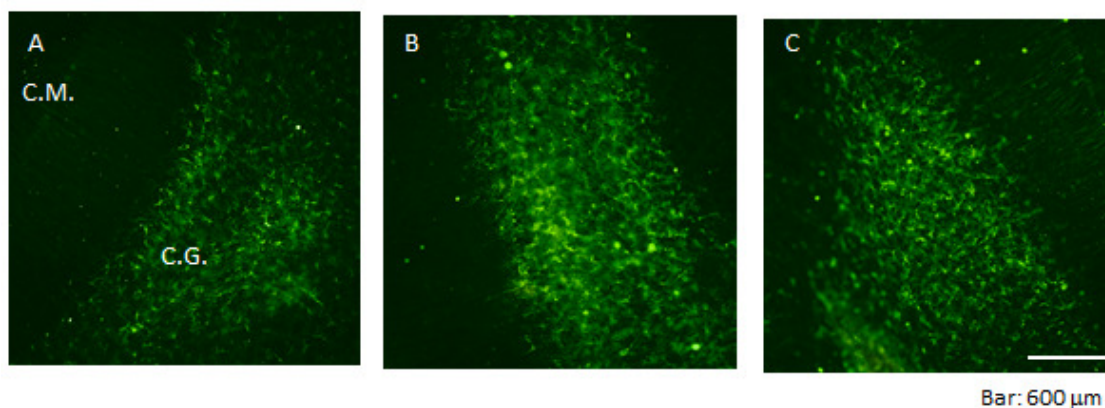


Figura 2a: Análise de imunofluorescência na região do vermis cerebelar (camada granular) com o anticorpo GFAP, demonstrando a atividade astrocítica nos grupos Controle, Mn e Mn + NAC. A – grupo Controle; B – grupo Mn; C – grupo Mn + NAC. C.M. – camada molecular; C.G. – camada granular. Aumento 200x, n=4.

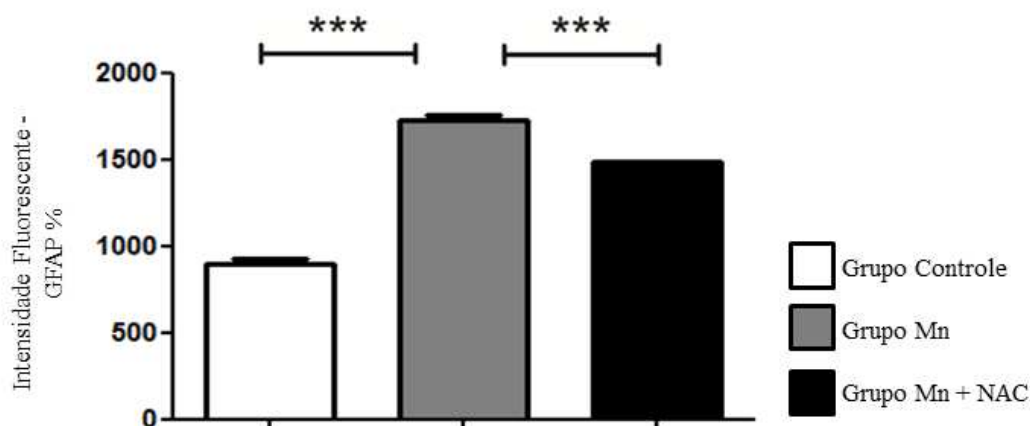


Figura 2b: Gráfico quantitativo da imunofluorescência com GFAP. Os resultados estão expressos em média $\pm$ DP. *** $P < 0,001$.

4.3 DAPI

A análise da marcação com DAPI indicou diminuição da intensidade do marcador nuclear no grupo Mn em comparação aos grupos Controle e Mn + NAC. O grupo Mn + NAC demonstrou resultados semelhantes ao grupo controle (figuras 3a e 3b). Na figura 3c observamos os resultados com o DAPI em sobreposição ao GFAP onde indicaram um aumento na reatividade astrocítica no grupo Mn e uma diminuição da intensidade do marcador nuclear, em comparação com o grupo Controle. Já o grupo Mn + NAC, apresentou uma diminuição em relação ao grupo Mn, semelhante ao grupo Controle.

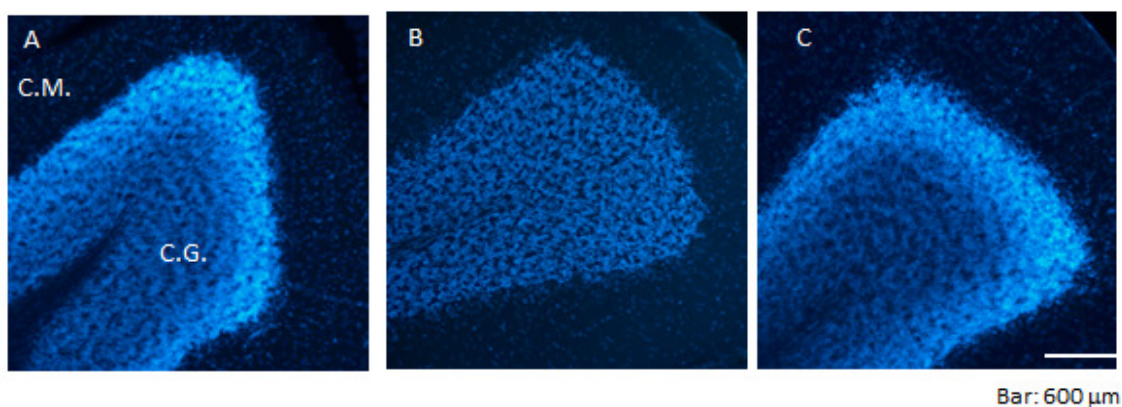


Figura 3a: Análise da região do vermis cerebelar com o marcador nuclear DAPI demonstrando o sinal fluorescente nos grupos Controle, Mn e Mn + NAC. A – grupo Controle; B – grupo Mn; C – grupo Mn + NAC. C.M. – camada molecular; C.G. – camada granular. Aumento 200x, n=4.

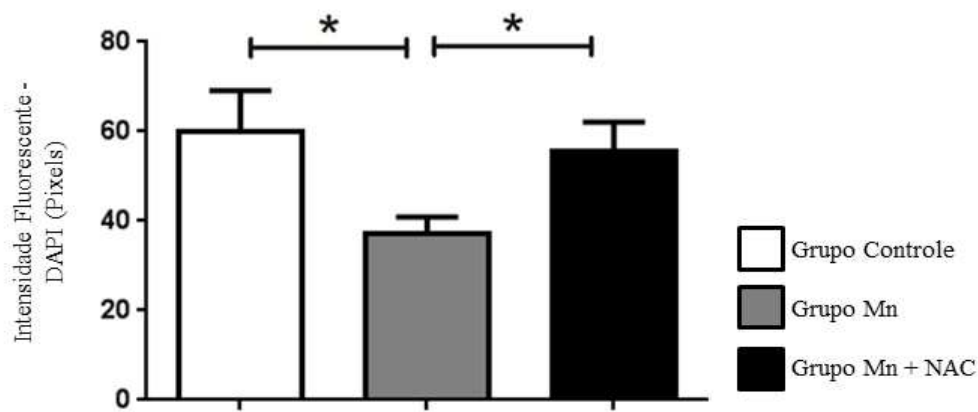


Figura 3b: Gráfico quantitativo do marcador nuclear DAPI. Os resultados estão expressos em média $\pm$ DP. * $P < 0,05$.

4.4 Análise de Imunohistoquímica

Na imunohistoquímica com o anticorpo NeuN (marcador de núcleos neuronais) pode-se observar que houve alterações no número de núcleos neuronais entre os grupos estudados na região da camada molecular (figuras 4a e 4b). Houve redução no grupo Mn em comparação ao grupo Controle, já o grupo Mn + NAC demonstraram resultados semelhantes ao grupo Controle

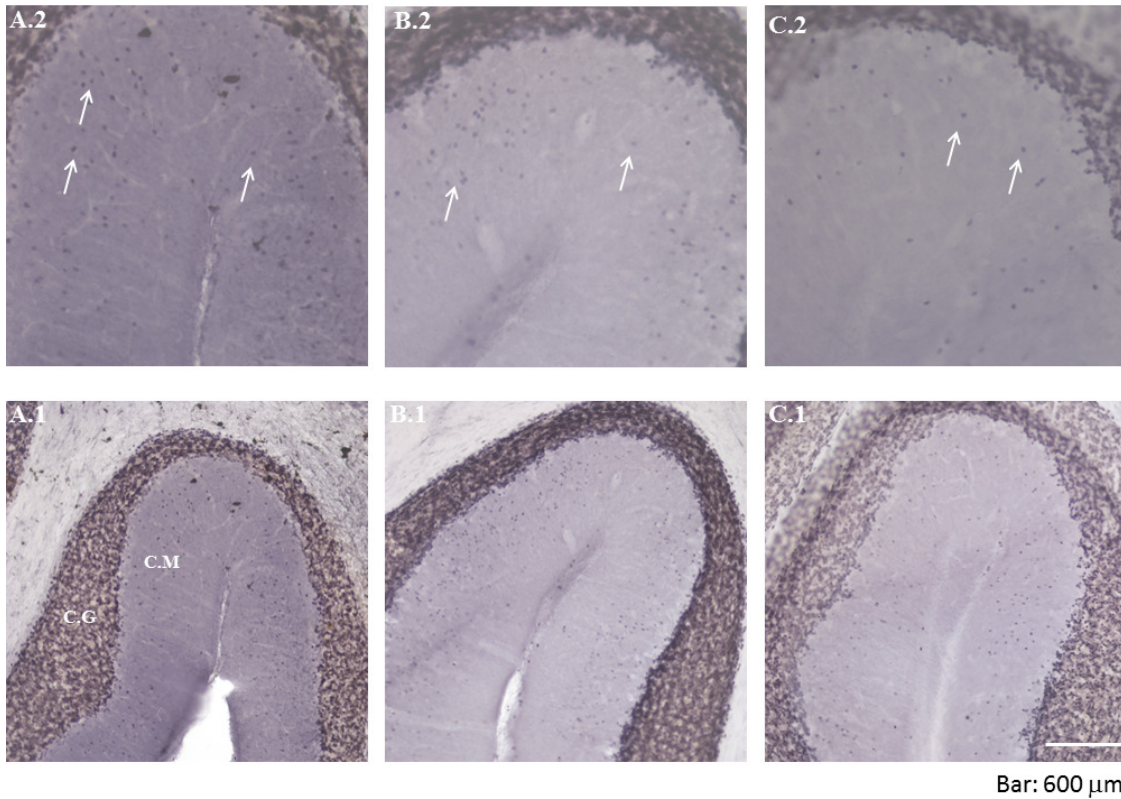


Figura 4a: Cortes histológicos da região do vermis cerebelar, observando a camada molecular, tratados com anticorpo NeuN. A.1 – grupo Controle; B.1 – grupo Mn; C.1 – grupo Mn + NAC; (aumento 200x); A.2 – grupo Controle; B.2 – grupo Mn; C.2 – grupo Mn + NAC; (aumento 400x). A.3 – grupo Controle; B.3 – grupo Mn; C.3 – grupo Mn + NAC; (aumento 400x) n=4.

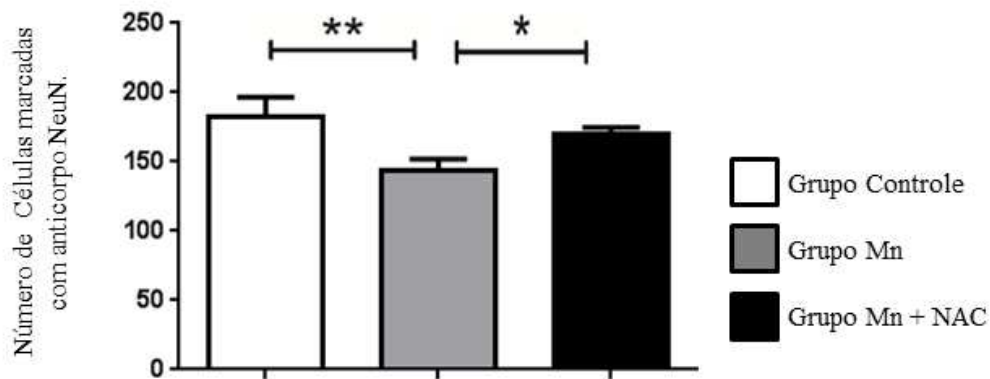


Figura 4b: Gráfico de números de células. Os resultados estão expressos em média $\pm$ DP. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.5 Fluoro-Jade C

Análise histoquímica utilizando o protocolo Fluoro-Jade C indica degeneração dos dendritos no grupo Mn em comparação com o grupo Controle. O grupo Mn + NAC apresentou resultado semelhante ao grupo Controle (figura 5a).

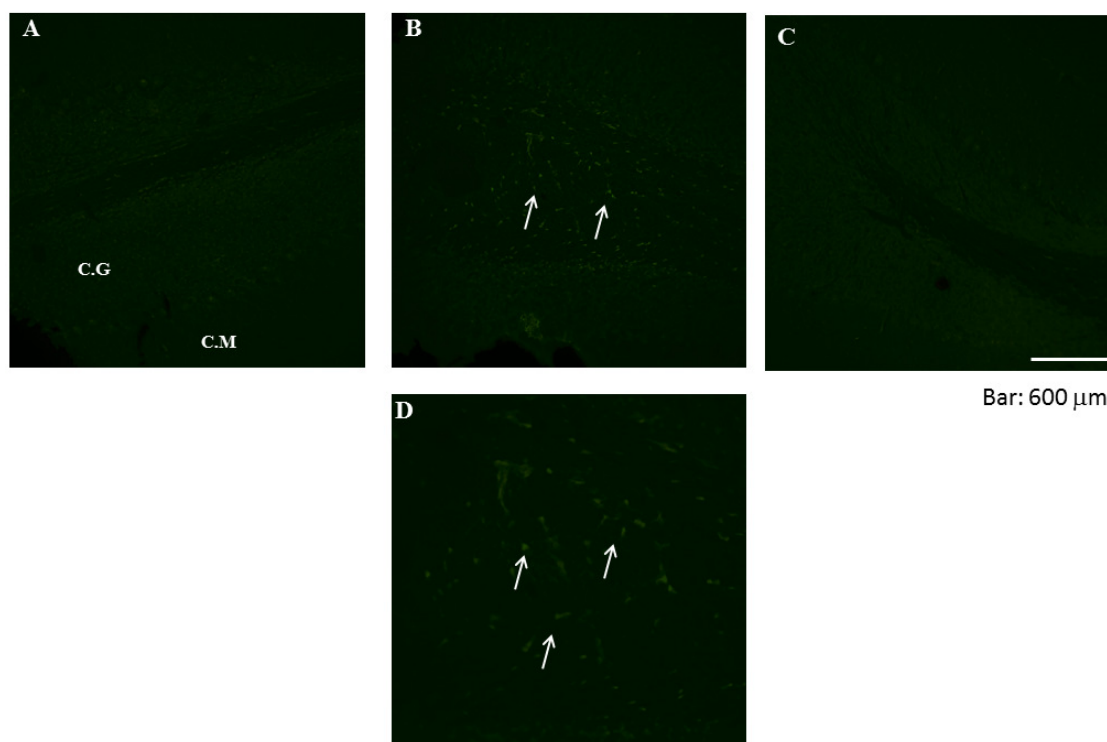


Figura 5a: Secções da região do vermis cerebelar, observando a camada granular, com o marcador Fluoro-Jade C, demonstrando degeneração dos dendritos no grupo Mn. A – grupo Controle 200x; B – grupo Mn 200x; C – grupo Mn + NAC 200x; D – grupo Mn 400x. C.M. – camada molecular; C.G. – camada granular. n=4.

4.6 Cresil Violeta

A análise histoquímica utilizando o protocolo do Cresil Violeta indicou um desarranjo na camada das células de Purkinje no grupo Mn em comparação com o grupo

Controle. Contudo nos animais do grupo Mn + NAC pode-se observar uma manutenção desse arranjo celular, mantendo resultados semelhantes ao grupo Controle (figure 6).

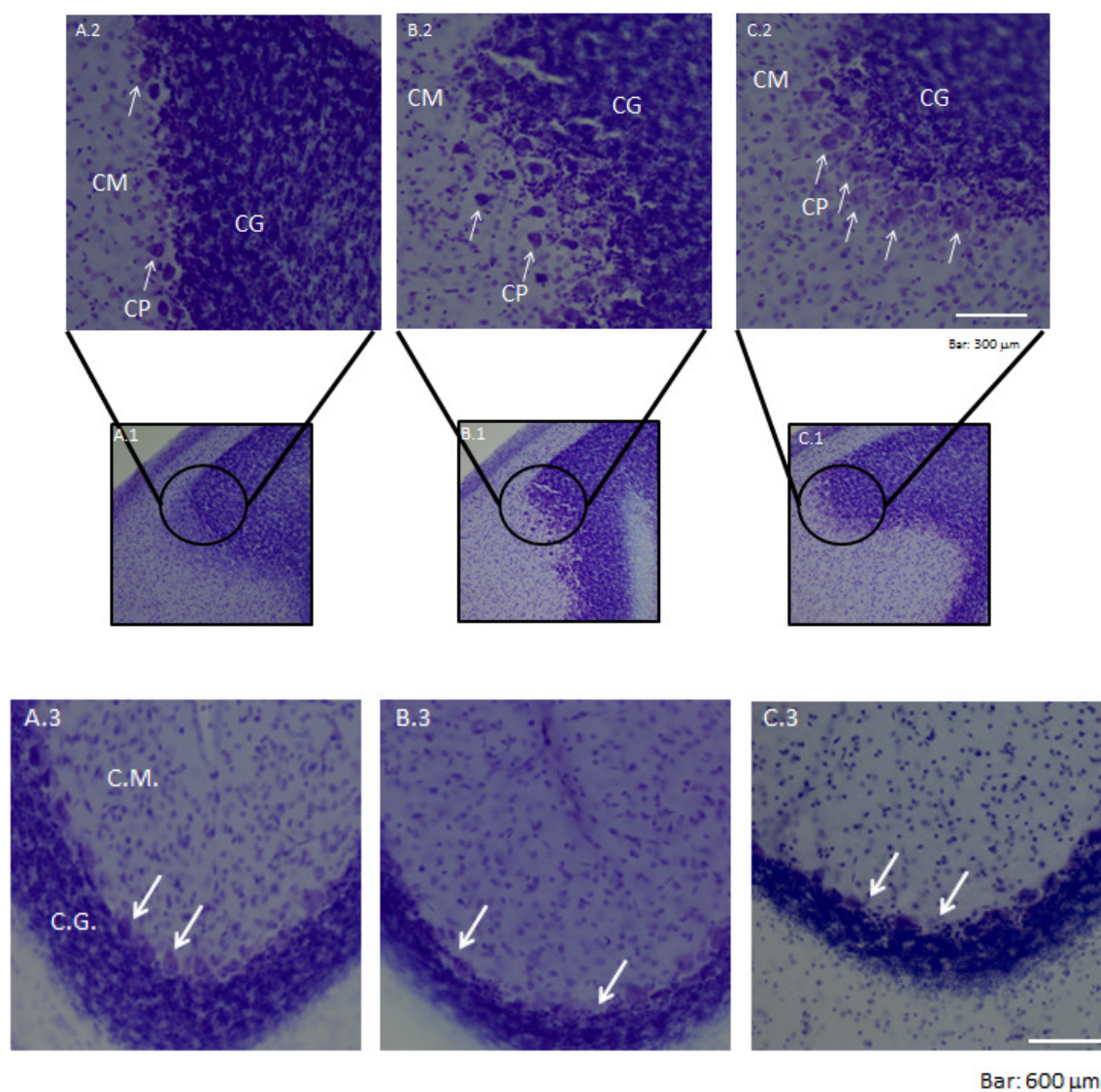


Figura 6: Secções da região do vermis cerebelar com a coloração com cresil violeta para visualização das células neurais, observando a camada das células de Purkinje. A.1 – grupo Controle; B.1 – grupo Mn; C.1 – grupo Mn + NAC; (aumento 200x); A.2 – grupo Controle; B.2 – grupo Mn; C.2 – grupo Mn + NAC; (aumento 400x). A.3 – grupo Controle; B.3 – grupo Mn; C.3 – grupo Mn + NAC; (aumento 400x), n=4.

4.7 Análise de Western blotting.

4.7.1 GFAP

Análise de western blotting com o anticorpo GFAP realizado nos grupos Controle, Mn e Mn +NAC (figura 7a), onde foi observado que o grupo Mn tem um aumento na expressão do GFAP, demonstrando um aumento na reatividade astrocítica nesse grupo em relação ao grupo Controle. O grupo Mn + NAC demonstrou resultados semelhantes ao grupo Controle.

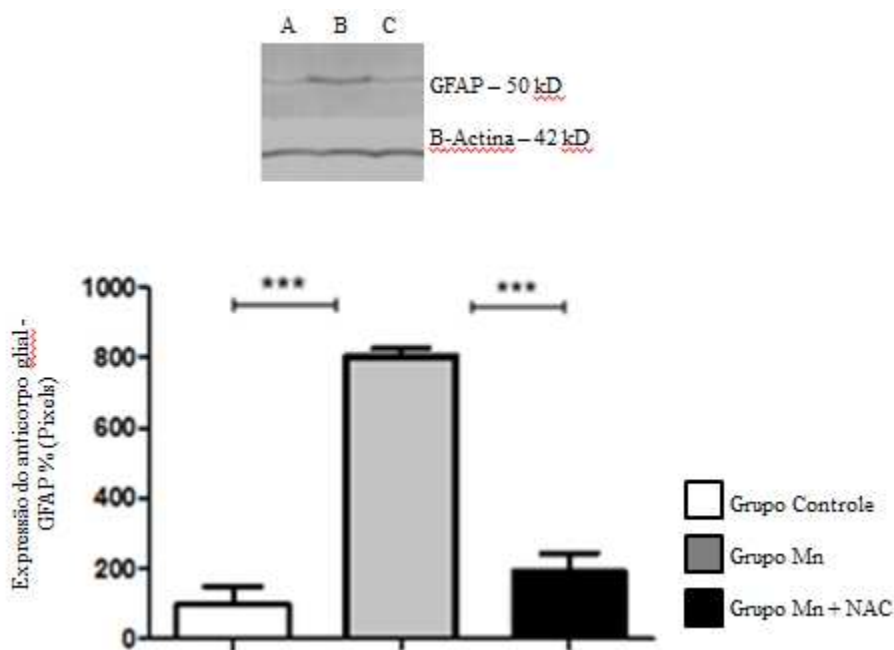


Figura 7a: Western blotting utilizando anticorpo GFAP da região do vérmis cerebelar nos grupos Controle, Mn e Mn + NAC, n=6, 50 ng de proteína. Os resultados estão expressos em média $\pm$ DP. *** $P < 0,001$.

4.7.2. GLAST

Análise de western blotting com o anticorpo GLAST realizado nos grupos Controle, Mn e Mn +NAC (figura 7b). Nos resultados obtidos não foi demonstrado diferença significativa entre os grupos Controle, Mn e Mn + NAC.

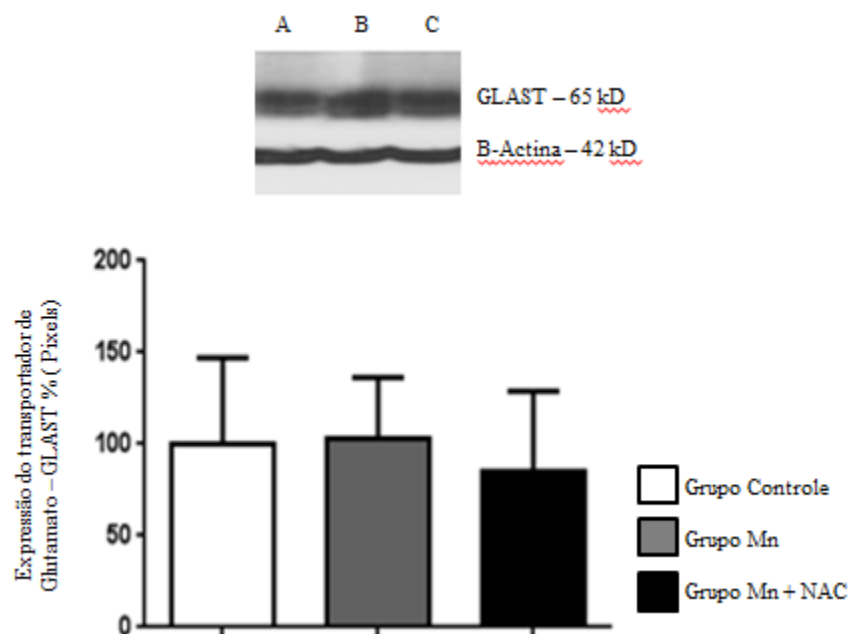


Figura 7b: Western blotting utilizando anticorpo GLAST da região do vérmis cerebelar nos grupos Controle, Mn e Mn + NAC, n=6, 50 ng de proteína. Os resultados estão expressos em média $\pm$ DP. * $P < 0,05$, não apresentando significância.

4.7.3. GLT-1a

Análise de western blotting com o anticorpo GLT-1a realizado nos grupos Controle, Mn e Mn + NAC (figura 7c). Pode-se observar um aumento na expressão do transportador de glutamato GLT-1a no grupo Mn em relação ao grupo Controle. O grupo Mn + NAC manteve a expressão desse transportador semelhante ao grupo Controle.

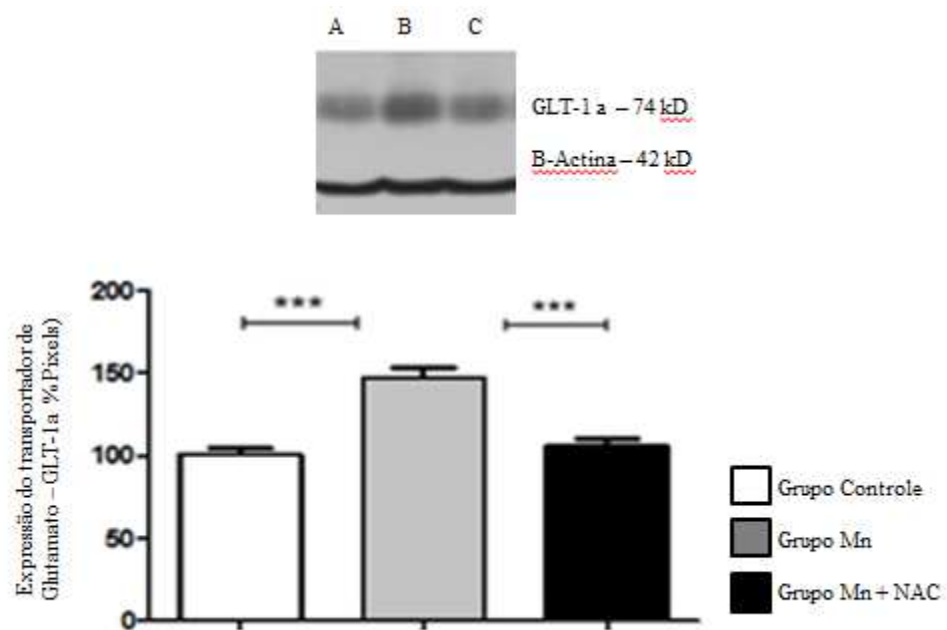


Figura 7c: Western blotting utilizando anticorpo GLT-1a da região do vérmis cerebelar nos grupos Controle, Mn e Mn + NAC, n=6, 50 ng de proteína. Os resultados estão expressos em média $\pm$ DP. *** $P < 0,001$.

5.DISSCUSSÃO

A exposição humana ao Mn é uma preocupação crescente. Embora os mecanismos celulares e moleculares da neurotoxicidade por Mn ainda não sejam totalmente compreendidos, os estudos recentes destacam a ligação entre estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, inflamação e neurodegeneração com a exposição a este metal (117, 119).

Estudos anteriores demonstram que após 4 dias de tratamento com o Mn, a concentração de Mn no cerebelo é 427% maior em comparação ao controle (26). A análise de biomarcadores do cerebelo para danos oxidativos revelou que a exposição de ratos ao Mn aumenta a oxidação de proteínas, confirmando que a intoxicação por Mn é capaz de causar estresse oxidativo. O Mn atrapalha a fosforilação oxidativa e aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (121).

No presente estudo analisamos a marcha de animais expostos ao Mn em um modelo sub-agudo. Essas funções são controladas basicamente pela região do vérmis, que promove a contração adequada dos músculos axiais e proximais dos membros, de modo a manter o equilíbrio e a postura normal mesmo em condições de deslocamento corporal. As informações provenientes do cerebelo são transmitidas aos neurônios motores pelos tratos vestibulo-espinhal e retículo-espinhal (36). Ao realizar o teste de Catwalk observamos que os animais do grupo Mn demonstraram uma diminuição do comprimento e largura da impressão das patas apoiadas na plataforma, com consequente diminuição da área apoiada, redução do comprimento da passada e da base de suporte das patas posteriores. Com isso podemos associar alterações na marcha e no equilíbrio à exposição ao Mn.

Os animais do grupo Mn + NAC demonstraram um restabelecimento do tamanho do comprimento e largura das patas, chegando a valores semelhantes ao do controle. Nesse grupo houve uma tendência à recuperação na área das patas e base de suporte, esta, porém, não foi significativa. Antioxidantes como a NAC impedem a produção excessiva de ROS mitocondrial observada em estudos com exposição elevada ao Mn (122). A NAC é eficaz na proteção contra os efeitos tóxicos do Mn em cérebro de rato e astrócitos (26, e 123).

No teste realizado com o cresil violeta (marcador de neurônios) não foi demonstrada perda neuronal em grande escala no tratamento com Mn, porém observou-se efeitos sutis na camada de células de Purkinje. Estes neurônios possuem compartimento somático (incluindo o segmento inicial), sendo responsáveis por gerar o potencial de ação. O tratamento com a NAC foi capaz de amenizar o efeito de desarranjo na camada de células de Purkinje. Assim, podemos sugerir que esse desarranjo pode, em parte, ocorrer devido ao estresse oxidativo. Existem evidências do estresse oxidativo em várias doenças neurodegenerativas, mas nem sempre é claro se o estresse oxidativo é a causa de morte neuronal ou o resultado dos processos degenerativos (44).

A identificação da célula de Purkinje como um fator importante em doenças motora e não-motoras, abriu novos caminhos para a compreensão de distúrbios cerebrais complexos. Sendo um tipo de célula com função aparentemente única e especializada, as células de Purkinje possuem algumas das capacidades computacionais básicas do cerebelo, que têm sido relacionadas ao comportamento do sistema motor, como a capacidade de discriminar os padrões e utilizá-los para aprender a fazer previsões dependentes do contexto (124).

O teste com o anticorpo NeuN (marcador de núcleo neuronal) apresentou mudanças entre os grupos estudados. No grupo Mn, observamos uma perda neuronal na região cerebelar, sugerindo que a exposição ao Mn causa morte celular. No grupo Mn + NAC houve uma melhora significativa, em que o antioxidante demonstrou realizar uma proteção na região do vérmis cerebelar. Estudos em ratos exposto a Mn demonstraram déficits motores e morte celular, parcialmente dependente de estresse oxidativo (30). Com os resultados obtidos podemos sugerir que as alterações na marcha e no equilíbrio podem ser, em parte, em função da morte de células neuronais no cerebelo.

A reatividade astrocítica é o nome dado para todas as formas de respostas dos astrócitos associados à lesão ou doença. A reatividade astrocítica consiste em mudanças na expressão gênica que estão associadas a diferentes graus de hipertrofia do corpo celular. Essas mudanças ocorrem sem perda substancial de domínio celular individual e sem proliferação dos astrócitos (125-126). Há ainda um aumento da expressão de proteínas

estruturais, tais como proteína ácida fibrilar glial (GFAP), sendo esse aumento proporcional ao grau de reatividade (126).

A reatividade astrocítica está geralmente associada ao trauma leve não-penetrante e não-contundente, com ativação imune inata difusa (infecções virais, infecções bacterianas do sistema) e com áreas que estão a alguma distância de lesões focais do sistema nervoso central. No entanto, a hipertrofia de astrócitos reativos não é uma resposta uniforme estereotipada. O grau de hipertrofia celular é heterogêneo e altamente variável entre os astrócitos reativos e é mais ou menos proporcional à gravidade dos insultos e a proximidade do astrócito do insulto (126).

Os experimentos de imunofluorescência com o anticorpo GFAP mostraram aumento do sinal na camada granular após a exposição ao Mn, sugerindo aumento da reatividade dos astrócitos. O tratamento com NAC não foi capaz de bloquear totalmente este efeito, mas demonstrou uma melhora significativa, sugerindo não ser somente o estresse oxidativo a causa dessa reatividade. O teste de western blotting confirmou os achados imunofluorescência.

O aumento da concentração de Mn está associado com as alterações na quantidade e no metabolismo de neurotransmissores, como o glutamato, que causa distúrbios psicológicos e motores (31-32).

A excitotoxicidade do glutamato tem sido relacionada ao desenvolvimento de diversas doenças neurológicas. A remoção do glutamato do espaço extracelular é realizada principalmente pela captação dos transportadores de glutamato presentes na membrana das células. Destes, a absorção por astrócitos é quantitativamente mais importante para a manutenção de concentrações normais de glutamato extracelular. A captação pelos astrócitos também pode ser um instrumento para moldar a cinética da atividade sináptica glutamatérgica. A captação do glutamato pode ser regulada tanto por alterações na expressão quanto por alterações na atividade de transportador (127).

A relação metabólica entre astrócitos e neurônios é crítica para o metabolismo de energia, bem como para a síntese do neurotransmissor (128). Os neurônios são

extremamente sensíveis à excitotoxicidade (129). A excitotoxicidade causa danos na mielina, contudo os axônios parecem mais resistentes (130). A excitotoxicidade contribui para a disfunção da barreira hemato-encefálica através de danos nos receptores endotelial da célula (131). Estresse oxidativo e excitotoxicidade causam degeneração neuronal em muitas doenças neurodegenerativas (132).

Transportadores de glutamato são rapidamente sintetizados e uma piscina citosólica destas proteínas fica disponível para a inserção na membrana plasmática como proteínas funcionais em resposta a alterações nos níveis de glutamato extracelular (11). O consequente aumento na concentração glutamato extracelular é potencialmente excitotóxico aos neurônios, representando uma causa próxima de neurotoxicidade por manganês (7). Para evitar danos oxidativos devido ao catabolismo de oxigênio, durante a evolução das espécies as defesas antioxidantes naturais foram integradas proporcionando a atividade neuroprotetora experimental e clínica (enzimática ou não enzimática) (132).

Nos resultados encontrados demonstramos que na região do vérmis cerebelar não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados no transportador GLAST.

Já em relação ao transportador GLT-1a observou-se que houve um aumento da concentração no grupo Mn, sendo que no grupo Mn + NAC o valor se aproximou novamente ao grupo controle. Assim, podemos sugerir que em animais expostos ao Mn ocorre um aumento da concentração de glutamato extracelular, sendo o nível normal de transportadores insuficiente para normalizar os níveis do glutamato e com isso há um aumento na expressão do transportador.

Ambos os subtipos de transportador dos astrócitos, GLT-1 e GLAST, contêm resíduos de cisteína funcionais que são sensíveis à formação de pontes de cisteína oxidativa e provocam inibição do fluxo de glutamato através dos transportadores (133). Estas observações fornecem conexões entre ativação dos transportadores e excitotoxicidade por glutamato.

O NAC atua como um precursor de síntese de glutathione (GSH) (104), que é um antioxidante natural. O aumento da concentração de antioxidante intracelular estabelece uma proteção contra o estresse oxidativo, reduzindo, assim, a produção de radicais livres. Com isso podemos sugerir que o NAC está protegendo os astrócitos da região do vérmis cerebelar da excitotoxicidade causada pelo glutamato.

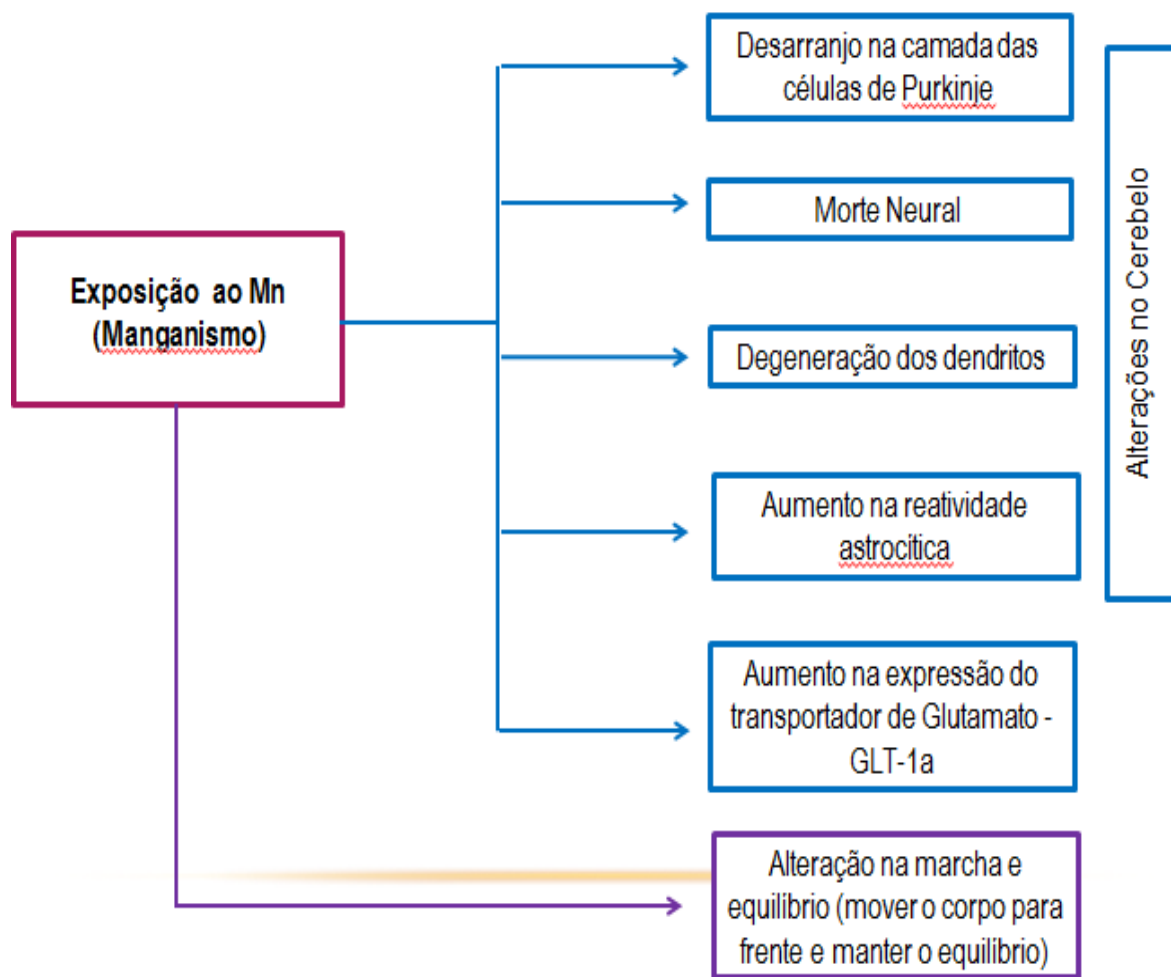


Figura 6. Esquema das causas da exposição aguda ao manganês.

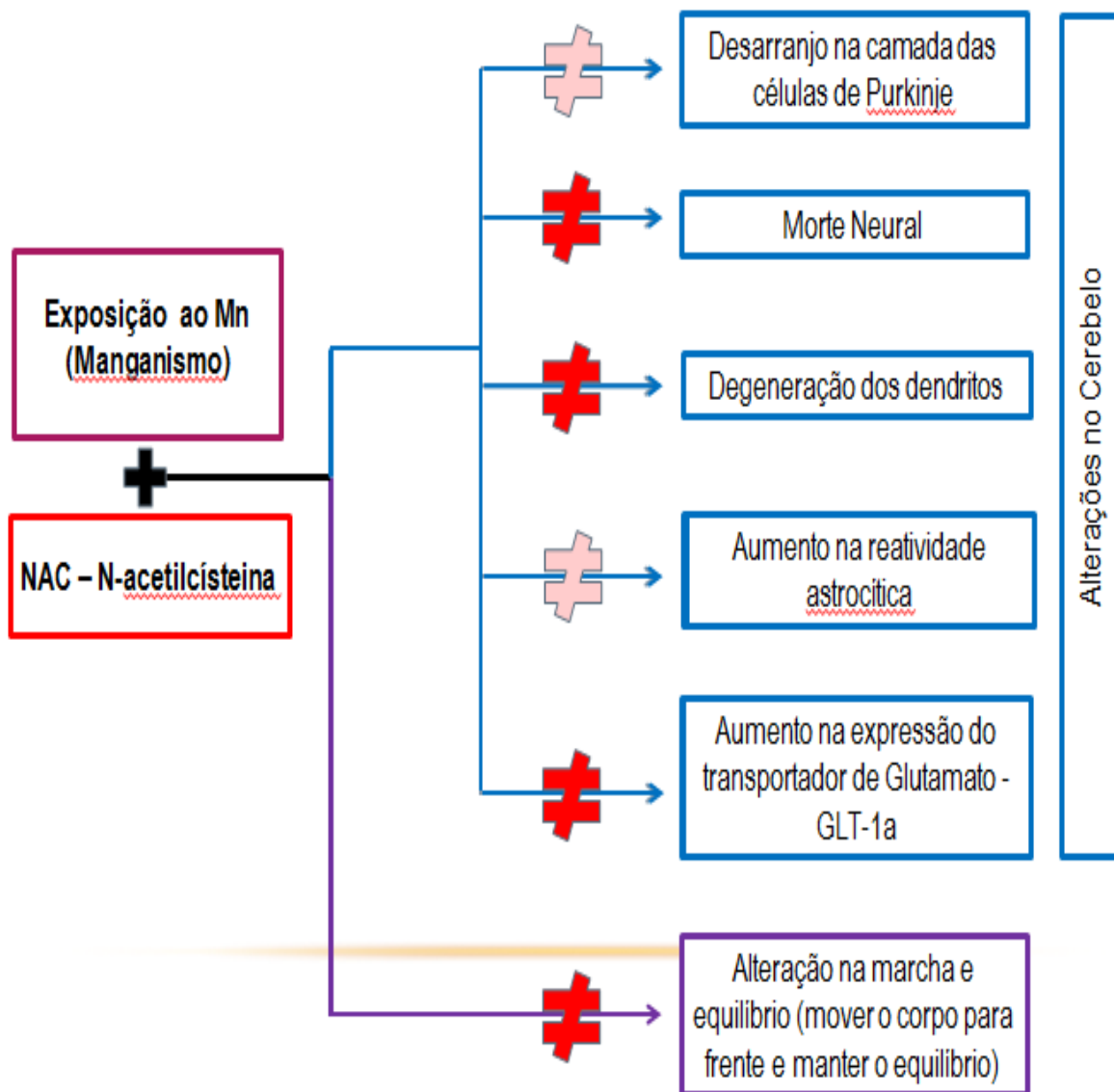


Figura 6. Esquema das causas da exposição aguda ao manganês + N-acetilcisteína.

6.CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos podemos concluir que a neurotoxicidade por Mn causa alteração no equilíbrio e marcha dos animais, promovendo a diminuição da área da impressão da pata (comprimento e largura), do comprimento da passada e da base de suporte.

Nossos resultados indicam que as alterações no tecido cerebelar, como o desarranjo na camada das células de Purkinje, o aumento da reatividade astrocítica na camada granular, a morte neuronal e o aumento do transportador de glutamato GLT-1a, podem estar relacionadas com as disfunções motoras observadas através da técnica de Catwalk.

O co-tratamento com o antioxidante NAC foi capaz de impedir parcialmente esses danos, exercendo uma ação protetora na área do cerebelo e na função motora.

7.REFERÊNCIAS

1. Corathers LA. Manganese. 2006 Minerals Yearbook. US. Geological Survey Minerals. 2006;1:47.1-47.16
2. Quaresma LF. Desenvolvimento de estudos para elaboração do plano decenal (2010 - 2030) de geologia, mineração e transformação mineral. Ministério de Minas e Energia. 2009.
3. Aschner M, Aschner J. Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-barrier transport. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1991;15:333-340.
4. ASTDR ((Agency of Toxic Substances and Disease Registry)). Toxicological Profile for Manganese. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service. 2000.
5. Finley JW, Davis CD. Manganese deficiency and toxicity: are high or low dietary amounts of manganese cause for concern? *BioFactors* 1999;10:15-24.
6. Aschner JL, Aschner M. Nutritional Aspects of manganese homeostasis. *Mol. Aspects Med.* 2005;36:353-362.
7. Erikson KM, Aschner M. Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. 2003;43:475-480.
8. NAS. Panel on Micronutrients Available at: www.nap.edu/books/0309072794/html/ 2001.
9. Ljung K, Vahter M. Time to re-evaluate the guideline value for manganese in drinking water? *Environ. Health Perspect.* 2007;115:1533-1538.
10. Krachler M, Prohaska T, Koellensperger G, Rossipal E, Stingeder G. Concentrations of selected trace elements in human milk and in infant formulas determined by magnetic sector field inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Biol. Trace Elem. Res.* 2000;76:97-112.
11. Davis KE, Straff DJ, Weinstein EA, Bannerman PG, Correale DM, Rothstein JD, Robinson MB. Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of

the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in c6 glioma. *J. Neurosci.* 1998;18:2475-2485.

12. Hardy G. Manganese in parenteral nutrition: who, when, and why should we supplement? *Gastroenterology.* 2009;137:529-535.

13. Zinghel K, Dovensky W, Crossman A, Allen A. Ephedrone: 2-methylamino-1-phenylpropan-1-one. *J. Forensic. Sci.* 1991;36:915-920.

14. Malecki EA, Devenyi AG, Barron TF, Mosher TJ, Eslinger P, Flaherty-Craig CV, Rossaro L. Iron and manganese homeostasis in chronic liver disease: relationship to pallidal T1-weighted magnetic resonance signal hyperrintensity. *Neurotoxicology.* 1999;20:647-652.

15. Herynek V, Babis M, Trucecka P, Filip K, Vymazal J, Dezortova M, Hajek M. Chronic liver disease: relaxometry in the brain after liver transplantation. *Magma.* 2001;12:10-15.

16. Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Muriel P, Rios C. Striatal manganese accumulation induces changes in dopamine metabolism in the cirrhotic rat. *Brain Res.* 2001; 891:123-129.

17. Rose C, Butterworth RF, Zayed J, Normandin L, Todd K, Michalak A, Spahr L, Huet PM, Pomier-Layrargues G. Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology.* 1999;117:640-644.

18. Reimund JM, Dietemann JL, Warter JM, Baumann R, Duclos B. Factors associated to hypermanganesemia in patients receiving home parenteral nutrition. *Clin. Nutr.* 2000;19:343-348.

19. Ikeda S, Yamaguchi Y, Sera Y, Ohshiro H, Uchino S, Yamashita Y, Ogawa M. Manganese deposition in the globus pallidus in patients with biliary atresia. *Transplantation* 2000;69:2339-2343.

20. Hazell AS, Norenberg MD. Manganese decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem. Res.* 1997;23:869-873.

21. Zhou BG, Noremborg MD. Ammonia downregulates GLAST mRNA glutamate transporter in rat astrocyte cultures. *Neurosci. Lett.* 1999;276:145-148.
22. Davis C, Wolf T, Greger J. Varying levels of manganese and iron affect absorption and gut endogenous losses of manganese by rats. *J. Nutr.* 1992;122:1300-1308.
23. Chua ACG, Morgan EH. Effects of iron deficiency and iron overload on manganese uptake and deposition on the brain and other organs of the rat. *Biol. Trace. Met. Res.* 1996;55:39-54.
24. Kwik-Urbe CL, Golub MS, Keen CL. Chronic marginal iron intakes during early development in mice alter brain iron concentrations and behavior despite postnatal iron supplementation. *J. Nutr.* 2000;130:2040-2048.
25. Aschner M, Guilarte TR, Schneider, Zheng W. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol. Appl Pharmacol.* 2007;221:131-147.
26. Hazell AS, Normandin L, Norenberg MD, Kennedy G, Yi JH. Alzheimer type II astrocytic changes following sub-acute exposure to manganese and its prevention by antioxidant treatment. *Neurosci. Lett.* 2006;396:167-171.
27. Aschner M, Gannon M, Kimelberg HK. Manganese uptake and efflux in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* 1992;58(2):730-735.
28. Hunter D. *The diseases of Occupations.* Ed The English Universities Press. London. 1974
29. Jankovic J. Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease. *Neurology.* 2005;64:2021-8.
30. Cordova FM, Aguiar AS Jr, Peres TV et. al. In vivo manganese exposure modulates erk, akt and darpp-32 in the striatum of developing rats and impairs their motor function. *PLoS ONE.* 2012;7(3):e33057.

31. Calne DB, Chu NS, Huang CC, Lu CS, Olanow W. Manganism and idiopathic parkinsonism similarities and differences. *Neurology*. 1994;44:1583-1586.
32. Pal PK, Samii A, Calne DB. Manganese neurotoxicity: a review of clinical feature, imaging and pathology. *Neurotoxicology*. 1999;20:227-238.
33. Cordova FM, Aguiar AS Jr, Peres TV et. Al. Manganese-exposed developing rats display motor deficits and strial oxidative stress that are reversed by Trolox. *Arch Toxicol*. 2013;87:1231-1244.
34. Zwingmann C, Leibfritz D, Hazell AS. Brain energy metabolism in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity: an ex vivo nuclear magnetic resonance study using [1-¹³C] glucose. *Neurotoxicology*. 2004;25:573–87.
35. Zwingmann C, Leibfritz D, Hazell AS. NMR spectroscopic analysis of regional brain energy metabolism in manganese neurotoxicity. *Glia*. 2007;55:1610–7.
36. D’Angelo, E. Neuronal circuits of the cerebellum: hypothesis for function. *J. Integr. Neurosci.* 2011;10:317-352.
37. Doyon J, Song AW, Karni A, Lalonde F, Adams MM, Ungerleider LG. Experience dependent changes in cerebellar contributions to motor sequence learning. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:1017–22.
38. Chang Y, Jin SU, Kim Y, Shin KM, Lee HJ, Kim SH, Ahn JH, Park SJ, Jeong KS, Weon YC, Lee H. Decreased brain in manganese-exposed welders. *Neurotoxicology*. 2013;37:182-189.
39. Hennemam E. O cerebelo. In: MOUNTCASTLE, Vernon B. *Fisiologia médica*. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982.
40. Ramnani N. The primate cortico-cerebellar system: Anatomy and function. *Nat Ver Neurosci*. 2006;7:511–22.

41. Esberard CA. Mecanismos neurais da postura e do movimento. In: AIRES, Margarida de Mello. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1991.
42. Kuemerle B, Gulden F, Cherosky N, Williams E, Herrup K. The mouse Engrailed genes: a windows into autism. *Behav. Brain Res.* 2007;176:121-132.
43. Palkovits M, Magyar P, Szentagothai J. Quantative histological analysis of the cerebellar cortex in the cat. IV Mossy fiber-Purkinje cell numerical transfer. *Brain Res.* 1972;45:15-29.
44. Andersen BB, Korbo L, Pakkenberg B. A quantitative study of the human cerebellum with unbiased stereological techniques. *J. Comp. Neurol.* 1992; 326:549-560.
45. Marr D. A theory of cerebellar cortex. *J. Physiol.* 1969;202:437-470.
46. Albus. A theory of cerebelar function. *Math. Biosci.* 1971;10:25-61 doi:20.2026/0025-5564(71)90051-4
47. Brunel N, Hakim V, Isope P, Nadal JP, Babour B. Optimal information storage and the distribution of synaptic weights: perceptron versus Purkinje cell. *Neuron.* 2004;43:745-757.
48. White JJ, Sillitoe RV. Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Wiley Intersdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2013;2:149-164.
49. Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhratsky A, Reichenbanch A, Ketternmann H. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glia cells. *Nat. Neurosci.* 1999;2:139-143.
50. Chen X, Tang TS, Tu H, Nelson O, Pook M, Hammer R et. al. Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J. Neurosci.* 2008;28:12713-12724.

51. Liu K, Tang TS, Tu H, Nelson O, Herndon E, Huynt DP, et. al. Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 2. *J. Neurosci.* 2009;29:9148-9162.
52. Barnes JA, Ebner BA, Duvick LA, Gao W, Chen G, Orr HT, et. al. Abnormalities in the climbing fiber-Purkinje cell circuit contribute to neuronal dysfunction om ATXN1[82Q] mice. *J. Neurosci.* 2011;31:12778-12789.
53. Hourez R, Sevais L, Orduz D, Gall D, Millard I, de Kerchove D'Exaerde A, et. al. Aminopyridines correct early dysfunction and delay neurodegeneration in a mouse modelo f spinocerebellar ataxia type 1. *J. Neurosci.* 2011;31:11795-11807.
54. Shakkottai VG, do Carmo Costa M, Dell'Orco JM, Sankaranarayanan A, Wulff H, Paulson HL. Early changes in cerebelar physiology accompany motor dysfunction in the polyglutamine disease spinocerebellar ataxia type 3. *J. Neurosci.* 2011;31:13002-13014.
55. Kasumu AW, Liang X, Egorova P, Vorontsova D, Bezprazvanny I. Chronic suppression of inositol 1 4, 5-triphosphate receptor-mediated calcium signaling in cerebellar purkinje cells alleviates pathological phenotype in spinocerebellar ataxia 2 mice. *J. Neurosci.* 2012;32:12786-12796.
56. Hansen ST, Meera P, Otis TS, Pulst SM. Changes in Purkinje cell firing and gene expression precede behavioral pathology in a mouse model of SCA2. *Hum. Mol. Genet.* 2013;22:271-283.
57. LeDoux MS. Animal models of dystonia: lessons from a mutant rat. *Neurobiol. Dis.* 2011;42:457-467.
58. Walter JT, Alvina K, Womack MD, Chevez C, Khdakhah K. Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia. *Nat. Neurosci.* 2006;9:389-397.
59. Meldrum B. Amino acids as dietary excitotoxins: a contribution to understanding neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 1993;18:293-314.

60. Bliss TV, Callingham GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;6407:31-39.
61. Kostandy BB. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol. Sci.* 2012;33:223-237.
62. Frandsen A, Schousboe A. Excitatory amino acid-mediated cytotoxicity and calcium homeostasis in cultured neurons. *Neurochem.* 1993;60:1202-1211.
63. Deitmer JW, Bröer A, Bröer S. Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways. *J. Neurochem.* 2003;87:27-35.
64. Hertz L. Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present, and future. *Neurochem. Int.* 2004;45:285-196.
65. Lucas DR, Newhouse. The toxic effect of sodium l-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch. Ophthalmol.* 1957;58:193-201.
66. Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* 1988;451:205-212.
67. Meldrum B, Evans M, Griffiths T, Simon R. Ischaemic brain damage: the role of excitatory activity and of calcium entry. *Br. J. Anaesth.* 1985;57:44-46.
68. Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*. 1992;360:467-471.
69. Pines G, Danbolt N, Bioras M, Zhang Y, Bedahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg EE, Kanner BI. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. 1992;360:464-467.

70. Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992;89:10955-10959.
71. Fairman WA, Vanderberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SH. An excitatory amino-acid transporter with properties of ligand-gated chloride channel. *Nature.* 1995;372:599-603.
72. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997;94:4155-4160.
73. Chaudhry FA, Lehre KP, Van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J. Glutamate transporter in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocyto-chemistry. *Neuron.* 1995;15:711-720.
74. Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Differential expression of two glial glutamate transporter in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 1995;15:1835-1853.
75. Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat central nervous system development *J. Neurosci.* 1997;17:8363-8375.
76. Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem. Int.* 2009;51:333-355.
77. Erikson KM, Dorman DC, Lash LH. Manganese inhalation by rhesus monkey is associated with brain regional changes in biomarkers of neurotoxicity. *Toxicol. Sci.* 2007;97:459-466.
78. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knockout of glutamate transporters reveals

a major role for astroglia transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. 1996;16:675-686.

79. Gegelashvili G, Danbolt NC, Schousboe A. Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *J. Neurochem*. 1997;69:2612-2615.

80. Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J. Neurosci*. 1997;17:932-940.

81. Schlag BD, Vondrasek JR, Munir M, Kalandadze A, Zeleniaia OA, Rothstein JD, Robinson MB. Regulation of the glia Na⁺-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol. Pharmacol*. 1998;53:355-369.

82. Gegelashvili G, Civenni G, Racagni G, Danbolt NC, Schousboe I, Schousboe A. Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. *Neuroreport*. 1996;8:261-265.

83. Thorlin T, Roginski RS, Choudhury K, Nilsson M, Ronnback L, Hansson E, Eriksson PS. Regulation of the glial glutamate transporter GLT-1 by glutamate and delta-opioid receptor stimulation *FEBS Lett*. 1998;425:435-459.

84. Gegelashvili G, Schousboe A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol. Pharmacol*. 1997;52:6-15.

85. Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. *Eur. J. Neurosci*. 1997;9:1646-1655.

86. Brook-Kayla AR, Munir M, Jin H, Robinson MB. The glutamate transporter, GLT-1, is expressed in cultured hippocampal neurons. *Neurochem. Int*. 1998;33:95-100.

87. Mennerick S, Dhond RP, Benz A, Xu W, Rothstein JD, Danbolt NC, Isenberg KE, Zorumski CF. Neuronal expression of the glutamate transporter GLT-1 in hippocampal microcultures. *J. Neurosci.* 1998;18:4490-4499.
88. Wang GF, Chung HJ, Schnuer J, Lea E, Robinson MB, Potthoff WK, Aizenman E, Rosenberg PA. Dihydrokainate-sensitive neuronal glutamate transport is required for protection of rats cortical neurons in culture against synaptically released glutamate. *Eur. J. Neurosci.* 1998;10:2523-2531.
89. Northington FJ, Traystman RJ, Koehler RC, Martin LJ. GLT-1, glial glutamate transporter, is transiently expressed in neurons and develops astrocyte specificity, only after midgestation in the ovine fetal brain. *J. Neurobiol.* 1999;39:515-526.
90. Plaxes C, Danbolt NC, Récasens M. Transient expression of the glial glutamate transporters GLAST and GLT in hippocampal neurons in primary culture. *J. Neurosci. Res.* 2000;59:587-593.
91. Yamada K, Watanabe M, Shibata T, Nagashima M, Tanaka K, Inoue Y. Glutamate transporter GLT-1 is transiently localized on growing axons of the mouse spinal cord before establishing astrocytic expression. *J. Neurosci.* 1998;18:5706-5713.
92. Martin LJ, Brambrink AM, Lehmann C, Portera-Cailliau C, Koehler R, Rothstein J, Traystman RJ. Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann. Neurol.* 1997;42:335-348.
93. Rauen T, Weissner M, Sullivan R, Lee A, Pow DV. A new GLT-1 splice variant: cloning and immunolocalization of GLT-1c in the mammalian retina and brain. *Neurochem.* 2004;45:1095-1106.
94. Reye P, Sullivan R, Scott H, Pow DV. Distribution of two splice variants of the glutamate transporter GLT-1 in rat brain and pituitary. *Glia.* 2002;38:246-255.

95. Williams SM, Sullivan RK, Scott HL, Finkestein DI, Colditz PB, Lingwood BE, et.al. Glial glutamate transporter expression patterns in brains from multiple mammalian species. *Glia*. 2005;49:520-541.
96. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993;262:689-695.
97. Wang GJ, Randall RD, Thayer SA. Glutamate-induced intracellular acidification of cultured hippocampal neurons demonstrates altered energy metabolism resulting from Ca^{2+} loads. *J. Neurophysiol*. 1994;72:2563-2569.
98. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995;92:7162-7166.
99. Fitsanakis VA, Aschner M. The importance of glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid transport and regulation in manganese, mercury and lead neurotoxicity. *Toxicol Appl. Pharmacol*. 2005;204:343-354.
100. Migheli R, Godani C, Sciola L, Delogu MR, Serra PA, Zangani D, Denatale G, Miele E, Desolem M. Enhancing effect of manganese on L-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: role of oxidative stress. *J. Neurochem*. 1999;73:1155-1163.
101. Andreas K, Ray D. Nervous system. H. Marquadt, G. Siegfried, RO Mclellay (Eds.), *Toxicology*, Academic Press, New York. 1999.
102. Chen CJ, Liao SL, Kuo JS. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *J. Neurochem*. 2000;75:1557-1565.
103. Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol. Ther*. 1991;51:155-194.

104. Dekhuijzen P. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 2004;23:629-636.
105. Cooper AJ, Kristal BS. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* 1997;378:793-802.
106. Seaton TA, Cooper JM, Schapira AH. Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. *Brain Res.* 1997;777:110-118.
107. Yang L, Tan P, Zhou X, Zhu X, Cui Y, Zhu L, Feng X, Qi H, Zheng J, Gu P, Fan X, Chen H. N-acetylcysteine protects against hypoxia mimetic-induced autophagy by targeting the HIF-1 α pathway in retinal ganglion cells. *Cell Mol. Neurobiol.* 2012;32:1275-1285.
108. Reed DJ, Fariss MW. Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol. Rev.* 1984;36:255-335.
109. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Buttler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Rad. Biol. Med.* 1989;6:593-597.
110. Donnelly PJ, Walker RM, Racz WJ. Inhibition of mitochondrial respiration *in vivo* is an early event in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Arch. Toxicol.* 1994;68:110-118.
111. Miquel J, Ferrandiz ML, De Juan E, Sevilla I, Martinez M. N-acetylcysteine protects against age-related decline of oxidative phosphorylation in liver mitochondria. *Eur. J. Pharmacol.* 1995;292:333-335.
112. Martinez M. N-acetylcysteine elicited increase in complex I activity in synaptic mitochondria from aged mice: implications for treatment of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2000;859: 173-175.
113. Ferrari G, Yan CY, Greene LA. N-acetylcysteine (D-and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J. Neurosci.* 1995;15:2857-66.

114. Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, Singh A. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J. Neurosci. Res.* 2004;76:519-527.
115. Park SW, Kim SH, Park KH, Kim SD, Kim JY, Baek SY, Chung BS, Kang CD. Preventive effect of antioxidants MPTP-induced mouse of Parkinson's disease.
116. Xiong Y, Peterson PL, Lee C.P. Effect of *N*-acetylcysteine on mitochondrial function following traumatic brain injury in rats, *J. Neurotrauma.* 1999;16:1067–1082.
117. Hazell AS, Rama Rao KV, Danbolt NC, Pow DV, Butterworth RF. Selective down-regulation of the astrocyte glutamate transporters GLT-1 and GLAST within the medial thalamus in experimental Wernicke's encephalopathy, *J. Neurochem.* 2001;78:560–568.
118. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, San Diego, 1998.
119. Milatovic D, Yin Z, Gupta RC, Sydoryk M, Albrecht J, Aschner JL, Aschner M. Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes. *Toxicol. Sci.* 2007;98:198-205.
120. Milatovic D, Zaja-Milatovic S, Gupta RC, Yu Y, Aschner M. Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009;240:219-225.
121. Chtourou Y, Fetoni H, Garoui EM, Boudawara T, Zeghal N. Improvement of cerebellum redox states and cholinergic functions contribute to the beneficial effects of silymarin against manganese-induced neurotoxicity. *Neurochem. Res;* 2012;37:469-479. 2012
122. Zhang S, Fu J. Zhou Z. In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species and respiratory chain complexes activities of mitochondrial isolated from rat brain. *Toxicol. In Vitro.* 2004;18:71-77.

123. Avila DS, Colle D, Gubert P, Palma AS, Puntel G, Manarin F, Noremborg S, Nascimento PC, Aschner M, Rocha JB, Soares FA. A possible neuroprotective action of a vinyltelluride against Mn-induced neurotoxicity. *Toxicol. Sci.* 2010;115:194-201.
124. Bastian AJ. Moving sensing and learning with cerebellar damage. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2011;21:596-601.
125. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 2009;32:638-647.
126. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119:7-35.
127. Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia.* 2000;32:1-14.
128. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* 2006;98(3):641-653.
129. Follett PL, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter. *J. Neurosci.* 2000;20:9235-9241.
130. Li S, Stys PK. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *J. Neurosci.* 2000;20:1190-1198.
131. Sharp CD, Hines I, Houghton J, Warren A, Jackson TH, Jawahar A, et.al. Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activations of NMDA receptor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003;285:H2592-2598.
132. Gonsette RE. Oxidative stress and excitotoxicity: a therapeutic issue in multiple sclerosis? *Mult. Scler.* 2008;14:22-34.

133. Trotti D, Danbolt NC, Volterra A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? Trends Pharmacol Sci. 1998;19:328-334.