

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Sabrina Antunes Ferreira

**EFEITOS DO MANGANÊS SOBRE RESPOSTAS  
NEUROCOMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS EM PEIXE-ZEBRA  
(*DANIO RERIO*)**

SANTA MARIA, RS, BRASIL  
2022

Sabrina Antunes Ferreira

**EFEITOS DO MANGANÊS SOBRE RESPOSTAS  
NEUROCOMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS EM PEIXE-ZEBRA  
(*DANIO RERIO*)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Nilda B. de Vargas Barbosa  
Coorientador: Matheus Mülling dos Santos

Santa Maria, RS, Brasil  
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Ferreira, Sabrina  
EFEITOS DO MANGANÊS SOBRE RESPOSTAS  
NEUROCOMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS EM PEIXE-ZEBRA (Danio  
Rerio) / Sabrina Ferreira.- 2022.  
60 p.; 30 cm

Orientadora: Nilda Berenice de Vargas Barbosa  
Coorientador: Matheus Mülling dos Santos  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2022

1. manganês 2. ansiedade 3. neurotoxicidade 4. peixe  
zebra I. Berenice de Vargas Barbosa, Nilda II. Mülling  
dos Santos, Matheus III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, SABRINA FERREIRA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Sabrina Antunes Ferreira

**EFEITOS DO MANGANÊS SOBRE RESPOSTAS NEUROCOMPORTAMENTAIS E  
BIOQUÍMICAS EM PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Aprovada em 25 de março de 2022:



---

**Nilda Berenice de Vargas Barbosa, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)



---

**Daiana Silva de Ávila, Dra. (UNIPAMPA)**  
(Videoconferência)



---

**Jeferson Luis Franco, Dr. (UNIPAMPA)**  
(Videoconferência)

Santa Maria, RS, Brasil  
2022

A minha mãe, que me deu vida, amor, cuidado, enxugou minhas lágrimas, corrigiu meus erros, me levantou de meus tombos, e principalmente, acreditou nos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Dra. Nilda Barbosa**, minha orientadora. Profe Nilda, obrigada pelo acolhimento desde o primeiro dia que cheguei ao laboratório, pela confiança, por me dar liberdade para trabalhar e apoio nos meus projetos. Por permitir que eu me desenvolva como profissional e pessoa dentro desse espaço que me acolheu: o Lab Nilda!

Ao **Dr. Matheus Mülling dos Santos**, meu co-orientador. Matheuzito, te agradeço por todo carinho, dedicação, pela paciência comigo, por acreditar e confiar a mim. Por estar comigo nas vitórias, nas horas difíceis e por apoiar meu trabalho com amizade sempre. Nada disso seria possível sem a nossa parceria!

Ao Zebrafish Team. **Matheus, Gabriel, Mariana e Talise**. Obrigada pelas conversas, pelas palavras de apoio, pelo acolhimento e pela convivência. Obrigada por dividirem os seus conhecimentos e seus tempos. A gente junto é muito massa!

Ao **Guilherme**, mais do que colega de laboratório, meu amigo. Que fez eu me sentir em casa desde o momento que cheguei no laboratório. Obrigada por todo o carinho, pela compreensão, pelo incentivo. Nossas conversas tornam tudo mais leve e simples de viver (mesmo nos momentos de caos).

Aos demais colegas de laboratório, que são também grandes amigos. **Pâmela, Alessandro, João**. Obrigada pela convivência e carinho.

A **Julia**. Meu bem, os últimos tempos não foram os mais fáceis, mas tu continuaste aqui, do meu lado, me dando carinho e muito amor. Obrigada por estar comigo o tempo todo apoiando e acreditando. Tu me inspiras a ser melhor todos os dias. Agradeço cada dia por compartilhar a vida contigo.

Um agradecimento especial a **Marícia**, não só pela amizade, mas por me ensinar a dar os primeiros passos nessa vida científica. Obrigada pela paciência comigo. Sem os teus ensinamentos eu nem estaria aqui. Não vou ter palavras pra expressar a gratidão que eu sinto.

Agradeço também a professora **Andrea Goldschmidt**. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos. Por todo o incentivo, pela compreensão, por me ensinar que eu não tenho que ter medo de fracassar e sim medo de nunca tentar. Os dias no Lab de Ensino me fizeram melhor como profissional, mas principalmente como pessoa.

Aos meus amigos de sempre (e pra sempre): **Mariana Lucas, Maira, Ramiro e Lara**. Estiveram comigo o tempo todo apoiando e acreditando. Mari, obrigada pela parceria inigualável, por estar presente nos momentos que mais precisei, obrigada pela amizade até de longe. Maira, você faz da amizade uma concretização e da convivência uma diversão. Tua amizade me fez perceber que a vida pode mais leve e simples de viver. Ramiro, meu irmão, minha dupla. Sou grata por saber que contigo eu posso contar sempre. Lara, obrigada pelo carinho e por ter esse amor imenso por mim mesmo nos meus momentos mais dramáticos. Por sempre dizer que o futuro pode trazer coisas maravilhosas. Agradeço por saber que vocês estão sempre na torcida.

Aos meus pais **Juarez** e **Marta**, que se empenham além da conta para que eu realize meus sonhos. Por acreditarem na educação e na ciência. Obrigada pela torcida, pelo carinho e por terem esse amor imenso por mim. Obrigada por todo apoio emocional e financeiro. Obrigada por acreditarem e se orgulharem de mim. Obrigada por não me deixarem nunca desistir. Vocês são o porto seguro na vida. Vamos juntos sempre até o final.

A **UFSM**, universidade pública e de qualidade, agradeço pelos recursos disponíveis e de toda estrutura, que permite que essa e outras pesquisas básicas se concretizem.

A **CAPES**. Pelo financiamento, fundamental para o desenvolvimento da pesquisa que possibilitou a realização deste trabalho.

## RESUMO

### EFEITOS DO MANGANÊS SOBRE RESPOSTAS NEUROCOMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS EM PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*)

AUTORA: Sabrina Antunes Ferreira

ORIENTADORA: Nilda B. de Vargas Barbosa

COORIENTADOR: Matheus Mülling dos Santos

O manganês é considerado um importante poluente ambiental, bem como um suposto fator de risco para distúrbios neurodegenerativos. Sendo o 12º elemento mais abundante e compondo aproximadamente 0,1% da crosta terrestre, o Mn é onipresente no meio ambiente. Como elemento essencial, é crucial para a função de uma variedade de enzimas. Como tal, o Mn está envolvido no metabolismo de aminoácidos, lipídios, proteínas e carboidratos. Considerando o duplo papel do Mn, é de extrema importância a realização de estudos toxicológicos que investiguem os limites entre a janela funcional e toxicológica de exposição ao elemento nos sistemas biológicos. Pouco se sabe sobre os efeitos que esse contaminante pode causar quando em concentrações e ocorrências ambientalmente relevantes. Assim, utilizando o peixe-zebra, este estudo teve como objetivo verificar as alterações comportamentais e os déficits locomotores, associados a perturbações psiquiátricas, nomeadamente fenótipos de ansiedade, gerados pela exposição ao Mn. Os peixes foram expostos a  $MnCl_2$  a 0.5, 2.0, 7.5 e 15.0 mg/L por 96 h. A fim de encontrar biomarcadores após a exposição ao Mn, medimos a atividade da enzima AChE e os níveis de cortisol dos peixes. Além disso, o conteúdo de Mn no tecido cerebral foi quantificado. Por testes comportamentais, descobrimos que a exposição ao Mn, juntamente com déficits locomotores, induziu fenótipos semelhantes à ansiedade em peixes-zebra. As maiores concentrações causaram perda de viabilidade celular, maior acúmulo de Mn e aumento da atividade da AChE no cérebro, e um aumento no conteúdo de cortisol no corpo inteiro. Nossas descobertas demonstraram que o peixe-zebra é bastante sensível aos níveis de Mn encontrados no ambiente. Em resumo, mostramos que a exposição ao Mn além da alteração dos padrões comportamentais também pode causar alterações psiquiátricas, nomeadamente a ansiedade.

**Palavras-chave:** ansiedade; neurotoxicidade; cloreto de manganês (II); padrões comportamentais.



## ABSTRACT

### EFFECTS OF MANGANESE ON NEUROBEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL RESPONSES IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

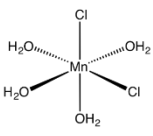
AUTHOR: Sabrina Antunes Ferreira  
ADVISOR: Nilda B. de Vargas Barbosa  
CO-ADVISOR: Matheus Mülling dos Santos

Manganese (Mn) is considered an important environmental pollutant, as well as a putative risk factor for neurodegenerative disorders. As the 12<sup>o</sup> most abundant element and comprising approximately 0,1% of the earth surface, Mn is omnipresent in the environment. As an essential element, it is crucial for the function of a variety of enzymes. As such, Mn is involved in aminoacids, lipids, proteins and carbohydrates metabolism. Considering Mn dual role, it is extremely important to carry out toxicological studies that investigate the limits between the functional and toxicological window of exposure to the element in biological systems. Little is known about the effects that this contaminant can cause when in environmentally relevant concentrations and occurrences. Therefore, using zebrafish, this study aimed to verify behavioral changes and locomotor deficits associated with psychiatric disorders, namely anxiety phenotypes, generated by exposure to Mn. Zebrafish were exposed to MnCl<sub>2</sub> in 0.5, 2.0, 7.5 e 15.0 mg/L by 96 h. In order to find biomarkers after Mn exposure, we measured the activity of AChE enzyme and the cortisol levels. Furthermore, the brain tissue Mn content was quantified. Through behavioral tests, we discovered that Mn exposure, along with locomotor deficits, induced anxiety-like phenotypes in zebrafish. High concentrations caused cell viability loss, higher Mn accumulation, higher AChE activity in the brain tissue, and higher levels of cortisol content in whole-body samples. Our findings show that zebrafish are quite sensitive to Mn levels found in the environment. In summary, we demonstrate that Mn exposure can lead not only to behavioral alterations, but also to psychiatric alterations, namely anxiety.

**Keywords:** anxiety; neurotoxicity; manganese (II) chloride; behavioral patterns.

# RESUMO GRÁFICO

## A EXPOSIÇÃO



Cloreto de Manganês (II)


0 mg/L

0.5 mg/L

2.0 mg/L

7.5 mg/L

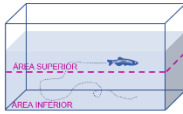
15.0 mg/L



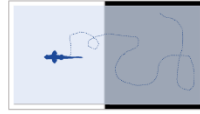
96 horas

**B TESTES COMPORTAMENTAIS**

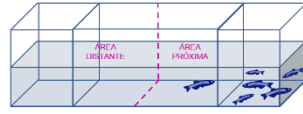
**Novo tanque**



**Claro/Escuro**




**Preferência Social**



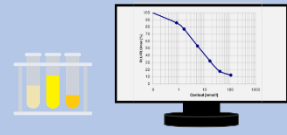
## C ANÁLISES BIOQUÍMICAS

**Quantificação de manganês**

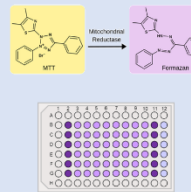


Espectroscopia de absorção atômica

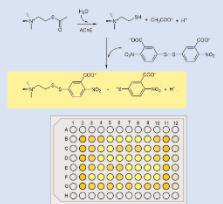
**Extração e análise de cortisol**



**Teste MTT**



**Determinação da atividade da AChE**



Leitor de microplacas

## D RESULTADOS

### EXPOSIÇÃO AO MANGANÊS:

- Altera as atividades locomotoras e exploratórias
- Induzir padrões de comportamento semelhantes à ansiedade
- Eleva os níveis de cortisol em corpo total
- Aumenta os níveis de Mn no cérebro
- Provoca diminuição da viabilidade das células cerebrais
- Interrompe a atividade da AChE no cérebro sem alterar a AChE muscular

## LISTA DE SIGLAS

<b>AA</b>	Aminoácidos
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>AD</b>	Doença de Alzheimer
<b>APLP1</b>	Proteína 1 precursora de amiloide
<b>A<math>\beta</math>:</b>	Beta amilóide
<b>BHE</b>	Barreira hemato-encefálica
<b>Ca</b>	Cálcio
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina
<b>DH</b>	Doença de Huntington
<b>DMT1</b>	Transportador de metal divalente 1
<b>DP</b>	Doença de Parkinson
<b>DRI</b>	Ingestão diária de referência
<b>ELA</b>	Esclerose lateral amiotrófica
<b>ER</b>	Retículo endoplasmático
<b>ERO</b>	Espécies reativas
<b>Fe</b>	Ferro
<b>Fpn</b>	Ferroportina
<b>MMT</b>	Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl
<b>Mn</b>	Manganês
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de manganês (II)
<b>MNs</b>	Neurônios motores
<b>MnSOD</b>	Superóxido dismutase dependente de manganês

<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>RM</b>	Ressonância magnética
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TfR</b>	Receptor de transferrina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1	Manganês: Propriedades Físicas e aplicabilidade .....	14
1.2	Metal essencial e funções fisiológicas .....	15
1.3	Mn: Exposição, Absorção e Aspectos Toxicológicos.....	16
1.4	Papel do manganês nas doenças do Sistema Nervoso Central .....	20
1.5	Mn e sistema colinérgico .....	22
1.6	Peixe-zebra como modelo alternativo.....	23
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>4</b>	<b>MANUSCRITO .....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Manganês: Propriedades Físicas e aplicabilidade

Sendo o 12º elemento mais abundante e compondo aproximadamente 0,1% da crosta terrestre, o manganês (Mn) é onipresente no meio ambiente (MARTINEZ-FINLEY et al., 2012). Como metal de transição, o Mn existe em mais de cinco estados de valência, com a maioria como  $Mn^{2+}$  ou  $Mn^{3+}$  e não ocorre naturalmente como um metal livre, mas sim em mais de 100 minerais, como óxidos, carbonatos e silicatos, sais (sulfato e gluconato) e quelatos (aspartato, fumarato, succinato) (FARINA et al., 2013). Foi considerado pela primeira vez como elemento químico em meados do século XVIII pelo químico sueco Carl Scheele, e já no século XIX começou a ser utilizado em ligas metálicas (RANCKE-MADSEN, 1975).

Extraído em mais de 30 países, as principais reservas de manganês estão em países essencialmente situados no mundo ocidental, como a Austrália (160 milhões/t), Gabão (160 milhões/t) e África do Sul (4,0 bilhões/t), que fornecem algo em torno de 90% do mercado internacional. As principais reservas brasileiras estão localizadas nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Bahia e Pará, sendo todas as empresas pertencentes ao grupo VALE. A extração é realizada por métodos a céu aberto e subterrâneo, e posteriormente é fundido para fazer ligas de aço (IMnI, 2009; SUN et al., 2020). A indústria siderúrgica é principal consumidora de manganês, em virtude da liga de manganês ser utilizada na fabricação de praticamente todos os tipos de aço e fundidos de ferro devido a sua propriedade de dessulfurização (retirada do enxofre) (AFONSO, 2019; TORRES et al., 2018).

O Mn inorgânico possui inúmeras aplicações, entre elas a produção de ferro e aço, fabricação de baterias, vidros, fósforos e fogos de artifício, produção de permanganato de potássio, agente oxidante para revestimento de eletrodos em barras de solda, entre outros (ASCHNER; ASCHNER, 2005). O manganês pode ser identificado no cérebro sem necessitar de procedimentos invasivos, através de imagens por ressonância magnética (RM) devido suas propriedades ferro- magnéticas. Pelo fato de melhorar as imagens em RM (dado que apresenta vários eletros desparelhados), desenvolveu-se um agente de contraste contendo manganês complexado com a dipiridoxil (derivado da vitamina B6), chamado Teslascan® (INOUE; MAJID; PAUTLER, 2011). Os compostos orgânicos de Mn fazem parte da composição de fungicidas (Maneb® e Mancozeb®), muito utilizados em plantações de frutas, vegetais, grãos

e conservação de árvores ornamentais (SANTAMARIA et al., 2007). Além disso, o manganês também tem sido utilizado na fabricação de outros compostos, como o antidetonante MMT (Tricarbonil metilciclopentadienil manganês), desenvolvido em 1974 nos EUA para substituir o chumbo tetraetila adicionado aos combustíveis (ZAYED; HONG; L'ESPÉRANCE, 1999).

## 1.2 Metal essencial e funções fisiológicas

O Mn ocorre em pequenas quantidades em todos os tecidos do corpo, pois é essencial para muitas reações enzimáticas, incluindo a síntese de aminoácidos (AA), lipídios, proteínas e carboidratos. Também desempenha um papel nutricional fundamental no crescimento ósseo, metabolismo de gorduras e carboidratos, regulação do açúcar no sangue e absorção de cálcio (BOWMAN et al., 2011).

Atua também na gliconeogênese como ativador da piruvato carboxilase e no Ciclo de Krebs como cofator da isocitrato desidrogenase. De particular importância, no sistema nervoso central (SNC), o Mn atua como cofator de enzimas, como a arginase (formação da ureia), piruvato carboxilase, superóxido dismutase (MnSOD, desempenha ações antioxidantes e está presente na matriz mitocondrial, formada normalmente na respiração celular e anormalmente em casos de inflamações agudas ou crônicas), glutamina sintetase (metabolismo da amônia no cérebro), presente principalmente nos astrócitos; e outras envolvidas na síntese e metabolismo de neurotransmissores (ERIKSON et al., 2004; GERBER; LÉONARD; HANTSON, 2002; PERES et al., 2016).

Estando presente em grãos integrais, leguminosas, oleaginosas, chás, vegetais de folhas verdes, a principal via de exposição ao Mn em humanos é através da ingestão alimentar. A abundância de alimentos enriquecidos com Mn na dieta diária típica torna relativamente fácil acumular a ingestão diária de referência (DRI) de 2,3 mg/dia para homens e 1,8 mg/dia para mulheres (ASCHNER; ASCHNER, 2005). Minimizando assim o risco de defeitos congênitos relacionados à deficiência de Mn, dermatite, fertilidade prejudicada, osteoporose e maior suscetibilidade a convulsões. Em geral, para observação de sintomas clínicos, deficiências muito graves no suprimento dietético de Mn são necessárias (AVILA; PUNTEL; ASCHNER, 2013; HARISCHANDRA et al., 2019).

### 1.3 Mn: Exposição, Absorção e Aspectos Toxicológicos

Apesar de seus benefícios nutricionais, o papel do Mn como nutriente essencial e tóxico é tênue. Embora seja necessário para várias atividades fisiológicas como citado anteriormente, o Mn pode acumular-se no corpo humano, tornando-se um perigo potencial para a saúde e resultando em toxicidade grave. A contaminação por Mn pode ocorrer através de uma exposição ocupacional ou ambiental. Basicamente, a origem de ambos os modos de contaminação provém das mesmas fontes. As concentrações de manganês que ocorrem naturalmente no ar são baixas, contudo, as atividades humanas são fontes significativas de emissão de vários metais para o ambiente. Os casos de intoxicação mais comumente encontrados são encontrados entre os trabalhadores das indústrias como, mineração e fabricação de ligas metálicas, aço e bateria, soldagem, e trabalhadores agrícolas, expostos a fungicidas organiquímicos (PERES et al., 2016; SANTAMARIA et al., 2007). A disponibilidade do metal no meio ambiente, água ou alimentos contendo altos teores de Mn representa uma fonte de contaminação para a população em geral.

O risco de exposição ao Mn, pode ocorrer também pelo aumento da liberação desse metal na atmosfera devido ao uso do aditivo antidetonante na gasolina, o MMT, que compõe cerca de 24,4% de manganês em sua composição total (ASCHNER; ERIKSON, 2017). Desde seu desenvolvido em 1974, suscitou preocupação pela saúde das populações, principalmente em centros urbanos expostas aos vapores de automóveis (ZAYED; HONG; L'ESPÉRANCE, 1999). Além dos escapamentos do motor, o uso de MMT pode aumentar os níveis ambientais de Mn em outros meios, como solo, sedimentos e água, considerando a alta densidade de MMT ou propriedades lipofílicas. Além disso, o MMT pode sofrer decomposição fotoquímica rapidamente na água e no solo (HOWE; MALCOLM; DOBSON, 2004), levantando questões sobre o tempo real de sua degradação em ambientes naturais (FASANO, 2017).

O Mn pode ser absorvido através da ingestão, inalação e permeação dérmica e também administrado em injeção intravenosa. O abuso de drogas tornou-se também uma preocupação para a intoxicação por Mn, uma vez que usuários de drogas fazem uso de uma mistura contendo efedrona (metacatinona) e manganês (PERES et al., 2016; TUSCHL; MILLS; CLAYTON, 2013). Após vários meses de injeções contínuas, a maioria dos usuários desenvolve uma síndrome extrapiramidal irreversível descrita por hipocinesia acentuada, disartria, distonia e instabilidade postural com quedas precoces. Esta síndrome se assemelha ao manganismo - uma condição neurológica causada pela exposição ambiental excessiva ao manganês (Mn) (PERES et al., 2016). Apesar dos sintomas evidentes de dano extrapiramidal, a síndrome, como o



manganismo, não responde ao tratamento antiparkinsoniano usual e continua sendo uma causa vitalícia de incapacidade para a grande maioria da população influenciada (ASSER et al., 2019).

Casos de intoxicação podem ocorrer também pela via alimentar e pela ingestão de água (FINKELSTEIN; JERRETT, 2007). Por exemplo, metais como o Mn pode estar presentes nos recursos hídricos por meio de ações antropogênicas, como emissões agrícolas e industriais, causando preocupação por não serem removidos dos ecossistemas aquáticos por autopurificação e se acumularem em partículas e sedimentos em suspensão (DE JONGE et al. 2012). Assim, o Mn acumula-se nas plantas e em outros organismos, causando um acúmulo dentro da cadeia trófica aquática. Quando há uma alta concentração desse metal no ambiente, os organismos vivos não conseguem regular a concentração interna de Mn, levando à intoxicação (HARANGI et al., 2017).

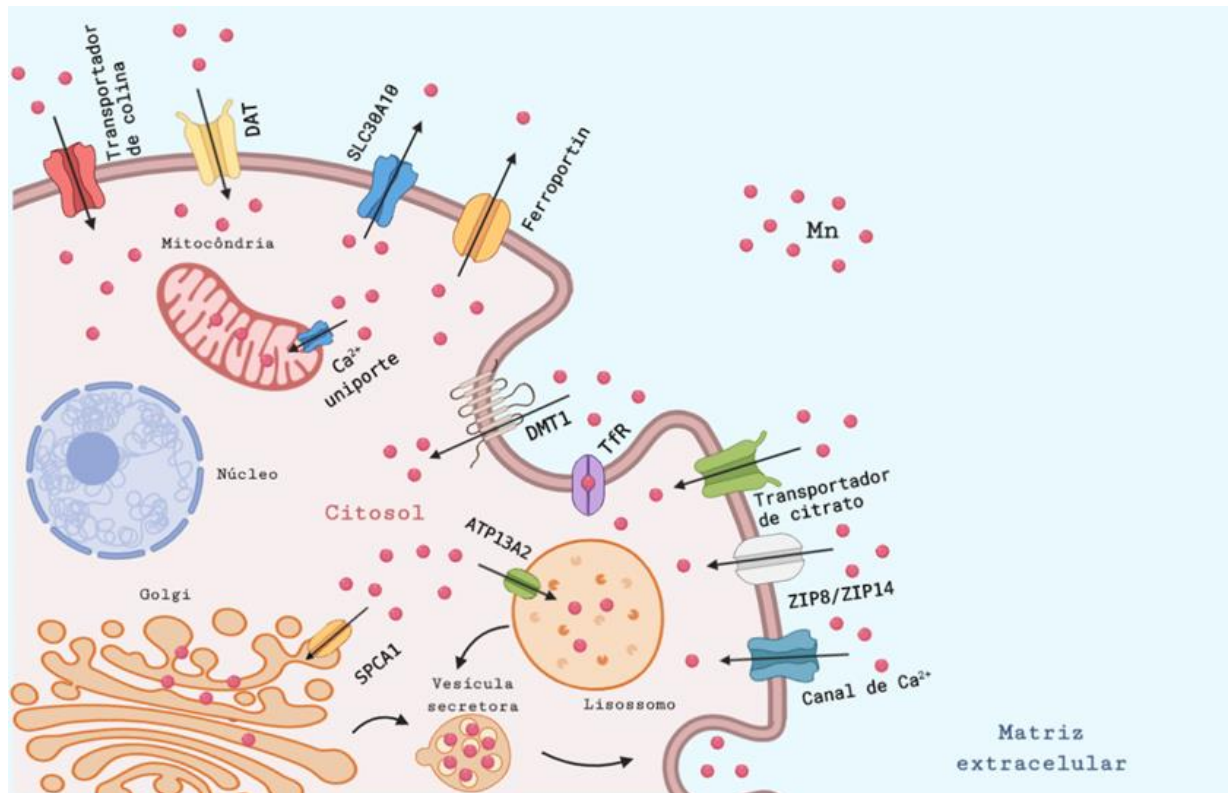
Nos últimos 53 anos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) listou o manganês (Mn) como uma ameaça à água potável. Uma diretriz emitida pela OMS, destaca que a concentração de Mn em água potável baseada em saúde mais protetora seria de no máximo 400 µg/L (OMS 2004). No entanto, exemplos de água potável ou potenciais fontes de água potável com concentrações de Mn > 400 µg/L podem ser encontrados em todo o mundo (FRISBIE; MITCHELL; SARKAR, 2015). No Brasil, inclusive, as concentrações de Mn comumente encontradas em diferentes cursos d'água podem variar de 0,05 a 0,5 mg/L a 19,3 mg/L (RODRIGUES et al., 2020).

A alimentação parenteral também representa uma importante forma de exposição ao Mn, principalmente em recém-nascidos. Na indústria de alimentos infantis, o Mn é comumente adicionado à nutrição parenteral total em concentrações significativas como nutriente essencial, e também em fórmulas infantis à base de soja (ASCHNER; ASCHNER, 2005; KRACHLER; ROSSIPAL, 2000). Pesquisas demonstram que o tecido nervoso de neonatos ou em fase de desenvolvimento é mais suscetível à toxicidade do Mn. Além disso, a absorção intestinal do metal é maior na primeira semana de vida, decaindo constantemente com a idade. Tais fatores contribuem para um risco maior de neurotoxicidade para recém-nascidos quando expostos ao excesso do metal (MOLINA et al., 2011). Um equilíbrio adequado dos níveis de Mn é essencial para a manutenção da saúde e para evitar a neurotoxicidade. Como o Mn é necessário para múltiplos eventos celulares, mas torna-se tóxico em níveis elevados, a concentração de Mn intracelular deve estar sob estrito controle.

Vários mecanismos regulam a homeostase do Mn no SNC, que depende principalmente de diferentes transportadores de Mn. Dadas as propriedades físicas semelhantes de Fe e Mn, a maioria dos transportadores é capaz de transportar ambos os metais, que competem pela ligação na membrana plasmática. Até o momento, nenhuma proteína é identificada como transportador específico de Mn (PERES et al., 2016). O Mn pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) através de diversos carreadores e em diferentes estados de oxidação. Nas células, o nível intracelular de Mn é fortemente regulado pelos transportadores na superfície celular e pelos transportadores intracelulares localizados na membrana das organelas (Fig 1). Além do influxo, o efluxo é um processo fundamental, pois desempenha um papel crucial na regulação dos níveis celulares desse e outros metais essenciais já citados. Defeitos genéticos nos transportadores de efluxo podem levar a distúrbios metabólicos graves. Estudos recentes identificaram quatro proteínas que facilitam a exportação de Mn, que são: ferroportina (Fpn), SLC30A10 (soluto portador da família 30 membro 10), via secretória  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 1 (SPCA1) e ATPase 13A2 (ATP13A2 ou PARK9) (BALACHANDRAN et al., 2020; PERES et al., 2016).

No corpo humano, o Mn é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, acumulando-se no fígado e posteriormente excretado na bile, antes de adentrar a corrente sanguínea. Nos pulmões, o Mn presente em partículas pode ser absorvido pela circulação pulmonar e depois distribuído aos tecidos através da circulação sanguínea. Os órgãos que apresentam maiores níveis Mn no corpo humano são fígado, pâncreas, ossos, rins e cérebro. Entre esses, o cérebro é o que apresenta menores níveis de Mn, no entanto, é o principal alvo da toxicidade (BOWMAN et al., 2011).

Os mecanismos propostos de neurotoxicidade do Mn variam desde alterações funcionais na neurotransmissão, até danos nas organelas celulares e estresse oxidativo causado pelo acúmulo de Mn. O efeito do Mn no cérebro também é influenciado pela via de exposição e magnitude do acúmulo. A inalação de Mn está geralmente associada ao estresse oxidativo e aumento da apoptose neuronal, enquanto a ingestão de Mn tem um efeito mais sutil, alterando a neuroquímica e a cognição. Essas diferenças são provavelmente devido ao Mn inalado ter uma entrega mais direta e concentrada ao cérebro *versus* o Mn ingerido que passa pelo intestino e muito desse Mn é armazenado no fígado e a entrega ao cérebro é muito menor do que o Mn inalado (ERIKSON; ASCHNER, 2019).



**Fig. 1.** Na superfície celular o transportador de metal divalente 1 (DMT1), o receptor de transferrina (TfR), os canais de cálcio (Ca), transportadores de zinco ZIP8 e ZIP14, transportadores de citrato, transportador de colina e o transportador de dopamina (DAT) facilitam o fluxo de Mn no citosol, enquanto o Mn pode ser transportado diretamente nas células por TfR. Além disso, quando o Mn citosólico atinge um limiar, o SPCA1 na membrana de Golgi, e o ATP13A2 na membrana do lisossomo, respectivamente, facilitam o efluxo de Mn para matriz extracelular por vesículas secretoras. SLC30A10, ferroportina são outros dois transportadores que demonstraram atividade do efluxo de Mn em sistemas experimentais.

Os mecanismos propostos para explicar a neurotoxicidade do Mn variam de alterações funcionais na neurotransmissão, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. O Mn intracelular é acumulado na matriz mitocondrial, provavelmente usando os transportadores de cálcio uma vez que o Mn aumenta a taxa de captação de cálcio na mitocôndrias cerebrais e inibe seu efluxo (GAVIN; GUNTER; GUNTER, 1999; GUNTER, 2017; LICCIONE; MAINES, 1988). Além da produção de energia, uma das principais funções fisiológicas das mitocôndrias é sequestrar o cálcio celular, uma função compartilhada com o retículo endoplasmático (ER). Da mesma forma, Mn provoca instabilidade no ER (CHUN; LEE; SON, 2001; YOON et al., 2018) Alterações na homeostase do Ca desencadeiam eventos que culminam com aumento na geração de espécies reativas (ERO) e morte celular. Nas mitocôndrias, o Mn também afeta a estabilidade de enzimas dependentes de ferro (Ciclo de Krebs e na cadeia de transporte de elétrons), e consequentemente a síntese de ATP, podendo levar a uma deficiência severa de energia (BJØRKLUND et al., 2020; KAUR et al., 2017). Em resumo, os mecanismos de neurotoxicidade do Mn levam a alterações na homeostase do ferro, excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, e alteração nas condições homeostáticas de outros metais

bivalentes que compartilham sistemas de transportadores (BOWMAN et al., 2011; CHEN et al., 2019; ERIKSON et al., 2004; FARINA et al., 2013; MALECKI, 2001).

#### 1.4 Papel do manganês nas doenças do Sistema Nervoso Central

Vários estudos mostraram que a exposição a pesticidas e fungicidas, material particulado e metais pesados aumentam o risco de desenvolver diferentes doenças neurodegenerativas (MARTINS et al., 2020). Estudos epidemiológicos demonstraram associação entre metais tóxicos não essenciais e doenças neurodegenerativas. No entanto, a exposição a altos níveis de elementos essenciais, como o manganês (Mn), também pode ser tóxico para os seres humanos e desencadear doenças neurodegenerativas (BALACHANDRAN et al., 2020). A exposição excessiva ao Mn em ambientes ocupacionais ou de fontes ambientais tem sido associada a uma síndrome neurológica que compreende déficits cognitivos, anormalidades neuropsicológicas e parkinsonismo.

O processo neurodegenerativo induzido pelo acúmulo de Mn é chamado de manganismo. O manganismo é uma síndrome semelhante à doença de Parkinson, caracterizada por problemas psiquiátricos, cognitivos e comprometimento motor. O alvo primário da toxicidade do manganês é o sistema nervoso, e os sintomas comuns associados a quantidades excessivas incluem ataxia, demência e ansiedade (MARTINS et al., 2020).

O Mn pode oxidar as catecolaminas, incluindo a dopamina (DA), alterando a homeostase de neurônios dopaminérgicos. A perturbação nos níveis de DA no estriado provavelmente explica a síndrome bifásica experimentada por pacientes com manganismo (CALNE et al., 1994). Uma fase inicial de produção aumentada de DA está associada a episódios psicóticos comumente observados em pacientes psiquiátricos. À medida que a intoxicação por Mn progride, os níveis de catecolaminas diminuem, provavelmente devido à perda de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais e, conseqüentemente, surgem os sintomas do tipo parkinsoniano. Assim, nos estágios iniciais do manganismo, após a cessação da exposição ao Mn, os sintomas podem ser revertidos, enquanto em pacientes com distúrbios motores, o manganismo é irreversível (AVILA; PUNTEL; ASCHNER, 2013; BOWMAN et al., 2011). Historicamente, os estudos sobre os efeitos do Mn em humanos e animais experimentais têm se preocupado com os efeitos nos gânglios basais e no sistema dopaminérgico no que se refere

a anormalidades do movimento (GUILARTE, 2013). No entanto, as alterações induzidas pelo Mn nos padrões comportamentais, nomeadamente incoordenação motora ou disfunção emocional e cognitiva, observadas tanto em doentes como em modelos animais, estão também associadas à perturbação do metabolismo dos neurotransmissores.

A sinalização prejudicada do neurotransmissor pode ocorrer por meio de diversos mecanismos, como inibição da liberação do neurotransmissor, alterações na depuração do neurotransmissor da fenda sináptica ou modulação dos níveis ou atividade do receptor (PERES et al., 2016). Apesar do principal sistema neurotransmissor estudado na neurotoxicidade do Mn seja o sistema dopaminérgico (DAérgico) (GUILARTE et al., 2008) vários estudos também descreveram os efeitos do Mn nos sistemas GABAérgico (FORDAHL; ERIKSON, 2014) e glutamatérgico (SIDORYK-WEGRZYNOWICZ; ASCHNER, 2013). O Mn em níveis neurotóxicos também afeta o sistema colinérgico. A acetilcolina (ACh) é um importante neurotransmissor excitatório tanto no sistema nervoso central quanto periférico, modulando funções cognitivas essenciais, como aprendizado, memória e locomoção (PERES et al., 2016).

Em humanos, estudos demonstram que a exposição ao manganês também aumenta a ansiedade e comportamentos semelhantes à depressão. Segundo Bowler et al. (2007) a ansiedade é um dos sintomas neuropsicológicos em trabalhadores expostos ao Mn. As análises de alterações de humor indicaram que os níveis de depressão clínica e ansiedade estavam acima da média normativa, indicando altos níveis de perturbação. No estudo realizado por Racette e colaboradores (2021), eles procuraram quantificar a associação entre exposição ambiental ao Mn e ansiedade e depressão em um grande estudo de base populacional. Eles observaram uma associação entre o humor e a exposição residencial ao Mn em concentrações de várias ordens de magnitude inferiores às relatadas em estudos ocupacionais anteriores, porém, encontram associações semelhantes. Suas descobertas sugerem que as exposições ambientais ao Mn podem ter implicações além de afetar as vias do sistema motor (RACETTE et al., 2021).

De fato, a ansiedade/depressão é descrita como uma das manifestações psiquiátricas iniciais na intoxicação por manganês. Os trabalhadores expostos ao Mn apresentam uma relação dose-efeito entre o nível de exposição e os sintomas neuropsiquiátricos, incluindo depressão (CHEN et al., 2019). Além disso, Hong et al. (2014) apontam que a exposição ao manganês pode ser parcialmente responsável pelo aumento da prevalência de transtornos de humor e ansiedade, bem como de conduta antissocial e transtornos de personalidade, relatados na população com Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH).

Embora historicamente o foco da neurotoxicidade de Mn tenha sido associado ao manganismo como resultado dos altos níveis de exposição que ocorreram na mineração e processamento de minério de Mn e em outros ambientes ocupacionais, a última década trouxe evidências experimentais convincentes de que em níveis cumulativos mais baixos doses de Mn que podem ocorrer a partir de exposições ocupacionais e ambientais, outros efeitos neurológicos não motores parecem ser mais prevalentes e estes parecem estar associados a déficits de função cognitiva.

### 1.5 Mn e sistema colinérgico

A disfunção colinérgica induzida por Mn é compatível com esses déficits cognitivos, bem como com as anormalidades neuropsicológicas observadas posteriormente no curso clínico do manganismo (FINKELSTEIN; MILATOVIC; ASCHNER, 2007). De fato, algumas características salientes do manganismo, como a intensidade dos distúrbios do humor e o momento inicial do declínio intelectual (BOWLER et al., 2007) não podem ser explicadas apenas pela interrupção dos sistemas dopaminérgicos cerebrais. O quadro clínico complexo e a história natural do manganismo podem ser consistentes com os efeitos do manganês em sistemas neuroquímicos adicionais, principalmente nos sistemas colinérgicos do SNC, que são cruciais na modulação da resposta emocional, locomoção e funções cognitivas (FINKELSTEIN; MILATOVIC; ASCHNER, 2007). Embora vários sintomas de DP e manganismo estejam amplamente relacionados aos efeitos no sistema DAérgico, estudos sugerem que o sistema colinérgico pode desempenhar um papel importante nessas doenças.

O sistema colinérgico engloba o neurotransmissor Acetilcolina (ACh), enzima que sintetiza a ACh denominada Colina Acetiltransferase (ChaT), as enzimas que hidrolisam a ACh denominadas colinesterases (acetilcolinesterase - AChE e butirilcolinesterase - BChE;), pelos receptores colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos) e pelo sistema que recaptura a colina (PERES et al., 2016). Evidências experimentais e clínicas demonstram que a atividade colinérgica desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da neurotoxicidade induzida pelo manganês. O manganês atua como um estressor químico nos neurônios colinérgicos de uma maneira específica da região, causando a quebra dos mecanismos homeostáticos celulares (FINKELSTEIN; MILATOVIC; ASCHNER, 2007; PERES et al., 2016).

AChE, por exemplo, é uma importante enzima reguladora que rapidamente hidrolisa a ACh nas sinapses colinérgicas do cérebro, bem como na junção neuromuscular. A AChE possui características únicas não encontradas em nenhuma outra enzima, como sua organização do

sítio ativo e seu mecanismo catalítico (MASSOULIÉ et al., 1993). A AChE é também extremamente importante na regulação da função cerebral. Mudanças na atividade dessa enzima são comumente acompanhadas por sinais claros de alterações neurocomportamentais (FINKELSTEIN; MILATOVIC; ASCHNER, 2007). Vários estudos abordaram a influência do Mn na atividade AChE (PERES et al., 2016). É importante enfatizar que os efeitos do Mn em sistemas biológicos dependem das vias de exposição, dose, idade, período de exposição, fatores ambientais e estado nutricional.

Modelos animais facilitam o uso de diferentes vias de exposição ao Mn, bem como o uso de diferentes formas químicas de Mn, que podem mimetizar a exposição ambiental ou ocupacional.

#### 1.6 Peixe-zebra como modelo alternativo

A neurotoxicidade do Mn é uma área de intensa investigação devido à sua relevância para a saúde humana. Experimentos *in vitro* são essenciais para compreender os mecanismos de ação envolvidos na toxicidade do manganês. No entanto, há uma necessidade de modelos *in vivo* para estudar os efeitos a curto e longo prazo dos impactos desse metal e estabelecer relações entre distúrbios específicos e mecanismos. Roedores (camundongos e ratos), *C. elegans* e peixe-zebra são rotineiramente usados para modelar a neurotoxicidade do Mn em animais. As principais vantagens dessas espécies são a facilidade de uso e as semelhanças nos resultados neurocomportamentais funcionais da toxicidade do Mn com humanos (TAYLOR et al., 2020).

O uso recente do peixe-zebra para o estudo da neurotoxicidade do Mn e distúrbios associados mostrou que ele representa um modelo promissor para dissecar os mecanismos da doença relacionada ao Mn. O peixe-zebra (*Danio rerio*) (Fig. 2), é um pequeno teleósteo (3-4 cm) de água doce utilizado como organismo modelo para a realização de estudos nas diferentes áreas das Ciências Biológicas (BAGGIO et al., 2018; CANZIAN et al., 2017; DE ABREU et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2018; MARINS et al., 2019; RODRIGUES et al., 2020).



**Fig. 2** Peixe-zebra macho (indivíduo inferior) e fêmea (indivíduo superior) (Foto: Erik Leist, 2013).

É um organismo cujo genoma (JEKOSCH, 2004), transcriptoma (MATHAVAN et al., 2005) e proteoma (LUCITT et al., 2008) já foram elucidados, fato que otimiza estudos moleculares. Apresenta fácil manipulação, comportamento facilmente observado em um ambiente controlado e rápido desenvolvimento e ciclo biológico, vantagens importantes do uso do animal em experimentação (FONTANA et al., 2018; MAXIMINO et al., 2010a). A estrutura básica do SNC nos peixes tem todos os principais domínios encontrados em cérebro de mamíferos, e os neurotransmissores, como GABA, glutamato, dopamina, noradrenalina, serotonina, histamina e acetilcolina, são encontrados tanto nos sistemas interneurônios quanto nas longas vias (PANULA et al., 2010). Após o sequenciamento completo do seu genoma, foram descritos genes evolutivamente conservados, que apresentam cerca de 70% de homologia com os de humanos (HOWE et al., 2013). Neste, muitos dos genes envolvidos nas doenças neurodegenerativas humanas foram identificados (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014).

O peixe-zebra tem sido usado com sucesso como modelo de neurotoxicidade do Mn para estudar os efeitos do Mn ambiental em adultos e larvas realizados (ALTENHOFEN et al., 2017; RODRIGUES et al., 2020). Há evidências que níveis altos de Mn induz diversas alterações celulares, que podem interferir nas vias de sinalização (ALTENHOFEN et al., 2017; MARINS et al., 2019), nas funções neuronais nos níveis sensorial e motor (BAKTHAVATSALAM et al.,



2014). Em embriões, achados sugerem que a exposição precoce ao Mn pode causar toxicidade significativa no desenvolvimento, resultando em mortalidade e malformação embrionária. Além disso, a exposição ao Mn induziu estresse no retículo endoplasmático, dano ao DNA e apoptose, fornecendo pistas para a neurotoxicidade do Mn (XU et al., 2022).

Como os sintomas do envenenamento de manganês são lentamente progressivos e existem ao longo de um *continuum*, o modelo animal pode mostrar alterações observadas no início da intoxicação. Como por exemplo, fenótipos do tipo ansiedade, observados em parâmetros comportamentais. Além disso, os parâmetros fisiológicos, como os níveis de hormônio do estresse, também podem ser adições valiosas as observações comportamentais (EGAN et al., 2009). Notavelmente, o peixe-zebra, como os humanos, emprega cortisol (em vez de corticosterona, como fazem os roedores) como um hormônio primário de resposta ao estresse (BARCELLOS et al., 2007), o que os torna um modelo animal útil relevante para a fisiologia do estresse humano. Todas essas vantagens permitem que o peixe-zebra seja um poderoso modelo de peixe de laboratório para investigar a toxicidade de poluentes ambientais.

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar de sua essencialidade, o excesso de Mn pode ser tóxico para os organismos. A ingestão de alimentos e água contendo altos teores de Mn e a exposição ocupacional são as principais fontes de contaminação para as pessoas. A exposição ocupacional ou ambiental ao manganês (Mn) pode levar ao desenvolvimento de manganismo, uma condição neurológica que apresenta certos sintomas motores semelhantes à doença de Parkinson (DP). Assim como a DP, a toxicidade do Mn é observada no sistema nervoso central. Desde o primeiro relato de toxicidade induzida por Mn em 1837, vários estudos experimentais e epidemiológicos foram conduzidos para entender esse distúrbio. Embora historicamente o foco da neurotoxicidade de Mn tenha sido associado ao manganismo, pesquisas recentes demonstram que exposições ocupacionais e ambientais de Mn em baixas doses, são capazes de gerar outros efeitos neurológicos não motores, associados a déficits de função cognitiva e manifestações psiquiátricas. Análises neurocomportamentais são importantes para investigar o impacto da exposição ambientalmente relevantes e também em períodos curtos de tempo. Isso porque, o aparecimento de distúrbios psiquiátricos, especialmente fenótipos semelhantes à ansiedade podem estar relacionados a intoxicação por manganês. Além disso, a avaliação de risco à saúde em áreas poluídas com metais pode ser melhorada com o uso de biomarcadores. Biomarcadores são definidos como a medida da interação entre o sistema biológico e o agente ambiental, podendo ser química, física ou biológica. Portanto, a indução *in vivo* de biomarcadores é uma boa ferramenta ambiental para avaliar a exposição e o efeito adverso de estressores nos organismos, como o manganês. Então, utilizando o peixe-zebra, poderemos verificar se além dos déficits locomotores, o Mn em concentrações ambientalmente relevantes poderia causar distúrbios psiquiátricos, nomeadamente fenótipos de ansiedade. Acreditamos que o Mn induza alterações neurocomportamentais e neurotoxicidade em peixes, eventos marcados pela redução da viabilidade de células cerebrais, desregulação do cortisol e da atividade da acetilcolinesterase (AChE).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Através da avaliação de parâmetros neurocomportamentais e bioquímicos buscar compreender se o manganês em concentrações ambientalmente relevantes poderia causar distúrbios psiquiátricos, nomeadamente fenótipos do tipo ansiedade.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar se a exposição ao Mn altera a atividade locomotora e gera diferentes padrões de comportamento nos animais;
- Quantificar o Mn cerebral por espectrometria de absorção atômica;
- Avaliar a viabilidade do tecido cerebral dos animais expostos ao Mn, através da determinação da atividade de desidrogenases mitocondriais;
- Através da determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE), averiguar se a toxicidade do Mn afeta o sistema colinérgico cerebral e muscular nos animais;
- Determinar se a exposição ao Mn altera o comportamento semelhante à ansiedade e os níveis de cortisol no corpo inteiro no peixe-zebra.

#### 4 MANUSCRITO

Os resultados obtidos no presente estudo estão apresentados sob a forma de artigo científico. Nestas seções constam: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. O artigo científico possui apresentação e estruturação seguindo as normas do periódico ao qual o artigo foi submetido (Environmental Toxicology and Pharmacology).

Environmentally relevant Manganese concentrations evoke anxiety phenotypes in adult zebrafish

Sabrina Antunes Ferreira<sup>a</sup>, Julia Sepel Loreto<sup>a</sup>, Matheus Mülling dos Santos<sup>a</sup>, Nilda Vargas Barbosa<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

\*Corresponding author: Dr<sup>a</sup> Nilda Vargas Barbosa, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. e-mail: nvbarbosa@yahoo.com.br

#### ABSTRACT

Manganese (Mn) is an essential metal for living organisms. However, the excess of Mn can be toxic, especially for the central nervous system. Herein, we used adult zebrafish as model organism to investigate the relationship of an environmentally relevant Mn exposure with the onset of neurobehavioral disturbances and brain biochemical alterations. Fish were exposed to MnCl<sub>2</sub> at 0.5, 2.0, 7.5 and 15.0 mg/L for 96 h, and after submitted to trials for examining exploratory, locomotor and anxiety-related behaviors. The neurobehavioral parameters were followed by the analyses of cell viability, Mn accumulation and acetylcholinesterase activity in the brain, and whole-body cortisol levels. By *Novel tank*, *Light dark* and *Social preference test*, we found that the exposure to Mn, along with locomotor deficits induced anxiety-like phenotypes in zebrafish. Most of these behavioral changes were evoked by the highest concentrations, which also caused cell viability loss, higher accumulation of Mn and increased AChE activity in the brain, and an increase in the whole-body cortisol

content. Our findings demonstrated that zebrafish are quite sensitive to levels of Mn found in the environment, and that the magnitude of the neurotoxic effects may be associated with the levels of manganese accumulated in the brain. Interestingly, we showed that Mn exposure in addition to motor deficits may also cause psychiatric abnormalities, namely anxiety.

**Keywords:** Manganese chloride; *Danio rerio*, anxiety, acetylcholinesterase, cortisol.

## 1. INTRODUCTION

Manganese (Mn) is one of the most abundant elemental metals in the earth's crust, existing as inorganic and organic forms, and also in several chemical and complexed states. The element is used for various industrial purposes, including iron and steel production, manufacture of batteries, glass, ceramics, adhesives, paints, matches, and fireworks (ASCHNER; ASCHNER, 2005). Besides, organic forms can be found in the fuel additive methyl-cyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT), in fungicides (e.g., Maneb and Mancozeb), and in contrast agents for magnetic resonance imaging (SANTAMARIA et al., 2007).

Mn is found in all mammalian tissues where it is required for the normal amino acid, lipid, protein, and carbohydrate metabolism. It is also essential for the antioxidant and immune responses of cells (AVILA; PUNTEL; ASCHNER, 2013; CHEN et al., 2019). Enzymes as arginase, agmatinase, glutamine synthetase, and Mn superoxide dismutase (MnSOD) require Mn as a co-factor (BALACHANDRAN et al., 2020; BOWMAN et al., 2011; ERIKSON; ASCHNER, 2019).

For humans, the adult dietary intake of Mn has been estimated to range from 0.9 to 10 mg Mn/day; being the recommended daily intake  $\pm$  2 mg/day. In potable water, the concentration of Mn may vary from 1 to 100  $\mu$ g/L, but most of levels found are below 10  $\mu$ g/L (Avila et al., 2013; Farina et al., 2013; NAS, 2001) However, examples of drinking water or potential drinking-water supplies with Mn concentrations > 400  $\mu$ g/L can be found worldwide (FRISBIE; MITCHELL; SARKAR, 2015). The levels of Mn considered safety for the aquatic communities vary from 0.1 to 0.5 mg/L; however, higher levels have been found in the aquatic ecosystems due to the large inputs of Mn from human activities (QUEIROZ et al., 2021). Knowledge about the toxic effects of

Mn, particularly with human exposure through drinking water, are essential for better characterization of the toxicity of this environmental pollutant.

Despite its essentiality, the excess of Mn can be toxic to the organisms. Ingestion of foods and water containing high levels of Mn, and occupational exposure are the main sources of contamination for the people (BALACHANDRAN et al., 2020; PERES et al., 2016). Excessive intake and exposure to Mn have already been associated with neurological, reproductive, and respiratory disorders (ASCHNER; ERIKSON; DORMAN, 2005; BOWLER et al., 2007).

In the brain, Mn accumulates mainly in the basal ganglia region, inducing the neurodegenerative illness known as Manganism, a syndrome similar to Parkinson's disease (PD), and characterized by psychiatric and motor impairments. Manganism symptoms include ataxia, dementia, and anxiety (BOWLER et al., 2007; GERBER; LÉONARD; HANTSON, 2002; PERES et al., 2016). Mounting evidence has suggested that Mn is also a risk factor for other neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, Amyotrophic lateral sclerosis, and Huntington's disease (AVILA; PUNTEL; ASCHNER, 2013; BOUABID et al., 2016; SACHSE et al., 2019).

Considering the dual role of Mn, it is extremely important to carry out toxicological studies that investigate the limits between the functional and toxicological window of exposure to the element in the biological systems. In this scenario, the SNC has been the main target of investigations; however, the neurological networks and manifestations triggered by Mn toxicity are not still clear.

Zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as a feasible organism model for translational in neuroscience research. In addition to conserved brain architecture, the fish exhibits a complex behavioral repertoire that mirrors those found in mammals (FONTANA et al., 2018; KALUEFF et al., 2013).

Then, using zebrafish, this study was aimed to verify whether in addition to locomotor deficits, Mn in environmentally relevant concentrations could cause psychiatric disturbances, namely anxiety-phenotypes. In order to find biochemical endpoints following Mn exposure, we measured AChE enzyme activity and cortisol levels of fish. We hypothesized that Mn induces neurobehavioral alterations and neurotoxicity in fish, events marked by cortisol and Ache activity dysregulation.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Animals

Adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*) (4-6 months-old, males and females, approximately 50:50 ratio) were obtained from a local supplier (Hobby Aquarios, RS, Brazil). Fishes were maintained in 40 L aquariums (at a maximum density of 2 fish per liter) for at least 2 weeks before the experiments. The tanks contained non-chlorinated water under constant aeration and filtration at  $25 \pm 2$  °C, pH = 7.0 – 8.0 were maintained on a 14/10 h photoperiod (light/dark cycle). Fish were fed twice daily with commercially available fish flake food (Alcon Basic™, Alcon, Brazil). All conditions were maintained following the recommendations of the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011), and the experimental protocols were approved by the Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (process number: 2649140717/2017).

### 2.2 Mn Exposure

Fish were kept in 2-liter aquariums and randomly divided into 5 experimental groups (n= 10 animals per tank): Control and Mn ( $\text{MnCl}_2$  (manganese (II) chloride;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Sigma, St. Louis, MO, USA) at 0.5, 2.0, 7.5 and 15.0 mg/L. All tanks were filled with deionized water (MB4060, Aqua Plant, Brazil), which was renewed every 24 h. After 96 h exposure, the animals were gently transferred to the behavioral apparatus. Behavioral tests were recorded for 6 min and analyzed using the ANY-Maze™ software (Stoelting Co., USA). After the behavioral analyses, fish were euthanized by hypothermal shock, and brain and muscle were removed by dissection for the *ex vivo* assays. Especially for cortisol measurement, fish were weight and immediately frozen in liquid nitrogen for 10-30 s, followed by storage at  $-20$  °C until cortisol extraction. The choice of Mn concentrations and exposure time used herein were based on previous studies, which used concentrations of manganese close to those considered tolerable as well as concentrations considered excessive for both aquatic organisms and humans through drinking water (FRISBIE; MITCHELL; SARKAR, 2015; TU et al., 2017; YIN et al., 2018; RODRIGUES et al., 2020).

## 2.3 Behavioral tests

### *2.3.1 Novel tank test*

Fish were submitted to the 'new tank' test accordingly to the methodology described by Rosemberg et al. (2011). The test measures locomotor and exploratory parameters of fish into a rectangular apparatus (25cm x 15cm x 6cm) with 1.5 L of water, divided virtually into two parts: bottom and top. The following endpoints were measured: total distance travelled, time spent in the top area, transitions to the top area, episodes of immobility, immobility time and absolute turn angle. The total number of fish (20 per group) represents the sum of two independent experiments (10 fish/ each analysis).

### *2.3.2 Light-dark test*

Fish were individually transferred to the light-dark tank according the protocol described elsewhere (MAXIMINO et al., 2010b). The test consists of placing the animals in a tank (30cm x 10cm x 15 cm) filled with 2.5 L of water (8 cm high), and divided into two equally sized compartments with a white and black self-adhesive plastic covering the floor and walls. The behaviors were recorded for 6-minutes and the respective endpoints were assessed: total time in the lit area, average time in the lit, transitions to the lit area, and the number of risk assessment episodes. The risk assessment episode was defined as a fast ( $\leq 1$  s) or partial entry into the lit area with a subsequent return to the dark compartment. Risk assessment episodes were manually counted by two trained observers (inter-rater reliability  $\geq 0.85$ ) blinded to the experimental condition. The total number of fish (30 per group) represents the sum of three independent experiments (10 fish/ each analysis).

### *2.3.3 Social preference test*

The task followed the methodology performed by Müller et al. (2018) and Nunes et al. (2020). Initially, animals were placed individually on the central aquarium (25cm x 15cm x 6cm), situated between an empty tank and another tank containing five conspecifics (stimulus group). The apparatus was divided into two sections (far and close), where close represented the area closer to the stimulus group. The time remained close to the close section was measured and expressed as a tendency of



group approach. The test was performed for 2 min. The time spent, average time spent and transitions to the close area were recorded and quantified using the ANY-maze™ software (Stoelting, CO, USA). The total number of fish (20 per group) represents the sum of two independent experiments (10 fish/ each analysis).

## 2.4 Biochemical analyses

### *2.4.1 Mn quantification*

For cerebral Mn quantification, a pool of six brains was used for each analysis (n = 3, total of 18 brains per group). The absorbances (peak height) were determined in an atomic absorption spectrometer with a high-resolution continuum source (HR-CS GF-AAS), with platform model ContrAA 600 (Analytik Jena, Germany) equipped with MPE 60 autosampler. Argon 5.0 (99.99%) was used as carrier gas. The technique for metal determination was carried out according to the method described by Strungaru et al. (2018) and Marins et al. (2019) which offers measurements of high-quality by analyzing the interference with other elements. The results were expressed as micrograms per gram of tissue, and represent the read of 3 technical replicates.

### *2.4.2 MTT assay*

The viability of brain cells was determined by MTT assay as described by Zenki et al. (2014), with minor modifications. The assay is based on the enzymatic reduction of MTT (3- (4,5-dimethylthiazol2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) to formazan crystals by viable cell dehydrogenases. Briefly, after euthanasia, the whole brain (n = 8, per group) of the fish was placed in a 2 mL Eppendorf containing 0.5 s% MTT solution (dissolved in 10 mM PBS pH 7.4). After, the eppendorfs were placed in a water bath shaker for 20 minutes at 37 ° C. Then, the MTT solution was removed and 300 µL of DMSO was added to each sample, which were kept in the dark overnight for total solubilization of formazan crystals. The samples had the absorbance measured in a microplate reader at 540 nm. The assay was performed in technical triplicate, and results were expressed as a percentage in relation to the control.

### *2.4.3 AChE activity determination*

AChE activity was determined according to the method of Ellman et al. (1961) with some modifications. Brain and skeletal muscle were removed and homogenized on ice

at 60 vol. (v/m) of Tris HCL 0.05 M, pH 8.0, using a Potter-Elvehjem Tissue Homogenizer. For cerebral determination, a pool of 3 brains was considered as 1 sample. The enzyme activity was determined by the hydrolysis rate of acetylthiocholine iodide (ACSh, 0.88 mM), in a medium containing 100 mM phosphate buffer, pH 7.5 and 2 mM DTNB. In this solution, 5 mg of protein from each sample was added and pre-incubated at 25 ° C for 10 min. The method quantifies the dionium thiolate, compound formed by the hydrolysis of ACSh in the presence of a biological preparation. The absorbance of the samples was measured at 412 nm for 4 min (at 30 s intervals) using a microplate reader. The runs were performed in triplicate, using a total of 45 animals (9 per group). AChE activity was expressed as micromole of thiocholine (SCh) released per hour per milligram of protein.

#### *2.4.4 Cortisol extraction and analysis*

Fish were weighed and immediately frozen in liquid nitrogen for 10–30 s, followed by storage at –20 °C until cortisol extraction. Whole-body cortisol was extracted according to the method described by Oliveira et al., (2013). Each fish was weighed, minced and homogenized in 2 mL phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 6 min using a Potter-Elvehjem tissue homogenizer. Samples were transferred to a test tube, where 5 mL of ethyl ether was added. The tube was vortexed for 1 min and centrifuged for 10 min at 3000 rpm (RFC = 1603xG). The lipid portion containing cortisol and ethyl ether was removed and transferred to a new tube, that was kept overnight for complete evaporation of ethyl ether. The final lipid portion was resuspended in 1 mL of PBS, and the whole-body cortisol levels measured in technical duplicate using a commercially available immunoassay kit (EIAgen™ CORTISOL test, BioChem ImmunoSystems). The cortisol content of the samples was determined using a cortisol standard curve (50, 25, and 12.5 ng/mL). Data were normalized on the weight of the whole-body fish and expressed as ng/g body weight, using a total of 40 animals (8 per group).

#### *2.4.5 Protein determination*

Protein from samples was estimated according to method by Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

## 2.5 Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of the mean (SD) and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using Tukey's post-hoc test. For immobile episodes in novel tank test, the variables were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's. All significances were set at  $p \leq 0.05$ .

## **3. RESULTS**

### 3.1 Behavioral Trials

#### *3.1.1 Manganese alters the locomotor and exploratory activity of zebrafish in the novel tank test*

The results from Figure 1 illustrate the locomotor and exploratory profile of zebrafish exposed to Mn. Fish exposed to Mn for 96 h presented a significant reduction in the total distance traveled ( $F_{4,80} = 22.15$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 1A), absolute turn angle ( $F_{4,80} = 10.89$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 1B), time spent in top area ( $F_{4,80} = 17.16$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 1C) and transitions to top area ( $F_{4,80} = 16.65$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 1D) when compared to the control. These effects were elicited by all concentrations of Mn tested. Besides, there was a tendency of Mn in increasing the episodes of immobility ( $F_{4,80} = 1.920$ ,  $P < 0.1153$ ) (Fig. 1E), and the immobility time of fish as well ( $F_{4,80} = 2.270$ ,  $P < 0.068$ ) (Fig. 1F).

#### *3.1.2 Manganese evokes anxiety-like behavior in zebrafish*

The light-dark test is a complementary task to assess anxiety-like responses, which explores the natural tendency of fish to avoid brightly lit environments. We found that fish exposed from 0.5 to 15 mg/L Mn spent less time spent in lit area ( $F_{4,93} = 7,983$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 2B), and also presented a shorter average time spent in lit area than control ( $F_{4,93} = 6,737$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 2C). The number of crossings to the lit area increased in groups exposed to the highest concentrations of Mn ( $F_{4,93} = 6,506$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 2B). Except at 0.5 mg, Mn also caused a marked increase in the number of risk assessments when compared to the control ( $F_{4,93} = 12,87$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 2D).

Since anxiety induces disruption in different behavior patterns, herein we also analyzed the social behavior of fish exposed to manganese. We found that fish exposed to the highest concentrations of Mn spent less time in the conspecific close area (Fig. 3A and 3B), with a marked decrease in the time spent in the close area ( $F_{4, 81} = 8,329$ ,  $P < 0,0003$ ) and average time ( $F_{4, 81} = 5,554$ ) parameters. No difference among groups was observed about the number of transitions to the conspecific close area (Fig. 3C).

## 3.2 Biochemical parameters

### *3.2.1 Manganese exposure decreases brain cell viability*

Figure 4 shows the cell viability of zebrafish brain analyzed by MTT assay. We found that 15 mg/L Mn reduced significantly the viability of cells from brain ( $F_{4,35} = 7,237$ ,  $P < 0.0002$ ). Different, exposure to 0.5, 2 and 7.5 mg/L Mn did not cause cell viability loss when compared to the control.

### *3.2.2 Manganese disrupts the activity of AChE in brain without altering AChE muscular*

Figure 5 shows the effects of Mn exposure on AChE activity from brain and skeletal muscle of zebrafish. Fish exposed to 7.5 and 15 mg/L Mn had a significant increase in the activity of AChE from brain ( $F_{4, 39} = 3,141$ ,  $P < 0.02$ ) (Fig. 5A). Differently, the activity of muscle enzyme was not affected by any concentration tested of Mn (Fig. 5B).

### *3.2.3 Manganese exposure enhances whole-body cortisol levels in zebrafish*

Figure 6 shows the effects of manganese on whole-body cortisol content after 96 h exposure. Fish exposed to 7.5 and 15 mg/L Mn presented cortisol levels higher than control ( $F_{4, 28} = 5,293$ ,  $P < 0.0026$ ). No difference was found in the whole-body cortisol among control and the groups treated with 0.5 and 2 mg/L Mn.

### *3.2.4 Content of Mn accumulated in zebrafish brain*

The quantification of Mn by HR-CS GF-AAS was performed to assess the bioaccumulation of element in the brain of adult zebrafish (Table 1). The Mn content found in the brain of fish exposed to 0.5 and 2.0 mg/L was ~ 1.5 fold higher than control (not detectable levels). The levels of Mn accumulated in brain of fish from 7.5 and 15.0 mg/L groups were ~ 2.4 and 3.2 fold higher than control, respectively.

#### 4. DISCUSSION

Excessive Mn is well known to be associated mainly with the development of motor and cognitive disorders (HARISCHANDRA et al., 2019; TAYLOR et al., 2020; TUSCHL; MILLS; CLAYTON, 2013). Herein, we performed some neurobehavioral analyses in adult zebrafish to investigate the impact of environmental relevant short exposure to Mn on the appearance of psychiatric disturbances, especially anxiety-like phenotypes, referencing cell viability, AChE activity, cortisol and brain Mn levels as underlying biomarkers for Mn neurotoxicity. Overall, we found that the short exposure to Mn along with locomotor deficits induced anxiety-related behaviors in zebrafish. The anxiety phenotypes were induced mainly by the highest concentrations which increased brain accumulation of Mn, AChE activity and also the body cortisol levels.

As Mn toxicity is marked by expressive motor impairments, we firstly analyzed the locomotor and exploratory behavior of fish treated with Mn for 96 h. For that, fish were evaluated in the novel tank test, whose context is based on the animal's instinct to seek protection in an unfamiliar environment by diving, freezing and reducing exploration. We found that the distance traveled, the number of transitions, the time spent in the top area, and the absolute turn angle were decreased in the groups exposed to Mn. These findings are in agreement with those found by Altenhofen and collaborators, where larvae and adult zebrafish acutely exposed to Mn (0.5 to 1.5 mM) exhibited deficits in locomotor function (Altenhofen et al., 2017). Mechanically, the locomotor deficits were linked to changes in the dopaminergic system since both larvae and adults presented an increase in brain tyrosine hydroxylase and DOPAC levels. In turn, a recent study found that Mn, at concentrations of environmental occurrence (0.5 mg L<sup>-1</sup> to 16.0 mg L<sup>-1</sup>/ for 96 h), did not alter the locomotor parameters evaluated in adult zebrafish, even after chronic exposures (RODRIGUES et al., 2020). As the neurobehavioral disturbances of Mn toxicity are still being modeled in adult zebrafish, we suppose that these different effects may be related to protocol and parameter specificities.

Although Manganism is the main disease induced by accumulation of Mn in the brain, mounting evidence has associated excess of Mn with poorer memory, learning, and psychiatric disorders as well (BLECHARZ-KLIN et al., 2012; NYARKO-DANQUAH et al., 2020; RIVERA-MANCÍA; RÍOS; MONTES, 2011). So, herein we also explored the

relationship of Mn exposure with the onset of abnormal emotion states, especially anxiety phenotypes. For that, fish experienced the light/dark tank, a test that explores their natural preference for the darkroom, called scototaxia. In this task fish with increased anxiety-like behavior usually spend more time in the dark (BLASER; ROSEMBERG, 2012; MAXIMINO et al., 2010b; STEWART et al., 2012). We found that zebrafish exposed to Mn spent less time in the light and also exhibited a greater number of risk episodes. The risk assessment is a behavioral endpoint related to the defensive approach which consists of a careful investigation of potentially aversive environments (KALUEFF et al., 2013). The appearance of these phenotypes indicates increased anxiety-like behavior and defensive approach. Since anxiolytic drugs can decrease social behavior, we also analyzed the influence of Mn on social preference test. The test reflects the natural tendency of fish in establishing shoal, where fish seek for the conspecifics (MILLER; GERLAI, 2007). In this set of experiment, we also found in the groups exposed to high Mn concentrations, behavioral patterns that mirror anxiety episodes, namely a shorter time spent close to the conspecifics. Taken together, the data from light/dark tank and social preference tasks show that the short exposure to Mn evoked both motor abnormalities and anxiety in adult zebrafish. In literature, we found only one study indicating an anxiogenic behavior in adult zebrafish after Mn exposure. In this work, fish chronically exposed to 4.0 mg L<sup>-1</sup> of MnCl<sub>2</sub> (30 days) spent less time in the top zone of the aquarium and traveled a longer distance in the bottom zone of the aquarium compared to the controls (RODRIGUES et al., 2020).

Several studies have reported a positive correlation between whole-body cortisol levels and behavioral alterations in response to neurotoxic agents (CACHAT et al., 2010; MAXIMINO et al., 2010a). In this sense, the levels of stress hormones have been considered a valuable biochemical marker for evidencing anxiety in different organism models (CANAVELLO et al., 2011; EGAN et al., 2009; MEZZOMO et al., 2016). Likewise humans, zebrafish employ cortisol (rather than corticosterone, as do rodents) as the primary stress response hormone (BARCELLOS et al., 2007), which makes it a useful organism model to mimic human stress physiology. Herein, we evidenced that zebrafish exposed to the two highest concentrations of Mn presented a marked increase in the whole-body cortisol content. This increase in cortisol levels strengthens the anxiogenic role of Mn, and may serve as a marker of its neurotoxicity.

The dopaminergic neurotransmitter signaling is the most studied pathway for explaining the neurotoxicity induced by Mn, especially the motor impairments observed in people and experimental animals exposed to Mn (GUILARTE, 2010; HARISCHANDRA et al., 2019; PERES et al., 2016). Nevertheless, it is known that Mn neurotoxicity also compromises the homeostasis of other neurotransmitter systems, namely the cholinergic system (ANJUM et al., 2019; FINKELSTEIN; MILATOVIC; ASCHNER, 2007; LOCKMAN; RODER; ALLEN, 2001). The cholinergic components have been gaining attention for their modulatory role in the learning, memory and motor processes, which are also affected by Manganism (PERES et al., 2016; SANTOS et al., 2012; YE; KIM, 2015). Herein, we investigated the activity of enzyme AChE from brain and muscle, in order to know whether components of the cholinergic system could be affected Mn short exposure in adult zebrafish. Our results demonstrated that the highest concentrations of Mn enhanced the AChE activity in brain, but not in muscle. In accordance, we found findings showing that adult zebrafish exposed acutely (15 mg/kg, for 2 days), and chronically (2 mg/Kg for 8 weeks) to Mn had a marked increase in the brain AChE activity (YOUSEFI BABADI et al., 2014). Interestingly, a similar effect profile was found in zebrafish embryos and larvae after exposure to Mancozeb (LEANDRO et al., 2021). However, it is important to highlight that the responses of brain AChE to Mn exposures vary so much according to the species, age, dose, route and frequency of administration and genetic background. For example, some protocols have reported that brain AChE activity is decreased in rats and mice after MnCl<sub>2</sub> exposure (DESKIN; BURSIAAN; EDENS, 1981; LAI; LEUNG; LIM, 1982), as well as indicated increases in brain AChE as a biomarker of Mn neurotoxicity (ANJUM et al., 2019; LIAPI et al., 2008; YOUSEFI BABADI et al., 2014).

Most of the deleterious effects observed in fish exposed to Mn were evoked by the highest concentrations; which also caused a significant reduction in the number of viable cells, verified by MTT assay. MTT assay is commonly used to indicate tissue toxicity and mitochondrial disruption. Herein we don't analyze cell death parameters linked to mitochondria dysfunction, but there is evidence that the treatment with Mn at 0.5, 1, and 1.5 mM, for 96 h, increased the levels of caspase-8 and BAX in the brain of adult zebrafish (ALTENHOFEN et al., 2017a). Interestingly, we found that the brain of fish exposed to the highest concentrations also accumulated more Mn, indicating that the content of Mn into cerebral tissue may be related to the magnitude and severity

of symptoms as well as the extent of biochemical alterations verified mainly in the groups exposed to the highest concentrations.

## 5. CONCLUSION

In summary, we showed that in addition to locomotor deficits, short Mn exposure caused anxiety behavior in adult zebrafish. Our findings also indicated that brain AChE activity and cortisol dysregulation seem to follow Mn toxicity in adult zebrafish. However, we emphasize that additional mechanistic studies are needed to understand the involvement of cortisol and AChE system with the neurobehavioral changes found in the animals after Mn exposure.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgments

The financial supports by FAPERGS, CAPES, and CNPq are gratefully acknowledged. N.V.B is a recipient of CNPq fellowships.

## LEGENDS

**Fig. 1.** Effects of manganese on locomotor and exploratory parameters of fish by novel tank test. Parameters of distance traveled (A), absolute turn angle (B), time spent in top (C), transitions to top area (D), immobile episodes (E) and immobile time (F) of control and groups exposed to MnCl<sub>2</sub>. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test and expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ . Different letters indicate statistically significant differences among groups (n = 15-20 animals per group).

**Fig. 2.** Effects of manganese on anxiety-like behavior of zebrafish evaluated by light-dark test. Time spent in lit area (A), crossings to the lit area (B), average time in lit area (C) and number of risk assessment of control and groups treated with MnCl<sub>2</sub>. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test and expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ . Different letters



indicate statistically significant differences among groups (n = 20-30 animals per group).

**Fig. 3.** Social preference test in adult zebrafish exposed to Mn. (A) time spent in the conspecific close area (B) average time spent in conspecific close area (C) number of transitions among the two areas. The data were expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ . Different letters indicate statistically significant differences among groups (n = 15-20 animals per group).

**Fig. 4.** Effects of manganese on the cell viability of zebrafish brain. Results were expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ . Different letters indicate statistically significant differences among groups (n= 8 animals per group).

**Fig. 5.** Effects of manganese on AChE activity of zebrafish brain (A) and muscles (B). Data were expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ . Different letters indicate statistically significant differences among groups (n = 9 animals per group).

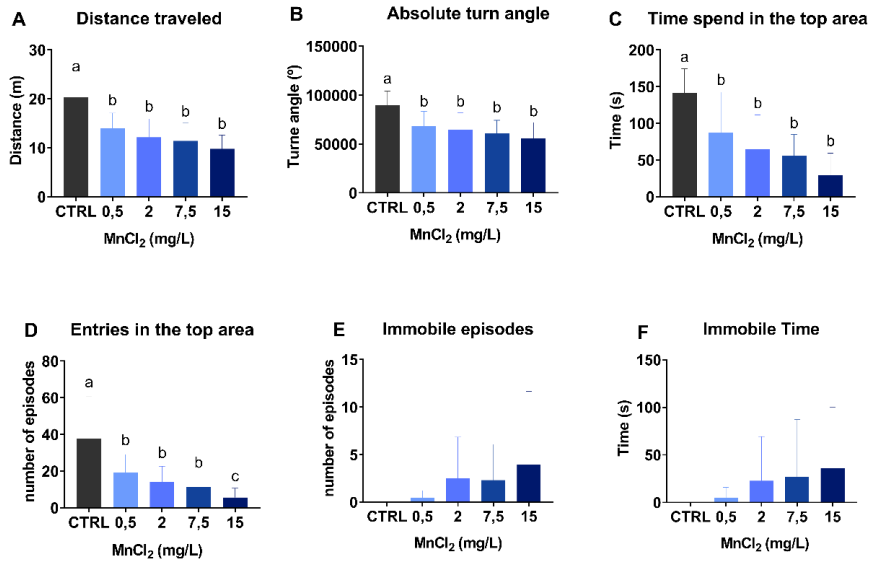
**Fig. 6.** Effects of manganese on whole-body cortisol content of zebrafish. Data were expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ . Different letters indicate statistically significant differences among groups (n = 8 animals per group).

**Table 1** Brain Mn levels of adult zebrafish after 96 h exposure

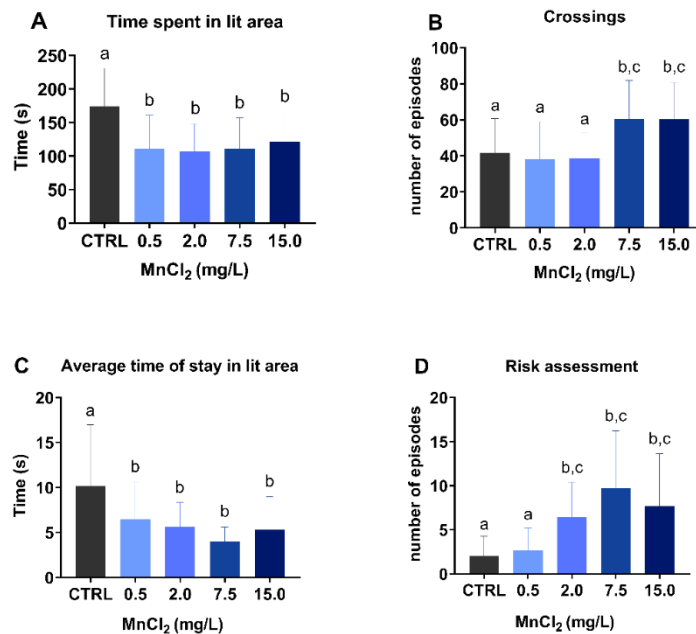
<b>Groups (mg/L)</b>	<b>Mn content (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math>)</b>
0 (Control)	ND
0.5	1.41 $\pm$ 0.181
2.0	1.5 $\pm$ 0.133
7.5	2.45 $\pm$ 0.219 <b>a,b</b>
15	3.22 $\pm$ 0.114 <b>a,b</b>

ND: non detectable levels, **a** Indicates statistical difference compared to the control; **b** Indicates statistical difference among the respective groups by one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test ( $p \leq 0.05$ )

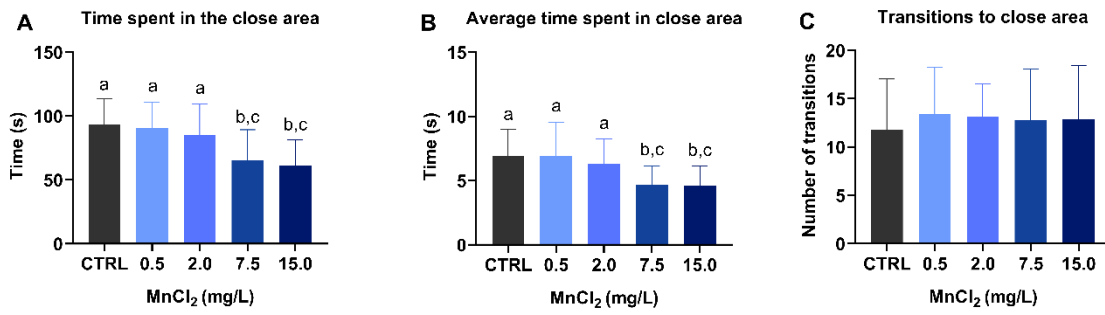
**FIGURE 1**



**FIGURE 2**



**FIGURE 3**



**FIGURE 4**

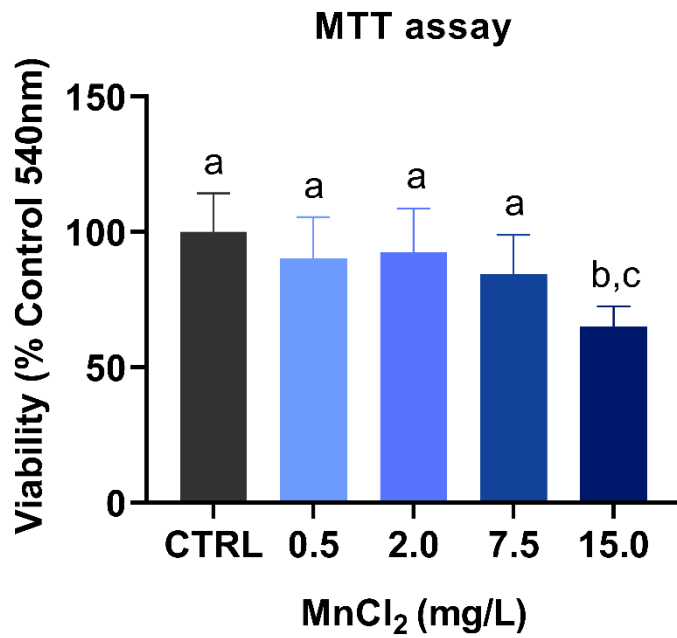


FIGURE 5

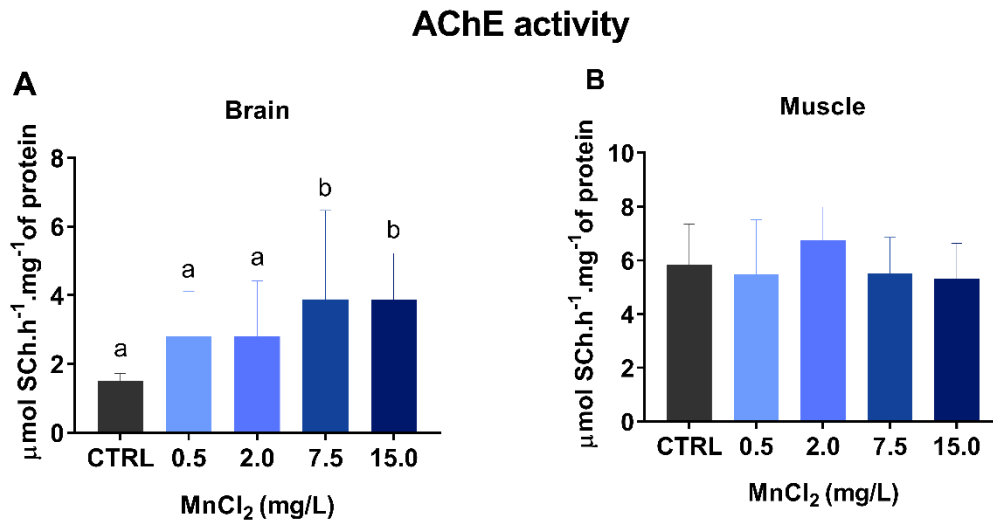
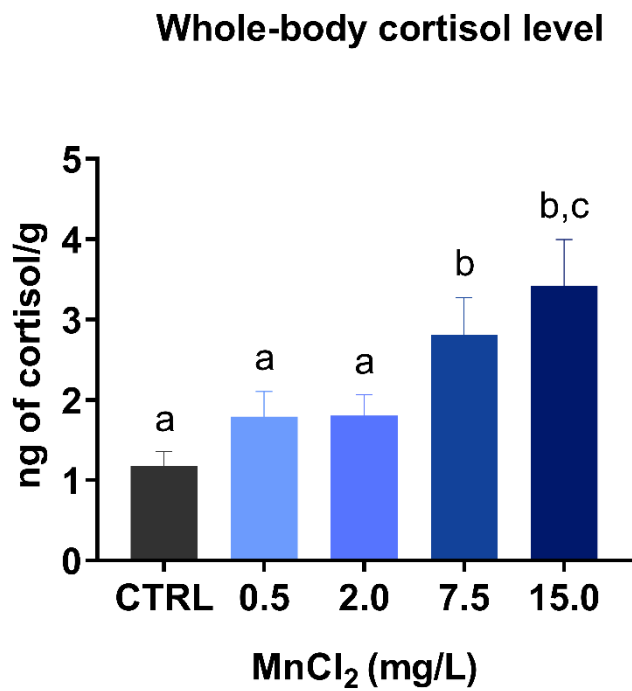


FIGURE 6



## 6. REFERENCES

- AFONSO, J. C. MANGANÊS NO BRASIL: DESCOBERTA, EXTRAÇÃO, CONSUMO E COMERCIALIZAÇÃO NUMA PERSPECTIVA HISTÓRICA. **Química Nova**, v. 42, n. 10, p. 1172–1183, 2019.
- ALTENHOFEN, S. et al. Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 172–183, 2017a.
- ALTENHOFEN, S. et al. Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 172–183, jan. 2017b.
- ANJUM, A. et al. Butyrylcholinesterase—a potential plasma biomarker in manganese-induced neurobehavioral changes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 7, p. 6378–6387, 7 mar. 2019.
- ASCHNER, J. L.; ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4- 5 SPEC. ISS., p. 353–362, 2005.
- ASCHNER, M.; ERIKSON, K. Manganese. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, n. 3, p. 520–521, 15 maio 2017.
- ASCHNER, M.; ERIKSON, K. M.; DORMAN, D. C. Manganese Dosimetry: Species Differences and Implications for Neurotoxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 1–32, 10 jan. 2005.
- ASSER, A. et al. Acute effects of methcathinone and manganese in mice: A dose response study. **Heliyon**, v. 5, n. 9, p. e02475, set. 2019.
- AVILA, D. S.; PUNTEL, R. L.; ASCHNER, M. Manganese in Health and Disease. In: **Metal Ions in Life Sciences**. [s.l: s.n.]. v. 13p. 199–227.
- BAGGIO, S. et al. Embryonic alcohol exposure leading to social avoidance and altered anxiety responses in adult zebrafish. **Behavioural brain research**, v. 352, p. 62–69, out. 2018.
- BALACHANDRAN, R. C. et al. Brain manganese and the balance between essential roles and neurotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 19, p. 6312–

6329, maio 2020.

BARCELLOS, L. J. G. et al. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 272, n. 1–4, p. 774–778, nov. 2007.

BJØRKLUND, G. et al. Interactions between iron and manganese in neurotoxicity. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 725–734, 16 mar. 2020.

BLASER, R. E.; ROSEMBERG, D. B. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): Dissociation of black/white preference and novel tank test. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2012.

BLECHARZ-KLIN, K. et al. Effect of intranasal manganese administration on neurotransmission and spatial learning in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 265, n. 1, p. 1–9, 2012.

BOUABID, S. et al. Manganese neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission. **Journal of Neurochemistry**, v. 136, n. 4, p. 677–691, 2016.

BOWLER, R. M. et al. Dose-effect relationships between manganese exposure and neurological, neuropsychological and pulmonary function in confined space bridge welders. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 64, n. 3, p. 167–177, 1 mar. 2007.

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

CACHAT, J. et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nature protocols**, v. 5, n. 11, p. 1786–1799, nov. 2010.

CALNE, D. B. et al. Manganism and idiopathic parkinsonism: Similarities and differences. **Neurology**, v. 44, n. 9, p. 1583–1583, 1 set. 1994.

CANAVELLO, P. R. et al. Measuring Endocrine (Cortisol) Responses of Zebrafish to Stress. In: KALUEFF, A. V; CACHAT, J. M. (Eds.). . **Zebrafish Neurobehavioral Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. p. 135–142.

CANZIAN, J. et al. Conspecific alarm substance differently alters group behavior of

zebrafish populations: Putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. **Behavioural Brain Research**, v. 320, n. December, p. 255–263, mar. 2017.

CHEN, P. et al. Iron and manganese-related CNS toxicity: mechanisms, diagnosis and treatment. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 19, n. 3, p. 243–260, 4 mar. 2019.

CHUN, H. S.; LEE, H.; SON, J. H. Manganese induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates multiple caspases in nigral dopaminergic neuronal cells, SN4741. **Neuroscience Letters**, v. 316, n. 1, p. 5–8, dez. 2001.

COUNCIL, N. R. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition**. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.

DE ABREU, M. S. et al. Neuropharmacology, pharmacogenetics and pharmacogenomics of aggression: The zebrafish model. **Pharmacological Research**, v. 141, n. December 2018, p. 602–608, 2019.

DESKIN, R.; BURSIAAN, S. J.; EDENS, F. W. The effect of chronic manganese administration on some neurochemical and physiological variables in neonatal rats. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 12, n. 4, p. 279–280, jan. 1981.

DOS SANTOS, M. M. et al. **Hyperglycemia elicits anxiety-like behaviors in zebrafish: Protective role of dietary diphenyl diselenide**. [s.l.] Elsevier Inc, 2018. v. 85

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 38–44, dez. 2009.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

ERIKSON, K. M. et al. Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain. **Science of the Total Environment**, v. 334–335, p. 409–416, 2004.

ERIKSON, K. M.; ASCHNER, M. Manganese: Its Role in Disease and Health. **Metal**

**ions in life sciences**, v. 19, p. 253–266, 2019.

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

FASANO, G. **Effects of Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl on dopaminergic neurons in zebrafish**, 2017.

FINKELSTEIN, M. M.; JERRETT, M. A study of the relationships between Parkinson's disease and markers of traffic-derived and environmental manganese air pollution in two Canadian cities. **Environmental Research**, v. 104, n. 3, p. 420–432, 2007.

FINKELSTEIN, Y.; MILATOVIC, D.; ASCHNER, M. Modulation of cholinergic systems by manganese. v. 28, p. 1003–1014, 2007.

FONTANA, B. D. et al. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. **Experimental Neurology**, v. 299, p. 157–171, 2018.

FORDAHL, S. C.; ERIKSON, K. M. Manganese accumulation in membrane fractions of primary astrocytes is associated with decreased  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) uptake, and is exacerbated by oleic acid and palmitate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 1148–1156, maio 2014.

FRISBIE, S. H.; MITCHELL, E. J.; SARKAR, B. Urgent need to reevaluate the latest World Health Organization guidelines for toxic inorganic substances in drinking water. **Environmental Health**, v. 14, n. 1, p. 63, 13 dez. 2015.

GAVIN, C. E.; GUNTER, K. K.; GUNTER, T. E. Manganese and calcium transport in mitochondria: implications for manganese toxicity. **Neurotoxicology**, v. 20, n. 2–3, p. 445–53, 1999.

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

GUILARTE, T. R. et al. Impairment of nigrostriatal dopamine neurotransmission by



manganese is mediated by pre-synaptic mechanism(s): implications to manganese-induced parkinsonism. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 5, p. 1236–1247, dez. 2008.

GUILARTE, T. R. Manganese and Parkinson's disease: A critical review and new findings. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 8, p. 1071–1080, 2010.

GUILARTE, T. R. Manganese neurotoxicity: New perspectives from behavioral, neuroimaging, and neuropathological studies in humans and non-human primates. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 5, n. JUN, p. 1–10, 2013.

GUNTER, T. E. Manganese and Mitochondrial Function. In: **Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 389–396.

HARANGI, S. et al. Accumulation of Metals in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*) Exposed to Sublethal Levels of Iron and Manganese: Survival, Body Weight and Tissue. **Biological Trace Element Research**, v. 177, n. 1, p. 187–195, 2017.

HARISCHANDRA, D. S. et al. Manganese-induced neurotoxicity: New insights into the triad of protein misfolding, mitochondrial impairment, and neuroinflammation. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. JUN, p. 1–19, 2019.

HONG, S. B. et al. Blood manganese levels in relation to comorbid behavioral and emotional problems in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Psychiatry Research**, v. 220, n. 1–2, p. 418–425, 2014.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

HOWE, P.; MALCOLM, H.; DOBSON, S. **Manganese and its compounds: environmental aspects**. [s.l.] World Health Organization, 2004.

INOUE, T.; MAJID, T.; PAUTLER, R. G. Manganese enhanced MRI (MEMRI): neurophysiological applications. **Reviews in the Neurosciences**, v. 22, n. 6, p. 675–694, 1 jan. 2011.

JEKOSCH, K. The Zebrafish genome project: Sequence analysis and annotation. **Methods in Cell Biology**, v. 2004, n. 77, p. 225–239, 2004.

- KALUEFF, A. V. et al. Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, mar. 2013.
- KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63–75, fev. 2014.
- KAUR, G. et al. Affected energy metabolism under manganese stress governs cellular toxicity. **Scientific Reports**, p. 1–11, 2017.
- LAI, J. C. K.; LEUNG, T. K. C.; LIM, L. The Ontogeny of Acetylcholinesterase Activities in Rat Brain Regions and the Effect of Chronic Treatment with Manganese Chloride. **Journal of Neurochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1767–1769, dez. 1982.
- LEANDRO, L. et al. Behavioral changes occur earlier than redox alterations in developing zebrafish exposed to Mancozeb. **Environmental Pollution**, v. 268, 2021.
- LIAPI, C. et al. Effects of Short-Term Exposure to Manganese on the Adult Rat Brain Antioxidant Status and the Activities of Acetylcholinesterase, (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase: Modulation by L-Cysteine. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 103, n. 2, p. 171–175, ago. 2008.
- LICCIONE, J. J.; MAINES, M. D. Selective vulnerability of glutathione metabolism and cellular defense mechanisms in rat striatum to manganese. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 247, n. 1, p. 156–161, out. 1988.
- LOCKMAN, P. R.; RODER, K. E.; ALLEN, D. D. Inhibition of the rat blood-brain barrier choline transporter by manganese chloride. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 3, p. 588–594, 2001.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- LUCITT, M. B. et al. Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 981–994, 2008.
- MALECKI, E. A. Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 225–228, 2001.

- MARINS, K. et al. Iron and manganese present in underground water promote biochemical, genotoxic, and behavioral alterations in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 23, p. 23555–23570, 2019.
- MARTINEZ-FINLEY, E. J. et al. Cellular transport and homeostasis of essential and nonessential metals. **Metallomics**, v. 4, n. 7, p. 593, 2012.
- MARTINS, A. C. et al. Manganese-induced neurodegenerative diseases and possible therapeutic approaches. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 20, n. 11, p. 1109–1121, 1 nov. 2020.
- MASSOULIÉ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31–91, jul. 1993.
- MATHAVAN, S. et al. Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays. **PLoS Genetics**, v. 1, n. 2, p. 0260–0276, 2005.
- MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 157–171, 2010a.
- MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, v. 5, n. 2, p. 221–228, 2010b.
- MEDICINE, I. OF. **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc**. Washington, DC: The National Academies Press, 2001.
- MEZZOMO, N. J. et al. The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: A comparative study using the novel tank and the light-dark tasks. **Neuroscience Letters**, v. 613, p. 19–24, 2016.
- MILLER, N.; GERLAI, R. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 184, n. 2, p. 157–166, dez. 2007.
- MÜLLER, T. E. et al. Sodium Selenite Prevents Paraquat-Induced Neurotoxicity in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 1928–1941, 27 mar. 2018.
- NUNES, M. E. M. et al. Acute embryonic exposure of zebrafish to permethrin induces

behavioral changes related to anxiety and aggressiveness in adulthood. **Journal of Psychiatric Research**, v. 121, n. October 2019, p. 91–100, 2020.

NYARKO-DANQUAH, I. et al. Manganese Accumulation in the Brain via Various Transporters and Its Neurotoxicity Mechanisms. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 24, p. 1–21, 2020.

OLIVEIRA, T. A. et al. Alcohol Impairs Predation Risk Response and Communication in Zebrafish. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–7, 2013.

PANULA, P. et al. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 46–57, out. 2010.

PERES, T. V. et al. “Manganese-induced neurotoxicity: a review of its behavioral consequences and neuroprotective strategies”. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 57, 4 dez. 2016.

QUEIROZ, H. M. et al. Manganese: The overlooked contaminant in the world largest mine tailings dam collapse. **Environment International**, v. 146, n. August 2020, 2021.

RACETTE, B. A. et al. Depression and anxiety in a manganese-exposed community. **NeuroToxicology**, v. 85, n. May, p. 222–233, jul. 2021.

RANCKE-MADSEN, E. The Discovery of an Element. **Centaurus**, v. 19, n. 4, p. 299–313, dez. 1975.

RIVERA-MANCÍA, S.; RÍOS, C.; MONTES, S. Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies. **BioMetals**, v. 24, n. 5, p. 811–825, 1 out. 2011.

RODRIGUES, G. et al. Histopathological, genotoxic, and behavioral damages induced by manganese (II) in adult zebrafish. **Chemosphere**, v. 244, p. 125550, abr. 2020.

ROSEMBERG, D. B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

SACHSE, B. et al. Dietary Manganese Exposure in the Adult Population in

Germany—What Does it Mean in Relation to Health Risks? **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 63, n. 16, p. 1900065, ago. 2019.

SANTAMARIA, A. B. et al. State-of-the-science review: Does manganese exposure during welding pose a neurological risk? **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 10, n. 6, p. 417–465, 2007.

SANTOS, D. et al. The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain. **Toxicology**, v. 292, n. 2–3, p. 90–98, fev. 2012.

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

STEWART, A. et al. Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 135–143, jan. 2012.

STRUNGARU, S. A. et al. Acute exposure to gold induces fast changes in social behavior and oxidative stress of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, n. July, p. 249–256, 2018.

SUN, X. et al. Insights into the global flow pattern of manganese. **Resources Policy**, v. 65, n. September 2019, p. 101578, 2020.

TAYLOR, C. A. et al. Maintaining Translational Relevance in Animal Models of Manganese Neurotoxicity. **Journal of Nutrition**, v. 150, n. 6, p. 1360–1369, 2020.

TORRES, C. et al. Reserva, produção, mercado e consumo brasileiro de manganês entre 2010 e 2013. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 08, p. 63–73, 2018.

TU, H. et al. Effects of cadmium, manganese, and lead on locomotor activity and neurexin 2a expression in zebrafish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 2147–2154, 2017.

TUSCHL, K.; MILLS, P. B.; CLAYTON, P. T. Manganese and the Brain. In: **International Review of Neurobiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 110p. 277–312.

- XU, Y. et al. Neurotoxicity and gene expression alterations in zebrafish larvae in response to manganese exposure. **Science of The Total Environment**, v. 825, p. 153778, jun. 2022.
- YE, Q.; KIM, J. Loss of Hfe function reverses impaired recognition memory caused by olfactory manganese exposure in mice. **Toxicological Research**, v. 31, n. 1, p. 17–23, 2015.
- YIN, J. et al. Time-response characteristic and potential biomarker identification of heavy metal induced toxicity in zebrafish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 72, n. May 2017, p. 309–317, jan. 2018.
- YOON, H. et al. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by manganese trigger  $\alpha$ -synuclein accumulation. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 8, p. 1497–1503, 2018.
- YOUSEFI BABADI, V. et al. The Toxic Effect of Manganese on the Acetylcholinesterase Activity in Rat Brains. **Journal of Toxicology**, v. 2014, 2014.
- ZAYED, J.; HONG, B.; L'ESPÉRANCE, G. Characterization of manganese-containing particles collected from the exhaust emissions of automobiles running with MMT additive. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 19, p. 3341–3346, 1999.
- ZENKI, K. C. et al. Effects of ethanol and acetaldehyde in zebrafish brain structures: An in vitro approach on glutamate uptake and on toxicity-related parameters. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 5, p. 822–828, 2014.

## 5 CONCLUSÃO

Sabe-se que o excesso de Mn está associado principalmente à desenvolvimento de distúrbios motores e cognitivos. Nesse trabalho, investigamos o impacto da exposição ambiental de curta ao Mn no aparecimento de distúrbios psiquiátricos, especialmente fenótipos do tipo ansiedade, referenciando a viabilidade celular, atividade da AChE, cortisol e níveis cerebrais de Mn como biomarcadores subjacentes para a neurotoxicidade do Mn. No geral, descobrimos que a curta exposição ao Mn, juntamente com déficits locomotores, induziu comportamentos relacionados à ansiedade em peixes-zebra. Os fenótipos de ansiedade foram induzidos principalmente pelas

maiores concentrações que aumentaram o acúmulo cerebral de Mn, a atividade da AChE e também os níveis de cortisol corporal. Curiosamente, descobrimos que o cérebro de peixes expostos as maiores concentrações também acumularam mais Mn, indicando que o conteúdo de Mn em tecido cerebral pode estar relacionado com a magnitude e gravidade dos sintomas bem como a extensão das alterações bioquímicas verificadas principalmente nos grupos expostos às maiores concentrações. No entanto, enfatizamos que estudos mecanísticos adicionais são necessários entender o envolvimento do cortisol e do sistema AChE com as alterações neurocomportamentais encontradas nos animais após a exposição ao Mn.

## 6 PERSPECTIVAS

- Através do conhecimento dos níveis de expressão de mRNA, indicar quais transportadores de Mn no cérebro estão mais envolvidos com os efeitos neurotóxicos do metal.
- Estabelecer as relações existentes entre a neurotoxicidade mediada por Mn e a disfunção mitocondrial cerebral.
- Avaliar como o manganês pode afetar a atividade da AChE para verificar se a neurotoxicidade do metal envolve modulação do sistema colinérgico.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO, J. C. MANGANÊS NO BRASIL: DESCOBERTA, EXTRAÇÃO, CONSUMO E COMERCIALIZAÇÃO NUMA PERSPECTIVA HISTÓRICA. **Química Nova**, v. 42, n. 10, p. 1172–1183, 2019.
- ALTENHOFEN, S. et al. Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 172–183, 2017a.
- ANJUM, A. et al. Butyrylcholinesterase—a potential plasma biomarker in manganese-induced neurobehavioral changes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 7, p. 6378–6387, 7 mar. 2019.
- ASCHNER, J. L.; ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4- 5 SPEC. ISS., p. 353–362, 2005.
- ASCHNER, M.; ERIKSON, K. Manganese. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, n. 3, p. 520–521, 15 maio 2017.
- ASCHNER, M.; ERIKSON, K. M.; DORMAN, D. C. Manganese Dosimetry: Species Differences and Implications for Neurotoxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 1–32, 10 jan. 2005.
- ASSER, A. et al. Acute effects of methcathinone and manganese in mice: A dose response study. **Heliyon**, v. 5, n. 9, p. e02475, set. 2019.
- AVILA, D. S.; PUNTEL, R. L.; ASCHNER, M. Manganese in Health and Disease. In: **Metal Ions in Life Sciences**. [s.l: s.n.]. v. 13p. 199–227.
- BAGGIO, S. et al. Embryonic alcohol exposure leading to social avoidance and altered anxiety responses in adult zebrafish. **Behavioural brain research**, v. 352, p. 62–69, out.

2018.

- BALACHANDRAN, R. C. et al. Brain manganese and the balance between essential roles and neurotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 19, p. 6312–6329, maio 2020.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 272, n. 1–4, p. 774–778, nov. 2007.
- BJØRKLUND, G. et al. Interactions between iron and manganese in neurotoxicity. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 725–734, 16 mar. 2020.
- BLASER, R. E.; ROSEMBERG, D. B. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): Dissociation of black/white preference and novel tank test. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2012.
- BLECHARZ-KLIN, K. et al. Effect of intranasal manganese administration on neurotransmission and spatial learning in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 265, n. 1, p. 1–9, 2012.
- BOUABID, S. et al. Manganese neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission. **Journal of Neurochemistry**, v. 136, n. 4, p. 677–691, 2016.
- BOWLER, R. M. et al. Dose-effect relationships between manganese exposure and neurological, neuropsychological and pulmonary function in confined space bridge welders. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 64, n. 3, p. 167–177, 1 mar. 2007.
- BOWMAN, A. B. et al. Role of manganese in neurodegenerative diseases. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 25, n. 4, p. 191–203, dez. 2011.
- CACHAT, J. et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nature protocols**, v. 5, n. 11, p. 1786–1799, nov. 2010.
- CALNE, D. B. et al. Manganism and idiopathic parkinsonism: Similarities and differences. **Neurology**, v. 44, n. 9, p. 1583–1583, 1 set. 1994.
- CANAVELLO, P. R. et al. Measuring Endocrine (Cortisol) Responses of Zebrafish to Stress. In: KALUEFF, A. V.; CACHAT, J. M. (Eds.). **Zebrafish Neurobehavioral Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. p. 135–142.
- CANZIAN, J. et al. Conspecific alarm substance differently alters group behavior of zebrafish populations: Putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. **Behavioural Brain Research**, v. 320, n. December, p. 255–263, mar. 2017.
- CHEN, P. et al. Iron and manganese-related CNS toxicity: mechanisms, diagnosis and treatment. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 19, n. 3, p. 243–260, 4 mar. 2019.
- CHUN, H. S.; LEE, H.; SON, J. H. Manganese induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates multiple caspases in nigral dopaminergic neuronal cells, SN4741. **Neuroscience Letters**, v. 316, n. 1, p. 5–8, dez. 2001.
- COUNCIL, N. R. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition**. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.
- DE ABREU, M. S. et al. Neuropharmacology, pharmacogenetics and pharmacogenomics of aggression: The zebrafish model. **Pharmacological Research**, v. 141, n. December 2018, p. 602–608, 2019.
- DESKIN, R.; BURSIAN, S. J.; EDENS, F. W. The effect of chronic manganese administration on some neurochemical and physiological variables in neonatal rats. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 12, n. 4, p. 279–280, jan. 1981.
- DOS SANTOS, M. M. et al. **Hyperglycemia elicits anxiety-like behaviors in zebrafish: Protective role of dietary diphenyl diselenide**. [s.l.] Elsevier Inc, 2018. v. 85
- EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 38–44, dez. 2009.



ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

ERIKSON, K. M. et al. Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain. **Science of the Total Environment**, v. 334–335, p. 409–416, 2004.

ERIKSON, K. M.; ASCHNER, M. Manganese: Its Role in Disease and Health. **Metal ions in life sciences**, v. 19, p. 253–266, 2019.

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

FASANO, G. **Effects of Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl on dopaminergic neurons in zebrafish**, 2017.

FINKELSTEIN, M. M.; JERRETT, M. A study of the relationships between Parkinson's disease and markers of traffic-derived and environmental manganese air pollution in two Canadian cities. **Environmental Research**, v. 104, n. 3, p. 420–432, 2007.

FINKELSTEIN, Y.; MILATOVIC, D.; ASCHNER, M. Modulation of cholinergic systems by manganese. v. 28, p. 1003–1014, 2007.

FONTANA, B. D. et al. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. **Experimental Neurology**, v. 299, p. 157–171, 2018.

FORDAHL, S. C.; ERIKSON, K. M. Manganese accumulation in membrane fractions of primary astrocytes is associated with decreased  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) uptake, and is exacerbated by oleic acid and palmitate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 1148–1156, maio 2014.

FRISBIE, S. H.; MITCHELL, E. J.; SARKAR, B. Urgent need to reevaluate the latest World Health Organization guidelines for toxic inorganic substances in drinking water. **Environmental Health**, v. 14, n. 1, p. 63, 13 dez. 2015.

GAVIN, C. E.; GUNTER, K. K.; GUNTER, T. E. Manganese and calcium transport in mitochondria: implications for manganese toxicity. **Neurotoxicology**, v. 20, n. 2–3, p. 445–53, 1999.

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

GUILARTE, T. R. et al. Impairment of nigrostriatal dopamine neurotransmission by manganese is mediated by pre-synaptic mechanism(s): implications to manganese-induced parkinsonism. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 5, p. 1236–1247, dez. 2008.

GUILARTE, T. R. Manganese and Parkinson's disease: A critical review and new findings. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 8, p. 1071–1080, 2010.

GUILARTE, T. R. Manganese neurotoxicity: New perspectives from behavioral, neuroimaging, and neuropathological studies in humans and non-human primates. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 5, n. JUN, p. 1–10, 2013.

GUNTER, T. E. Manganese and Mitochondrial Function. In: **Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 389–396.

HARANGI, S. et al. Accumulation of Metals in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*) Exposed to Sublethal Levels of Iron and Manganese: Survival, Body Weight and Tissue. **Biological Trace Element Research**, v. 177, n. 1, p. 187–195, 2017.

HARISCHANDRA, D. S. et al. Manganese-induced neurotoxicity: New insights into the triad of protein misfolding, mitochondrial impairment, and neuroinflammation. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. JUN, p. 1–19, 2019.

HONG, S. B. et al. Blood manganese levels in relation to comorbid behavioral and emotional problems in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Psychiatry Research**, v.

220, n. 1–2, p. 418–425, 2014.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

HOWE, P.; MALCOLM, H.; DOBSON, S. **Manganese and its compounds: environmental aspects**. [s.l.] World Health Organization, 2004.

INOUE, T.; MAJID, T.; PAUTLER, R. G. Manganese enhanced MRI (MEMRI): neurophysiological applications. **Reviews in the Neurosciences**, v. 22, n. 6, p. 675–694, 1 jan. 2011.

JEKOSCH, K. The Zebrafish genome project: Sequence analysis and annotation. **Methods in Cell Biology**, v. 2004, n. 77, p. 225–239, 2004.

KALUEFF, A. V. et al. Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, mar. 2013.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63–75, fev. 2014.

KAUR, G. et al. Affected energy metabolism under manganese stress governs cellular toxicity. **Scientific Reports**, p. 1–11, 2017.

LAI, J. C. K.; LEUNG, T. K. C.; LIM, L. The Ontogeny of Acetylcholinesterase Activities in Rat Brain Regions and the Effect of Chronic Treatment with Manganese Chloride. **Journal of Neurochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1767–1769, dez. 1982.

LEANDRO, L. et al. Behavioral changes occur earlier than redox alterations in developing zebrafish exposed to Mancozeb. **Environmental Pollution**, v. 268, 2021.

LIAPI, C. et al. Effects of Short-Term Exposure to Manganese on the Adult Rat Brain Antioxidant Status and the Activities of Acetylcholinesterase, (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase: Modulation by L-Cysteine. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 103, n. 2, p. 171–175, ago. 2008.

LICCIONE, J. J.; MAINES, M. D. Selective vulnerability of glutathione metabolism and cellular defense mechanisms in rat striatum to manganese. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 247, n. 1, p. 156–161, out. 1988.

LOCKMAN, P. R.; RODER, K. E.; ALLEN, D. D. Inhibition of the rat blood-brain barrier choline transporter by manganese chloride. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 3, p. 588–594, 2001.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUCITT, M. B. et al. Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 981–994, 2008.

MALECKI, E. A. Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 225–228, 2001.

MARINS, K. et al. Iron and manganese present in underground water promote biochemical, genotoxic, and behavioral alterations in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 23, p. 23555–23570, 2019.

MARTINEZ-FINLEY, E. J. et al. Cellular transport and homeostasis of essential and nonessential metals. **Metallomics**, v. 4, n. 7, p. 593, 2012.

MARTINS, A. C. et al. Manganese-induced neurodegenerative diseases and possible therapeutic approaches. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 20, n. 11, p. 1109–1121, 1 nov. 2020.

MASSOULIÉ, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31–91, jul. 1993.

MATHAVAN, S. et al. Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays. **PLoS Genetics**, v. 1, n. 2, p. 0260–0276, 2005.

MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 157–171, 2010a.

MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, v. 5, n. 2, p. 221–228, 2010b.

MEDICINE, I. OF. **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc**. Washington, DC: The National Academies Press, 2001.

MEZZOMO, N. J. et al. The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: A comparative study using the novel tank and the light-dark tasks. **Neuroscience Letters**, v. 613, p. 19–24, 2016.

MILLER, N.; GERLAI, R. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 184, n. 2, p. 157–166, dez. 2007.

MÜLLER, T. E. et al. Sodium Selenite Prevents Paraquat-Induced Neurotoxicity in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 1928–1941, 27 mar. 2018.

NUNES, M. E. M. et al. Acute embryonic exposure of zebrafish to permethrin induces behavioral changes related to anxiety and aggressiveness in adulthood. **Journal of Psychiatric Research**, v. 121, n. October 2019, p. 91–100, 2020.

NYARKO-DANQUAH, I. et al. Manganese Accumulation in the Brain via Various Transporters and Its Neurotoxicity Mechanisms. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 24, p. 1–21, 2020.

OLIVEIRA, T. A. et al. Alcohol Impairs Predation Risk Response and Communication in Zebrafish. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–7, 2013.

PANULA, P. et al. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 46–57, out. 2010.

PERES, T. V. et al. “Manganese-induced neurotoxicity: a review of its behavioral consequences and neuroprotective strategies”. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 57, 4 dez. 2016.

QUEIROZ, H. M. et al. Manganese: The overlooked contaminant in the world largest mine tailings dam collapse. **Environment International**, v. 146, n. August 2020, 2021.

RACETTE, B. A. et al. Depression and anxiety in a manganese-exposed community. **NeuroToxicology**, v. 85, n. May, p. 222–233, jul. 2021.

RANCKE-MADSEN, E. The Discovery of an Element. **Centaurus**, v. 19, n. 4, p. 299–313, dez. 1975.

RIVERA-MANCÍA, S.; RÍOS, C.; MONTES, S. Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies. **BioMetals**, v. 24, n. 5, p. 811–825, 1 out. 2011.

RODRIGUES, G. et al. Histopathological, genotoxic, and behavioral damages induced by manganese (II) in adult zebrafish. **Chemosphere**, v. 244, p. 125550, abr. 2020.

ROSEMBERG, D. B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

SACHSE, B. et al. Dietary Manganese Exposure in the Adult Population in Germany—What Does it Mean in Relation to Health Risks? **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 63, n. 16, p. 1900065, ago. 2019.

SANTAMARIA, A. B. et al. State-of-the-science review: Does manganese exposure during welding pose a neurological risk? **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 10, n. 6, p. 417–465, 2007.

SANTOS, D. et al. The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain. **Toxicology**, v. 292, n. 2–3, p. 90–98, fev. 2012.

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

STEWART, A. et al. Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 135–143, jan. 2012.

STRUNGARU, S. A. et al. Acute exposure to gold induces fast changes in social behavior and oxidative stress of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, n. July, p. 249–256, 2018.

SUN, X. et al. Insights into the global flow pattern of manganese. **Resources Policy**, v. 65, n. September 2019, p. 101578, 2020.

TAYLOR, C. A. et al. Maintaining Translational Relevance in Animal Models of Manganese Neurotoxicity. **Journal of Nutrition**, v. 150, n. 6, p. 1360–1369, 2020.

TORRES, C. et al. Reserva, produção, mercado e consumo brasileiro de manganês entre 2010 e 2013. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 08, p. 63–73, 2018.

TU, H. et al. Effects of cadmium, manganese, and lead on locomotor activity and neurexin 2a expression in zebrafish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 2147–2154, 2017.

TUSCHL, K.; MILLS, P. B.; CLAYTON, P. T. Manganese and the Brain. In: **International Review of Neurobiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 110p. 277–312.

XU, Y. et al. Neurotoxicity and gene expression alterations in zebrafish larvae in response to manganese exposure. **Science of The Total Environment**, v. 825, p. 153778, jun. 2022.

YE, Q.; KIM, J. Loss of Hfe function reverses impaired recognition memory caused by olfactory manganese exposure in mice. **Toxicological Research**, v. 31, n. 1, p. 17–23, 2015.

YIN, J. et al. Time-response characteristic and potential biomarker identification of heavy metal induced toxicity in zebrafish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 72, n. May 2017, p. 309–317, jan. 2018.

YOON, H. et al. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by manganese trigger  $\alpha$ -synuclein accumulation. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 8, p. 1497–1503, 2018.

YOUSEFI BABADI, V. et al. The Toxic Effect of Manganese on the Acetylcholinesterase Activity in Rat Brains. **Journal of Toxicology**, v. 2014, 2014.

ZAYED, J.; HONG, B.; L'ESPÉRANCE, G. Characterization of manganese-containing particles collected from the exhaust emissions of automobiles running with MMT additive. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 19, p. 3341–3346, 1999.

ZENKI, K. C. et al. Effects of ethanol and acetaldehyde in zebrafish brain structures: An in vitro approach on glutamate uptake and on toxicity-related parameters. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 5, p. 822–828, 2014.