

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

**INTERFERÊNCIAS DO MANGANÊS NO METABOLISMO DE LIPÍDEOS
E NA REPRODUÇÃO DO NEMATÓDEO *Caenorhabditis elegans***

TESE DE DOUTORADO

PRISCILA GUBERT

Orientador: Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares

Santa Maria, RS

2016

**INTERFERÊNCIAS DO MANGANÊS NO METABOLISMO DE
LIPÍDEOS E NA REPRODUÇÃO DO NEMATÓDEO
*Caenorhabditis elegans***

Por

PRISCILA GUBERT

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares.

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

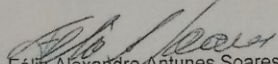
INTERFERÊNCIAS DO MANGANÊS NO METABOLISMO DE LIPÍDEOS E NA
REPRODUÇÃO DO NEMATÓDEO *Caenorhabditis elegans*

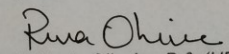
elaborada por

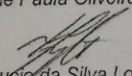
Priscila Gubert

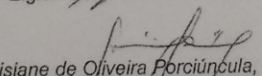
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

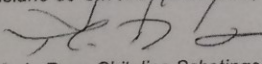
Comissão examinadora:


Félix Alexandre Antunes Soares, Dr.
(Presidente/Orientador)


Riva de Paula Oliveira, Dr^a. (UFRN)


Elgion Lucio da Silva Loreto, Dr. (UFSM)


Lisiane de Oliveira Porciúncula, Dr^a. (UFRGS)


Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 24 de maio de 2016.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gubert, Priscila
INTERFERÊNCIAS DO MANGANÊS NO METABOLISMO DE LIPÍDEOS
E NA REPRODUÇÃO DO NEMATÓDEO *Caenorhabditis elegans* /
Priscila Gubert.-2016.
102 p.; 30cm

Orientador: Félix Alexandre Antunes Soares
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2016

1. Manganês 2. *Caenorhabditis elegans* 3. dopamina 4.
metabolismo de lipídios 5. vitelogeninas I. Soares,
Félix Alexandre Antunes II. Título.

Dedico esta Tese aos meus pais científicos Félix Soares e Daiana Ávila

e aos meus amores Paulo, Neli e Greici.

Agradecimentos

A finalização dessa etapa só foi possível pelo empenho, dedicação, ajuda e amparo de muitos que de alguma forma doaram um pouco do seu tempo, do seu conhecimento ou do seu abraço.

Gostaria de forma muito especial de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Félix Soares pelos conselhos, pela paciência, pelo carinho, pela compreensão e pela oportunidade de crescimento como pesquisadora no seu laboratório (desde 2005...). À prof^a. Dra. Daiana que sempre com seu jeito direto e objetivo auxiliou-me a tomar decisões importantes e a construir-me como pessoa em diversos sentidos (exceto quanto às escolhas de cores de esmalte). Ao Prof. Aschner, pelos jeito bondoso com o qual me passou seus preciosos conhecimentos. Bem como, aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Santa Maria que sempre me receberam de portas abertas em seus laboratórios. Em especial, agradeço a nossa secretária da PPGBTox Elvandir Guimarães, pelo auxílio quando tudo parecia dar errado.

À CAPES, pelo apoio financeiro, pela bolsa de doutorado e doutorado sanduíche (PDSE).

Agradeço aos colegas do lab. do prof. Félix: Nelson, Gui, Leti, Mondonguinho e Glaúbia, Rômulo, Tássia, Dani, Marina, Thay, Aline, Flávia, Guilherme, Sílvio e Ingrid. Vocês são e serão para sempre minha família querida.

Às Ics Bruna e Tássia pelo apoio preciso nesse trabalho.

Aos colegas do lab. Prof. Aschner: Patrícia, Sudipta, Pan, Sam, Thuy, Megan, Emily, Tanara, Nancy, Vivian, Cari, Ebany e Yingchun pela paciência, conhecimentos e abraços.

Aos meus amigos inoxidáveis da POSQUIPA da Universidade Federal do Oeste da Bahia: Boaz, Jacques, Oldair, Poty, Val, Danilo, Mauro, Dayton, Rauldenis e Serginho pelos infundáveis cafés, comidinhas, risadas, apoio nas horas de estresse e por confiarem no meu trabalho. Aos meus anjos Netto e Jajá que me ampararam (“aguentaram”) em Barreiras e fizeram de tudo para que minha alegria só aumentasse aqui. Ao Luiz Gustavo e Dani pela acolhida e simpatia. Aos meus colegas da Faculdade São Francisco de Barreiras (FASB), em especial: Neni Tuco, Nene

Thiago, Nena Luana, Nene Diogo, Nene Cassol, Mari, Cristiane, Tia Sara, PC, Rogério, Chan, Marden, Fernando, Daia, Bianca, Dayanne, Márcio, Éricka, Izabela, Enoch, Enoc, Cris, Neves, Alessandro, Júlio, Ashjan, Fábio, Mirela, André B., prof. Tadeu e Prof. Pedro pelas rodas de mate, causos, prosas, auxílio nas aulas, conselhos e apoio sempre!

Aos meus queridos padrinhos, madrinhas, amigos, afilhados, compadres e familiares. Agradeço também aos meus avós David, Emma, Doralia e Edmar que deixaram lindos exemplos e uma saudade infinita.

Aos amigos e agregados da Copo Furado onde “tudo que é problema morre em um copo da malvada, livra-se das angústias e se torna sucesso!”, em especial aos afilhados Junin e Rodrigo e as primas.

Aos amigos Natália, Gabriel, Jaque Scher, Jaque Pessoa, Lucas, Diane, Dani, Julia, Teteu, Bruna Compari e Jéssika pelo carinho e amizade incondicionais. Ao meu padrinho Magno pelos conselhos ainda que de longe e por ter me tornado tia Pri da bela Olívia. Aos meus queridos Graziela e Borrachito, porque sem vocês não sei viver...

Aos meus alunos que auxiliaram-me de todas as formas para que eu pudesse concluir (in vivo) esse trabalho.

Aos queridos Greici e Vinícius pela presença, apoio e carinho. Tenho muito orgulho de vocês!

Papi, obrigada pela confiança, paciência, pelo jeito otimista e alegre que me anima sempre. Mami, obrigada por nunca esquecer que eu existo e sempre me ligar para ver se eu to bem. Vocês são tudo de mais importante na minha vida.

Finalmente, agradeço a todos que mesmo não estando aqui fisicamente, auxiliaram de alguma forma e tornaram esse trabalho realidade.

Muito obrigada!

Epígrafe

*“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo, mas qualquer um pode
recomeçar e fazer um novo fim!”*

Emmanuel

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma
alma humana, seja apenas outra alma humana”*

Carl Jung

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

INTERFERÊNCIAS DO MANGANÊS NO METABOLISMO DE LIPÍDEOS E NA REPRODUÇÃO DO NEMATÓDEO *Caenorhabditis elegans*

AUTORA: Priscila Gubert

ORIENTADOR: Prof. Dr. Félix A. A. Soares

Local e data da defesa: Santa Maria, 24 de maio de 2016.

O metal de transição manganês (Mn) possui inúmeras propriedades fisiológicas, como por exemplo a sua atuação como cofator enzimático. No entanto, a exposição ambiental em excesso a este metal tem representado um fator pré-disponível à ocorrência de uma condição patológica designada manganismo e a alterações dopaminérgicas. Além disso, o Mn tem sido reportado por modificar o metabolismo de lipídios. No nematódeo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), a dopamina, alvo do manganês, cumpre papel na regulação nas reservas lipídicas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial tóxico do Mn sobre o acúmulo de lipídios, comportamento e as vias envolvidas nesse processo em *C. elegans*. Os vermes selvagens (N2) e transgênicos foram mantidos em condições padrão de crescimento até o estágio L4. A exposição ao MnCl₂ (15, 30 e 45 mM) ou NaCl (85 mM como controle) ocorreu por 4 h em meio líquido na presença da bactéria *E. coli* (OP50). Verificamos que o Mn aumentou o acúmulo de gordura nos vermes e reduziu a atividade metabólica. A sobrevivência dos animais foi reduzida (CL₅₀= 68.36 mM ± 5.683) bem como o batimento faríngeo. O Mn reduziu drasticamente os níveis de dopamina, sem alterar a morfologia dos neurônios da via dopaminérgica. Vimos ainda que os efeitos metabólicos podem estar relacionados a sinalização através de receptores dopaminérgicos, fator de transcrição SBP-1 e proteína quinase LET-363. Além disso, a vitelogênese e a produção de ovos foi reversivelmente reduzida pelo Mn no *C. elegans*, efeito este que pode estar associado à ativação do DAF-16 por este metal. Nossos resultados evidenciaram que o Mn altera, possivelmente de forma associada, o metabolismo de lipídios e a reprodução do *C. elegans*. A confirmação da relação entre os fenótipos encontrados após a exposição ao Mn e outros genes ainda não evidenciados poderão elucidar os mecanismos para as alterações metabólicas observadas.

Palavras-chave: Manganês; *Caenorhabditis elegans*; dopamina; metabolismo de lipídios; reprodução; vitelogeninas.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduation Program in Biological Science: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

MANGANESE INTERFERENCE ON LIPID METABOLISM AND REPRODUCTION OF THE NEMATODE *Caenorhabditis elegans*

Author: Priscila Gubert
Advisor: Professor Félix A. A. Soares, PhD.
Place and date of defense: Santa Maria, May 24, 2016.

The transition metal manganese (Mn) has many physiological properties such as its role as enzyme cofactor. However, excessive environmental exposure to this metal has represented a pre-factor to the occurrence of a pathological condition named manganism and dopaminergic changes. Moreover, Mn has been reported to modify lipid metabolism. In the *Caenorhabditis elegans* nematode (*C. elegans*), dopamine, a manganese target, plays a role in regulating the lipid reserves. This study aimed to evaluate the potential toxicity of Mn on the accumulation of lipids, behavior and pathways involved in this process in *C. elegans*. The wild-type worms (N2) and transgenics were maintained in standard growth conditions until the L4 larval stage. The exposure to MnCl₂ (15, 30 and 45 mM) and NaCl (85 mM as a control) occurred for 4 h in liquid medium in the presence of *E. coli* (OP50). We found that Mn increased fat accumulation in worms and reduced the metabolic activity. The survival of animals (LC₅₀ = 68.36 ± 5.683 mM) and the pharyngeal rate were decreased. The Mn drastically reduced dopamine levels without changing the morphology of the dopaminergic neurons. We have also seen that metabolic effects could be related to signaling through dopamine receptors, SBP-1 transcription factor and LET-363 protein kinase. Furthermore, vitellogenesis and egg production was reversibly decreased by Mn in *C. elegans*, an effect that could be associated with the activation of DAF-16 by this metal. Our results showed that the Mn changes lipid metabolism and reproduction of *C. elegans*, possibly in associated approach. The confirmation of the relationship between the phenotypes found after exposure to Mn and other genes not shown yet may elucidate the mechanisms for the observed metabolic changes.

Key words: Manganese; *Caenorhabditis elegans*; dopamine; lipid metabolism; reproduction; vitellogenin.

LISTA DE SIGLAS

5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
ADE	Neurônios deirídios anteriores
AKT	Proteína quinase B
C/EBP	Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT
CEP	Neurônios cefálicos
CMT	Mn tricarbonil ciclopentadienil
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta do AMP
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
FoxO	Fator de transcrição mamífero Forkhead box O
GABA	Ácido δ -aminobutírico
GFP	Proteína verde fluorescente
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>“high density lipoprotein”</i>)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>“low density lipoprotein”</i>)
MMT	Tricarbonil metilciclopentadienil
MnSOD	Mn superóxido-dismutase
NGM	Meio de crescimento para nematoides
NHR	Receptores nucleares de hormônios
O₂^{•-}	Radical superóxido
OA	Octopamina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDE	Neurônios pós-deirídios
PET-SCAN	Tomografia por emissão de pósitrons
PIP3	Fosfoinositol-trifosfato
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
QI	Quociente de inteligência
RNAi	RNA de interferência
SREBP	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao esteroi
TA	Tiramina
TGA	Triglicerídeos
TOR	Proteína alvo da rapamicina
VITs	Vitelogeninas

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1 Manganês.....	13
1.1.1 Importância fisiológica do Mn	15
1.1.2 Mn como indutor de toxicidade.....	15
1.2 O modelo experimental <i>Caenorhabditis elegans</i>.....	20
1.2.1 O nematoide <i>C. elegans</i> nas investigações da toxicidade do Mn	22
1.2.2 O metabolismo de lipídios no <i>C. elegans</i>	23
1.2.2 Vitelogeninas no transporte lipídico e na reprodução do <i>C. elegans</i> ..	27
1.2.3 Comportamentos e a sinalização de neurotransmissores no verme ...	29
2. Objetivos	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. Manuscrito 1: Metabolic effects of manganese in the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> through DAergic pathway and transcription factors activation.	32
4. Artigo 1: Reversible reprotoxic effects of manganese through DAF-16 transcription factor activation and vitellogenin downregulation in <i>Caenorhabditis elegans</i>.	58
5. Discussão.....	77
6. Conclusão	83
7. Perspectivas	83
8. Referências	84

1 Introdução

1.1 Manganês

O Mn é um micro-elemento essencial para o dinamismo fisiológico humano, especialmente no desenvolvimento e metabolismo. Sua ostensiva presença na crosta terrestre proporciona a exposição através de diversas fontes como alimentos, água e produtos industrializados que utilizam este metal como matéria prima para a sua produção (Avila *et al.*, 2016). O Mn é um metal de transição, apresenta coloração branca acinzentado e propriedades químicas semelhantes ao ferro (Fe). Tais semelhanças propiciam o compartilhamento de transportadores entre Fe e Mn, como a transferrina, e a captação intramitocondrial de Mn (Farina *et al.*, 2013).

O Mn não ocorre naturalmente na forma metálica, e sim como componente de mais inúmeros minerais, incluindo óxidos, sulfetos, carbonatos, silicatos, boratos e fosfatos. Entre eles, os mais comuns incluem pirolusita (dióxido de manganês), rodocrosita (carbonato de manganês), e rodonita (silicato de manganês) (OMS, 1999).

Dentre as fontes alimentares de Mn destacam-se os grãos, arroz, castanhas, açaí, frutos do mar e alimentos à base de soja (Avila *et al.*, 2016). Uma grande parte do Mn (95 – 99 %) proveniente da dieta não chega a ser absorvido pelo trato gastrointestinal, embora os mecanismos que regulam esta captação não estejam completamente compreendidos e, em alguns casos, altas concentrações são encontradas no fígado, rins, pâncreas e glândulas adrenais (SCF/CS/NUT/UPPLEV/21, 2000).

No meio ambiente, podemos encontrar este metal em inúmeras formas químicas incluindo onze estados de oxidação (Mn^{2+} , Mn^{3+} , Mn^{4+} , Mn^{6+} , Mn^{7+} , entre outros), sais (gluconatos e sulfatos) e quelatos (aspartato, fumarato e succinato). Já no corpo humano, este metal apresenta-se apenas nas formas Mn^{2+} e Mn^{3+} (Meco *et al.*, 1994; Avila *et al.*, 2016)).

No Brasil, o minério de Mn é um importante recurso natural, seja pelas significativas reservas existentes, seja pela sua utilização na produção de ferroligas e aço (Figura 1) (Sampaio *et al.*, 2002). O espectro de consumo expande-se ainda para a

produção de pilhas eletrolíticas, ligas especiais, cerâmicas, produtos químicos, etc. Dentre estes, o setor siderúrgico destaca-se por representar 85% da demanda por Mn a nível mundial (Costa e Figueredo, 2001).

Figura 1 – Distribuição de Mn no Brasil.



Fonte: Adaptado de Sampaio et. al., 2002.

Já sua forma orgânica, pode ser encontrada em pesticidas e fungicidas como o maneb e mancozeb (Meco *et al.*, 1994; Brody *et al.*, 2013). Dentre os orgânicos, destacam-se ainda o Mn tricarbonil metilciclopentadienil (MMT) e o Mn tricarbonil ciclopentadienil (CMT), ambos utilizados como aditivos para aumentar o nível de octanagem da gasolina (agente antidetonante) (Gulson *et al.*, 2006). Ainda, uma fonte recente tem sido reportada, a intoxicação por Mn em usuários da droga injetável metcatinona (efedrona) devido ao uso do permanganato de potássio na síntese de tal substância (Stepens *et al.*, 2008). O uso desta droga, denominada entre seus usuários

como “coquetel Russo”, tem gerado os sintomas característicos de manganismo (Guilarte, 2010)

Em humanos, a taxa de Mn no soro de indivíduos normais é 0.05–0.12 µg/dl (Crossgrove e Zheng, 2004).

1.1.1 Importância fisiológica do Mn

O Mn na fisiologia humana é considerado um metal essencial nas dinâmicas biológicas, principalmente na sua forma divalente (Mn^{2+}). Neste estado oxidativo, o Mn é transportado para o citoplasma celular e oxidado intracelularmente através de reações com superóxidos a um estado trivalente (Mn^{3+}), estado este que tem sido associado à citotoxicidade do Mn, especialmente relacionada à oxidação da DA e danos às células do sistema dopaminérgico (Archibald e Tyree, 1987; Farina *et al.*, 2013).

Dentre as inúmeras funções do Mn no organismo estão a síntese da protrombina na presença de vitamina K, enzimas glicosiltransferases, participando da síntese de mucopolissacarídeos das cartilagens e intervindo indiretamente na condrogênese e osteogênese (Phipps, 2002).

Além disso, o Mn é fundamental para o metabolismo do colesterol, crescimento corpóreo e reprodução. Sua deficiência acarreta alterações nas estruturas celulares e deformações específicas do esqueleto, associado por vezes ao excesso de cálcio, fosfato, Fe e carbonato, os quais limitam a absorção do Mn (Avila *et al.*, 2016).

Como cofator enzimático, o Mn é importante na biossíntese de ureia pela ligação à enzima arginase. Ainda destacam-se, a enzima piruvato-carboxilase, metaloproteína que está envolvida com a metabolização da glicose e a Mn Superóxido-Dismutase (MnSOD) mitocondrial, que participa do sistema de defesa do organismo contra os radicais livres, ambas apresentando o componente metálico Mn na sua constituição (Ali *et al.*, 1995).

A restrição ao Mn, seja por carências dietéticas ou defeituosa absorção, tem sido associada a danos no metabolismo de lipídios e carboidratos, má formação óssea e desenvolvimento fetal inadequado. Tais condições também estão relacionadas à redução na fertilidade e reprodução (Aschner *et al.*, 2005).

1.1.2 Mn como indutor de toxicidade

Por outro lado, diversos estudos já relacionaram a exposição a altos níveis de Mn, através da inalação, à alterações deletérias nos sistemas respiratórios e neurológicos (Crossgrove e Zheng, 2004; Aschner *et al.*, 2005).

Estudos recentes mostraram também que a exposição ao Mn pelas vias aéreas está associada a danos irreversíveis nas funções motoras e cognitivas de crianças e adolescentes (Riojas-Rodriguez *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2011; Lucchini *et al.*, 2012; Torres-Agustin *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2014; Menezes *et al.*, 2014). Bouchard e colaboradores avaliaram 362 crianças de Quebec, no Canada, e mostrou uma associação negativa entre a concentração de Mn na água consumida e o quociente de inteligência (QI), além de defasagem de memória, déficit de atenção e funções motoras prejudicadas (Bouchard *et al.*, 2011). No Brasil, já foram reportados altos níveis de Mn no ar próximo a um complexo industrial na Bahia e as crianças residentes neste local apresentaram QI e memória de trabalho inferior, evidenciando danos no circuito fronto-estriatal, região relacionada a este tipo de memória (Carvalho *et al.*, 2014).

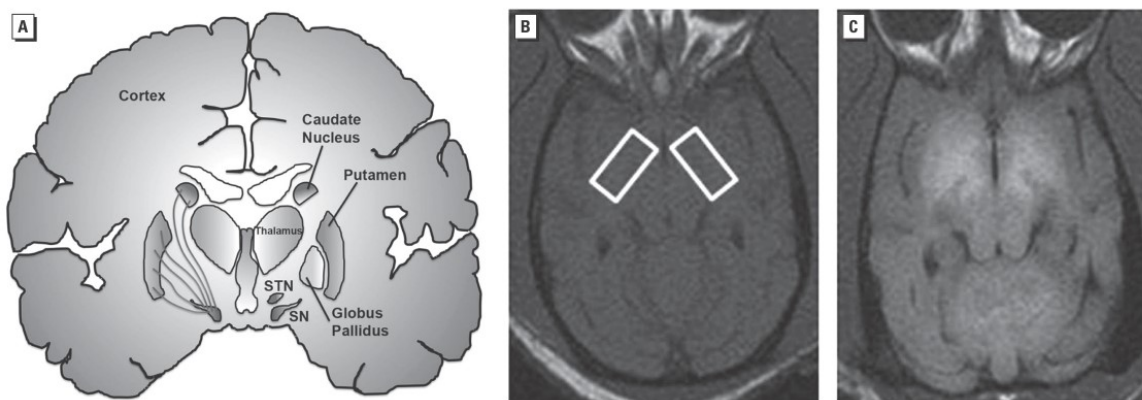
O Mn está presente em níveis elevados nas preparações dietéticas (nutrição parenteral), utilizadas inclusive por recém-nascidos, e indivíduos que recebem tais dietas estão mais suscetíveis ao acúmulo indevido desse metal, bem como, pacientes com disfunção hepática (Bertinet *et al.*, 2000; Aschner e Aschner, 2005; Aschner *et al.*, 2009)

Além disso, a exposição à altas concentrações de Mn está relacionada ao desenvolvimento de uma condição patológica denominada manganismo, cujos sintomas são semelhantes aos encontrados na Doença de Parkinson (DP) (Takeda, 2003). O desenvolvimento do manganismo tipicamente emerge da superexposição ocupacional a altos níveis de Mn nos fumos, *i.e.*, profissionais soldadores, mineiros, trabalhadores em fundições, entre outros. Em consequência disso, observa-se o aparecimento de sintomas que incluem redução do apetite, cefaleia, bradicinesia, tremores, insônia, baixos níveis energéticos, resposta rápida reduzida, déficits intelectuais e de memória, alucinação e alterações de humor (Mergler *et al.*, 1999; Pal *et al.*, 1999; Aschner *et al.*, 2005) Quando prolongada, esta exposição eventualmente ocasiona rigidez muscular, distonia e hipocinesia (Pal *et al.*, 1999).

A fisiopatologia da DP e os efeitos do Mn, por vezes dificultam o diagnóstico diferencial entre tais condições, pois os pacientes apresentam sintomas semelhantes. O

Mn especialmente acumula-se em algumas regiões encefálicas como núcleo caudado e putamen, globo pálido, substância negra e núcleo subtalâmico (Aschner *et al.*, 1999; Dobson *et al.*, 2004). O fator diferencial parece ser um dano mais pronunciado no globo pálido quando há a superexposição ao Mn, o que não se verifica no Parkinsonismo (Figura 2) (Verity, 1999; Guilarte, 2010). Cinco principais fatores ocorrem especificamente na intoxicação por Mn incluindo (a) tremores de repouso menos frequentes, (b) distonia mais pronunciada, (c) maior propensão à quedas de costas, (d) resposta falha ao tratamento com levodopa (precursor da DA normalmente recomendado ao pacientes com DP) e (e) falência em reduzir a captação de fluorodopa pela tomografia por emissão de pósitrons (PET-SCAN) (Calne *et al.*, 1994). Os indivíduos frente à exposição ao Mn, apesar de produzirem DA normalmente, apresentam limitações na liberação desse neurotransmissor, motivo pelo qual a L-dopa é pouco efetiva para o tratamento. Além disso, os comportamentos resultantes do manganismo estão muito mais relacionados à disfunção (problemas na liberação de DA) que propriamente do neurodegeneração do sistema dopaminérgico (Guilarte, 2010). No entanto, a severa redução do neurotransmissor DA está associada a ambas condições (Guilarte, 2010).

Figura 2 – Regiões cerebrais onde ocorre acúmulo de Mn (A), sendo que o globo pálido (B, evidenciação nos retângulos) é uma região onde esse metal preferencialmente se localiza (C). Fator este determinante para a diferenciação entre o manganismo e à Doença de Parkinson.



Fonte: Adaptado de Guilarte, 2010.

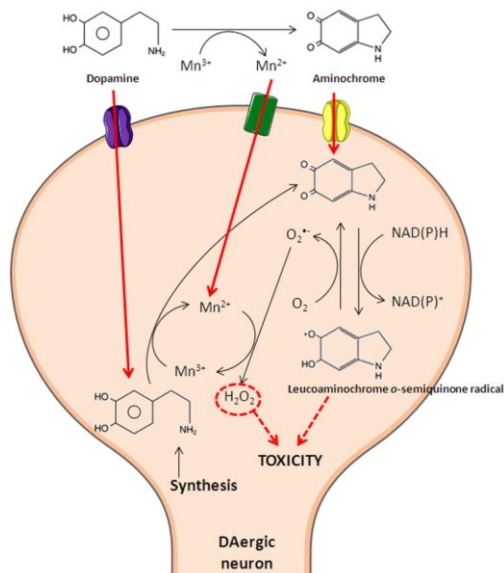
A fisiopatologia da toxicidade induzida por Mn fundamenta-se em algumas hipóteses, ainda não totalmente compreendidas. As disfunções nos comportamentos

controlados por DA e o acúmulo desse metal nas regiões cerebrais específicas de inervação dopaminérgica reforçam o seu possível papel nos mecanismos inerentes a toxicidade do Mn.

Uma das hipóteses baseia-se no aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela via da formação de DA-o-quinona durante a redução de Mn^{3+} para Mn^{2+} na reação redox (Figura 3). Esta quinona e as EROs podem culminar na indução de morte dos neurônios dopaminérgicos resultante da exposição ao Mn (Farina *et al.*, 2013). Os mecanismos referentes ao dano causado tanto pela semi-quinona quanto pelo aminocromo no processo neurodegenerativo induzido por Mn incluem: (a) depleção de NADH e NADPH, (b) inibição enzimática pela oxidação de grupos tióis ou aminoácidos essenciais, (c) formação de EROs e (d) peroxidação lipídica.

Dentro das células, o Mn acumula-se predominantemente nas mitocôndrias, especialmente como Mn^{2+} . Isso implica em alterações na respiração oxidativa, resultando em elevada produção de EROs e culminando em disfunção mitocondrial (Gunter e Pfeiffer, 1990; Gavin *et al.*, 1992). O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), exemplo de EROs, pode ainda formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela atuação na matriz mitocondrial da Mn-SOD, a qual apresenta Mn como seu cofator. Além disso, o Mn pode inibir diretamente a cadeia transportadora de elétrons, resultando na redução da produção de ATP, aumentando o escape de elétrons e a produção de $O_2^{\cdot-}$ (Farina *et al.*, 2013).

Figura 3 – Oxidação da DA induzida por Mn. O Mn catalisa a autooxidação da DA pelas reações redox (Mn^{2+} e Mn^{3+}) e gera EROs e o radical o-quinona ou catalisa a produção intraneuronal de H_2O_2 , consequentemente levando ao dano oxidativo nos neurônios dopaminérgicos.



Fonte: Adaptado de Farina et. al., 2013.

Um outro importante efeito decorrente do desequilíbrio nos níveis de Mn são as alterações no controle do metabolismo energético, já demonstrado em modelos animais como ratos e camundongos (Baly *et al.*, 1990).

O Mn tem sido há muitos anos relacionado ao desenvolvimento de aterosclerose e a exposição excessiva causou o aumento dos lipídios totais no plasma, fosfatidilcolina, colesterol, ésteres de colesterol, esfingomielina e triglicerídeos em bovinos (Jenkins e Kramer, 1991). Tal condição ainda gerou uma atividade insulino-mimética e aumentou na captação de glicose em adipócitos isolados de rato (Baquer *et al.*, 2003; Ueda *et al.*, 1984).

Recentemente, a exposição pré-natal ao Mn, ainda que em baixos níveis, foi associada à alta prevalência de neonatos com altos índices ponderais (Yu e Cao, 2013).

Por outro lado, a deficiência de Mn relaciona-se com redução no peso corporal, peso de órgãos como o fígado, proteínas plasmáticas totais, lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol e apolipoproteína E em ratos (Klimis-Tavantzis *et al.*, 1983; Kawano *et al.*, 1987). Além disso, Baly e colaboradores mostrou que adipócitos isolados de ratos com deficiência dietética de Mn apresentavam redução na síntese de triglicerídeos em comparação aos animais que receberam níveis adequados do metal (Baly *et al.*, 1990).

Legleiter e col. (2005) também verificaram alterações no metabolismo de lipídios em modelo bovino, sugerindo que a administração de altos níveis de Mn aos animais poderia ser uma boa estratégia para que os mesmos ganhassem peso mais rapidamente (Legleiter *et al.*, 2005).

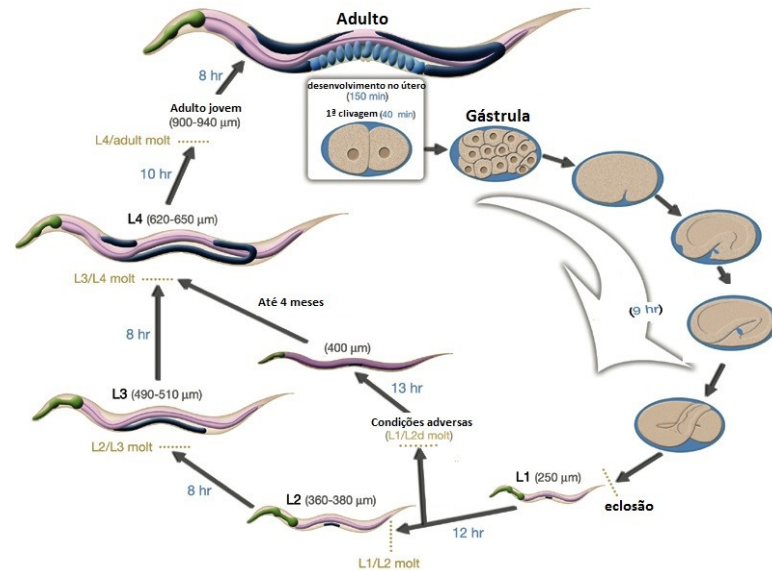
1.2 O modelo experimental *C. elegans*

A crescente limitação no uso de animais vertebrados para pesquisa e as dificuldades de controlar o consumo/gasto energético de um certo modelo instigou-nos a buscar novas possibilidades. A exemplo disso, o nematoide saprófita não patogênico *C. elegans*, proposto como um modelo experimental a partir de 1963 pelo pesquisador sul-africano Sydney Brenner, ganhou ênfase na comunidade científica em meados dos anos 2000 quando finalmente seu genoma foi sequenciado e identificou-se uma homologia de 60-80% aos genes humanos (Wood, 1988; Consortium, 1998; Kaletta e Hengartner, 2006). Este pequeno verme (aproximadamente 1 mm quando adulto) pode ser encontrado no solo em várias regiões do mundo e em laboratório, servindo como ferramenta para avaliações de aspectos genéticos, farmacológicos, toxicológicos, em biologia molecular, entre outros (Donald, 1997).

Sua crescente aplicação como modelo experimental alternativo deve-se às inúmeras vantagens como a facilidade de cultivo em laboratório a baixos custos, onde os mesmos são armazenados em placas de petri contendo meio de crescimento para nematoides (NGM) semeadas com a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) cepa OP50 como fonte nutricional.

Avaliações de influências na longevidade e desenvolvimento são comuns no *C. elegans*, uma vez que atingem a maturidade com 2,5 dias a 25° C e apresentam um tempo de vida curto, cerca de 20 dias na temperatura acima citada. O ciclo de vida do animal compreende a um período de desenvolvimento embrionário (dentro do ovo), quatro estágios larvais (L1; L2; L3 e L4) e finalmente o adulto (Figura 4) (<http://www.wormatlas.org/>).

Figura 4 – Ciclo de vida de *C. elegans* á 22 °C. O hermafrodita expelle o ovo que, após sua eclosão, passa por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta. Sob condições adversas, L1 pode entrar em “pausa”.



Fonte: Adaptado de: Wormatlas (2014).

O ciclo de vida deste organismo inicia-se como uma única célula, que dá origem, através de divisões celulares repetidas, há 558 células que formam o pequeno verme dentro do ovo. Após eclodir, divisões posteriores resultam no crescimento e na maturação sexual do verme podendo gerar duas formas sexuais: macho e hermafrodita. A forma macho representa uma pequena porção da população de cerca de 0,1 %. O processo reprodutivo compreende à autofecundação do verme hermafrodita ou pela fecundação cruzada com macho, fato que influencia diretamente na proporção de filhotes gerados (em geral 300 para a autofecundação e até mil decorrentes do cruzamento). Deste cruzamento, temos uma população resultante de 50 % de animais também na forma sexual macho (Hope, 1999)

Em condições adversas, tais como: escassez de alimento, estresse oxidativo e temperatura inadequada, a larva L1 do *C. elegans* pode entrar em um estágio alternativo de “pausa” chamado larva *dauer*. Neste estado, os animais minimizam expressivamente a atividade metabólica e tornam-se altamente resistentes ao estresse, com capacidade de sobreviver por longos períodos de várias semanas até meses (Figura 4 (<http://www.wormatlas.org/>)).

Além disso, o *C. elegans* apresenta um pequeno número de células (959 células no hermafrodita e 1031 nos machos) e a sua transparência possibilita a visualização da

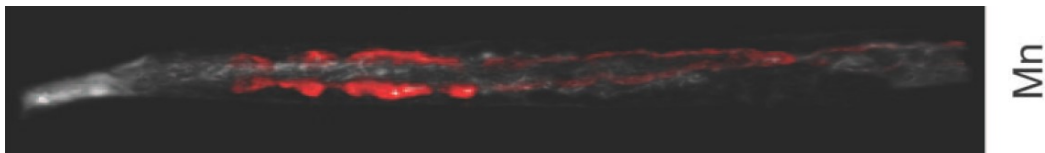
organização anatômica interna e aquisição de imagens frente à marcação fluorescente de determinadas biomoléculas.

Os estudos relacionados à genética desse nematoide são os mais expressivos em números e fomentam o desenvolvimento de inúmeras cepas transgênicas, aplicadas na verificação do papel de determinados genes em uma expressão de fenótipo diferenciado, na regulação de vias metabólicas, de reprodução, inclusão de genes codificadores de proteínas fluorescentes para visualização de neurônios específicos, inclusão de genes de proteínas (β -amiloide) para o desenvolvimento de modelo experimental para doenças humanas, entre outros (Wu e Luo, 2005).

1.2.1 O nematoide *C. elegans* nas investigações da toxicidade do Mn

O Mn como um xenobiótico já foi previamente avaliado no modelo experimental *C. elegans*. O Mn acumula-se, em condições padrão de cultivo, próximo aos primeiros pares de células intestinais, cuja concentração foi estimada em 38 μ M. O questionamento de como o verme consegue manter uma alta concentração desse metal nas células, sem gerar toxicidade ainda permanece sem uma resposta conclusiva (Figura 7) (McColl *et al.*, 2012).

Figura 7 – Localização do metal Mn no verme *C. elegans* por tomografia elemental (*Scanning x-ray Fluorescence Tomography*).



Fonte: Adaptado de McColl *et al.*, 2012.

As proteínas envolvidas com a captação do Mn e as vias relacionadas à toxicidade deste metal estão presentes no *C. elegans*, *i.e.*, a família de transportadores de metais NRAMP/DMT (Au *et al.*, 2009).

Dentre os efeitos tóxicos observados estão a indução de formação de EROs no verme e reduzir o tempo de vida do verme quando exposto no estágio larval L1 (Benedetto *et al.*, 2010; Wollenhaupt *et al.*, 2014). Além disso, foi capaz de aumentar os níveis proteicos de DAF-16, superóxido dismutase e proteína quinase B (AKT) (Avila *et*

al., 2016). O fungicida Mancozeb, que contém Mn na sua composição, foi associado à redução da postura de ovos em *C. elegans* (Brody *et al.*, 2013). Somado a isso, exposições prolongadas ao Mn estão associadas a déficits no desenvolvimento e reprodução, provavelmente gerados pelo dano oxidativo induzido por este metal (Xiao *et al.*, 2009).

Benedetto e col. compararam a neurotoxicidade induzida por Mn em vários tipos neuronais do verme, dentre estes: dopaminérgicos, gabaérgicos, colinérgicos e neurônios quimiosensoriais. A neurodegeneração foi apenas observada nos neurônios dopaminérgicos e tal efeito foi dependente do transportador de DA, DAT-1 (Benedetto *et al.*, 2010).

1.2.2 O metabolismo de lipídios no *C. elegans*

Dado o número de fatores que convergem associadamente para armazenamento e consumo de energia, faz-se necessário a compreensão do processo de absorção de nutrientes, armazenamento, sua distribuição e regulação. Tais informações são altamente relevantes uma vez que o desequilíbrio em qualquer passo da via metabólica pode tornar-se incisivo no desencadeamento de distúrbios metabólicos, tais como diabetes, obesidade, aterosclerose e envelhecimento acelerado. A obesidade ou ganho excessivo de peso é uma questão de grande preocupação, pois grande parte do aumento desta condição é impulsionado por alterações na captação de nutrientes, na sua distribuição e forma de acúmulo (Hashmi *et al.*, 2013).

A obesidade, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), define-se pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, a qual pode acarretar inúmeros danos à saúde dos indivíduos (WHO, 2015). No Brasil, a prevalência de sobrepeso já acomete cerca de 50 % da população (IBGE, 2010; Malta *et al.*, 2014). A obesidade nas capitais brasileiras, em 2013, já chegava a 17,5 % (Malta *et al.*, 2014). Várias são as hipóteses que fomentam as explicações para o crescimento mundial da obesidade, desde fatores econômicos, sociais, mudanças de hábitos e fatores biológicos (Walts *et al.*, 2008; Malta *et al.*, 2014).

Dentre as inúmeras vantagens do modelo *C. elegans*, certamente a conservação das vias do metabolismo lipídico amplia demasiadamente a viabilidade de estudos considerando substâncias que venham a alterar a dinâmica dessas vias (Walts *et al.*, 2008).

Faz-se necessário, no entanto, evidenciar algumas das diferenças encontradas no verme, assim como em outros modelos experimentais. O *C. elegans*, não apresenta um tecido funcionalmente direcionado para o acúmulo dos lipídios. Os mesmos são depositados na forma de triglicerídeos (TGA) em gotículas lipídicas localizadas nas células intestinais (o intestino vem sendo também denominado víscera, uma vez que não exerce apenas a função intestinal), hipoderme (camada celular localizada abaixo da cutícula) e gônadas.

Como os mamíferos, o verme também adquire gordura para reserva através da nutrição e da biossíntese de lipídeos. Entre os lipídios sintetizados pelo verme estão ácidos graxos poli-insaturados, ácidos graxos de cadeia ramificada (monometil), ceramidas, fosfolipídios, lipoproteínas e transportadores (Zhang *et al.*, 2013). Todavia, o *C. elegans* não realiza a síntese de colesterol, necessitando de suplementação exógena quando cultivado em laboratório (Kurzchalia e Ward, 2003).

O verme apresenta um percentual elevado de genes relacionados ao metabolismo de lipídios e ortólogos aos genes humanos, aproximadamente 72 %. Substancialmente maior que o observado em outros modelos invertebrados como *Drosophila melanogaster*, cerca de 58 % (Zhang *et al.*, 2013). Apesar dos inúmeros mapeamentos genéticos apontando genes provavelmente relacionados ao metabolismo de lipídios, apenas uma pequena parte tem sido caracterizada bioquimicamente quanto a sua efetiva função no nematoide (Zhang *et al.*, 2013).

Outra grande discussão no meio científico gira em torno da utilização de marcadores para evidenciar e quantificar as reservas lipídicas no verme. Muitos são as possibilidades de marcadores já bastante estabelecidas, como *Nile red*, *BODIPY*, *Oil red O*, entre outros. Alguns já foram descartados devido à atuação *per se* na regulação do acúmulo lipídico, como por exemplo os marcadores *Quantum dots* (Wu *et al.*, 2016). Alguns trabalhos têm mostrado que as marcações fluorescentes por *Nile red* não são eficientes para a verificação da maioria das gotículas lipídicas de acúmulo, ao passo que o método de marcação por *Oil red O*, pós fixação, é mais eficaz para evidenciar tais acúmulos (O'Rourke *et al.*, 2009).

Em relação ao aproveitamento dos lipídios provenientes da dieta, o verme apresenta células intestinais do tipo epitelial colunar polarizada, com a membrana apical voltada para o lúmen intestinal responsáveis pela secreção de lipases e peptidases

digestivas, além de apresentarem superfície rica em microvilosidades que contribuem para a absorção de nutrientes (Mullaney e Ashrafi, 2009). Em especial, o transporte de lipídios para o interior das células do verme pode ocorrer tanto através de difusão pela membrana celular quanto por transporte ativo (Watts, 2009).

Além disso, o *C. elegans*, diferentemente dos mamíferos, é capaz de sintetizar ácido linoleico (18:2n6) e linolênico (18:3n3) (Watts, 2009).

Uma das principais formas de fornecimento de energia no verme, o catabolismo de ácidos graxos, ocorre nas mitocôndrias e peroxissomos (Reddy e Hashimoto, 2001). Relacionado a este processo, o verme conserva genes codificadores de enzimas lipases, algumas das quais o papel metabólico já foi esclarecido (K08B12.1, ATGL-1, K04A8.5, HOSL-1, LIPS-7, FIL-1, FIL-2, e F01G10.7) (Elle *et al.*, 2010).

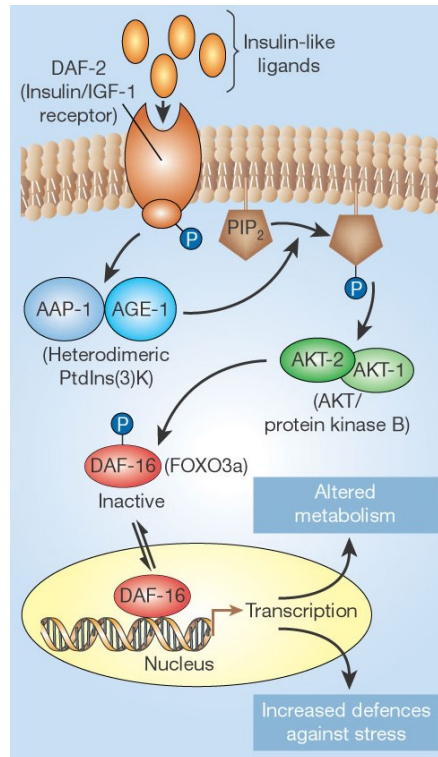
Além da ingesta alimentar e a influência da atividade comportamental sobre o gasto energético, o nematoide apresenta um sistema endógeno de controle da dinâmica de acúmulo lipídico.

Muitos trabalhos têm procurado demonstrar que a regulação do perfil lipídico no *C. elegans* dá-se por intermédio de alguns genes, bem como por influência neuroendócrina (Elle *et al.*, 2008). Ashrafi e col. (2003), após *screening* com RNA de interferência, identificaram 305 genes relacionados à redução dos depósitos de gordura e 112 gerando aumento do acúmulo lipídico após redução da expressão gênica (Ashrafi *et al.*, 2003). Recentemente, um novo *screening* com RNA de interferência utilizando o método de quantificação de lipídios sem marcação através de espalhamento Raman estimulado detectou novos genes responsáveis pelo controle de acúmulo lipídico (Wang *et al.*, 2011).

Um dos genes identificados como responsável pelo controle lipídico no *C. elegans* é o fator de crescimento semelhante à insulina (*insulin/IGF-I like*). Frente a condições ambientais propícias ao crescimento e reprodução, o receptor de insulina (DAF-2) é ativado por ligantes insulina-*like*; isto ativa a enzima *fosfoinositol-3-quinase* (AGE-1) que gera fosfoinositol-trifosfato (PIP3) e recruta *AKT-1*, *AKT-2*, *SGK-1* e *PDK-1* para a membrana plasmática. Por fim, esta cascata de fosforilações ocasiona a fosforilação e inativação por sequestro citoplasmático de DAF-16, ortólogo do fator de transcrição "*Forkhead*" da família da FoxO, impedindo a transcrição de genes sob seu controle

(Figura 5) (Dorman *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997; Paradis e Ruvkun, 1998; Nemoto e Finkel, 2004; Lin *et al.*, 2005; Gami *et al.*, 2006).

Figura 5 – Via de sinalização do fator de transcrição DAF-16 em *C. elegans*.



Fonte: Adaptado de Nemoto & Toren Finkel, 2004.

Estudos demonstram que frente a uma perda genética ou não atividade do DAF-2 (situação em que há ativação nuclear do DAF-16), ocorre um aumento no acúmulo lipídico em vermes no estágio larval L4, o que se deve ao aumento na síntese *de novo* e na captação de ácidos graxos (Kimura *et al.*, 1997; Perez e Van Gilst, 2008). Na larva *dauer*, o fator de transcrição DAF-16, quando ativado, induz acúmulo de gordura e suprime a lipólise; fenótipo este observado também na restrição alimentar ((Ashrafi *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003; Narbonne e Roy, 2009).

O acúmulo e utilização da gordura no *C. elegans* é dependente também da proteína ativada por AMP, fatores de transcrição como a proteína de ligação ao elemento de resposta ao esteroide (SREBP), proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBP), fator de transcrição *Krüppel-like* e proteína ligante ao elemento de resposta do AMP (CREB) (Long *et al.*, 2002; Mckay *et al.*, 2003; Apfeld *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2004; Yang

et al., 2006; Jones *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). A mutação no gene *let-363* causou o aumento nas reservas lipídicas do verme (Jones *et al.*, 2009). Aliado a isso, a família dos receptores nucleares de hormônios (NHR) também está relacionada ao metabolismo de lípidos, já que a redução da expressão ou deleção do gene *nhr-49* relaciona-se a elevação da quantidade de gordura estocada no animal (Ashrafi *et al.*, 2003; Van Gilst *et al.*, 2005)

O controle exercido por neurotransmissores como serotonina (5-HT) e DA também é apontado como fator regulador das reservas lipídicas no verme (Ashrafi *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2014).

No *C. elegans*, a liberação de 5-HT ativa receptores serotoninérgicos acoplados a proteína G. Estudos demonstram que vermes incapazes de sintetizar este neurotransmissor por prejuízo na função de *tph-1* apresentam reduzida taxa de alimentação e acúmulo lipídico (Sze *et al.*, 2000; Ashrafi *et al.*, 2003). Por outro lado, vermes expostos exogenamente à DA apresentaram redução das reservas lipídicas, principalmente devido à regulação por este neurotransmissor na β -oxidação (Barros *et al.*, 2014). Sendo assim, 5-HT e DA parecem ter efeitos antagônicos na sinalização do acúmulo lipídico.

O Mn já foi associado à destruição dos neurônios dopaminérgicos em *C. elegans* (Benedetto *et al.*, 2010) e este fato nos levou a hipotetizar se tal efeito poderia gerar alterações nas reservas lipídicas, uma vez que o controle do acúmulo lipídico dá-se também pela via dopaminérgica no verme.

1.2.3 Vitelogeninas no transporte lipídico e na reprodução do *C. elegans*

Uma das prováveis consequências da inefetividade do transporte de lipídios para a formação do vitelo é o prejuízo dos processos reprodutivos no *C. elegans*. Em relação à utilização e localização das reservas de gordura, o transporte exerce papel fundamental nesta relação.

O *C. elegans*, assim como muitas espécies de ovíparos, apresenta proteínas do vitelo ou vitelogeninas (VITs) e seus lipídios associados, as quais são importantes fontes nutricionais para o desenvolvimento dos embriões (Fagotto, 1995). Dentre elas, destacam-se YP170, YP115 e YP88. Seis genes são responsáveis pela codificação das VITs no *C. elegans*, sendo que *vit-1*, *-2*, *-3*, *-4* e *-5*, contribuem para a formação da YP170,

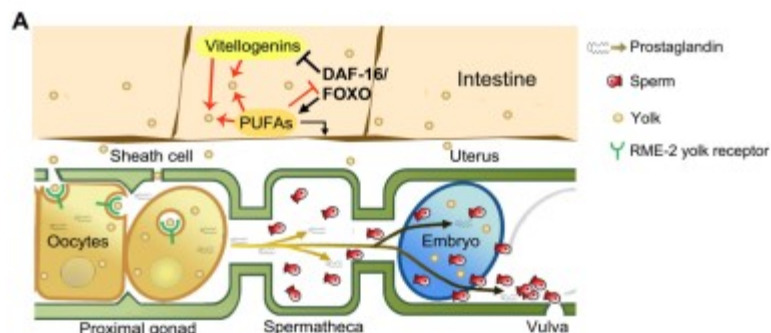
a principal proteína do vitelo. Já as proteínas YP115 e YP88 são codificadas pelo gene *vit-6*.

Apesar do verme não apresentar as lipoproteínas humanas, as VITs do *C. elegans* são homólogas da ApoB-100 humana, importante componente da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Baker, 1988; Spieth *et al.*, 1991), e assim como ApoB-100, elas medeiam o transporte de colesterol (Matyash *et al.*, 2001).

A síntese das VITs YP170, YP115 e YP88 ocorre nas células intestinais do hermafrodita a partir do estágio larval L4 e secretadas na cavidade corporal (Kimble e Sharrock, 1983). Em seguida, são internalizada nos oócitos maduros via receptor-mediado por endocitose do receptor RME-2/LDL que localiza-se em vesículas (Grant e Hirsh, 1999). As VITS são importantes fontes de lipídios para a formação do embrião, especialmente devido ao transporte de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) para o embrião (Edmonds *et al.*, 2010; Depina *et al.*, 2011; Van Rompay *et al.*, 2015).

Vários fatores têm sido associados à regulação da expressão das VITs em *C. elegans*, como condições de estresse, exposição à metais pesados (cádmio), hormônios e fatores de transcrição como o DAF-16 (Novillo *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2012). Sabe-se que ambos genes *vit-2* e *vit-5* têm a expressão reduzida nos vermes *knockdown* para *daf-2* e expressão aumentada nos vermes *knockdown* para *daf-16* (Figura 6) (Murphy *et al.*, 2003; Edmonds *et al.*, 2010).

Figura 6 - DAF-16 promove a biossíntese intestinal de PUFAs devido ao aumento da expressão de genes de gordura e inibição da formação do complexo de lipoproteínas formadoras do vitelo, necessárias para o transporte de tais lipídios para os oócitos.



Fonte: Adaptada de Edmonds *et al.*, 2010.

Existem várias evidências que a exposição a alguns metais pode gerar defeitos na reprodução do verme, cujos ovos acabam por acumular-se no interior dos nematódeos e alguns efeitos tóxicos podem ser inclusive observados na prole de vermes progenitores previamente expostos (Wang e Yang, 2007; Wang e Wang, 2008). O cloreto de mercúrio (HgCl_2) em certas concentrações é um dos metais que estão relacionados à redução do tamanho da prole e alteração no tempo de maturidade sexual dos vermes (Guo *et al.*, 2009).

1.2.4 Comportamentos e a sinalização de neurotransmissores no verme

O *C. elegans* apresenta inúmeros fenótipos comportamentais, principalmente evidenciados frente a modificações genéticas (*knockout* e *knockdown*), indução de toxicidade, condições de estresse e alterações na sinalização neuronal (Kaletta e Hengartner, 2006). De todos os sistemas, o mais complexo e excepcionalmente bem definido é o neuronal no qual 302 células (os machos possuem 89 células neurais adicionais) estão envolvidas em cerca de 5.000 sinapses e determinam diversos comportamentos. O verme utiliza pequenas moléculas neurotransmissoras como acetilcolina (ACh), ácido δ -aminobutírico (GABA), óxido nítrico (NO), glutamato e as aminas biogênicas octopamina (OA), tiramina (TA), 5-HT e DA (Brownlee e Walker, 1999).

O estímulo para a ovoposição e batimento faríngeo ocorrem principalmente por influência da 5-HT (Horvitz *et al.*, 1982). A contagem das pulsações faríngeas são observadas quando o nematoide *C. elegans* encontra-se sobre a bactéria fazendo a ingesta da mesma, sendo que a verificação de tal comportamento pode ser representativo da taxa de alimentação deste verme (Avery e You, 2012). Como já mencionado, a 5-HT também cumpre importante papel regulatório sobre o metabolismo. Já a OA, equivalente da noradrenalina nos vermes, quando exogenamente administrada causa alterações na locomoção e reduz o batimento faríngeo, ovoposição e defecação (Horvitz *et al.*, 1982). A TA pode reverter, quando administrada exogenamente, o aumento dos batimentos faríngeos induzidos pela 5-HT, além de diminuir a ovoposição e influenciar no movimento exploratório (Alkema *et al.*, 2005).

A DA, por sua vez, modula a plasticidade comportamental pelo controle da área de movimento exploratório, bem como, da frequência em que os vermes retornam para

a o local onde está a bactéria após entrarem em uma região da placa desprovida de alimento (Hills *et al.*, 2004). A DA também inibe a locomoção e a ovoposição, além de reduzir o acúmulo lipídico (Horvitz *et al.*, 1982; Barros *et al.*, 2014). O sistema dopaminérgico do verme é composto por oito neurônios, incluindo um par de neurônios deirídios anteriores (ADE) e dois pares de neurônios cefálicos (CEP) ambos localizados na cabeça, além de um par de neurônios pós-deirídios (PDE) na cauda. Os machos ainda apresentam neurônios dopaminérgicos adicionais na cauda. Tais neurônios podem ser facilmente visualizados pela expressão de $P_{dat-1}::GFP$, que direciona especificamente a expressão de proteína verde fluorescente (GFP) nos neurônios dopaminérgicos.

Até o momento, foram identificados cinco receptores dopaminérgicos no *C. elegans*, sendo quatro ortólogos a receptores em mamíferos: DOP-1, DOP-2, DOP-3, DOP-4 e LGC-53 (Chase e Koelle, 2007; Ringstad *et al.*, 2009). Estudos mais recentes têm apresentado o gene *dop-5* como possível codificador de receptor dopaminérgico (www.wormbase.org). Além disso, o gene *Cat-2* codifica a proteína responsável pela formação do L-DOPA a partir do aminoácido tirosina, sendo essa enzima ortóloga da tirosina hidroxilase em mamíferos. O gene *cat-1* codifica a proteína responsável pelo transporte de DA do citosol para vesículas sinápticas. O sistema dopaminérgico também é composto por um transportador de DA, codificado pelo gene *dat-1*, responsável pela redução da concentração de DA na fenda sináptica sinalizando o término da transmissão dopaminérgica no verme (Nass *et al.*, 2002).

Quando os mesmos sofrem processo de neurodegeneração ou prejuízo no neurodesenvolvimento, observam-se *punctas* (rarefações na fluorescência nos prolongamentos neuronais), retração no corpo neuronal, perda nos dendritos e corpo celular nos 4 CEPs e 2 ADEs no hermafrodita (Chen *et al.*, 2015).

Uma vez que o Mn interfere no sistema dopaminérgico do *C. elegans*, sistema este responsável pelo controle da plasticidade lipídica, instigamo-nos a investigar se o referido metal poderia também alterar o acúmulo de lipídios, o comportamento reprodutivo e a viabilidade neuronal.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Verificar os efeitos do Mn sobre o acúmulo de lipídios, comportamento e as vias envolvidas nesse processo em *C. elegans*.

2.2 Objetivos específicos:

- 2.2.1 Determinar os efeitos do cloreto de Mn (MnCl_2) sobre o acúmulo de lipídios no verme e as vias envolvidas na sua regulação.
- 2.2.2 Avaliar a atuação do MnCl_2 sobre a reprodução do *C. elegans* e na vitelogenese.
- 2.2.3 Verificar o papel do MnCl_2 na expressão de genes envolvidos no controle da reprodução no verme.

3. Manustrito 1:

Este manuscrito foi submetido à revista *Toxicology research* e aguarda em processo de revisão.

Metabolic effects of manganese in the nematode *Caenorhabditis elegans* through DAergic pathway and transcription factors activation.

Priscila Gubert ¹, Bruna Puntel ¹, Tassia Lehmen ¹, Joshua P. Fessel ², Pan Cheng ³, Lucas S. Trindade ⁴, Julia Bornhorst ⁵, Daiana S. Avila ⁶, Michael Aschner ³, Felix A. A. Soares ¹

1 Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

2 Division of Allergy, Pulmonary and Critical Care Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, USA.

3 Department of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461, USA.

4 Department of Biological Science, Tokyo Metropolitan University, Hachioji-Shi, Tokyo, Japan.

5 Institute of Nutritional Sciences, University of Potsdam, Arthur-Scheunert-Allee 114-166, 14558 Nuthetal, Germany.

6 Laboratório do Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCe), Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Uruguaiana, RS, Brazil.

*Corresponding author:

Félix Alexandre Antunes Soares-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-CCNE Universidade Federal de Santa Maria-97105-900-Santa Maria-RS-Brazil.

Phone: +55-55-3220-9522. Fax: +55-55-3220-8978. E-mail: felix@ufsm.br

Abstract

Manganese (Mn) is an essential trace element for physiological functions since it acts as an enzymatic co-factor. Nevertheless, overexposure to Mn has been associated with a pathologic condition called manganism. Furthermore, Mn has been reported to affect lipid metabolism by mechanisms which have yet to be established. Herein, we used the nematode *Caenorhabditis elegans* to examine Mn's effects on the dopaminergic (DAergic) system and determine which transcription factors that regulate with lipid metabolism are affected by it. Worms were exposed to Mn for four hours in the presence of bacteria and in a liquid medium (85 mM NaCl). Mn increased fat storage as evidenced both by Nile Red fluorescence and Oil Red O lipid assays, concomitantly increasing triglyceride levels. In addition, metabolic activity was reduced as a reflection of decreased oxygen consumption caused by Mn. In addition, Mn affected feeding behavior as evidenced by decreased pharyngeal pumping rate. DAergic neurons viability were not altered by Mn, however the dopamine levels were significantly reduced following Mn exposure. Furthermore, the expression of *sbp-1* transcription factor and *let-363* protein kinase responsible for lipid accumulation control was increased and decreased, respectively, by Mn. Altogether, our data suggest that Mn increases the fat storage in *C. elegans*, secondary to DAergic system alterations, under the control of SBP-1 and LET-363 proteins.

1. Introduction

Manganese (Mn) is a crucial metal since it acts as a cofactor for many enzymes, including glutamine synthetase, calmoduline-dependent phosphatase, and mitochondrial superoxide dismutase¹. Although Mn intake is essential for maintaining physiological functions, exposure to high levels of this metal may lead to dopaminergic (DAergic) neuronal loss accompanied by the development of a debilitating neurological syndrome called manganism, resembling Parkinson's disease (PD)². Furthermore, Mn can also interfere with lipid and carbohydrate metabolism in cattle and rodent models^{3,4}

Mn deficiency decreased the low density lipoprotein (LDL) cholesterol concentration in the hypercholesterolemic RICO rats⁵. However, overexposure to Mn is more frequent than deficiency cases. In humans, prenatal Mn exposure, even at a low levels, is associated with a higher prevalence of a neonatal high ponderal index⁶. Nevertheless, the molecular mechanisms associated with Mn's effects on lipid metabolism are not fully understood. In this context, the nematode *Caenorhabditis elegans* provides an interesting tool for monitoring lipid content and some behaviors which directly interfere with energetic homeostasis. *C. elegans* does not contain specialized adipocytes, however it is able to accumulate lipids as triglycerides (TG), into the intestinal cells and hypodermis, analogous to mammalian body fat⁷. The energy provided by lipid β -oxidation can be used as source for hormonal synthesis and can be transported by the vitellogenin lipoproteins (VIT) to the worm gonads for the developing embryos. *C. elegans* conserves its energy balance through numerous physiological systems that include neuroendocrine signaling, accumulating, mobilizing and using energy stores⁸.

Notably, the DAergic system is associated with the control of fat storage in the worm by regulating the fat content⁹. The susceptibility of the DAergic system to Mn is also evident in the nematode, since it causes neuronal development injury, predominantly in animals treated at the L1 larval stage¹⁰. In addition, Mn has been reported by our group

to impair VIT expression levels and transport efficiency during the critical L4 larval stage, as well as reversibly impairing the reproduction of *C. elegans*¹¹. Considering this data, we hypothesized that Mn may interfere with lipid accumulation in the worm by altering the DAergic pathway.

2. Materials and Methods

2.1 Worms and culture

C. elegans strains were handled and maintained at 20°C on nematode growth medium (NGM) fed with OP50 *Escherichia coli*¹². The following strains were used: N2 wild type, *Pdat-1::GFP* (*egls1*), *dop-1(vs100)*; *dop-3(vs106)*, *dop-3(vs106)*, *dop-2(vs105)*; *dop-3(vs106)*, *dop-1(vs100)*, *dop-2(vs105)*; *dop-1(vs100) dop-3(vs106)*, *dop-2(vs105)*; *dop-1(vs100)*, *dop-1(vs100)*; *dop-2(vs105)*; *dop-3(vs106)*; *dop-4(ok1321)*; *dop-1(vs100)*; *dop-4(ok1321)*, *lgc-53(n4330)*, *dop-4* (*ok1321*). All strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC, University of Minnesota).

2.2 Preparation of $MnCl_2$

In order to prevent oxidation, fresh $MnCl_2$ (>99.995% purity) (Sigma-Aldrich) stock solutions were prepared in 85 mM NaCl shortly before each experiment.

2.3 Manganese exposure

Synchronized worms (wild-type or transgenic strains) were grown to the L4 larval stage on solid NGM. Next, worms were transferred to a liquid medium and exposed to 4 h at the larval stage L4 to NaCl (85 mM as a control) or manganese chloride ($MnCl_2$) at various concentrations in presence of bacteria (OD_{600} of approximately 1.0, freshly concentrated three times by speeding at 3,000 rpm for 10 min). Then, worms were washed for at least 4 times with NaCl (85 mM) and conducted in each of the performed assays (see below).

2.4 Lipid Analysis

C. elegans L4 larval stage fat content was visualized/quantified by the lipid-staining dye Nile Red as previously described¹³. Fluorescence was captured with an Olympus IX81 Inverted Microscope at 40x magnification and ImageJ quantification software to quantify the optical densitometry in the first intestinal cells (Z stacks, 2.5 μm of distance). Approximately 25 worms were visualized in each group and the experiments were independently repeated on 5 different days. For Oil red O staining, 2,000 L4 worms per group were fixed in 1% formaldehyde for 10 minutes and stained with 60% Oil red O solution. Next, they were washed in 1 x PBS, and the stained worms were observed and images were acquired.

2.5 DAergic neuron viability

After the exposure, at least thirty *dat-1::GFP* worms were mounted on 2% agarose pads and anaesthetized with 50 mM sodium azide in M9 buffer. Fluorescence observations were obtained with an Olympus FV10i Laser Scanning Confocal Microscope. Longitudinal optical slices were acquired (2.5 μm of distance, ~17 slices by worm) for ~10 worms per group. The eight DAergic neurons were visualized, and the presence of a cell body and dendritic morphology qualitatively observed. Experiments were performed independently five times in distinct days.

2.6 TG quantification

Triglyceride (TG) content was determined after Mn exposure with a commercially available kit (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's recommendations¹⁴. Worms were extensively washed in 85 mM NaCl to eliminate any bacterial content. Absorbance was measured with a Beckman spectrophotometer at 540 nm. All calculated triglyceride concentrations were normalized to protein concentrations. Ten thousand worms were used in each group and the experiments were independently performed on four distinct days.

2.7 Survival

Worms were collected after the exposure and transferred to new NGM plates (~25 worms by plate). Survival was assessed for the next 24 h. Each one of the five experiments was independently performed in triplicate.

2.8 Oxygen consumption

Oxygen consumption rates were measured with the Oroboros O2k Oxygraph after Mn exposure (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Worms were extensively washed in 85 mM NaCl and re-suspended in M9 buffer. Worms (300) suspended in M9 were introduced into the Oxygraph chamber containing 2 ml of M9 buffer, maintained at 20°C¹⁵. Oxygen consumption was measured for a minimum of 15 min. The slopes of the linear portions of the plots were used to calculate oxygen consumption rates. All measurements were independently performed for at least four times and results were expressed as pmol O₂/second/100 worms.

2.9 Behavioral tests

Following Mn exposure, worms were transferred to new NGM plates with bacteria and allowed to settle for 30 min. Animals were tested for pharyngeal pumping for 10 s (3 x), and the time of three defecation cycles was quantified¹⁶. Body-bend assay were observed after 30 min as a movement representative behavior. After one min of adaptation over a NGM plate without bacteria, worms were scored for the number of body bends performed in a 60-s time interval. A body bend was defined as a direction change of propagation of the posterior pharynx bulb along the y-axis, when the worm was traveling along the x-axis¹⁷. Ten worms were observed in three independent experiments at 22 ± 2°C.

2.10 Dopamine Levels

L4 larval stage animals treated for 4 h with MnCl₂ were intensively washed with 85 mM NaCl. Samples were collected in M9 buffer and frozen immediately. HPLC analysis was performed by the Neurochemistry Core facility at Vanderbilt University's Center for

Molecular Neuroscience. Each strain was tested at least four times and the results corrected by protein content¹⁸.

2.11 TaqMan gene expression assay

Total RNA was isolated via the Trizol method. Briefly, after Mn exposure, 1 mL of Trizol (Life Technologies) was added to each tube containing washed worms re-suspended in 100 μ L 85 mM NaCl, followed by three cycles of freezing in liquid nitrogen and thawing at 37 °C. Next, 200 μ L of chloroform was added to each tube, followed by precipitation using isopropanol and washing with 75% ethanol. Following the isolation procedure, 1 μ g total RNA was used for cDNA synthesis as recommended in the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). cDNA samples were kept at 4°C. Quantitative real-time PCR (BioRad) was conducted in duplicate wells using TaqMan Gene Expression Assay probes (Life Technologies) for each gene, using the *ama-1* (RNA polymerase II) housekeeping gene for normalization after determining the fold difference using the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method¹⁹. The following probes were used: *nhr-49*: Ce02412669_g1; *sbp-1*: Ce02453001_g1; *let-363*: Ce02417498_g1.

2.12 Statistics

All graphics and statistics carried out using GraphPad Prism 5. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test or Student's t-test were used for group comparisons. $P < 0.05$ was deemed to represent statistically significant difference between the groups.

3. Results

3.1 Mn's effect on lipid accumulation in *C. elegans*

We tested Mn's effects on lipid accumulation with the vital label Nile Red, fixative label Oil Red O and TG levels (1C and 1D). Mn at 45 mM significantly increased Nile Red fluorescence ($p < 0.001$, Figures 1A and 1B) and Oil Red O colorimetric label was strongly present at the intestine and hypodermis of worms exposed to 45 mM Mn (Figure 1C).

Furthermore, in worms exposed to 30 or 45 mM Mn TG levels were significantly increased vs. controls ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Figure 1 D). The metabolic activity reflected by the oxygen consumption rate was decreased in worms exposed to 30 mM or 45 mM Mn compared to the control group ($p < 0.001$, Figure 2). In addition, we observed Mn toxicity at the highest dose as reflected by decreased survival rate in L4 larval staged worms (Figure 3, Mn LC₅₀ (68.36 mM \pm 5.683)).

3.2 Mn effects on *C. elegans* behavior

We examined behaviors reflecting energetic homeostasis in the worm and observed that Mn affected pharyngeal pumping, reducing it by 9.91% and 21.43% at 45 and 60 mM exposures, respectively ($p < 0.001$, Figure 4A). Nevertheless, body movements (Figure 4B) and defecation cycles (Figure 4C) were not impaired by Mn exposure.

3.3 Mechanisms associated with Mn's effects on fat storage

A major signaling pathway affected by Mn toxicity is the dopaminergic system^{20, 10}. Herein, Mn exposure in L4 larval stage animals decreased the dopamine levels to undetectable ranges (Figure 1S). However, the eight DAergic neurons (CEPs, ADEs, PDEs) in the Pdat-1::GFP strain did not appear to show altered morphology or fluorescence (Figure 5).

We also determined whether the DAergic receptors were involved in the Mn-induced increased fat storage (Figure 6). TG levels were increased after Mn exposure in *dop-1; dop-4* mutants and in the *dop-1; dop-2; dop-3* mutants compared to wild-type N2 worms. *dop-1* intrinsically expresses higher accumulation of lipids and Mn did not appear to enhance the TG levels in this strains, with levels remaining indistinguishable from wild-type animals and *dop-1* mutants. No significant differences were found in TG levels in the other strains in response to Mn exposure (data not shown).

In addition, the expression of the *sbp-1* transcription factor, which involved in lipid storage in *C. elegans* was significantly increased (Figure 7A), while *let-363* mRNA (Figure

7C) levels decreased upon Mn exposure. Upon removal of the worms from Mn for 24 h, the transcriptional levels were indifferent vs. the untreated group (Figure 7B, *sbp-1*; Figure 7D, *let-363*). *nhr-49* expression was not changed by Mn exposure (Figure 2S).

4. Discussion

C. elegans provides great advantages for studying molecular pathways, including those related to fat storage. Here, we show that Mn exposure induced an increase in fat storage and TG levels in *C. elegans* (Figure 8). The effect of Mn on lipid homeostasis has been previously reported in other experimental models, such as calf, where Mn overexposure increased plasma total lipids, phosphatidylcholine, cholesterol, cholesterol esters, sphingomyelin and triglycerides²¹.

In humans, prenatal Mn exposure, even at low levels, is associated with a higher prevalence of neonatal high ponderal index⁶. In rats, Mn deficiency has been associated with the reduction of total body and liver weights, liver Mn levels, total plasma protein, HDL cholesterol and HDL protein, as well as apolipoprotein E levels^{22, 23}. Moreover, Bali and coworkers showed that isolated adipocytes derived from Mn-deficient rats had decreased triglyceride synthesis compared to rats fed with adequate Mn diet²⁴.

In the present study, *C. elegans* metabolic activity was reduced by Mn, which as reflected by decreased oxygen consumption. This data suggests that Mn slowed down the worms' metabolic activity, likely by reducing catabolic processes. It is noteworthy that Mn has been shown to reduce energy metabolism both *in vivo* and *in vitro*, decreasing the activities of mitochondrial enzymes, thus altering membrane potential and reducing ATP production. These Mn effects likely reflect the preferential accumulation of this metal in these organelles²⁵, which among many other functions regulate intermediary metabolism, including β -oxidation of lipids.

Given previous observations on Mn-induced behavioral changes, especially a delay in reproduction¹¹, we focused herein on putative mechanisms, which might underlie these effects. Invertebrates facing a great availability of lipids commonly target energy to egg production²⁶, which was not previously observed for our group, since we the fat storage was increased and the egg production reduced by Mn¹¹. We attribute the Mn-

induced delay in egg production to impairment in lipid transport by vitellogenins¹¹. Since we observed increased fat storage in intestinal cells upon Mn exposure, and considering that vitellogenins are lipoproteins responsible for lipid trafficking from the intestine to the gonads, we posit that Mn is signaling for lipid permanence at intestinal cells instead of being targeted to yolk synthesis at the gonads (Figure 8).

Metabolic activity in the worm is controlled by numerous mechanisms, reflecting the intensity of several behaviors, such as pharyngeal pumping (representing the feeding frequency), defecation cycles and movement²⁷. We assessed these worms' behaviors upon Mn exposure, noting that only pharyngeal pumping was reduced in response to this metal. This effect might be due to either the bacterial content during the exposure, which might not be as palatable given the addition of Mn, or due to a direct effect of Mn, causing an imbalance in systems responsible for pharyngeal function.

Contractions at the pharyngeal muscles are regulated mainly by serotonin (5-HT)²⁸. DA, in turn, can indirectly affect 5-HT levels by acting on the DAergic receptor DOP-5. *dop-5* RNA interference (RNAi) animals fail to have normal brood size and pharyngeal pumping²⁹. Notably, Mn is known to cause DA depletion³⁰. Furthermore, DA is strongly implicated as a direct signal for food recognition in *C. elegans* and its level is impaired by Mn exposure in this study. This data is consistent with Mn's ability to oxidize DA with ensuing effects on pharyngeal pumping secondary to altered 5-HT homeostasis³¹.

In *C. elegans*, DA is a neuromodulator that is implicated in numerous functions, including the encounter of a food source³², increasing in turn frequency when worms leave food³³, habituation to mechanical stimuli³⁴, transitions between crawling and swimming behavior, and defecation³⁵. Mn selectively affects the viability of worm DAergic neurons upon L1-stage exposure^{10,36}. Though DA levels herein were reduced, L4 worms did not exhibit changes in DAergic neuron viability upon Mn exposure, suggesting that younger worms may be more sensitive to this metal.

Recently, Barros and coworkers demonstrated that the exogenous exposure to DA decreased the fat content in worms by acting on β -oxidation and DAergic receptors⁹. Since the DAergic system is considered the main Mn target, this was our initial hypothesis in accounting for its effects on fat storage accumulation. *dop-1::dop-4* double-mutants

exposed to Mn depicted greater accumulation of TG in comparison to wild-type animals exposed Mn. This mutant was also resistant to the decrease in lipid accumulation induced by DA, suggesting its influence on DAergic control over fat content⁹. In addition, *dop-1* mutants whose TG levels are normally higher than in wild-type worms did not exhibit such increase upon Mn exposure, suggesting the involvement of DAergic signaling on fat storage in *C. elegans*.

In addition to DA's regulation of fat storage, other systems have also been implicated in this process. We focused on several fat control transcription factors, such as SBP-1 and NHR-49, as well as the Rictor/TORC2 (*let-363*) protein³⁷. SBP-1 is the *C. elegans* conserved homolog of mammalian transcription factor SREBP-1c (sterol response element binding protein). Worms lacking this gene exhibit delayed growth, lower fat levels, and altered rates of expression of fat synthesis genes, specifically *fas-1*, *Acc-1*, stearoyl-CoA desaturases (*fat-6* and *fat-7*), and fatty acid elongases (*elo-5* and *elo-6*)^{8, 13, 38, 39}. Mn induced the increase of *sbp-1* expression and increased fat storage, thus corroborating the findings in *sbp-1* mutant animals. The *sbp-1* mRNA changes were transient, and unfortunately we were unable to correlate them with the lipid accumulation 24 h post-exposure. Nevertheless, our previous studies have shown a difference in the number of eggs, which might adversely influence the fat evaluation. In addition, we tested the TOR (target of rapamycin) pathway, which is a family of kinases that can form multiprotein complexes and origin TOR complex 1 (*Raptor*/TORC1) and *Rictor*/TORC2^{40, 41}. *C. elegans* mutants for the homolog of the TORC2-specific component, *Rictor* (*CeRictor*, *let-363*) show increased lipid storage⁴². We found that Mn decreased the expression of *let-363*, while increasing fat storage, corroborating the profile inherent to the *let-363* knockout animals (loss of *let-363* caused increased fat storage). Furthermore, the expression of *C. elegans* homologous gene to the transcription factor NHR (nuclear hormone receptors), *nhr-49* was tested following Mn exposure (Figure S2). *nhr-49* has been previously associated with a high fat content, yet we failed to observe changes in its gene expression following Mn exposure^{13, 43}. Taken together, our data indicate that Mn effects on lipid accumulation depend not only on DAergic signaling, but also on diverse set of metabolic networks, including the transcription factor SBP-1 and the Rictor/TORC2 protein complex.

5. Conclusion

We impart novel information on mechanisms associated with Mn-induced changes in lipid metabolism and increased fat accumulation. Using *C. elegans* as an experimental tool, we verified Mn-induced increase in fat storage and reduced metabolic activity by oxygen consumption and pharyngeal pumping. Furthermore, Mn reduced DA levels, absent notable changes in DAergic neurons viability. In addition, DA receptors and SBP-1 transcription factor and LET-363 protein kinase seem to be partially involved in the increased TG levels following Mn exposure. Nevertheless, we recognize that additional studies are needed to fully clarify the mechanisms underlying the adverse effects of Mn in blocking lipid targeting to egg production, concomitant with lipid accumulation in fat storage.

6. Acknowledgments

This work was carried out with funds from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Universal #472669/2011-7 and #475896/2012-2), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES for providing fellowship to P.G., PRONEM) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Programa de Apoio a Núcleos emergentes - PRONEM/FAPERGS #11/2029-1). Michael Aschner was supported in part by the National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) grant numbers R01 ES10563 and R01 ES07331. Joshua P. Fessel's was supported in part by NIH K08 121174 and the Parker B. Francis Foundation). Julia Bornhorst was supported by the DFG (BO 4103/2-1) and Daiana Avila by CNPq scholarship and Universal grant #453963/2014-5. In addition, we thank Carlo de Moraes for his art contribution.

7. Conflict of interest

There are no conflicts of interest to declare.

8. References

1. J. R. Prohaska, Functions of trace elements in brain metabolism, *Physiological reviews*, 1987, **67**, 858-901.
2. M. Williams, G. D. Todd, N. Roney, J. Crawford, C. Coles, P. R. McClure, J. D. Garey, K. Zaccaria and M. Citra, in *Toxicological Profile for Manganese*, Atlanta (GA), 2012.
3. L. R. Legleiter, J. W. Spears and K. E. Lloyd, Influence of dietary manganese on performance, lipid metabolism, and carcass composition of growing and finishing steers, *J Anim Sci*, 2005, **83**, 2434-2439.
4. M. Ueda, F. W. Robinson, M. M. Smith and T. Kono, Effects of divalent cations on the regulation of insulin-sensitive glucose transport and cAMP phosphodiesterase in adipocytes., *J. Biol. Chem*, 1984, **259**, 9520.-9525.
5. L. R. J. Klimis-Tavantzis DJ, Kris-Etherton PM., The effect of dietary manganese deficiency on cholesterol and lipid metabolism in the Wistar rat and in the genetically hypercholesterolemic RICO rat., *J Nutr.*, 1983, **113**, 328-336.
6. X. Yu and L. Cao, Elevated cord serum manganese level is associated with a neonatal high ponderal index, *Environmental research*, 2013, **121**, 79-83.
7. B. C. Mullaney and K. Ashrafi, *C. elegans* fat storage and metabolic regulation, *Biochimica et biophysica acta*, 2009, **1791**, 474-478.
8. K. Ashrafi, Obesity and the regulation of fat metabolism, *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 2007, DOI: 10.1895/wormbook.1.130.1, 1-20.
9. A. G. Barros, J. C. Bridi, B. R. de Souza, C. de Castro Junior, K. C. de Lima Torres, L. Malard, A. Jorio, D. M. de Miranda, K. Ashrafi and M. A. Romano-Silva, Dopamine signaling regulates fat content through beta-oxidation in *Caenorhabditis elegans*, *Plos One*, 2014, **9**, e85874.
10. A. Benedetto, C. Au, D. S. Avila, D. Milatovic and M. Aschner, Extracellular Dopamine Potentiates Mn-Induced Oxidative Stress, Lifespan Reduction, and Dopaminergic Neurodegeneration in a BLI-3-Dependent Manner in *Caenorhabditis elegans*, *Plos Genet*, 2010, **6**.
11. P. Gubert, B. Puntel, T. Lehmen, J. Bornhorst, D. S. Avila, M. Aschner and F. A. Soares, Reversible reprotoxic effects of manganese through DAF-16 transcription factor activation and vitellogenin downregulation in *Caenorhabditis elegans*, *Life sciences*, 2016, DOI: 10.1016/j.lfs.2016.03.016.
12. S. Brenner, The genetics of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*, 1974, **77**, 71-94.
13. K. Ashrafi, F. Y. Chang, J. L. Watts, A. G. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer and G. Ruvkun, Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes, *Nature*, 2003, **421**, 268-272.

14. M. Xie and R. Roy, Increased levels of hydrogen peroxide induce a HIF-1-dependent modification of lipid metabolism in AMPK compromised *C. elegans* dauer larvae, *Cell metabolism*, 2012, **16**, 322-335.
15. J. Hench, I. Bratic Hench, C. Pujol, S. Ipsen, S. Brodesser, A. Mourier, M. Tolnay, S. Frank and A. Trifunovic, A tissue-specific approach to the analysis of metabolic changes in *Caenorhabditis elegans*, *Plos One*, 2011, **6**, e28417.
16. P. Gubert, G. C. Aguiar, T. Mourao, J. C. Bridi, A. G. Barros, F. A. Soares and M. A. Romano-Silva, Behavioral and metabolic effects of the atypical antipsychotic ziprasidone on the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Plos One*, 2013, **8**, e74780.
17. E. L. Tsalik and O. Hobert, Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans*, *J Neurobiol*, 2003, **56**, 178-197.
18. S. W. Caito, W. M. Valentine and M. Aschner, Dopaminergic neurotoxicity of S-ethyl N,N-dipropylthiocarbamate (EPTC), molinate, and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate (MeDETC) in *Caenorhabditis elegans*, *Journal of neurochemistry*, 2013, **127**, 837-851.
19. K. J. Livak and T. D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 2001, **25**, 402-408.
20. S. C. Sistrunk, M. K. Ross and N. M. Filipov, Direct effects of manganese compounds on dopamine and its metabolite Dopac: an in vitro study, *Environmental toxicology and pharmacology*, 2007, **23**, 286-296.
21. K. J. Jenkins and J. K. Kramer, Effect of excess dietary manganese on lipid composition of calf blood plasma, heart, and liver, *J Dairy Sci*, 1991, **74**, 3944-3948.
22. J. Kawano, D. M. Ney, C. L. Keen and B. O. Schneeman, Altered high density lipoprotein composition in manganese-deficient Sprague-Dawley and Wistar rats, *J Nutr*, 1987, **117**, 902-906.
23. D. J. Klimis-Tavantzis, R. M. Leach, Jr. and P. M. Kris-Etherton, The effect of dietary manganese deficiency on cholesterol and lipid metabolism in the Wistar rat and in the genetically hypercholesterolemic RICO rat, *J Nutr*, 1983, **113**, 328-336.
24. D. L. Baly, J. S. Schneiderman and A. L. Garcia-Welsh, Effect of manganese deficiency on insulin binding, glucose transport and metabolism in rat adipocytes, *J Nutr*, 1990, **120**, 1075-1079.
25. T. E. Gunter, C. E. Gavin and K. K. Gunter, The case for manganese interaction with mitochondria, *Neurotoxicology*, 2009, **30**, 727-729.
26. T. JAGER, A. O. ÁLVAREZ, J. E. KAMMENGA and S. A. L. M. KOOIJMAN, Modelling nematode life cycles using dynamic energy budgets, *Functional Ecology*, 2005, **19**, 136-144.
27. L. Avery and Y. J. You, *C. elegans* feeding, *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 2012, DOI: 10.1895/wormbook.1.150.1, 1-23.
28. H. R. Horvitz, M. Chalfie, C. Trent, J. E. Sulston and P. D. Evans, Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Science*, 1982, **216**, 1012-1014.
29. H. Yu, B. Aleman-Meza, S. Gharib, M. K. Labocha, C. J. Cronin, P. W. Sternberg and W. Zhong, Systematic profiling of *Caenorhabditis elegans* locomotive

- behaviors reveals additional components in G-protein Galphaq signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**, 11940-11945.
30. M. Farina, D. S. Avila, J. B. da Rocha and M. Aschner, Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury, *Neurochemistry international*, 2013, **62**, 575-594.
 31. J. Donaldson, D. McGregor and F. LaBella, Manganese neurotoxicity: a model for free radical mediated neurodegeneration?, *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 1982, **60**, 1398-1405.
 32. E. R. Sawin, R. Ranganathan and H. R. Horvitz, C. elegans locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway, *Neuron*, 2000, **26**, 619-631.
 33. T. Hills, P. J. Brockie and A. V. Maricq, Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in *Caenorhabditis elegans*, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2004, **24**, 1217-1225.
 34. S. Sanyal, R. F. Wintle, K. S. Kindt, W. M. Nuttley, R. Arvan, P. Fitzmaurice, E. Bigras, D. C. Merz, T. E. Hebert, D. van der Kooy, W. R. Schafer, J. G. Culotti and H. H. Van Tol, Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*, *The EMBO journal*, 2004, **23**, 473-482.
 35. A. Vidal-Gadea, S. Topper, L. Young, A. Crisp, L. Kressin, E. Elbel, T. Maples, M. Brauner, K. Erbguth, A. Axelrod, A. Gottschalk, D. Siegel and J. T. Pierce-Shimomura, *Caenorhabditis elegans* selects distinct crawling and swimming gaits via dopamine and serotonin, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, **108**, 17504-17509.
 36. S. Chakraborty, P. Chen, J. Bornhorst, T. Schwerdtle, F. Schumacher, B. Kleuser, A. B. Bowman and M. Aschner, Loss of pdr-1/parkin influences Mn homeostasis through altered ferroportin expression in *C. elegans*, *Metallomics : integrated biometal science*, 2015, **7**, 847-856.
 37. E. Watson and A. J. Walhout, *Caenorhabditis elegans* metabolic gene regulatory networks govern the cellular economy, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 2014, **25**, 502-508.
 38. R. M. McKay, J. P. McKay, L. Avery and J. M. Graff, *C. elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage, *Dev Cell*, 2003, **4**, 131-142.
 39. M. Kniazeva, M. Sieber, S. McCauley, K. Zhang, J. L. Watts and M. Han, Suppression of the ELO-2 FA elongation activity results in alterations of the fatty acid composition and multiple physiological defects, including abnormal ultradian rhythms, in *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*, 2003, **163**, 159-169.
 40. D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini, Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex, *Science*, 2005, **307**, 1098-1101.
 41. P. T. Bhaskar and N. Hay, The two TORCs and Akt, *Dev Cell*, 2007, **12**, 487-502.
 42. K. T. Jones, E. R. Greer, D. Pearce and K. Ashrafi, Rictor/TORC2 regulates *Caenorhabditis elegans* fat storage, body size, and development through *sgk-1*, *PLoS biology*, 2009, **7**, e60.
 43. M. R. Van Gilst, H. Hadjivassiliou, A. Jolly and K. R. Yamamoto, Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*, *PLoS biology*, 2005, **3**, e53.

44. C. T. Murphy, S. A. McCarroll, C. I. Bargmann, A. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer, H. Li and C. Kenyon, Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 2003, **424**, 277-283.

9. Figures

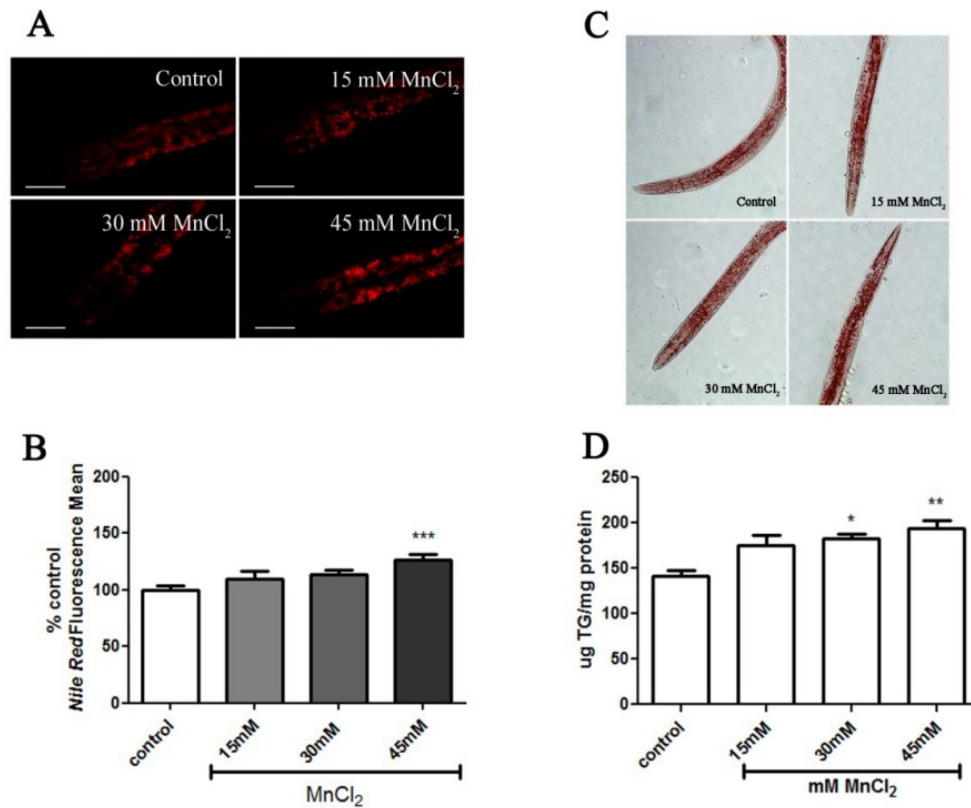


Figure 1: Manganese increases fat storage in *C. elegans*.

(A) Representative images of Nile red fluorescence at the first intestinal cells in L4 larval stage worms treated for 4 hours with manganese or vehicle (NaCl 85mM) in liquid medium.

(B) Nile red intensity increases upon Manganese treatment. Quantitative analysis of Nile red intensity after food removal is depicted. Nile red mean intensity was measured for least 25 animals from at least four biological replicates. Data are shown as mean \pm SEM. *** indicates statistical significance ($p < 0.001$) compared to the control group with one-way ANOVA followed by a Bonferroni's test.

(C) Fat storage was visualized by oil red O staining after 4 h of Manganese treatment.

(D) Colorimetric analysis of triglyceride content. Error bars indicate the \pm SEM of four independent experiments. * and ** indicate statistical significance ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) compared to the control group with one-way ANOVA followed by a Bonferroni's test.

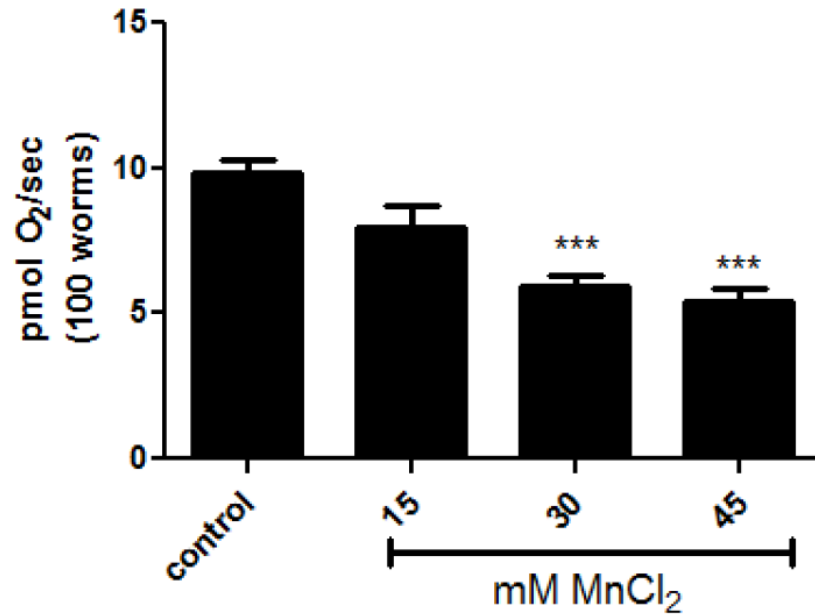


Figure 2: Metabolic activity was reduced by Manganese. Mn treated worms were washed to remove the bacteria and the oxygen consumption rates evaluated. At least 300 L4 larvae stage worms were verified per group in duplicates. The experiments were performed in four different days. Data are presented as mean of oxygen consumption (pmol O₂/ second) of 100 worms. *** indicates statistical significance ($p < 0.001$) compared to the control group with one-way ANOVA followed by a Bonferroni's test.

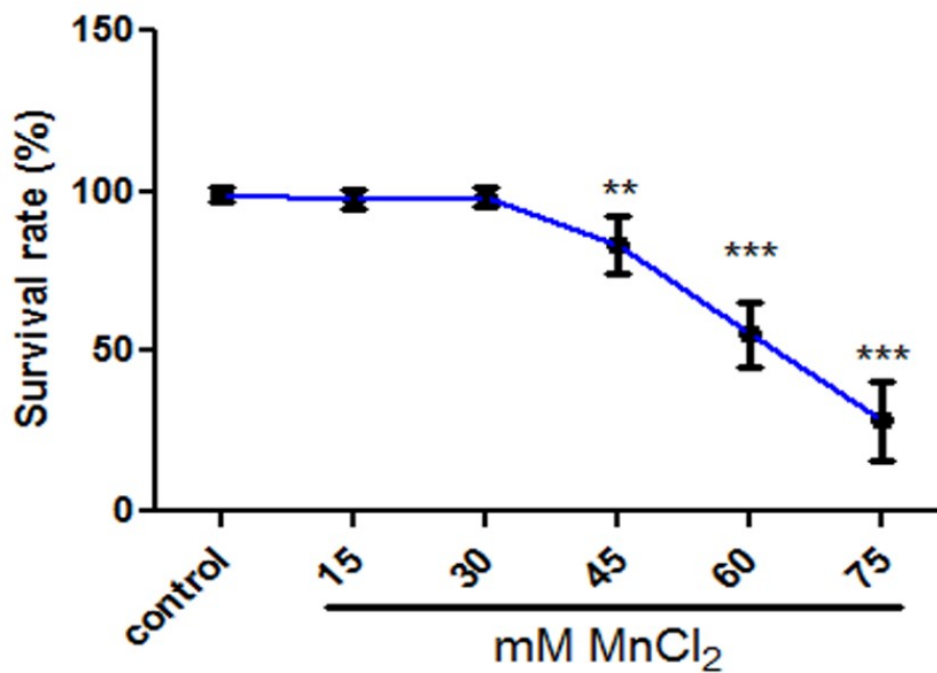


Figure 3: Manganese reduced the survival in young adult animals. Four hours treated animals were evaluated as survival 24 h later. Results are represented as mean \pm SEM of five independent experiments. *** indicate statistical significance ($p < 0.001$) compared to the control group with one-way ANOVA followed by a Bonferroni's test.

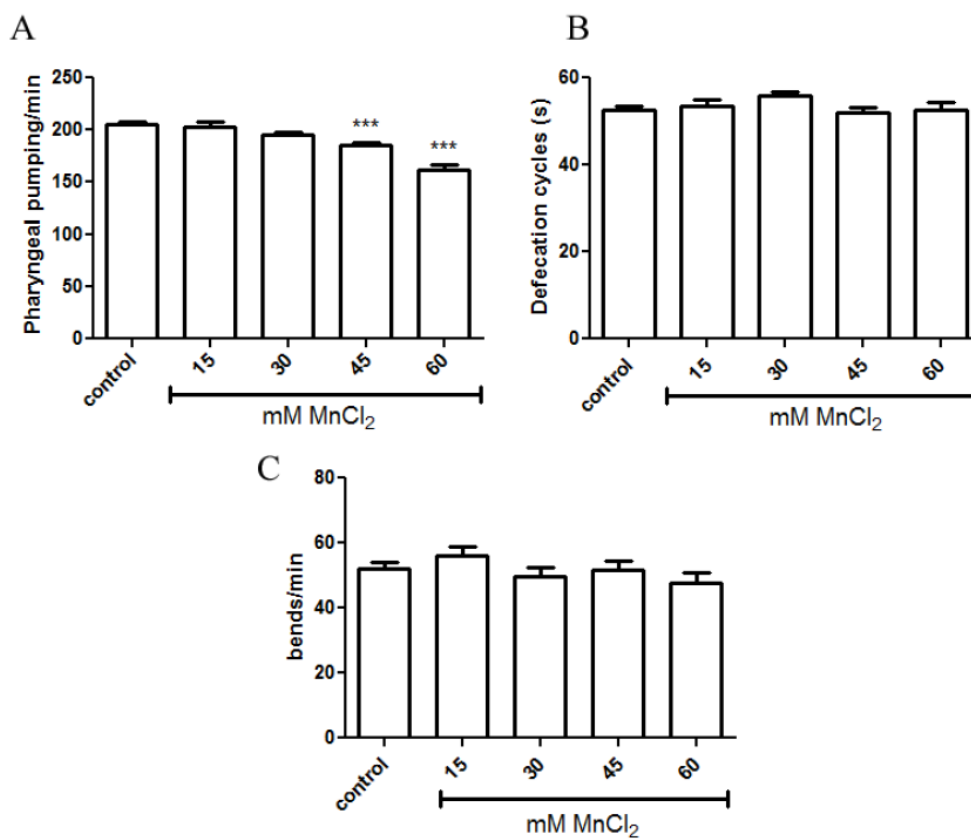


Figure 4: Manganese impaired worms' pharyngeal pumping. Pharyngeal pumping (A), defecation cycles (B) and body bends (C) were observed in the following 30 min after the treatment. Data are shown as mean \pm SEM. *** indicates statistical significance ($p < 0.001$) compared to the control group with one-way ANOVA followed by a Bonferroni's test. At least 10 worms were verified each experiments and the assays performed at least four times.

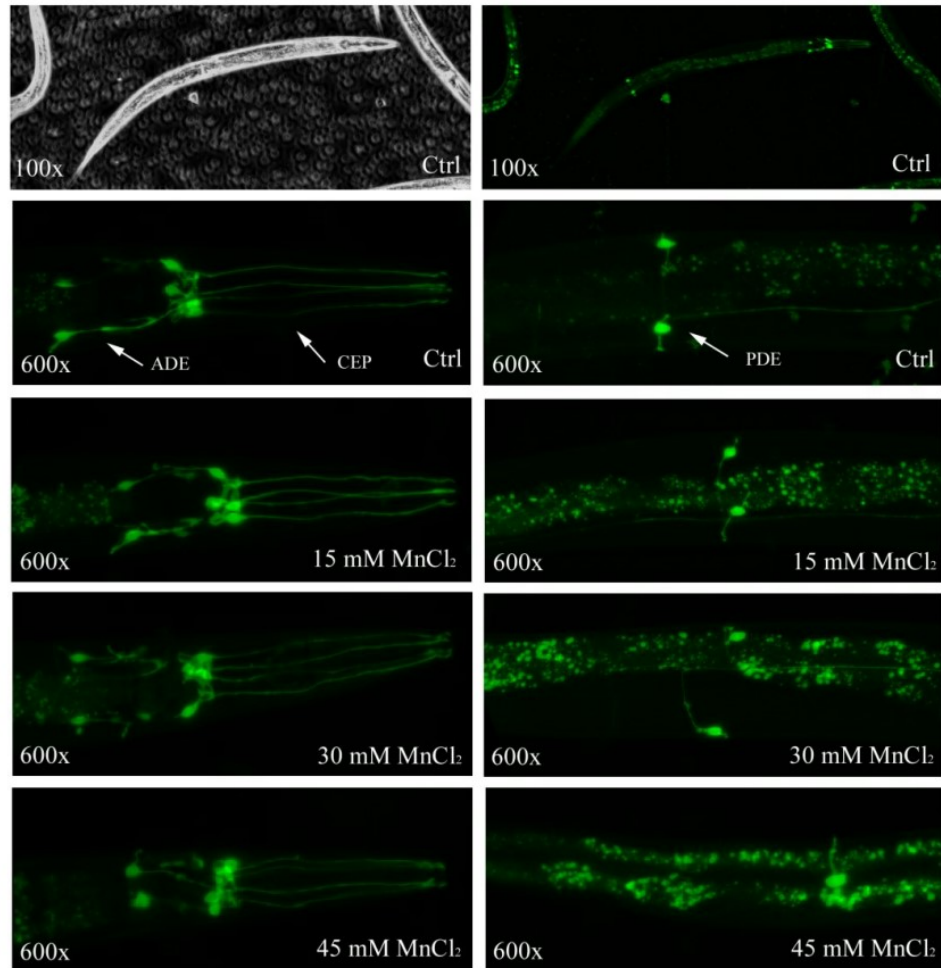


Figure 5: Mn did not cause death in DAergic neurons of young adult treated worms.

Representative images of young adult worms from *dat-1::GFP* transgenic animals visualized by bright-field light microscopy (BF, left) and epifluorescence microscopy (GFP) of whole body (middle) or enlarged head region (right). The positions of DA neurons (2 pairs of cephalic neurons CEPs, 1 pair of anterior deirid neurons ADEs, and 1 pair of posterior deirid neurons PDEs) are indicated by arrows. Morphologically, the neurons of Mn exposed animals and control were not different.

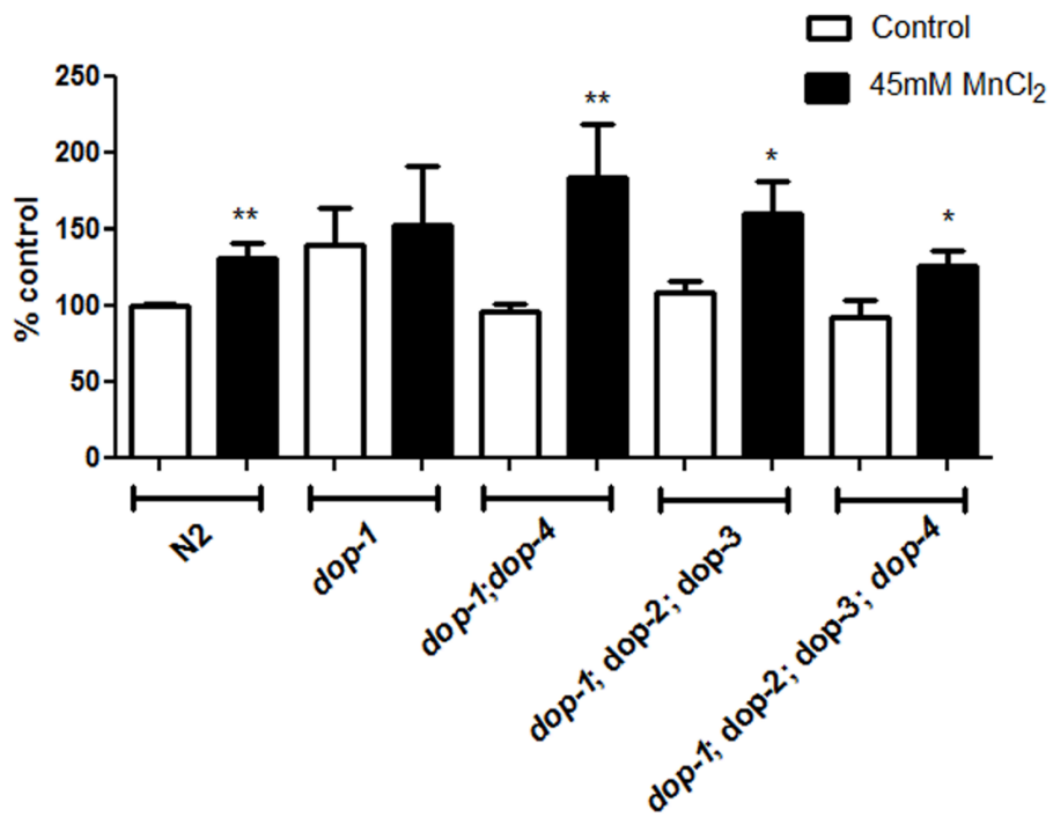


Figure 6: Dopaminergic receptors determine Mn effects on TG levels in *C. elegans*.

Mutants for DAergic receptors were treated with 45 mM MnCl₂ and the TG levels quantified. Statistically significant regarding the control of the same strain (*p < 0.05; **p < 0.01. SEM). Ten thousand worms were used in each experiment and the assays repeated four times in different days.

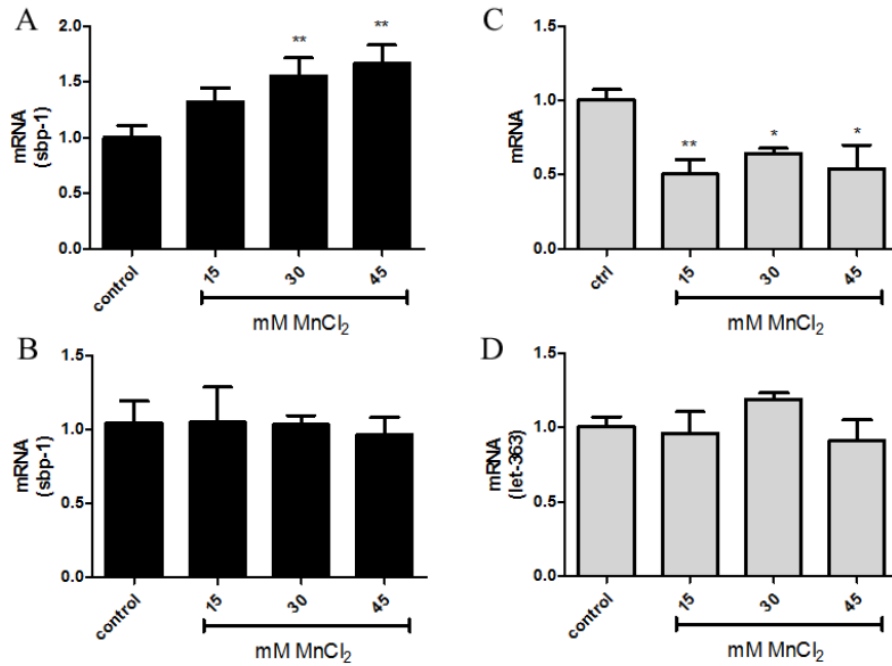


Figure 7: Manganese increases *sbp-1* expression while causes a reduction in *let-363* expression after treatment. qPCR analysis showed significantly increased *sbp-1* (A) and decreased *let-363* (C) mRNA levels and after the treatment. These effects were not verified 24 h later (B, *sbp-1*; C, TOR). ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ versus the control. mRNA was isolated from 1000 worms in four independent experiments.

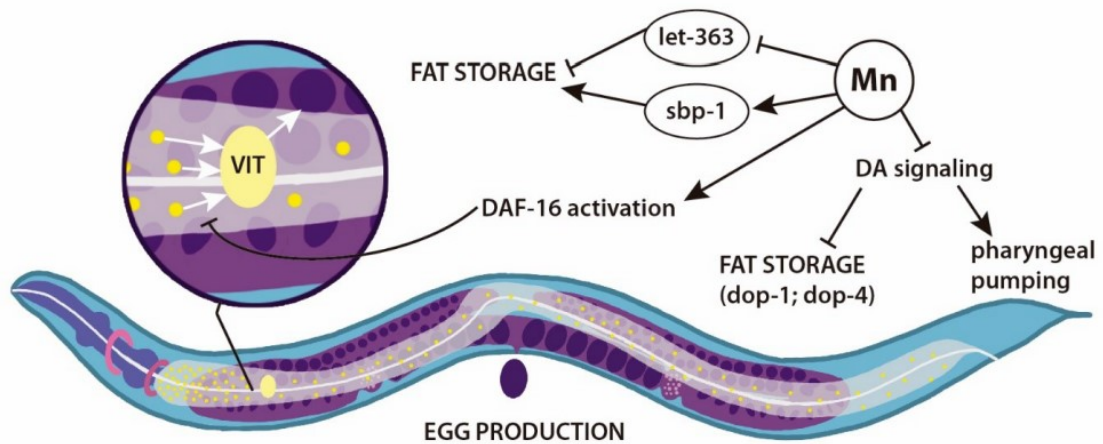


Figure 8: Suggested mechanisms whereby Mn can increase the fat storage and reduce the egg production. Mn reduced let-363 and raised sbp-1 expressions, both signaling to the increase of fat storage. Mn also reduces DA signaling which possibly through dop-1; dop-4 receptors can target the same effect to fat accumulation. This could also explain the reduction of pharyngeal pumping. The vitellogenins (VIT) which should transport lipids to the yolk formation to supply the embryos development had the expression and synthesis inhibited by Mn. This could be occurring due the DAF-16 downregulation, since this transcription factor was activated by Mn. As a result, Mn induced the reduction over egg production.

10. Supplemental material

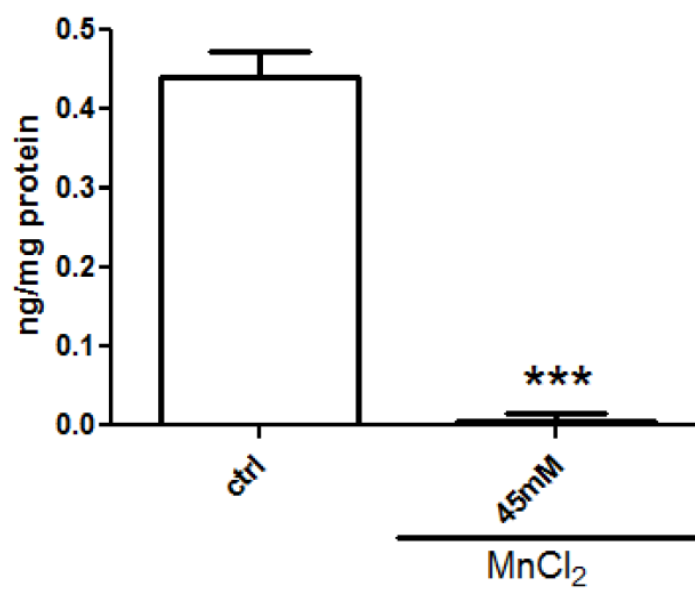


Figure 1S: Mn reduces dopamine levels in *C. elegans*. About two hundred fifty thousand worms were treated by group and the experiments performed four times at different days. *** $p < 0.001$ versus the control.

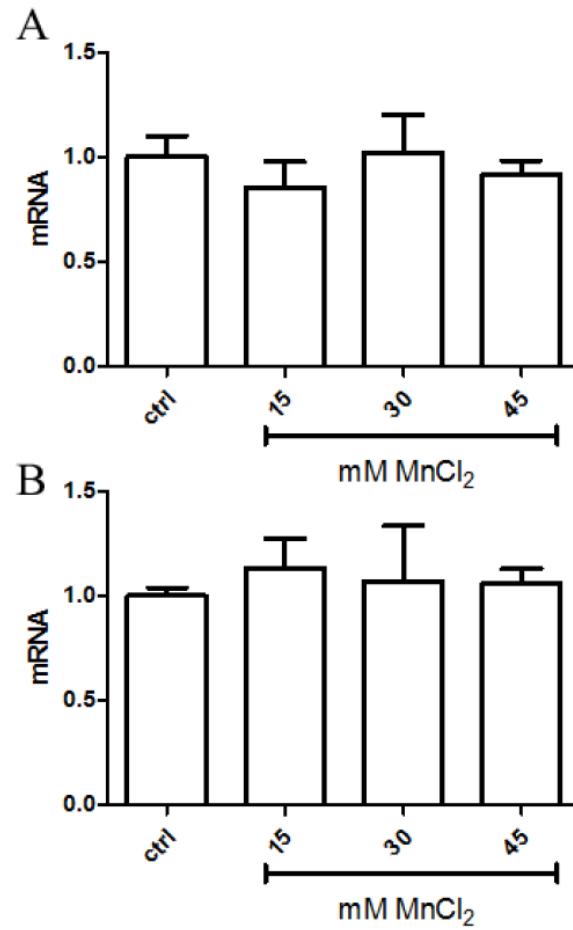


Figure 2S: Manganese does not change *nhr-49* expression in *C. elegans*. The *nhr-49* mRNA levels did not change after Mn treatment (A) and 24 h later (B). There is no statistic differences between Mn treated groups and control.

4. Artigo 1:

Este artigo foi aceito para publicação da revista *Life Science*.

Reversible reprotoxic effects of manganese through DAF-16 transcription factor activation and vitellogenin downregulation in *Caenorhabditis elegans*.

ACCEPTED MANUSCRIPT

1

Reversible reprotoxic effects of manganese through DAF-16 transcription factor activation and vitellogenin downregulation in *Caenorhabditis elegans*.

Priscila Gubert¹, Bruna Puntel¹, Tassia Lehmen¹, Julia Bornhorst², Daiana S. Avila³, Michael Aschner⁴, Felix A. A. Soares^{1*}

1 Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

2 Institute of Nutritional Sciences, University of Potsdam, Arthur-Scheunert-Allee 114-166, 14558 Nuthetal, Germany.

3 Laboratório do Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCe), Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Uruguaiana, RS, Brazil.

4 Department of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461, USA.

*Corresponding author:

Félix Alexandre Antunes Soares-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-CCNE Universidade Federal de Santa Maria-97105-900-Santa Maria-RS-Brazil.

Phone: +55-55-3220-9522. Fax: +55-55-3220-8978. E-mail: felix@ufsm.br

1. ABSTRACT

Aims: Vitellogenesis is the yolk production process which provides the essential nutrients for the developing embryos. Yolk is a lipoprotein particle that presents lipids and lipid-binding proteins, referred to as vitellogenins (VIT). The *Caenorhabditis elegans* nematode has six genes encoding VIT lipoproteins. Several pathways are known to regulate vitellogenesis, including the DAF-16 transcription factor. Some reports have shown that heavy metals, such as manganese (Mn), impair brood size in *C. elegans*; however the mechanisms associated with this effect have yet to be identified. Our aim was to evaluate Mn's effects on *C. elegans* reproduction and better understand the pathways related to these effects.

Main methods: Young adult larval stage worms were treated for 4 h with Mn in 85 mM NaCl and *E. coli* OP50 medium.

Key findings: Mn reduced egg-production and egg-laying during the first 24 h after the treatment, although the total number of progenies were indistinguishable from the control group levels. This delay may have occurred due to DAF-16 activation, which was noted only after the treatment and was not apparent 24 h later. Moreover, the expression, protein levels and green fluorescent protein (GFP) fluorescence associated with VIT were decreased soon after Mn treatment and recovered after 24 h.

Significance: Combined, these data suggest that the delay in egg-production is likely regulated by DAF-16 and followed by the inhibition of VIT transport activity. Further studies are needed to clarify the mechanisms associated with Mn-induced DAF-16 activation.

Keywords: Manganese; vitellogenin; *Caenorhabditis elegans*; DAF-16 transcription factor; brood size.

2. INTRODUCTION

Vitellogenesis is a process which starts with the mobilization of all energy needed, including lipids, from storage to yolk formation ensuring the growth of embryos in oviparous animals. Yolk is a lipoprotein particle formed by lipids and lipid-binding proteins referred to as vitellogenins (VITs). As part of this class of animals (oviparous), the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) expresses in its genome machinery six diverse VIT genes. *C. elegans*, a free-living, non-parasitic soil nematode, is one of the best-characterized animals at the molecular, genetic, physiological and developmental levels (Riddle, 1997), and has served as an optimal model for bioindicator toxicity tests, given its short life cycle, ease of growth in bulk populations and low cost (Hitchcock et al. , 1997, Mutwakil et al. , 1997, Wang and Yang, 2007).

The VIT encoding genes in *C. elegans*, vit-1, -2, -3, -4 and -5, contribute to the pool of YP170, the main yolk protein. The YP115 and YP88 proteins are encoded by the vit-6 gene. All worm VITs share sequence homology with vertebrate VITs and with ApoB-100, the major protein component of mammalian low density lipoprotein (LDL) (Baker, 1988, Spieth et al. , 1991).

The developmental expression of VITs in *C. elegans* hermaphrodites commences at the end of the last larval stage (L4) (Blumenthal et al. , 1984, Broverman, 1990, Schedin et al. , 1991) and levels remain high throughout adulthood. Moreover, the yolk synthesis occurs in the intestine followed by secretion into the pseudoceolomic space (body cavity) and is ultimately taken up into vesicles within the growing oocytes (Hall et al. , 1999, Kimble and Sharrock, 1983).

Vitellogenesis is impacted in response to stress conditions, including heavy metal (such as cadmium) exposure, sterol hormones and transcription factors (Fisher et al. , 2012, Novillo et al. , 2005, Shaw et al. , 2007). In wild-type worms, the activity of the forkhead box O (FoxO) transcription factor, DAF-16 is inhibited by a conserved phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI(3)K)/protein kinase D (PKD)/Akt pathway as a

response to DAF-2 activation. Vit-2 and vit-5 are both downregulated in *daf-2* knockdown and upregulated in *daf-16* knockdown worms (Murphy et al. , 2003). In astrocytes culture, Mn was able to induced FoxO expression in association with oxidative stress induction (Exil et al. , 2014). Furthermore, the lethality caused by Mn in *C. elegans* was attenuated by compounds that alter nuclear translocation FOXO/DAF-16 (Wollenhaupt et al. , 2014). As a consequence of vitellogenesis dysregulation, the number of progenies is reduced (DePina et al. , 2011). The heavy metal manganese (Mn) has been previously reported to impair *C. elegans* brood size (Xiao et al. , 2009).

In mammals, Mn is required for the regulation of reproduction and normal brain function. Besides, Mn activates and regulates several metabolic enzymes, such as arginase and pyruvate carboxylase (Lin et al. , 2006). While essential, elevated exposures to Mn are neurotoxic, leading to neurodegeneration and loss of dopaminergic neurons (Benedetto et al. , 2010).

Notably, little is known about the mechanisms by which Mn affects reproduction and vitellogenesis. To address this issue, we evaluated the number progenies, as well as Mn's effects on vitellogenin protein levels, mRNA levels, and traffic through GFP fluorescence. Moreover, we underscored DAF-16's role in the Mn-induced effects on vitellogenesis.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1 Worms and culture

C. elegans strains were handled and maintained at 20 °C on nematode growth medium (NGM) and fed with OP50 *Escherichia coli* (Brenner, 1974). The following strains were used: N2 wild type, *daf-16::GFP* (zls356) and *vit-2p::vit-2::GFP*. All strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetic Center (University of Minnesota) except for *vit-2p::vit-2::GFP*, which was kindly provided by Professor Barth Grant's lab (Rutgers, NJ).

3.2 Preparation of $MnCl_2$

$MnCl_2$ (>99.995% purity) (Sigma-Aldrich, US) stock solutions were prepared in 85 mM NaCl. To prevent oxidation, fresh stock solutions were prepared just before each assay.

3.3 Manganese treatment

Worms were synchronized via hypochlorite bleaching, hatched overnight, and subsequently cultured on NGM plates feed with *E. coli* OP50 until reaching the young adult larval stage (~ 44 h). Thereafter, worms were transferred to a liquid medium and exposed for 4h at the larval stage L4 to NaCl (85 mM as a control) or manganese chloride ($MnCl_2$) in the presence of bacteria. The concentrations were chosen based on $MnCl_2$ LD₅₀ (68.36 mM ± 5.683) identified in previous experiments using an analogous treatment (data not shown). Accordingly, concentrations below the LD₅₀ level (subtoxic) were used herein (15, 30 and 45 mM $MnCl_2$).

3.4 Reproductive profile assays

For the behavioral assays, after treatments worms were washed three times with NaCl (85 mM) and maintained on a plate in the absence Mn. Worms were then picked up and transferred to new NGM plates (35 mm diameter) with *E. coli* for each respective assay. Egg-laying and egg-production assays were evaluated 24 h after Mn treatment, given that at the time of treatment since worms were in young adult larval stage, no eggs were found. Egg-production refers to the number of eggs inside the uterus of each animal and egg-laying refers to the average number of eggs laid per hour, observed over a 2h period (Wang et al. , 2008). For brood size evaluations, the number of daily progenies for each worm were counted. Worms were individually kept on plates and transferred each day to new NGM plate (seeded with *E. coli*) until the 8th day of

adulthood when egg production is dramatically reduced. At least 10 worms were used in each experiments and the assays were performed at least four times.

3.4 *TaqMan gene expression assay*

Trizol method was used to isolate the Total RNA. Briefly, following treatment, 1 ml of Trizol (Life Technologies, US) was added to each tube containing washed worms resuspended in 100 μ l 85 mM NaCl, followed by three cycles of freezing in liquid nitrogen and thawing at 37° C. Two hundred μ l of chloroform was then added to each tube, followed by precipitation using isopropanol and washing with 75% ethanol. After isolating step, 1 μ g total RNA was used for cDNA synthesis using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, US), as per manufacturer's instructions. cDNA samples were stored at 4° C. Quantitative real-time PCR (BioRad, US) was conducted in duplicate wells using TaqMan Gene Expression Assay probes (Life Technologies, US) for each gene, using the *ama-1* (RNA polymerase II) housekeeping gene for normalization after determining the fold difference using the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The following probes were used: *vit-2*: Ce02505530_gh; *vit-6*: Ce02456456_g1. mRNA was isolated from 1000 worms for qPCR assays in four independent experiments.

3.5 *Vit-2p::vit-2::GFP evaluation*

After Mn treatment, worms were washed three times with 85 mM NaCl and transferred to new plates with OP50 *E. coli*. Worms were collected at 24 h, 48 h and 72 h, and microscopically (at 20 \times magnification; Epifluorescence Microscope, Nikon Eclipse 80i, Nikon, US) checked in the uterus region for the presence of green fluorescence. Images are representatives of at least twenty worms per group in four independent experiments.

3.6 DAF-16 nuclear localization assay

For quantification of DAF-16::GFP localization, worms were collected soon after Mn treatment or 24 h after treatment cessation, and scored for the presence, absence or partial GFP accumulation within the nuclei of whole body cells. GFP localization was analyzed with an Olympus IX81 Inverted Microscope (at 20 \times magnification, Olympus, US). Thirty animals were observed in 3 different experiments and classified according to the DAF-16 localization (cytosol, intermediate and nuclear).

3.7 Statistics

All graphics and statistics carried out using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software San Diego, CA). One-way ANOVA followed by Bonferroni's test or *Student's t-test* were used for the comparisons, with significance set at $p < 0.05$.

4. RESULTS

4.1 Manganese effects over the reproductive profile

First, we determined whether acute Mn exposure interferes with egg-production (Figure 1A) and egg-laying (Figure 1B) in the worm. Twenty-four hours after treatment, the number of eggs inside the uterus (egg-production) was significantly reduced after exposure to both 30 mM ($p < 0.05$) and 45 mM ($p < 0.01$) Mn. Furthermore, the number of eggs laid by the worms (expressed as the number of progeny per 2 hour) was significantly decreased upon acute exposure to Mn (45 mM; $p < 0.05$). To determine whether Mn caused lasting effects on *C. elegans* reproduction, we examined the brood size. Mn exposed worm were indistinguishable from controls (Figure 1C).

4.2 Manganese interference on DAF-16 transcription factor localization

Next, we addressed the mechanisms associated with the Mn-induced delay in offspring production. We evaluated the levels of DAF-16, a transcription factor which is responsible for controlling fat transport through the lipoprotein VIT and is required for *daf-2*'s effects on reproduction (Edmonds et al. , 2010, Shaw et al., 2007). Immediately upon Mn treatment, DAF-16 was predominantly localized in the nucleus, corresponding to its activated form at the highest concentration tested (Figure 2B, $p < 0.01$ at 45 mM Mn). Nucleus DAF-16 translocation was not significant at 15 and 30 mM Mn compared to control group, however the intermediate activation was significant at 30 mM Mn (Figure 2B, $p < 0.05$). In contrast to the translocation observed soon after the treatment, 24 h later, DAF-16 was predominantly localized to the cytoplasm, i.e. in its inactivated form (Figure 2C).

4.3 Vitellogenin dynamic over Manganese treatment at young adult larval stage

Next, we determined whether VITs' expression and protein levels were altered upon Mn exposure. Both VIT-2 (Figure 3A) and VIT-6's (Figure 3B) mRNA levels were decreased following acute Mn treatment. Notably, 24 h after the removal of Mn, VIT-2 and VIT-6 mRNA levels were indistinguishable from control worms (Figure 3C, vit-2; Figure 3D, vit-6).

Further, we addressed VIT-2's localization at different time points after Mn exposure, using a transgenic strain guided by a promoter, *vit-2p::vit-2::GFP*. Twenty-four hours after acute Mn exposure (30 and 45 mM $MnCl_2$), the VIT-2 lipoprotein was predominantly localized in the intestine, where it is initially produced, as well as in the pseudocoelom (Figure 4). In contrast, in control and 15 mM Mn exposed worms, VIT-2 was predominantly localized in the eggs (Figure 4). Levels of VIT-2 48 h (Figure 4) and 72 h (Data not shown) after Mn exposure followed a profile analogous to the control worms.

5. DISCUSSION

Lipids and proteins derived from yolk provide crucial nutrients necessary to support the fast development of the embryo. *C. elegans* VITs YP170, YP115, and YP88 are homologous to vertebrate VIT and ApoB-100, the main component of mammalian LDL particles (Baker, 1988; Spieth *et al.*, 1991). Endocytosis of yolk particles into membrane-bound vesicles of the oocyte is mediated by receptors of the LDL receptor superfamily in *C. elegans* (Grant and Hirsh, 1999), insects, and vertebrates. Yolk and yolk receptor endocytic trafficking is thought to proceed through pathways very similar to those used by LDL in somatic cells (Goldstein *et al.*, 1985, Schneider, 1996). Earlier studies have related Mn causing changes on rat lipoprotein (Klimis-Tavantzis *et al.*, 1983). To highlight the possible mechanisms regarding Mn effects over lipoproteins, we used *C. elegans* as a powerful tool to observe its reproduction as culminant profile of VIT changes.

The exposure to high levels of Mn has been associated with manganism, a condition resembling Parkinson's disease (Guilarte, 2010). Studies on Mn toxicity have largely focused on dopaminergic neurodegeneration, including in *C. elegans* (Benedetto *et al.*, 2010). To our knowledge, this is the first study to address the effects of Mn on reproduction in the same animal species. We observed a Mn-induced delay in egg-production, especially during the first day of adulthood. Interestingly, worms treated with Mn fully recovered, and the number of offspring at the end of the hermaphrodite fertile life was indistinguishable from untreated worms. Previous studies have established the ability of Mn to reduce brood size in worms (Guilarte, 2010); however, these experiments were performed over a more protracted exposure period and at lower Mn concentrations. Lin and coworkers (Lin *et al.*, 2006) found no changes in the brood size upon Mn exposure. Our results are consistent with an effect on brood size, yet the reproductive profile appears to recover to levels indistinguishable from controls 24 h after Mn exposure.

DAF-16 signaling and lipid transport are closely related to VITs' activity. *C. elegans* vitellogenesis is the most energetically expensive process for worms, demanding nutrients from the intestine for yolk formation. *C. elegans* express a class of VIT lipoproteins encoded by six different genes (Spieth *et al.*, 1985). Taking advantage

of the transgenic *vit-2p::vit-2::gfp* strain, we visualized VIT-2 at various developmental stages and the effect of Mn on its expression. Given the expression of VIT proteins starts at the last larval stage L4, no GFP fluorescence was noted 4 h after Mn exposure in young adult worms yet. Accordingly, we chose 24, 48 and 72 h after Mn exposure to assess the expression of VIT-2. qPCR assays showed VIT-2 and VIT-6 mRNA levels were significantly reduced after Mn exposure and fully recovered 24 h later. This finding corroborates fluorescence results of VIT expression. Given the analogous sequence of the six VIT genes, qPCR analysis is not amenable for determination of all VIT isoforms.

VITs are repressed by the transcription factor, DAF-16 (Fischer et al. , 2013). Mn not only decreased VIT levels, but also induced the translocation of DAF-16 to the nucleus, which corresponds to its activated form (Henderson and Johnson, 2001). DAF-16, the ortholog of mammalian Forkhead box O (FoxO) transcription factor is downstream of the DAF-2 kinase cascade, which when activated, leads to DAF-16 phosphorylation and cytoplasmic retention. The decrease in DAF-2 signaling invokes the dephosphorylation of DAF-16 and its translocation to the cell nucleus and transcriptional activation (Henderson and Johnson, 2001, Lin et al. , 2001). DAF-16 activation leads to changes in a wide-range of genes and physiological processes, such as metabolism, longevity and immune response, thus representing one of the most robust and best studied pathways in *C. elegans* (Tullet et al. , 2014).

Our results corroborate that DAF-16 activity suppresses vitellogenesis at the transcriptional levels (DePina et al., 2011). However, this effect is transient, and is fully reversed 24 h post Mn exposure (in adult 1-day-old worms). Combined, this data suggests a profound, yet temporary effect of Mn on the reproductive profile. Future studies will address whether the progeny display residual Mn effects subsequent to the initial non-effective source of energy during egg formation.

6. CONCLUSION

In summary, we showed, for the first time, that Mn affects both egg-production and egg-laying behaviors. Moreover, DAF-16 and VITs' signaling are associated with

this Mn-induced delay. These results suggest that exposure of *C. elegans* to Mn impairs the reproductive profile of hermaphrodites, yet this effect is fully overturned at the end of the reproductive phase. Future studies should be profitably directed to examine mechanisms associated with Mn-induced DAF-16 activation.

7. ACKNOWLEDGMENTS

We thank Professor Thomas Blumenthal, University of Colorado for YP88 rat-antivit-6 polyclonal antibody and Professor Barth Grant, Rutgers University, NJ, for generously provide us with the strain *vit-2p::vit-2::gfp*. This work was carried out with funds from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Universal #472669/2011-7 and #475896/2012-2), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES for providing fellowship to P.G., PRONEM) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Programa de Apoio a Núcleos emergentes - PRONEM/FAPERGS #11/2029-1). We are grateful to members of Professor Michael Aschner's (supported in part by NIH R01 ES10563) and Professor Félix A. A. Soares' laboratories.

8. CONFLICT OF INTEREST

The authors report no financial or other conflict of interest relevant to the subject of this article.

9. REFERENCES

Baker ME. Is Vitellogenin an Ancestor of Apolipoprotein-B-100 of Human Low-Density Lipoprotein and Human Lipoprotein-Lipase. *Biochem J.* 1988;255:1057-60.
Benedetto A, Au C, Avila DS, Milatovic D, Aschner M. Extracellular Dopamine Potentiates Mn-Induced Oxidative Stress, Lifespan Reduction, and Dopaminergic

- Neurodegeneration in a BLI-3-Dependent Manner in Caenorhabditis elegans. Plos Genet.* 2010;6.
- Blumenthal GR, Faber SM, Primack JR, Rees MJ. Formation of Galaxies and Large-Scale Structure with Cold Dark Matter. *Nature.* 1984;311:517-25.
- Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1974;77:71-94.
- Broverman S. Analysis of a vitellogenin promoter in transgenic nematodes: Indiana University; 1990.
- DePina AS, Iser WB, Park SS, Maudsley S, Wilson MA, Wolkow CA. Regulation of *Caenorhabditis elegans* vitellogenesis by DAF-2/IIIS through separable transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *BMC Physiol.* 2011;11:1472-6793.
- Edmonds JW, Prasain JK, Dorand D, Yang Y, Hoang HD, Vibbert J, et al. Insulin/FOXO signaling regulates ovarian prostaglandins critical for reproduction. *Dev Cell.* 2010;19:858-71.
- Exil V, Ping L, Yu Y, Chakraborty S, Caito SW, Wells KS, et al. Activation of MAPK and FoxO by manganese (Mn) in rat neonatal primary astrocyte cultures. *Plos One.* 2014;9:e94753.
- Fischer M, Regitz C, Kull R, Boll M, Wenzel U. Vitellogenins increase stress resistance of *Caenorhabditis elegans* after *Photobacterium luminescens* infection depending on the steroid-signaling pathway. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2013;15:569-78.
- Fisher WW, Li JJ, Hammonds AS, Brown JB, Pfeiffer BD, Weiszmann R, et al. DNA regions bound at low occupancy by transcription factors do not drive patterned reporter gene expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:21330-5.
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annual review of cell biology.* 1985;1:1-39.
- Grant B, Hirsh D. Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol Biol Cell.* 1999;10:4311-26.
- Guilarte TR. Manganese and Parkinson's disease: a critical review and new findings. *Environ Health Perspect.* 2010;118:1071-80.
- Hall DH, Winfrey VP, Blaeuer G, Hoffman LH, Furuta T, Rose KL, et al. Ultrastructural features of the adult hermaphrodite gonad of *Caenorhabditis elegans*: relations between the germ line and soma. *Developmental biology.* 1999;212:101-23.
- Henderson ST, Johnson TE. *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Current biology : CB.* 2001;11:1975-80.
- Hitchcock DR, Black MC, Williams PL. Investigations into using the nematode *Caenorhabditis elegans* for municipal and industrial wastewater toxicity testing. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1997;33:252-60.
- Kimble J, Sharrock WJ. Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology.* 1983;96:189-96.
- Klimis-Tavantzis DJ, Leach RM, Jr., Kris-Etherton PM. The effect of dietary manganese deficiency on cholesterol and lipid metabolism in the Wistar rat and in the genetically hypercholesterolemic RICO rat. *J Nutr.* 1983;113:328-36.
- Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet.* 2001;28:139-45.

- Lin YT, Hoang H, Hsieh SI, Rangel N, Foster AL, Sampayo JN, et al. Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short-lived *Caenorhabditis elegans* mutant. *Free Radical Bio Med.* 2006;40:1185-93.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C) method. *Methods.* 2001;25:402-8.
- Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2003;424:277-83.
- Mutwakil MH, Reader JP, Holdich DM, Smithurst PR, Candido EPM, Jones D, et al. Use of stress-inducible transgenic nematodes as biomarkers of heavy metal pollution in water samples from an english river system. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1997;32:146-53.
- Novillo A, Won SJ, Li C, Callard IP. Changes in Nuclear Receptor and Vitellogenin Gene Expression in Response to Steroids and Heavy Metal in *Caenorhabditis elegans*. *Integrative and comparative biology.* 2005;45:61-71.
- Riddle DL. *C. Elegans II*: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
- Schedin P, Hunter CP, Wood WB. Autonomy and nonautonomy of sex determination in triploid intersex mosaics of *C. elegans*. *Development.* 1991;112:863-79.
- Schneider WJ. Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family. *International review of cytology.* 1996;166:103-37.
- Shaw WM, Luo S, Landis J, Ashraf J, Murphy CT. The *C. elegans* TGF-beta Dauer pathway regulates longevity via insulin signaling. *Current biology : CB.* 2007;17:1635-45.
- Spieth J, Denison K, Zucker E, Blumenthal T. The nucleotide sequence of a nematode vitellogenin gene. *Nucleic acids research.* 1985;13:7129-38.
- Spieth J, Shim YH, Lea K, Conrad R, Blumenthal T. *elt-1*, an embryonically expressed *Caenorhabditis elegans* gene homologous to the GATA transcription factor family. *Molecular and cellular biology.* 1991;11:4651-9.
- Tullet JM, Araiz C, Sanders MJ, Au C, Benedetto A, Papatheodorou I, et al. DAF-16/FoxO directly regulates an atypical AMP-activated protein kinase gamma isoform to mediate the effects of insulin/IGF-1 signaling on aging in *Caenorhabditis elegans*. *Plos Genet.* 2014;10.
- Wang DY, Yang P. Multi-biological defects caused by lead exposure exhibit transferable properties from exposed parents to their progeny in *Caenorhabditis elegans*. *J Environ Sci.* 2007;19:1367-72.
- Wang MC, O'Rourke EJ, Ruvkun G. Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. *Science.* 2008;322:957-60.
- Wollenhaupt SG, Soares AT, Salgueiro WG, Norenberg S, Reis G, Viana C, et al. Seleno- and telluro-xylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO pathway. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association.* 2014;64:192-9.
- Xiao J, Rui Q, Guo YL, Chang XY, Wang DY. Prolonged manganese exposure induces severe deficits in lifespan, development and reproduction possibly by altering oxidative stress response in *Caenorhabditis elegans*. *J Environ Sci-China.* 2009;21:842-8.

10. LEGENDS

Figure 1: Manganese delayed the reproduction of *C. elegans* in a reversible way.

Both egg-production (A) and egg-laying (B) were decreased 24 h after worms left the Mn treatment. Young adult animals were exposed for 4 h, washed and returned to NGM plates seeded with *E. coli* OP50. Brood size (C) was not affected by Mn. Data are shown as mean \pm SEM. * and *** indicate statistical significance ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively) compared to the control group with one-way ANOVA followed by a Bonferroni's test. At least 10 worms were verified each experiments and the assays performed at least four times.

Figure 2: Manganese induces the nuclear localization of the transcription factor DAF-16 in *C. elegans*.

DAF-16 nuclear localization (cytosol, intermediate and nuclear, A) was observed directly following Mn treatment (B) and 24 h post-treatment recovering could be detected (C). The nuclear presence of DAF-16 was almost inexistent in all groups after the rest period. 30 animals were observed in 3 different experiments and classified regarding the DAF-16 localization. SEM, ** $p < 0.01$ comparing nuclear localization to the control group; * $p < 0.05$ comparing intermediate localization to the control group.

Figure 3: Manganese momentarily decreases the expression of two vitellogenins, VIT-2 and VIT-6, and VIT-6 protein production.

qPCR analysis showed a significantly decrease of vit-2 (A) and vit-6 (B) mRNA levels after the treatment. Twenty-four hours post-treatment, the mRNA levels of both vit-2 (C) and vit-6 (D) are similar to the control group. mRNA was isolated from 1000 worms for qPCR assays and ten thousands worms used for western blotting assays in 4 independent experiments. SEM, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; compared to the control group.

Figure 4: *vit-2::gfp* incorporation into yolk is impaired by Mn exposure and recovered after 48 h out-of-treatment. VIT-2::GFP localization driven by the integrated *vit-2p::vit-2::gfp* transgene. Animals were observed at 24 h, 48 h and 72 h (data not shown) after the liquid exposure. The images are representative of at least 20 animals observed for each group. Arrows represent vulval region.

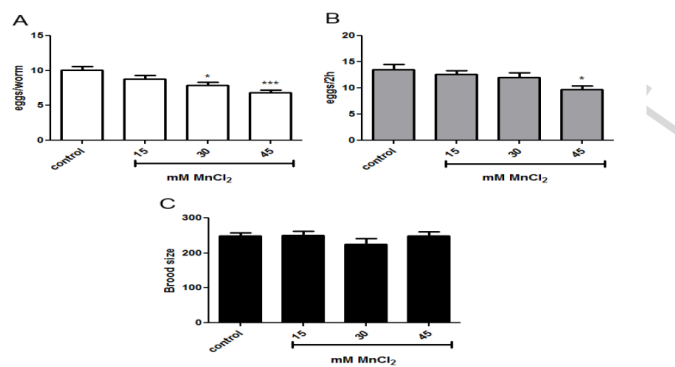


Figure 1

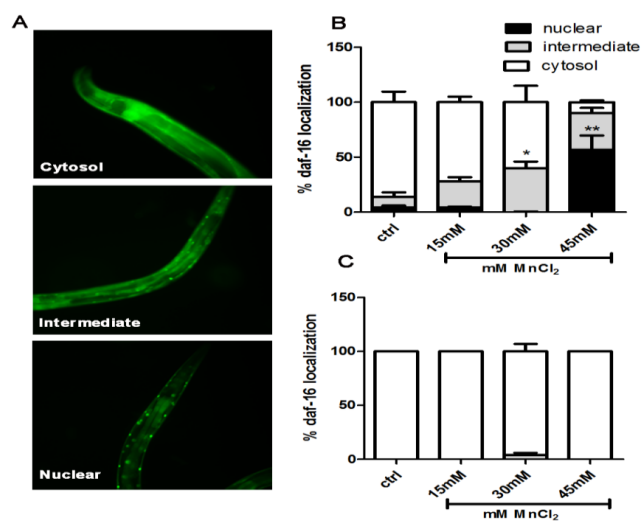


Figure 2

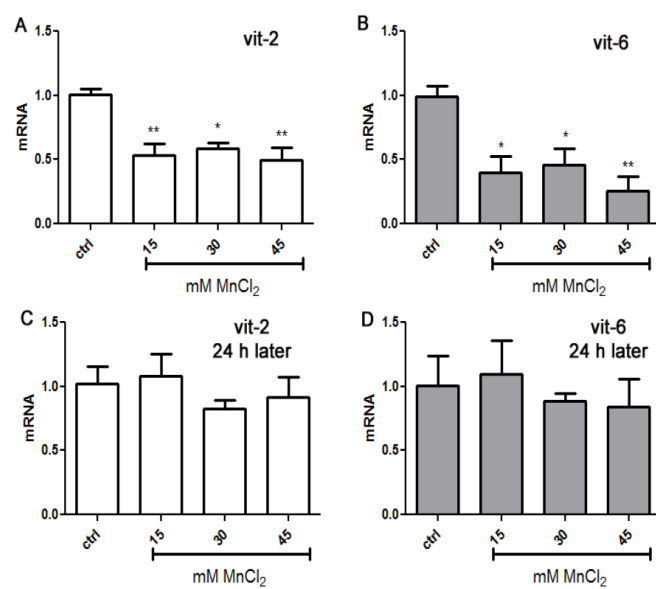


Figure 3

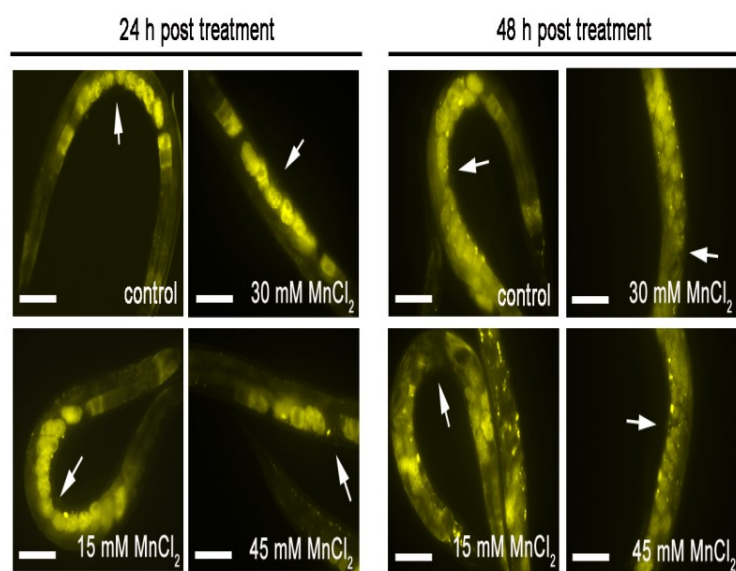


Figure 4

5. Discussão

A indiscutível importância fisiológica do metal Mn, faz indispensável sua presença como componente nutricional diário. Por outro lado, a exposição excessiva ao Mn apresenta-se como um fator eminente na atualidade quando observamos o foco dos estudos relacionados a esse metal. Quando consideramos as questões metabólicas a respeito do excesso de Mn, muitas ainda permanecem inconclusivas, principalmente quanto às vias de atuação deste metal que ocasionam tais efeitos sobre a dinâmica de acúmulo lipídico (Jenkins e Kramer, 1991; Legleiter *et al.*, 2005; Zalevsky *et al.*, 2009).

As avaliações metabólicas são sempre desafiadoras, pois o controle entre ingestão alimentar e demanda energética perfaz-se, por vezes, um fator limitante quando tais estudos são realizados nos modelos experimentais tradicionais. Nesse aspecto, o *C. elegans* é uma ferramenta valiosa para tais estudos, já que conserva inúmeras vias metabólicas, é facilmente cultivável e é um bom indicador em estudos de toxicidade.

Este trabalho avaliou o Mn quanto ao seu potencial em aumentar o acúmulo de gordura e níveis de TGA no verme acima citado. Efeito semelhante pode ser previamente observado em outros modelos experimentais como bovinos, nos quais o Mn aumentou o nível de lipídios totais no plasma, fosfatidilcolina, colesterol e TGA (Jenkins e Kramer, 1991). Em humanos expostos no período pré-natal, há uma predisposição à ocorrência de neonatos com alto índice ponderal (Yu e Cao, 2013). Já a deficiência de Mn, tem acarretado efeitos contrários no metabolismo de lipídios, como a redução no peso corporal e de órgãos, redução de colesterol HDL e apolipoproteína E em ratos (Klimis-Tavantzis *et al.*, 1983; Kawano *et al.*, 1987). Além disso, Baly e col. (1990) mostraram que adipócitos isolados de ratos, cuja dieta era deficiente em Mn, apresentaram síntese reduzidas de TGA em comparação aos ratos que recebiam níveis adequados de Mn (Baly *et al.*, 1990).

Nossos resultados apontam uma redução da atividade metabólica induzida por Mn como reflexo da diminuição no consumo de oxigênio, talvez por tornar lento os processos catabólicos no verme. Neste aspecto, outros estudos têm mostrado que o Mn reduz o metabolismo energético *in vivo* e *in vitro*, incluindo diminuição na atividade das enzimas

mitocondriais, no potencial de membrana, na produção de ATP, principalmente por este metal acumular-se intracelularmente na mitocôndria (Gunter *et al.*, 2009).

O envolvimento da mitocôndria em muitos aspectos do metabolismo intermediário, incluindo na β -oxidação de lipídios torna a sua atividade muito importante para manter a homeostase energética, a qual pode estar sendo alterada por Mn no *C. elegans*.

Inúmeros mecanismos controlam a atividade metabólica no verme e refletem a intensidade de alguns comportamentos executados pelo *C. elegans* como o batimento faríngeo, que representa a frequência de alimentação; os ciclos entre as defecações e o movimento corporal em relação aos principais gastos de energia (Avery e You, 2012). Dentre estes, nossos dados apontam que o Mn reduziu apenas o batimento faríngeo, fato que poderia ter duas considerações relevantes: a primeira é que o meio contendo bactéria e o Mn não seriam palatáveis ao verme e a segunda seria devido a alterações nos sistemas responsáveis pelo controle funcional da faringe. As contrações dos músculos da faringe são principalmente regulados por sinalização serotoninérgica no verme (Horvitz *et al.*, 1982). Estudos mostram que a DA, cujos níveis foram fortemente reduzidos frente ao tratamento com Mn em nosso trabalho, altera os níveis de 5-HT por atuar nos receptores dopaminérgicos DOP-5. Vermes com redução na expressão de dop-5 por RNA de interferência apresentaram redução no batimento faríngeo e prole (www.wormbase.org). Isto reforça que o Mn, como um depletor de DA, poderia estar alterando este comportamento via sistema dopaminérgico. Além disso, a DA no *C. elegans* é um neurotransmissor bastante relacionado ao direcionamento do verme para o alimento (Sawin *et al.*, 2000). Tais reduções nos níveis de DA podem ter ocorrido devido a sua oxidação pelo Mn, o que já foi reportado em outros trabalhos e inclusive associado como um dos principais fatores responsáveis pela toxicidade desse metal (Donaldson *et al.*, 1982).

A DA está implicada a outras funções como neuromoduladora no *C. elegans*, como habituação a estímulos mecânicos (Sanyal *et al.*, 2004) e transições entre os comportamentos de rastejamento e nado (Vidal-Gadea *et al.*, 2011). No *C. elegans*, Mn seletivamente afeta os neurônios dopaminérgicos quando exposto no primeiro estágio larval (L1) (Benedetto *et al.*, 2010). Esta via tem sido amplamente atribuída aos sintomas do manganismo em humanos (Mena *et al.*, 1967; Cook *et al.*, 1974; Barbeau, 1984). No entanto, no presente estudo não verificamos alterações na viabilidade dos neurônios

dopaminérgicos frente ao tratamento com Mn. Somado a isso, avaliações mais recentes sobre o Mn trazem novas discussões a respeito da morte neuronal e a superexposição ao Mn, considerando que há na realidade uma disfunção do sistema dopaminérgico e não propriamente a morte de tais neurônios (Guilarte, 2010).

Recentemente, Barros e col. (2014) demonstraram que DA também atua na regulação do metabolismo de lipídios através da β -oxidação e receptores dopaminérgico no *C. elegans*. A exposição exógena dos vermes à DA induziu uma redução no conteúdo lipídico (Barros *et al.*, 2014).

Frente a este resultado, nossa primeira hipótese para a atuação do Mn foi a via dopaminérgica. Os vermes mutantes *dop-1::dop-4* quando expostos ao Mn, apresentaram níveis ainda mais pronunciados de TGA neste estudo. Este mesmo mutante foi resistente à redução lipídica induzida pela DA exógena sugerindo sua influência no controle dopaminérgico sobre o acúmulo de gordura (Barros *et al.*, 2014). Entretanto, os mutantes *dop-1*, cujos níveis de TGA são normalmente mais altos que nos vermes selvagens, não apresentaram alterações em tais níveis após a exposição ao Mn. Estes resultados sugerem um envolvimento da via dopaminérgica no acúmulo lipídico no nematoide *C. elegans*.

Outros sistemas como os fatores de transcrição SBP-1 e NHR-49 e a proteína Rictor/TORC2 (*let-363*) também participam da regulação do acúmulo lipídico (Watson e Walhout, 2014). SBP-1 é um homólogo conservado no *C. elegans* do fator de transcrição SREBP-1c (*proteínas ligantes de elemento regulatório de estero*) presente nos mamíferos. Na ausência do gene *sbp-1*, os vermes exibem retardo no crescimento, redução nos níveis lipídicos, expressão de genes relacionados à síntese de lipídios alterada (Ashrafi *et al.*, 2003; Kniazeva *et al.*, 2003; McKay *et al.*, 2003; Ashrafi, 2007). Verificamos que o Mn induziu um aumento na expressão de *sbp-1*, bem como aumentou os níveis lipídicos corroborando com os resultados encontrados nos mutantes para o mesmo gene. Os efeitos do Mn sobre a expressão desse gene foi transitória e não verificada 24 h após a retirada do tratamento.

Além disso, testamos a via do TOR (*proteína alvo da rapamicina*) que apresenta um representante homólogo no *C. elegans*, o *Rictor* (*CeRictor*, *let-363*) (Sarbasov *et al.*, 2005; Bhaskar e Hay, 2007; Jones *et al.*, 2009). Os vermes mutantes para o *let-363* apresentam níveis aumentados no acúmulo de lipídios (Jones *et al.*, 2009). Nós

verificamos que o Mn reduziu a expressão de let-363 enquanto aumentou os níveis de TGA, níveis estes que estavam equivalentes aos do grupo controle após 24 h da retirada da exposição. Quanto à expressão do fator de transcrição nhr-49, não observamos quaisquer alterações significativas geradas pelo Mn. Infelizmente, não foi possível fazer quantificações lipídicas nas 24 h posteriores ao tratamento, pois as diferenças no número de ovos entre os grupos poderiam interferir nos resultados já que existe elevado conteúdo lipídico compondo o vitelo (Gubert *et al.*, 2016).

De maneira conjunta, estes resultados indicam que os efeitos do Mn em alterar o acúmulo lipídico não dependem apenas da via dopaminérgica, mas de outras vias incluindo o fator de transcrição SBP-1 e o complexo proteico Rictor/TORC2.

Outro importante resultado neste trabalho refere-se ao atraso na produção de ovos e ovoposição do *C. elegans* causada pela exposição ao Mn. Os invertebrados, quando apresentam grande disponibilidade energética, comumente destinam parte do excesso de energia para a produção de ovos. Ao verificar o excesso de acúmulo de lipídios, esperávamos que houvesse um consequente aumento na produção de ovos. Isso não foi observado nos vermes tratados com Mn. Verificamos ainda que houve um prejuízo no transporte de lipídios executado no *C. elegans* pelas VITs, as quais levam os lipídios do intestino para as gônadas onde farão parte da composição do vitelo.

Lipídios e proteínas presentes no vitelo são fontes nutricionais importantes para o desenvolvimento embrionário no *C. elegans*. Este verme apresenta as vitelogeninas YP170, YP115 e YP88 que são homólogas das VIT de vertebrados e ApoB-100, a principal componente da LDL em mamíferos (Baker, 1988; Spieth *et al.*, 1991). Acredita-se que o transporte e endocitose do vitelo ocorra por vias semelhantes as utilizadas pela LDL nas células somáticas (Goldstein *et al.*, 1985; Schneider, 1996). Neste âmbito, estudos prévios relatam que o Mn causa alterações nas lipoproteínas de ratos, cujos os mecanismos ainda não estão bem estabelecidos (Klimis-Tavantzis *et al.*, 1983). Na tentativa de esclarecer alguns mecanismos, principalmente relacionados aos efeitos do Mn, utilizamos o *C. elegans* para observar o perfil de modificações nas VITs e as consequências no comportamento reprodutivo.

Apesar do atraso na produção de ovos, especialmente durante o primeiro dia de adulto, os vermes tratados com o Mn conseguiram recuperar-se e produzir uma progênie em número equivalente ao grupo controle. Embora Lin e col. (2006) tenham mostrado

resultados semelhantes aos nossos, alguns trabalhos apresentam resultados contrários, mostrando que o Mn causaria redução na prole total (Lin *et al.*, 2006). Vale ressaltar que estes estudos usaram períodos de exposição mais prolongados ou repetidos.

A vitelogênese no *C. elegans* é um dos processos mais dispendiosos energeticamente, demandando nutrientes do intestino para a formação do vitelo. As VITs são formadas no verme a partir da expressão de seis genes (Spieth *et al.*, 1985). Tomando isso como ferramenta, observamos uma redução na expressão do *vit-2* através da cepa transgênica *vit-2p::vit-2::gfp* após a exposição ao Mn. Além disso, os níveis de mRNA apresentaram-se reduzidos tanto para VIT-2 quanto para VIT-6 logo após o tratamento. Essa diminuição da fluorescência dos níveis de mRNA não foram diferentes do controle para as próximas 24 h de remoção do tratamento com o Mn. Dessa forma, verificamos que mesmo os vermes tratados com o Mn após um tempo fora da exposição, foram capazes de recuperar os níveis de mRNA dos genes codificadores das VITs e a produção de progênie equivalentes aos dos vermes não tratados.

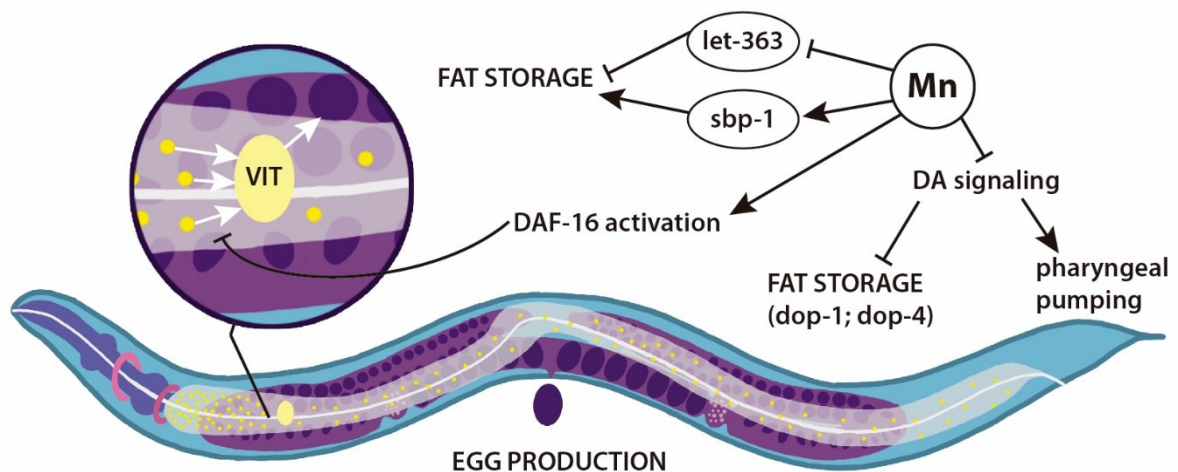
A sinalização pelo fator de transcrição DAF-16 e o transporte de lipídios estão proximamente relacionadas à atividade das VITs. O transporte realizado por tais lipoproteínas é reprimido após o translocamento do DAF-16 do citoplasma para o núcleo (Fischer *et al.*, 2013). Nossos resultados mostram que o Mn não só reduziu a transcrição de VIT, mas também induziu o translocamento nuclear do DAF-16, o qual corresponde à sua forma ativada (Henderson e Johnson, 2001). O *daf-16*, ortólogo ao fator de transcrição mamífero Forkhead box O (FoxO) sofre regulação da cascata do DAF-2 quinase. A ativação dessa cascata leva à fosforilação e ancoramento do DAF-16 no citoplasma. Por outro lado, a redução nessa sinalização causa a desfosforilação do DAF-16 e o seu translocamento para o núcleo da célula onde regulará a transcrição de vários genes (Henderson e Johnson, 2001; Lin *et al.*, 2001). Muitos desses genes controlados pela ativação do DAF-16 estão os relacionados a processos fisiológicos como: metabolismo, longevidade e resposta imune; sendo a via do DAF-16 uma das mais estudadas no verme *C. elegans* (Tullet *et al.*, 2014).

A ativação do DAF-16 têm sido apontado como um fator supressor da vitelogênese em níveis transcripcionais (Depina *et al.*, 2011). Em nosso estudo, verificamos a transição desse fator de transcrição para o núcleo frente à exposição ao Mn. Além disso,

verificamos que o efeito gerado pelo Mn na reprodução foi transitório e completamente revertido após 24 h (vermes com 1 dia de adulto).

Considerando os efeitos observados dos Mn sobre o acúmulo lipídico e a inibição na vitelogênese, sugerimos que o Mn exerceu uma sinalização que direcionou o verme para um maior acúmulo de gorduras e impediu que as mesmas fossem transportadas para as gônadas através das VITs. Tais efeitos podem estar relacionados à ação regulatória de genes como o *let-363*, *sbp-1*, *daf-16*, *vit-2*, *vit-6*; bem como decorrente da sinalização dopaminérgica através da ação conjunta dos receptores dop-1; dop-4 (Figura 8, Manuscrito 1).

Figura 8 – Mecanismo sugerido pelo qual o Mn pode aumentar o acúmulo lipídico e reduzir a produção de ovos. Mn reduziu a expressão de *let-363* e aumentou a de *sbp-1*, ambos efeitos sinalizam para o aumento do acúmulo de gordura. Além disso, Mn reduziu a sinalização por DA e possivelmente houve o envolvimento dos receptores dop-1; dop-4. Isto também poderia explicar a redução no batimento faríngeo. As VITs, lipoproteínas que transportam os lipídios que formarão o vitelo para suprir o desenvolvimento dos embriões, tiveram sua expressão e síntese inibidas por Mn. Este efeito pode ter ocorrido em consequência a regulação por DAF-16, fator de transcrição que foi ativado pela exposição ao Mn. Como resultado, Mn induziu a redução na produção de ovos.



6. Conclusão

O Mn tem sido amplamente estudado quanto aos efeitos observados no manganismo e sua, ainda indefinida, relação com a doença de Parkinson. Neste estudo trouxemos uma nova abordagem considerando as associações do Mn com o metabolismo de lipídios. Utilizando o *C. elegans* como ferramenta experimental, verificamos um aumento no acúmulo de lipídios, redução na atividade metabólica e redução nos comportamentos reprodutivos e batimento faríngeo. Além disso, o Mn reduziu os níveis de DA sem alterar a viabilidade os neurônios dopaminérgicos. Tais efeitos metabólicos, podem estar relacionados com a sinalização de receptores dopaminérgicos e outros genes relacionados ao controle do acúmulo lipídico. Somado aos efeitos metabólicos, observamos uma redução na vitelogênese que foi recuperada aos níveis do controle após a remoção da exposição. Este efeito pode ser atribuído à ativação temporária do fator de transcrição DAF-16 pelo Mn no *C. elegans*.

7. Perspectivas

A continuidade deste trabalho será fundamental para que alguns questionamentos possam ser respondidos. Propomos como experimentos complementares:

- Avaliar o papel da DA endógena na toxicidade do Mn utilizando cepas mutantes para a via de síntese da dopamina e para o transportador de DA.
- Quantificar DA frente à exposição ao Mn em concentrações de 15 mM e 30 mM e reavaliar esses valores 24 h após a remoção do tratamento;
- Confirmar o papel do fator de transcrição DAF-16 no controle da vitelogênese pela exposição ao Mn do verme resultante do cruzamento entre a cepa do mutante *daf-16* e o transgênico *vit-2::GFP*.

8. Referências

ALI, S. F. et al. Manganese-induced reactive oxygen species: comparison between Mn⁺² and Mn⁺³. **Neurodegeneration**, v. 4, n. 3, p. 329-34, Sep 1995. ISSN 1055-8330 (Print) 1055-8330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8581566> >.

ALKEMA, M. J. et al. Tyramine Functions independently of octopamine in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. **Neuron**, v. 46, n. 2, p. 247-60, Apr 21 2005. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15848803> >.

APFELD, J. et al. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. **Genes Dev**, v. 18, n. 24, p. 3004-9, Dec 15 2004. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15574588> >.

ARCHIBALD, F. S.; TYREE, C. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. **Arch Biochem Biophys**, v. 256, n. 2, p. 638-50, Aug 1 1987. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3039917> >.

ASCHNER, J. L.; ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Mol Aspects Med**, v. 26, n. 4-5, p. 353-62, Aug-Oct 2005. ISSN 0098-2997 (Print)

0098-2997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099026> >.

ASCHNER, M.; ERIKSON, K. M.; DORMAN, D. C. Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. **Crit Rev Toxicol**, v. 35, n. 1, p. 1-32, Jan 2005. ISSN 1040-8444 (Print)

1040-8444 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15742901> >.

ASCHNER, M. et al. Manganese and its role in Parkinson's disease: from transport to neuropathology. **Neuromolecular Med**, v. 11, n. 4, p. 252-66, 2009. ISSN 1559-1174 (Electronic)

1535-1084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19657747> >.

ASCHNER, M.; VRANA, K. E.; ZHENG, W. Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS). **Neurotoxicology**, v. 20, n. 2-3, p. 173-80, Apr-Jun 1999. ISSN 0161-813X (Print)

0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385881> >.

ASHRAFI, K. Obesity and the regulation of fat metabolism. **WormBook**, p. 1-20, 2007. ISSN 1551-8507 (Electronic)

1551-8507 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050496> >.

ASHRAFI, K. et al. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. **Nature**, v. 421, n. 6920, p. 268-72, Jan 16 2003. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529643> >.

AU, C. et al. SMF-1, SMF-2 and SMF-3 DMT1 orthologues regulate and are regulated differentially by manganese levels in *C. elegans*. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7792, 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19924247> >.

AVERY, L.; YOU, Y. J. *C. elegans* feeding. **WormBook**, p. 1-23, 2012. ISSN 1551-8507 (Electronic)

1551-8507 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22628186> >.

AVILA, D. S. et al. Manganese. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 637–640, 2016.

BAKER, M. E. Is Vitellogenin an Ancestor of Apolipoprotein-B-100 of Human Low-Density Lipoprotein and Human Lipoprotein-Lipase. **Biochemical Journal**, v. 255, n. 3, p. 1057-1060, Nov 1 1988. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://A1988Q857300045 >.

BALY, D. L.; SCHNEIDERMAN, J. S.; GARCIA-WELSH, A. L. Effect of manganese deficiency on insulin binding, glucose transport and metabolism in rat adipocytes. **J Nutr**, v. 120, n. 9, p. 1075-9, Sep 1990. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2204694> >.

BAQUER, N. Z. et al. Regulation of glucose utilization and lipogenesis in adipose tissue of diabetic and fat fed animals: effects of insulin and manganese. **J Biosci**, v. 28, n. 2, p. 215-21, Mar 2003. ISSN 0250-5991 (Print)

0250-5991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711814> >.

BARBEAU, A. Manganese and extrapyramidal disorders (a critical review and tribute to Dr. George C. Cotzias). **Neurotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 13-35, Spring 1984. ISSN 0161-813X (Print)

0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6538948> >.

BARROS, A. G. et al. Dopamine signaling regulates fat content through beta-oxidation in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85874, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24465759> >.

BENEDETTO, A. et al. Extracellular Dopamine Potentiates Mn-Induced Oxidative Stress, Lifespan Reduction, and Dopaminergic Neurodegeneration in a BLI-3-Dependent Manner in *Caenorhabditis elegans*. **Plos Genetics**, v. 6, n. 8, Aug 2010. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <Go to ISI>://000281383800039 >.

BERTINET, D. B. et al. Brain manganese deposition and blood levels in patients undergoing home parenteral nutrition. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 24, n. 4, p. 223-7, Jul-Aug 2000. ISSN 0148-6071 (Print)

0148-6071 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10885716> >.

BHASKAR, P. T.; HAY, N. The two TORCs and Akt. **Dev Cell**, v. 12, n. 4, p. 487-502, Apr 2007. ISSN 1534-5807 (Print)

1534-5807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17419990> >.

BOUCHARD, M. F. et al. Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. **Environ Health Perspect**, v. 119, n. 1, p. 138-43, Jan 2011. ISSN 1552-9924 (Electronic)

0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20855239> >.

BRODY, A. H. et al. Mancozeb-induced behavioral deficits precede structural neural degeneration. **NeuroToxicology**, v. 34, p. 74-81, 2013.

BROWNLEE, D. J.; WALKER, R. J. Actions of nematode FMRFamide-related peptides on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. **Ann N Y Acad Sci**, v. 897, p. 228-38, 1999. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676451> >.

CALNE, D. B. et al. Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. **Neurology**, v. 44, n. 9, p. 1583-6, Sep 1994. ISSN 0028-3878 (Print)

0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7936278> >.

CARVALHO, C. F. et al. Elevated airborne manganese and low executive function in school-aged children in Brazil. **Neurotoxicology**, v. 45, p. 301-8, Dec 2014. ISSN 1872-9711 (Electronic)

0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24308913> >.

CHASE, D. L.; KOELLE, M. R. Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*. **WormBook**, p. 1-15, 2007. ISSN 1551-8507 (Electronic)

1551-8507 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050501> >.

CHEN, P. et al. Age- and manganese-dependent modulation of dopaminergic phenotypes in a *C. elegans* DJ-1 genetic model of Parkinson's disease. **Metallomics**, v. 7, n. 2, p. 289-98, Feb 2015. ISSN 1756-591X (Electronic)

1756-5901 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25531510> >.

CONSORTIUM, T. C. E. G. S. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2012-8, Dec 11 1998. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851916> >.

COOK, D. G.; FAHN, S.; BRAIT, K. A. Chronic manganese intoxication. **Arch Neurol**, v. 30, n. 1, p. 59-64, Jan 1974. ISSN 0003-9942 (Print)

0003-9942 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4202256> >.

COSTA, M. R. M.; FIGUEREDO, R. C. Manganês. Balanço Mineral Brasileiro. **DNPM**, 2001.

CROSSGROVE, J.; ZHENG, W. Manganese toxicity upon overexposure. **NMR Biomed**, v. 17, n. 8, p. 544-53, Dec 2004. ISSN 0952-3480 (Print)

0952-3480 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15617053> >.

DEPINA, A. S. et al. Regulation of *Caenorhabditis elegans* vitellogenesis by DAF-2/IIS through separable transcriptional and posttranscriptional mechanisms. **BMC Physiol**, v. 11, n. 11, p. 1472-6793, 2011. ISSN 1472-6793 (Electronic)

1472-6793 (Linking).

DOBSON, A. W.; ERIKSON, K. M.; ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1012, p. 115-28, Mar 2004. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15105259> >.

DONALD, D. L. C. *elegans* II. **New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.**, 1997.

DONALDSON, J.; MCGREGOR, D.; LABELLA, F. Manganese neurotoxicity: a model for free radical mediated neurodegeneration? **Can J Physiol Pharmacol**, v. 60, n. 11, p. 1398-405, Nov 1982. ISSN 0008-4212 (Print)

0008-4212 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6129921> >.

DORMAN, J. B. et al. The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 141, n. 4, p. 1399-406, Dec 1995. ISSN 0016-6731 (Print)

0016-6731 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8601482> >.

EDMONDS, J. W. et al. Insulin/FOXO signaling regulates ovarian prostaglandins critical for reproduction. **Dev Cell**, v. 19, n. 6, p. 858-71, 2010. ISSN 1878-1551 (Electronic)

1534-5807 (Linking).

ELLE, I. C. et al. Something worth dyeing for: molecular tools for the dissection of lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. **FEBS Lett**, v. 584, n. 11, p. 2183-93, Jun 3 2010. ISSN 1873-3468 (Electronic)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371247> >.

ELLE, I. C. et al. *C. elegans*: A Model for Understanding Lipid Accumulation. **Lipid Insights**, v. 1, p. 13-21, 2008.

FAGOTTO, F. Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. **J Cell Sci**, v. 108 (Pt 12), p. 3645-7, Dec 1995. ISSN 0021-9533 (Print)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8719870> >.

FARINA, M. et al. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. **Neurochem Int**, v. 62, n. 5, p. 575-94, Apr 2013. ISSN 1872-9754 (Electronic)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266600> >.

FISCHER, M. et al. Vitellogenins increase stress resistance of *Caenorhabditis elegans* after *Photobacterium luminescens* infection depending on the steroid-signaling pathway. **Microbes Infect**, v. 15, n. 8-9, p. 569-78, Jul-Aug 2013. ISSN 1769-714X (Electronic)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727258> >.

FISHER, W. W. et al. DNA regions bound at low occupancy by transcription factors do not drive patterned reporter gene expression in *Drosophila*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 52, p. 21330-5, 2012. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking).

GAMI, M. S. et al. Activated AKT/PKB signaling in *C. elegans* uncouples temporally distinct outputs of DAF-2/insulin-like signaling. **BMC Dev Biol**, v. 6, p. 45, 2006. ISSN 1471-213X (Electronic)

1471-213X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17020605> >.

GAVIN, C. E.; GUNTER, K. K.; GUNTER, T. E. Mn²⁺ sequestration by mitochondria and inhibition of oxidative phosphorylation. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 115, n. 1, p. 1-5, Jul 1992. ISSN 0041-008X (Print)

0041-008X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1631887> >.

GOLDSTEIN, J. L. et al. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. **Annu Rev Cell Biol**, v. 1, p. 1-39, 1985. ISSN 0743-4634 (Print)

0743-4634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2881559> >.

GRANT, B.; HIRSH, D. Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, n. 12, p. 4311-26, Dec 1999. ISSN 1059-1524 (Print)

1059-1524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10588660> >.

GUBERT, P. et al. Reversible reprotoxic effects of manganese through DAF-16 transcription factor activation and vitellogenin downregulation in *Caenorhabditis elegans*. **Life Sci**, Mar 10 2016. ISSN 1879-0631 (Electronic)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26972607> >.

GUILARTE, T. R. Manganese and Parkinson's disease: a critical review and new findings. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 8, p. 1071-80, 2010. ISSN 1552-9924 (Electronic)

0091-6765 (Linking).

GULSON, B. et al. Changes in manganese and lead in the environment and young children associated with the introduction of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl in gasoline--preliminary results. **Environ Res**, v. 100, n. 1, p. 100-14, Jan 2006. ISSN 0013-9351 (Print)

0013-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16337847> >.

GUNTER, T. E.; GAVIN, C. E.; GUNTER, K. K. The case for manganese interaction with mitochondria. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 727-9, Jul 2009. ISSN 1872-9711 (Electronic)

0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19465053> >.

GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am J Physiol**, v. 258, n. 5 Pt 1, p. C755-86, May 1990. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2185657> >.

GUO, Y.; YANG, Y.; WANG, D. Induction of reproductive deficits in nematode *Caenorhabditis elegans* exposed to metals at different developmental stages. **Reprod Toxicol**, v. 28, n. 1, p. 90-5, Jul 2009. ISSN 1873-1708 (Electronic)

0890-6238 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19490999> >.

HASHMI, S. et al. A *C. elegans* model to study human metabolic regulation. **Nutrition & Metabolism**, v. 10, n. 31, 2013.

HENDERSON, S. T.; JOHNSON, T. E. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Curr Biol**, v. 11, n. 24, p. 1975-80, Dec 11 2001. ISSN 0960-9822 (Print)

0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11747825> >.

HERNANDEZ, R. B. et al. Mechanisms of manganese-induced neurotoxicity in primary neuronal cultures: the role of manganese speciation and cell type. **Toxicol Sci**, v. 124, n. 2, p. 414-23, Dec 2011. ISSN 1096-0929 (Electronic)

1096-0929 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21940818> >.

HILLS, T.; BROCKIE, P. J.; MARICQ, A. V. Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in *Caenorhabditis elegans*. **J Neurosci**, v. 24, n. 5, p. 1217-25, Feb 4 2004. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762140> >.

HOPE, I. A. C. *elegans: A Practical Approach*. **Oxford University Press, Oxford.** , 1999.

HORVITZ, H. R. et al. Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 216, n. 4549, p. 1012-4, May 28 1982. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6805073> >.

IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil**. 2010. 38 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA/IBGE. ,

JENKINS, K. J.; KRAMER, J. K. Effect of excess dietary manganese on lipid composition of calf blood plasma, heart, and liver. **J Dairy Sci**, v. 74, n. 11, p. 3944-8, Nov 1991. ISSN 0022-0302 (Print)

0022-0302 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1757632> >.

JIA, K.; CHEN, D.; RIDDLE, D. L. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. **Development**, v. 131, n. 16, p. 3897-906, Aug 2004. ISSN 0950-1991 (Print)

0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15253933> >.

JONES, K. T. et al. Rictor/TORC2 regulates *Caenorhabditis elegans* fat storage, body size, and development through *sgk-1*. **PLoS Biol**, v. 7, n. 3, p. e60, Mar 3 2009. ISSN 1545-7885 (Electronic)

1544-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19260765> >.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 5, p. 387-98, May 2006. ISSN 1474-1776 (Print)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672925> >.

KAWANO, J. et al. Altered high density lipoprotein composition in manganese-deficient Sprague-Dawley and Wistar rats. **J Nutr**, v. 117, n. 5, p. 902-6, May 1987. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3585544> >.

KIMBLE, J.; SHARROCK, W. J. Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. **Dev Biol**, v. 96, n. 1, p. 189-96, Mar 1983. ISSN 0012-1606 (Print)

0012-1606 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6825952> >.

KIMURA, K. D. et al. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 277, n. 5328, p. 942-6, Aug 15 1997. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9252323> >.

KLIMIS-TAVANTZIS, D. J.; LEACH, R. M., JR.; KRIS-ETHERTON, P. M. The effect of dietary manganese deficiency on cholesterol and lipid metabolism in the Wistar rat and in the genetically hypercholesterolemic RICO rat. **J Nutr**, v. 113, n. 2, p. 328-36, 1983. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166 (Linking).

KNIAZEVA, M. et al. Suppression of the ELO-2 FA elongation activity results in alterations of the fatty acid composition and multiple physiological defects, including abnormal ultradian rhythms, in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 163, n. 1, p. 159-69, Jan 2003. ISSN 0016-6731 (Print)

0016-6731 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586704> >.

KURZCHALIA, T. V.; WARD, S. Why do worms need cholesterol? **Nat Cell Biol**, v. 5, n. 8, p. 684-8, Aug 2003. ISSN 1465-7392 (Print)

1465-7392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12894170> >.

LEGLEITER, L. R.; SPEARS, J. W.; LLOYD, K. E. Influence of dietary manganese on performance, lipid metabolism, and carcass composition of growing and finishing steers. **J Anim Sci**, v. 83, n. 10, p. 2434-9, Oct 2005. ISSN 1525-3163 (Electronic)

0021-8812 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16160056> >.

LIN, K. et al. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. **Nat Genet**, v. 28, n. 2, p. 139-45, 2001. ISSN 1061-4036 (Print)

1061-4036 (Linking).

LIN, T. S.; MEIER, P.; NRIAGU, J. Acute toxicity of thallium to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 75, n. 2, p. 350-5, Aug 2005. ISSN 0007-4861 (Print)

0007-4861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222509> >.

LIN, Y. T. et al. Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short-lived *Caenorhabditis elegans* mutant. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 7, p. 1185-93, Apr 1 2006. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16545686> >.

LONG, X. et al. TOR deficiency in *C. elegans* causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. **Curr Biol**, v. 12, n. 17, p. 1448-61, Sep 3 2002. ISSN 0960-9822 (Print)

0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12225660> >.

LUCCHINI, R. G. et al. Inverse association of intellectual function with very low blood lead but not with manganese exposure in Italian adolescents. **Environ Res**, v. 118, p. 65-71, Oct 2012. ISSN 1096-0953 (Electronic)

0013-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22925625> >.

MALTA, D. C. et al. Trends in prevalence of overweight and obesity in adults in 26 Brazilian state capitals and the Federal District from 2006 to 2012. **Rev Bras Epidemiol**, v. 17 Suppl 1, p. 267-76, 2014. ISSN 1980-5497 (Electronic)

1415-790X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054269> >.

MATYASH, V. et al. Distribution and transport of cholesterol in *Caenorhabditis elegans*. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 6, p. 1725-36, Jun 2001. ISSN 1059-1524 (Print)

1059-1524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408580> >.

MCCOLL, G. et al. *Caenorhabditis elegans* maintains highly compartmentalized cellular distribution of metals and steep concentration gradients of manganese. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e32685, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22393436> >.

MCKAY, R. M. et al. *C. elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. **Dev Cell**, v. 4, n. 1, p. 131-42, Jan 2003. ISSN 1534-5807 (Print)

1534-5807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12530969> >.

MECO, G. et al. Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide maneb (manganese ethylene-bis-dithiocarbamate). **Scand J Work Environ Health**, v. 20, n. 4, p. 301-5, Aug 1994. ISSN 0355-3140 (Print)

0355-3140 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7801076> >.

MENA, I. et al. Chronic manganese poisoning. Clinical picture and manganese turnover. **Neurology**, v. 17, n. 2, p. 128-36, Feb 1967. ISSN 0028-3878 (Print)

0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6066873> >.

MENEZES, P. W. et al. Nanostructured manganese oxides as highly active water oxidation catalysts: a boost from manganese precursor chemistry. **ChemSusChem**, v. 7, n. 8, p. 2202-11, Aug 2014. ISSN 1864-564X (Electronic)

1864-5631 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25044528> >.

MERGLER, D. et al. Manganese neurotoxicity, a continuum of dysfunction: results from a community based study. **Neurotoxicology**, v. 20, n. 2-3, p. 327-42, Apr-Jun 1999. ISSN 0161-813X (Print)

0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385894> >.

MULLANEY, B. C.; ASHRAFI, K. C. elegans fat storage and metabolic regulation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1791, n. 6, p. 474-8, Jun 2009. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168149> >.

MURPHY, C. T. et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, n. 6946, p. 277-83, 2003. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking).

NARBONNE, P.; ROY, R. *Caenorhabditis elegans* dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. **Nature**, v. 457, n. 7226, p. 210-4, Jan 8 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19052547> >.

NASS, R. et al. Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 5, p. 3264-9, Mar 5 2002. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867711> >.

NEMOTO, S.; FINKEL, T. Ageing and the mystery at Arles. **Nature**, v. 429, n. 6988, p. 149-52, May 13 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15141200> >.

NOVILLO, A. et al. Changes in Nuclear Receptor and Vitellogenin Gene Expression in Response to Steroids and Heavy Metal in *Caenorhabditis elegans*. **Integr Comp Biol**, v. 45, n. 1, p. 61-71, Jan 2005. ISSN 1540-7063 (Print)

1540-7063 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21676746> >.

O'ROURKE, E. J. et al. *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. **Cell Metab**, v. 10, n. 5, p. 430-5, Nov 2009. ISSN 1932-7420 (Electronic)

1550-4131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19883620> >.

OGG, S. et al. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 994-9, Oct 30 1997. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353126> >.

OMS. Concise International Chemical Assessment Document 12 - Manganese and its compounds. **Organização Mundial da Saúde**, 1999.

PAL, P. K.; SAMII, A.; CALNE, D. B. Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. **Neurotoxicology**, v. 20, n. 2-3, p. 227-38, Apr-Jun 1999. ISSN 0161-813X (Print)

0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385886> >.

PARADIS, S.; RUVKUN, G. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. **Genes Dev**, v. 12, n. 16, p. 2488-98, Aug 15 1998. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9716402> >.

PEREZ, C. L.; VAN GILST, M. R. A ¹³C isotope labeling strategy reveals the influence of insulin signaling on lipogenesis in *C. elegans*. **Cell Metab**, v. 8, n. 3, p. 266-74, Sep 2008. ISSN 1932-7420 (Electronic)

1550-4131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18762027> >.

PHIPPS, D. A. The Biological Role of Metals. **Cambridge University Press.**, 2002.

REDDY, J. K.; HASHIMOTO, T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. **Annu Rev Nutr**, v. 21, p. 193-230, 2001. ISSN 0199-9885 (Print)

0199-9885 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375435> >.

RINGSTAD, N.; ABE, N.; HORVITZ, H. R. Ligand-gated chloride channels are receptors for biogenic amines in *C. elegans*. **Science**, v. 325, n. 5936, p. 96-100, Jul 3 2009. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19574391> >.

RIOJAS-RODRIGUEZ, H. et al. Intellectual function in Mexican children living in a mining area and environmentally exposed to manganese. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 10, p. 1465-70, Oct 2010. ISSN 1552-9924 (Electronic)

0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20936744> >.

SAMPAIO, J. A. et al. Rochas e Minerais Industriais – Manganês. **CETEM**, p. 515 a 530, 2002.

SANYAL, S. et al. Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. **EMBO J**, v. 23, n. 2, p. 473-82, Jan 28 2004. ISSN 0261-4189 (Print)

0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14739932> >.

SARBASSOV, D. D. et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098-101, Feb 18 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15718470> >.

SAWIN, E. R.; RANGANATHAN, R.; HORVITZ, H. R. *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. **Neuron**, v. 26, n. 3, p. 619-31, Jun 2000. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10896158> >.

SCF/CS/NUT/UPPLEV/21. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Manganese. **European Commission of Health & Consumer Protection**, 2000.

SCHNEIDER, W. J. Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family. **Int Rev Cytol**, v. 166, p. 103-37, 1996. ISSN 0074-7696 (Print)

0074-7696 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8881774> >.

SHAW, W. M. et al. The C. elegans TGF-beta Dauer pathway regulates longevity via insulin signaling. **Curr Biol**, v. 17, n. 19, p. 1635-45, Oct 9 2007. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17900898> >.

SPIETH, J. et al. The nucleotide sequence of a nematode vitellogenin gene. **Nucleic Acids Res**, v. 13, n. 19, p. 7129-38, Oct 11 1985. ISSN 0305-1048 (Print) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3855245> >.

SPIETH, J. et al. elt-1, an embryonically expressed Caenorhabditis elegans gene homologous to the GATA transcription factor family. **Mol Cell Biol**, v. 11, n. 9, p. 4651-9, Sep 1991. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1875944> >.

STEPENS, A. et al. A Parkinsonian syndrome in methcathinone users and the role of manganese. **N Engl J Med**, v. 358, n. 10, p. 1009-17, Mar 6 2008. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322282> >.

SZE, J. Y. et al. Food and metabolic signalling defects in a Caenorhabditis elegans serotonin-synthesis mutant. **Nature**, v. 403, n. 6769, p. 560-4, Feb 3 2000. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676966> >.

TAKEDA, A. Manganese action in brain function. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 41, n. 1, p. 79-87, Jan 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12505649> >.

TORRES-AGUSTIN, R. et al. Effect of environmental manganese exposure on verbal learning and memory in Mexican children. **Environ Res**, v. 121, p. 39-44, Feb 2013. ISSN 1096-0953 (Electronic) 0013-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23141434> >.

TULLET, J. M. et al. DAF-16/FoxO directly regulates an atypical AMP-activated protein kinase gamma isoform to mediate the effects of insulin/IGF-1 signaling on aging in Caenorhabditis elegans. **Plos Genetics**, v. 10, n. 2, 2014. ISSN 1553-7404 (Electronic) 1553-7390 (Linking).

UEDA, M. et al. Effects of divalent cations on the regulation of insulin-sensitive glucose transport and cAMP phosphodiesterase in adipocytes. **J. Biol. Chem**, v. 259, p. 9520.–9525, 1984.

VAN GILST, M. R. et al. Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*. **PLoS Biol**, v. 3, n. 2, p. e53, Feb 2005. ISSN 1545-7885 (Electronic)

1544-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15719061> >.

VAN ROMPAY, L. et al. New genetic regulators question relevance of abundant yolk protein production in *C. elegans*. **Sci Rep**, v. 5, p. 16381, 2015. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26553710> >.

VERITY, M. A. Manganese neurotoxicity: a mechanistic hypothesis. **Neurotoxicology**, v. 20, n. 2-3, p. 489-97, Apr-Jun 1999. ISSN 0161-813X (Print)

0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385907> >.

VIDAL-GADEA, A. et al. *Caenorhabditis elegans* selects distinct crawling and swimming gaits via dopamine and serotonin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 42, p. 17504-9, Oct 18 2011. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21969584> >.

WALTS, C. T. et al. Do sex or race differences influence strength training effects on muscle or fat? **Med Sci Sports Exerc**, v. 40, n. 4, p. 669-76, Apr 2008. ISSN 0195-9131 (Print)

0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18317378> >.

WANG, D. Y.; WANG, Y. Phenotypic and behavioral defects caused by barium exposure in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 54, n. 3, p. 447-53, Apr 2008. ISSN 1432-0703 (Electronic)

0090-4341 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932710> >.

WANG, D. Y.; YANG, P. Multi-biological defects caused by lead exposure exhibit transferable properties from exposed parents to their progeny in *Caenorhabditis elegans*. **J Environ Sci**, v. 19, n. 11, p. 1367-72, 2007. ISSN 1001-0742 (Print)

1001-0742 (Linking).

WANG, M. C. et al. RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy. **Nat Methods**, v. 8, n. 2, p. 135-8, Feb 2011. ISSN 1548-7105 (Electronic)

1548-7091 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21240281> >.

WATSON, E.; WALHOUT, A. J. Caenorhabditis elegans metabolic gene regulatory networks govern the cellular economy. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 10, p. 502-8, Oct 2014. ISSN 1879-3061 (Electronic)

1043-2760 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24731597> >.

WATTS, J. L. Fat synthesis and adiposity regulation in Caenorhabditis elegans. **Trends Endocrinol Metab**, v. 20, n. 2, p. 58-65, Mar 2009. ISSN 1043-2760 (Print)

1043-2760 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19181539> >.

WHO. Obesity and overweight. **World Health Organization**, 2015.

WOLLENHAUPT, S. G. et al. Seleno- and telluro-xylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in C. elegans via the DAF-16/FOXO pathway. **Food Chem Toxicol**, v. 64, p. 192-9, Feb 2014. ISSN 1873-6351 (Electronic)

0278-6915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24296137> >.

WOOD, W. B. Determination of pattern and fate in early embryos of Caenorhabditis elegans. **Dev Biol (N Y 1985)**, v. 5, p. 57-78, 1988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3077982> >.

WU, Q. et al. Quantum dots increased fat storage in intestine of Caenorhabditis elegans by influencing molecular basis for fatty acid metabolism. **Nanomedicine**, Mar 5 2016. ISSN 1549-9642 (Electronic)

1549-9634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26956412> >.

WU, Y.; LUO, Y. Transgenic C. elegans as a model in Alzheimer's research. **Curr Alzheimer Res**, v. 2, n. 1, p. 37-45, Jan 2005. ISSN 1567-2050 (Print)

1567-2050 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15977988> >.

XIAO, J. et al. Prolonged manganese exposure induces severe deficits in lifespan, development and reproduction possibly by altering oxidative stress response in Caenorhabditis elegans. **Journal of Environmental Sciences-China**, v. 21, n. 6, p. 842-848, 2009. ISSN 1001-0742. Disponível em: < <Go to ISI>://000266943600022 >.

YANG, F. et al. An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis. **Nature**, v. 442, n. 7103, p. 700-4, Aug 10 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16799563> >.

YU, X.; CAO, L. Elevated cord serum manganese level is associated with a neonatal high ponderal index. **Environ Res**, v. 121, p. 79-83, Feb 2013. ISSN 1096-0953 (Electronic)

0013-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23164521> >.

ZALEVSKY, J. et al. The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcγ receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates. **Blood**, v. 113, n. 16, p. 3735-43, Apr 16 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109559> >.

ZHANG, J. et al. Mutation in *Caenorhabditis elegans* Kruppel-like factor, KLF-3 results in fat accumulation and alters fatty acid composition. **Exp Cell Res**, v. 315, n. 15, p. 2568-80, Sep 10 2009. ISSN 1090-2422 (Electronic)

0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427851> >.

ZHANG, Y. et al. Comparative genomics and functional study of lipid metabolic genes in *Caenorhabditis elegans*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 164, 2013. ISSN 1471-2164 (Electronic)

1471-2164 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23496871> >.

Sites acessados:

<http://www.wormatlas.org/> acesso em 20 de abril de 2016.

<http://www.worbook.org/> acesso em 20 de abril de 2016.

<http://www.wormbase.org/> acesso em 20 de abril de 2016.

