



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

VANESSA ECLÉA DE OLIVEIRA

**POTENCIAL NEUROTÓXICO DO ALUMÍNIO COMO MODELO DA DOENÇA DE
ALZHEIMER EM *CAENORHABDITIS ELEGANS***

**ERECHIM
2016**

VANESSA ECLÉA DE OLIVEIRA

**POTENCIAL NEUROTÓXICO DO ALUMÍNIO COMO MODELO DA
DOENÇA DE ALZHEIMER EM *CAENORHABDITIS ELEGANS***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental sob a orientação da Prof^a Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin e Prof^a Dra. Helen Treichel.

ERECHIM
2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a meus pais, Rogério e Eliane, que primaram pela minha educação, muito obrigada por me mostrarem a importância dos estudos e de uma vida digna, por estarem ao meu lado e me proporcionarem a oportunidade de correr atrás dos meus sonhos. Hoje mais do que nunca percebo o quanto sou abençoada por ter pais tão batalhadores e corretos.

À minhas irmãs, Caroline e Jéssica e demais familiares que compreenderam meus momentos de tensão e ausência, permanecendo me apoiando em todos os momentos.

A meus amigos que sempre me apoiaram e incentivaram, sempre com palavras de motivação, não me deixando esmaecer.

Um agradecimento muito especial e do fundo do meu coração às minhas orientadoras, Rosilene Perin e Helen Treichel, vocês são meu exemplo, pessoal e profissional. Admiro-as muito. Seus exemplos e ensinamentos me fizeram enxergar um horizonte de possibilidades.

A todos os professores do PPG em Ciência e Tecnologia Ambiental da UFFS, que nos transmitiram tantos conhecimentos.

A todos os colegas e servidores do PPG, que sempre, de uma maneira ou outra, me ajudaram a chegar a esse momento.

A minhas colegas de trabalho do IFRS – Câmpus Sertão que sempre me apoiaram no que foi necessário.

Às queridas bolsistas do IFRS, que sempre estiveram presentes, ajudando, motivando, alegrando, contribuindo para que meus dias fossem mais bonitos.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para que esse sonho se realizasse.

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei nos ombros de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

O alumínio (Al) é um dos metais mais abundantes da crosta terrestre, sendo reconhecido como um potencial agente neurotóxico que promove a progressão de desordens neurológicas, como a Doença de Alzheimer (DA). Porém, o papel do Al na etiologia da AD permanece desconhecido. Dessa forma, o presente estudo pretende avaliar o potencial neurotóxico do Al e sua relação com a Doença de Alzheimer (AD), através da análise de parâmetros comportamentais e do status do sistema nervoso colinérgico, através da análise da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), usando cepas selvagens e o modelo de DA de cepas transgênicas do nematoide *C. elegans*. Após exposição crônica e aguda ao Al, os resultados indicaram que o Al altera o status colinérgico, aumentando sua atividade em cepas transgênicas nas concentrações mais baixas, até 116% na cepa transgênica GMC101 na concentração 0,5 mM em relação ao controle, revelando um possível efeito bifásico da exposição ao Al e consequente alteração dos parâmetros comportamentais do nematóide, sugerindo uma relação entre a exposição ao Al e a etiologia da AD.

Palavras-chave: Metal. Desordens neurológicas. *C. elegans*. Acetilcolinesterase. Análise comportamental.

ABSTRACT

Aluminum is one of the most abundant metals in the earth's crust, and is recognized as a potential neurotoxic agent that promotes the progression of neurological disorders, including the Alzheimer's disease (AD). However, the role of Al in the etiology of AD remains unknown. Thus, this study intends to evaluate the neurotoxic potential of Al and its role in the etiology of Alzheimer's disease (AD), through the analysis of behavioral parameters and status of the cholinergic nervous system using wild strains and the AD model transgenic strains of the nematode *C. elegans*. After chronic and acute exposure to Al, the results indicated that Al alters the cholinergic status, for example, increasing its activity in transgenic strains in lower concentrations, up to 116% in GMC101 strain in 0.5 mM concentration in relation to the control, and consequently changing behavioral parameters of the nematode, suggesting a relationship between exposure to Al and the etiology of AD.

Keywords: Metal. Neurological disorders. *C. elegans*. Acetylcholinesterase. Behavioral analysis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	ALUMÍNIO.....	17
2.2	DOENÇA DE ALZHEIMER.....	19
2.3	ACETILCOLINESTERASE.....	20
2.4	CAENORHABDITIS ELEGANS.....	22
3	OBJETIVOS.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
5	RESULTADOS.....	30
	Artigo: “The Aluminum and the etiology of Alzheimer’s disease in the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	31
6	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

A exposição a metais ocorre naturalmente no ambiente, mas desde a Revolução Industrial a distribuição e disponibilidade dos metais aos sistemas biológicos têm aumentado significativamente (HOPKIN, 1989). A descarga de efluentes derivados de instalações industriais é complexa, abrangendo diferentes componentes que variam continuamente no que se refere à quantidade e qualidade, dentre esses metais o alumínio (Al) tem se destacado, pois é encontrado em remédios, cosméticos, utensílios domésticos, vacinas e também na água de beber. Além disso, sais de alumínio são utilizados nos processos químicos para o tratamento de efluentes, como na coagulação-floculação, tecnologia utilizada por ser eficiente e de baixo custo (GUPTA e ALI, 2013), para esse procedimento o sulfato de alumínio é o reagente de escolha, por ser um floculante químico com bom desempenho, baixo-custo, efetividade e disponibilidade.

As implicações do alumínio na saúde não são completamente claras, por esse motivo a legislação, no que diz respeito ao teor de alumínio na água, não leva em consideração os efeitos desse metal na saúde humana, mas apenas questões relacionadas com a qualidade organoléptica da água. Outra questão que deve ser levada em conta é que, o alumínio total por si não é tão tóxico e biodisponível quanto quando encontrado complexado com outros elementos (EXLEY e MOLD, 2015).

Embora o Al seja o metal mais abundante na terra, não apresenta uma função biológica conhecida (SUWALSKY *et al.*, 2004), no entanto, ele é reconhecido como um agente neurotóxico causando encefalopatias, doenças psicomotoras e neurodegenerativas, entre estas a Doença de Alzheimer (DA) (EXLEY e KORCHAZHKINA, 2001). Ao observar o contexto da atualidade pode-se verificar o aumento da longevidade da população, em conjunto com esse fator cresce também a prevalência de doenças neurodegenerativas, onde o problema reside nos tratamentos para tais desordens, que por vezes são indisponíveis e/ou ineficazes (DIMITRIADI e HART, 2010). Corroborando esse fato, altos níveis de Al foram encontrados em áreas encefálicas de pacientes com placas senis e emaranhados neurofibrilares, característicos da DA (ZATTA, 2003). Entretanto, como o Al apresenta uma alta reatividade biológica há uma grande gama de potenciais ligantes com a forma Al(III) que poderiam induzir neurotoxicidade (EXLEY, 2009). Dessa forma, o mecanismo de indução da neurotoxicidade do Al permanece desconhecido.

Agentes neurotóxicos podem levar ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a DA, prevalente na população idosa. Caracteriza-se clinicamente pela perda progressiva de memória e outras habilidades cognitivas; histopatologicamente é identificada pela presença de placas senis, constituídas, principalmente, pelas espécies tóxicas do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares, constituídos pelas formas agregada e hiperfosforilada da proteína tau, no cérebro de indivíduos afetados (VICKERS *et al.*, 2000). Neumann (2013) explica que como sintomas iniciais verificam-se a perda de memória recente, dificuldade para manter a atenção e desorientação espacial e temporal, apresentando esquecimento e dificuldade para absorver novas informações, trazendo mudanças em seu comportamento. Progressivamente, já apresenta dificuldades para desenvolver atividades de rotina, pois compreensão, expressão e atividades motoras já foram afetadas. Após este período o paciente já apresenta completa deterioração intelectual e motora, em estado de dependência total de cuidados.

Segundo o IBGE (2012) não existem dados sobre a incidência de DA no Brasil, mas estima-se que 1,2 milhão de pessoas sofram com a doença, aumentando cerca de 100 mil casos por ano. Por isso verifica-se a importância de estudos mais aprofundados sobre a etiologia da doença. Nesse sentido, novas metodologias de estudo devem ser empregadas, e para isso novos modelos experimentais vem sendo utilizados, e um deles é o nematódeo *Caenorhabditis elegans*.

O *C. elegans* tem sido muito utilizado como modelo em pesquisas na área de toxicologia, biologia molecular, farmacologia, entre outros, em se tratando de estudos sobre a DA possui um gene relacionado à APP (proteína precursora amilóide), chamado APP-1, porém esta não possui a região codificadora do peptídeo beta amilóide ($A\beta$), que é um produto natural do metabolismo da APP (DAIGLE, LI, 1993). Sabe-se que a DA é caracterizada por placas senis que em sua maior parte é constituída do peptídeo $A\beta$ (DRAKE *et al.*, 2003). Por este motivo, são utilizados modelos transgênicos deste nematódeo, que expressam as espécies tóxicas $A\beta$, para estudo da deposição e toxicidade de $A\beta$ e da AD (WU *et al.*, 2006).

Assim, considerando a importância da compreensão dos mecanismos fisiológicos da DA e o papel do Al na etiologia dessa desordem neurológica, bem como, a real dificuldade de diagnóstico dos pacientes com DA, faz-se fundamental o desenvolvimento

de modelos animais que possam ser utilizados para o estudo desta desordem. Ao mesmo tempo, devido à complexidade do cérebro de vertebrados e a conservação dos mecanismos neurológicos, o uso de *C. elegans* é uma alternativa promissora aos tradicionais modelos experimentais de doenças neurodegenerativas em humanos (PARK e LI, 2008). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial neurotóxico do A β e seu papel na etiologia da DA, através da análise de parâmetros comportamentais e do status do sistema nervoso colinérgico usando cepas selvagens e o modelo de AD de cepas transgênicas do nematódeo *C. elegans*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ALUMÍNIO

O Al é abundante no meio ambiente, representando 8,8 % da crosta terrestre, e é o terceiro elemento mais abundante depois do oxigênio e sílica (BONDY, 2015). Ele é utilizado nas mais diferentes áreas, como na construção civil, transportes, tintas, explosivos químicos, medicina, cosmética, e na indústria alimentar (embalagens, painéis), além de muito usado no tratamento de águas como agente coagulante (WHO, 2003). O ser humano se expõe ao alumínio inevitavelmente, já que essa substância se encontra dissolvida na natureza, como em alimentos, na água e no ar, e também existe a forma de ingestão através do uso de medicamentos, águas tratadas, produtos de consumo, entre outros (ROSALINO, 2011).

A maior parte dos sais de Al apresenta alta insolubilidade, num intervalo de pH entre 6 e 8, a solubilidade é alcançada em condições ácidas (<pH6). A crescente solubilidade leva a alterações na especiação química do Al, podendo alterar-se da forma particulada e orgânica menos tóxica a formas de monômeros inorgânicos mais tóxicos (WENG *et al.*, 2002). Quando o Al, em forma de monômeros inorgânicos, encontra-se nas águas superficiais tem como efeito a diminuição de diversas espécies, pois nessa forma o Al apresenta toxicidade maior, tendo a capacidade de atravessar as membranas biológicas (WARBY, JOHNSON e DRISCOLL, 2008).

O metal já é considerado tóxico para as populações vegetais e animais a nível aquático em águas ácidas ou com reduzida capacidade tamponante em concentrações a partir de 0,1mg/L (HEMAT, 2009).

Quando se fala em exposição humana não ocupacional leva-se em consideração que muitos remédios contêm sais de alumínio; como por exemplo, o óxido de Al que é usado como adjuvante em muitas vacinas para promover a ativação do sistema imune; além de antiácidos, aspirinas e antitranspirantes comumente conterem Al em sua composição (BONDY, 2015). Adultos que ingerem medicações que contêm em sua formulação o alumínio podem estar ingerindo até 5 g desse metal por dia (WHO, 2003; HEALTH CANADA, 1998). De acordo com Bondy (2015) a forma mais comum de absorção do Al é pelo trato gastrointestinal, um adulto, diariamente, absorve entre 1 e 20 mg de alumínio das mais diversas fontes de exposição. Os alimentos são responsáveis por cerca de 8 mg Al/dia, porém existe uma preocupação muito grande no que diz respeito a exposição ao Al nas águas de consumo, pois assim ele se encontra mais

biodisponível, facilitando sua entrada no organismo, e assim podendo manifestar seu potencial neurotóxico.

Dependendo da finalidade de uso da água, a legislação prevê diferentes parâmetros de qualidade, porém quando se trata de abastecimento público as normas são bastante rígidas, a possibilidade de presença de quantidades residuais de Al tem sido vista como não desejável na água para abastecimento. Sua presença nas águas superficiais, muitas vezes causadas pelas frequentes chuvas ácidas, pode levar ao acúmulo desse residual, ainda deve-se levar em consideração o fato de utilizarem sais de Al como coagulantes no processo de tratamento da água, levando ao aumento expressivo da concentração residual de Al nas águas tratadas (WANG *et al.*, 2010).

A preocupação com a presença de alumínio na água de consumo público se dá principalmente por duas questões, primeiramente, porque altas concentrações de alumínio nas águas tratadas aumentam a turvação, diminuindo a eficiência da desinfecção e também pelo fato de que esse metal possa estar ligado ao surgimento de doenças neurodegenerativas (SRINIVASAN *et al.*, 1999). Gupta *et al.* (2005), bem como Suwalski (2000) e outros pesquisadores afirmam que nunca foi evidenciado que o alumínio apresente funções biológicas, levando a crer que essa substância apresente características que seriam neutras ou incompatíveis com processos fundamentais à vida.

Considerando que o Al é um metal bioacumulador e pode alterar a fluidez de membranas biológicas, pois do trato gastrointestinal é transferido para o sistema vascular através do sangue, ligado à proteína transferrina, dessa forma, podendo entrar no sistema nervoso central atravessando a barreira hematoencefálica usando um receptor endocítico de transferrina (BONDY, 2015), e como o metal em questão tem uma grande capacidade de se acumular no cérebro, as encefalopatias são bastante observadas, já que ele induz a degeneração neurofibrilar e morte neuronal (RONDEAU *et al.*, 2000). Bakar (2010) lembra que muitos estudos já demonstraram os prejuízos que o alumínio acumulado no cérebro podem trazer, indicando que seria um fator determinante para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Gupta *et al.* (2005) nos apresenta que em 1965, Klatzo demonstrou que injeções de sais de alumínio no cérebro de coelhos formaram emaranhados neurofibrilares semelhantes aos encontrados em cérebros com doença de Alzheimer e, posteriormente, em 1973, Crapper estudou cérebros de pacientes com AD e pode verificar que esses apresentavam concentrações de alumínio 2 a 3 vezes maiores que cérebros de não doentes de Alzheimer.

Outra característica do Al é que o mesmo interage com proteínas, alterando a sua conformação e reforçando processos tóxicos levando à interferência com o metabolismo de metais essenciais, como Mg (II), Ca (II) e Fe (III) (KISS, 2001). Ele se liga a sítios ativos de sistemas saudáveis que deveriam ser preenchidos por outros metais, algumas proteínas apresentam afinidade aumentada ao Al e diminuída para outros metais, prejudicando a função da proteína e levando a problemas neurológicos (REZABAL *et al.*, 2007). Dessa forma, considerando a capacidade do metal em atravessar a barreira hematoencefálica, bem como a capacidade de bioacumular nos tecidos substituindo os íons metálicos constituintes das proteínas, é fundamental avaliar a atividade de enzimas envolvidas na modulação da neurotransmissão.

2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

A doença de Alzheimer (DA) é a patologia neurodegenerativa mais comum associada à idade, e suas manifestações cognitivas e neuropsiquiátricas resultam em deficiência progressiva e incapacitação. Segundo Sereniki (2008) a doença afeta aproximadamente 10% dos indivíduos com idade superior a 65 anos e 40% acima de 80 anos, lembrando que em 2050, acredita-se que mais de 25% da população mundial será idosa, e poderá estar suscetível ao DA. A DA é possivelmente o resultado de um processo multifatorial, onde componentes genéticos e ambientais estão envolvidos. Leva-se em consideração que características genéticas individuais são influenciadas por exposições ambientais. Fatores de risco ambientais pautados para o desenvolvimento da DA incluem a exposição ao Al, sendo esse um dos fatores de risco ambientais mais estudados (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO ALUMÍNIO, 2000). Porém, o mecanismo bioquímico e fisiológico através do qual o Al atua na progressão dessa desordem permanece desconhecido.

Sabe-se que a DA é a mais comum doença neurodegenerativa, marcada por sintomas como declínio cognitivo, mudanças comportamentais e perda irreversível da memória (MATTSON, 2004) Estima-se que a sobrevida média de pacientes com AD seja de 7,1 anos, porém a contribuição da demência na mortalidade não é fácil de avaliar, já que nas declarações de óbito não constam como causa direta de falecimento. (WHO, 2012). Como sintoma inicial da patologia observa-se a perda progressiva da memória recente. Com o progresso da DA ocorrem mais prejuízos à memória e à cognição, como deficiências de linguagem e em funções visuo-espaciais; sintomas que são muitas vezes

seguidos por distúrbios comportamentais, incluindo agressividade, depressão e alucinações (SERENEKINI, 2008). Os sintomas clínicos da DA progridem como consequência da degeneração seletiva das células nervosas em regiões críticas do encéfalo para a aquisição de memória, performance cognitiva e personalidade dos afetados (PRICE *et al.*, 1998).

Na DA é observada a formação de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares no cérebro dos pacientes (HUANG e MUCKE, 2012). As placas amilóides são formadas por peptídeos Beta-amilóide (A β) e os emaranhados neurofibrilares contendo grande quantidade de proteína T hiperfosforilada (HUANG e MUCKE, 2012). Histologicamente, a DA é mais comum forma de demência caracterizada pela grande perda sináptica e degeneração neuronal nas regiões do cérebro que são responsáveis pelas funções cognitivas, como córtex cerebral, hipocampo, córtex entorrinal e estriado ventral (LI e LE, 2013).

Essa grande perda sináptica prejudica a neurotransmissão que é um processo dinâmico, amparado por um ciclo constante de liberação de neurotransmissores em resposta à estimulação. A acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima regulatória do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (GONÇALVES e SILVA, 2007). O neurotransmissor ACh, seus receptores e enzimas responsáveis por sua síntese e degradação constituem o sistema colinérgico, responsável pelo aprendizado, memória, organização cortical de movimentos e fluxo sanguíneo cerebral (WINOCUR e GRENEWOOD, 1999)

2.3 ACETILCOLINETERASE

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima da família das colinesterases, e é responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), estando presente no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (RANG, 2001). No SNP, a AChE modula os impulsos nervosos que controlam os batimentos cardíacos, a dilatação dos vasos sanguíneos e a contração dos músculos lisos. Já no SNC está envolvida no controle motor, na cognição e na memória (PETRONILHO, 2011). A atividade da AChE é influenciada por fatores como dietas (KAIZER *et al.*, 2004; VAJRESWARI *et al.*, 2002) e exposição a metais, como o Al (ZATTA *et al.*, 2002).

A AChE é uma enzima regulatória, que hidrolisa o neurotransmissor ACh, encontrada principalmente no encéfalo, músculos, eritrócitos e neurônios colinérgicos (MESULAM *et al.*, 2002); o neurotransmissor ACh é hidrolisado a partir de sua ligação ao resíduo de serina no sítio ativo da enzima, formando o intermediário acetil-AChE, liberando colina. Em sequência, há a hidrólise desse intermediário liberando acetato, e permitindo o “turnover” da enzima (SOREQ e SEIDMAN, 2001).

A ACh é um neurotransmissor formado na região terminal dos neurônios, chamada de axônio terminal, ficando contida em vesículas sinápticas; quando um impulso nervoso chega no axônio terminal, o neurônio libera a ACh para a região sináptica, que é atraída pelos receptores colinérgicos que estão localizados no outro neurônio. Quando a ACh interage com os receptores regenera o impulso nervoso no neurônio, permitindo o prosseguimento da transmissão (Figura 1) (PETRONILHO, 2011). Após efetuar sua “missão” o neurotransmissor ACh é degradado pela enzima AChE na fenda sináptica, liberando os produtos acetato e colina, ou seja, a estabilidade e atividade da ACh na fenda sináptica são reguladas por hidrólise, catalisada pela AChE (LIMA, 2008).

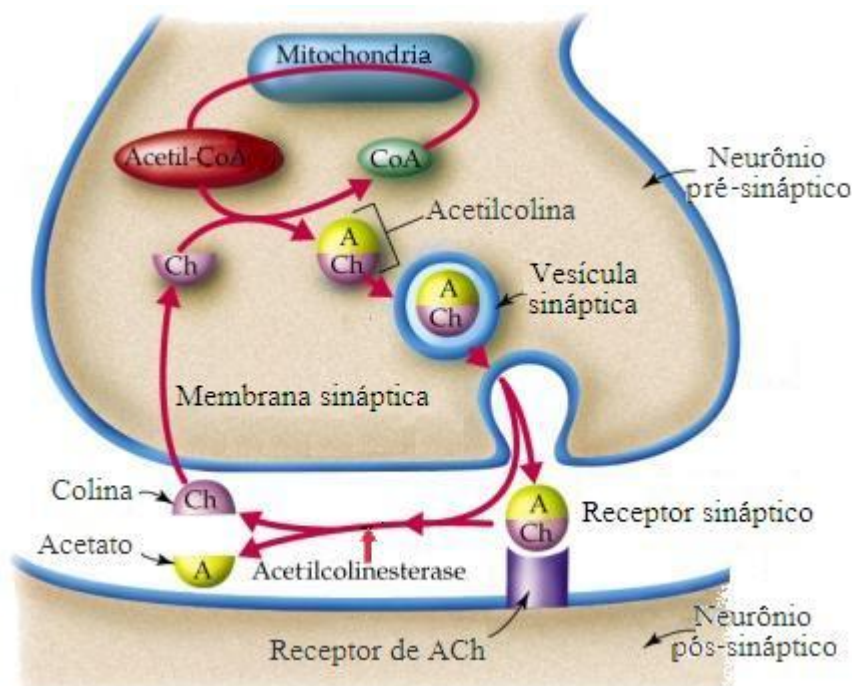


Figura 1: Sinapse Colinérgica

Fonte: <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/bancol/Sinapse%20colinergica%202.JPG>

A AChE desempenha um papel fundamental no SNC e está relacionada ao comportamento, bem como aprendizado e memória, além de atuar na organização

cortical do movimento, e controle do fluxo sanguíneo cerebral, desordens nesta enzima remetem a doenças neurológicas (MESULAM *et al.*, 2002; MORETTO *et al.*, 2004).

A nível celular, a DA está relacionada com redução dos percentuais de ACh na sinapse, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical e outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato (FORLENZA, 2005). Também foi observada a diminuição de receptores nicotínicos e muscarínicos de ACh nas terminações colinérgicas pré-sinápticas, Forlenza (2005) ainda cita que os inibidores das colinesterases são drogas conhecidas para o tratamento específico da DA, visando aumentar a disponibilidade sináptica de ACh, para compensar o déficit colinérgico, através da inibição das suas principais enzimas catalíticas

Wang *et al.* (2016) em seu estudo cita a importância de estudos que relacionem a exposição ao AI e sua relação com a DA. Neste sentido mostra-se significativo o estudo com modelos experimentais. É provável que 60 a 80% dos genes do nematóide *Caenorhabditis elegans* correspondam a genes humanos (KALETTA e HENGARTNER, 2006), e que um alto número de genes envolvidos em doenças humanas tenha um ortólogo em *C. elegans* (THE C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM, 1998), seu sistema nervoso tem alta diversidade de neurônios, os neurotransmissores acetilcolina, glutamato, Ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina e serotonina e seus neuroreceptores estão presentes no nematódeo e o mecanismo de liberação das vesículas sinápticas está conservado (RIDDLE *et al.*, 1997). Ávila (2012) lembra que estudos de exposição a diversos metais têm sido realizados com o nematodo *C. elegans*, e este tem contribuído para elucidar informações sobre seus mecanismos toxicológicos.

2.4 CAENORHABDITIS ELEGANS

O *Caenorhabditis elegans* é um membro da família *Rhabditidae* de nematódeos. É um importante modelo experimental em áreas de pesquisa como biologia molecular, toxicologia e farmacologia (COX *et al.*, 2012). Bastante caracterizado a nível genômico, embriológico, celular, de vias metabólicas e biossintéticas, podendo ser comparado aos vertebrados, incluindo processos envolvidos no desenvolvimento celular, na manutenção do sistema nervoso e na morte celular programada (RIDDLE *et al.*, 1997; NASS e BLAKELY, 2003).

Devido às vantagens associadas ao uso do *C. elegans* como modelo experimental, muitos pesquisadores o têm usado para estudar diversas questões científicas, incluindo questões

relativas à toxicologia e a mecanismos toxicológicos. Dentre as inúmeras vantagens que o *C. elegans* fornece para seus usuários, as principais são: tamanho muito pequeno, transparência, tempo de geração rápido, curto tempo de vida, capacidade de ser congelado, comportamento simples e mensurável, extensa caracterização genômica, genética e embriológica, além de rastreabilidade genética (HOPE, 1999). Além disso, é utilizado como sistema *in vivo*, e ainda mantém muitas características benéficas de um sistema *in vitro*, ou seja, pode ser criado e manipulado com tanta facilidade e rapidez de um microrganismo, porém é um animal. Seu conjunto completo de órgãos e sistema sensorial apresentam um comportamento coordenado e facilmente analisável (HOPE, 1999).

Os *C. elegans* formam vermes adultos capazes de colocar ovos em cerca de 3,5 dias, em condições controladas a 20°C. O desenvolvimento até a idade adulta é, no entanto, dependente da temperatura, variando de cerca de 3 dias a 25°C e a 6 dias a 15°C. Após a eclosão do ovo, as larvas passam por quatro estágios do desenvolvimento que compreende as fases: L1, L2, L3 e L4 até o adulto maduro (Figura 2). Ao final de cada estágio do desenvolvimento os nematódeos perdem a cutícula que recobre seu corpo, a qual é constituída por uma camada de carboidratos e proteínas que cobrem a hipoderme. A cutícula é um exoesqueleto flexível e resistente que possui inúmeras funções como suporte, proteção e crescimento do verme, porém é um fator limitante para a utilização do *C. elegans* como modelo experimental em bioquímica (BHASKARAN *et al.*, 2011). O tempo médio de vida dos vermes adultos é de 18 dias à 20 °C. Em casos de estresse, por aglomeração ou falta de alimento, o desenvolvimento é interrompido, geralmente, no final da fase larval caracterizando a “larva dauer”, o que pode ser revertido pela eliminação do fator estressante.

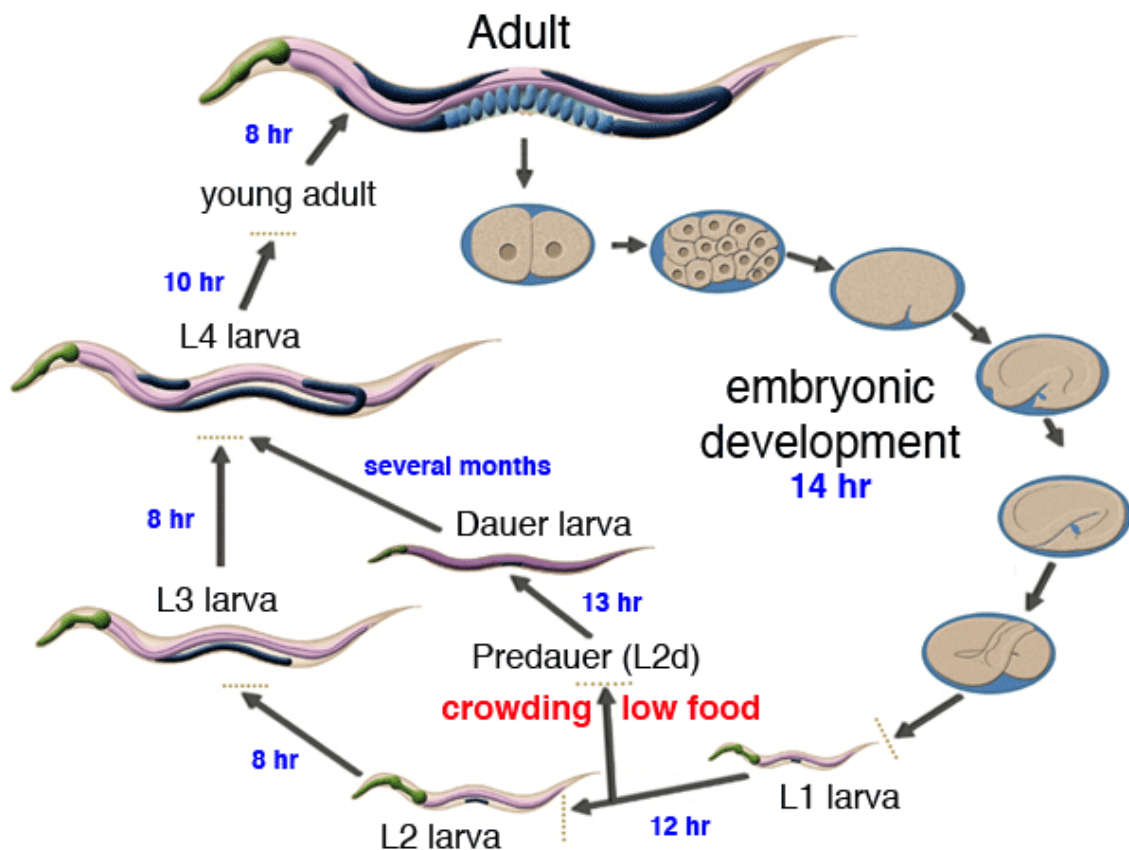


Figura 2: Ciclo de vida do *C. elegans*

Fonte: <http://www.sfu.ca/biology/faculty/hutter/hutterlab/research/Celegans.html> disponível em 16/07/2014.

O genoma do *C. elegans* tem sido bastante estudado podendo ser verificado uma alta homologia com os genes dos mamíferos (KALETTA, HENGARTNER, 2006). Outra semelhança entre mamíferos e *C. elegans* é observada quando se estudam as rotas do estresse oxidativo, onde os danos celulares causados por radicais livres levam a neurotoxicidade causada pelos tóxicos presentes no ambiente, explicando a fisiopatologia de várias doenças, como Huntington, Alzheimer e doença de Parkinson (BROWNE e BEAL, 2006; YUAN, *et al*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2008).

Esse nematódeo é sensível a diversas substâncias, como metais pesados, toxinas orgânicas e uma ampla gama de drogas psicoativas, podendo ser empregado como modelo experimental em uma variedade de estudos de toxicidade (RAND e JOHNSON, 1995; NASS e BLAKELY, 2003). Efeitos tóxicos podem ser facilmente detectados através da análise dos movimentos do animal, observado com o auxílio de um microscópio

(RIDDLE *et al.*, 1997). Ainda, a morte decorrente de toxicidade pode ser verificada pela simples perda de movimento do animal ao ser tocado com um fio de platina ou com o auxílio de corantes fluorescentes (GILL *et al.*, 2003). Adicionalmente, por ser transparente, o *C. elegans* permite a avaliação da morfologia e viabilidade celular (RIDDLE *et al.*, 1997). *C. elegans* também é um bom modelo para estudo de capacidade antioxidante de substâncias (WILSON *et al.* 2006) e quimiotaxia relacionada à memória e aprendizado (DOSANJH *et al.* 2010).

O sistema neuronal deste nematodo é seu maior órgão, superior a um terço de suas células, de suas 959 células, 302 são neurônios e 56 células gliais. Pode-se dizer que a conectividade neuronal do *C. elegans* é simples se comparada a vertebrados, pois apresenta em torno de 5.000 sinapses químicas e 2.000 junções neuromusculares. Diferenças em seu comportamento podem ser facilmente visualizadas e mapeadas com exatidão nas redes neuronais (COX, 2012).

A ACh é o principal neurotransmissor excitatório nas junções neuromusculares do *C. elegans*, e mais de um terço das células do sistema nervoso do nematóide liberam ACh. A transmissão colinérgica está envolvida no comportamento do *C. elegans*, incluindo locomoção, postura, alimentação e acasalamento dos machos. A ação da ACh é terminada por hidrólise enzimática do neurotransmissor AChE na fenda sináptica. A colina resultante é transportada de volta para o neurônio pré-sináptico, esta colina está, então, disponível para a síntese de ACh adicional (RAND, 2007).

A alimentação do *C. elegans* depende da ação da faringe, uma bomba neuromuscular que liga a boca ao intestino. O músculo da faringe capta o alimento e leva até o intestino. Ele faz isso através de uma combinação de dois movimentos, bombeamento e peristaltismo. Durante o bombeamento na alimentação normal o seu tempo é controlado por dois tipos de neurônios motor da faringe, já o peristaltismo depende de um terceiro tipo de neurônio motor (AVERY e YOU, 2012). O sistema nervoso faríngeo contém 20 neurônios de 14 tipos diferentes (ALBERTSON e THOMSON, 1976). Neurônios faríngeos contêm neuropeptídeos e neurotransmissores, os mais importantes neurotransmissores são a acetilcolina, o glutamato e a serotonina (AVERY e YOU, 2012).

O intestino é um dos principais órgãos do *C. elegans*, responsável pela digestão e assimilação dos alimentos, bem como a síntese e armazenamento de macromoléculas. Além disso, o intestino está emergindo como um sistema experimental para estudar fenômenos biológicos como o tráfico vesicular, relógios bioquímicos, respostas ao

estresse e envelhecimento (MCGHEE, 2007). O programa motor de defecação do *C. elegans* coordena os eventos que ocorrem no intestino, em músculos, principalmente entéricos e em neurônios (AVERY e THOMAS, 1997).

Em comparação com modelos vertebrados, onde existem complexidades e limitações maiores, o *C. elegans* se torna importante modelo para delinear mecanismos moleculares de neurodegeneração. Por estas razões, o *C. elegans* tem surgido como um importante sistema modelo *in vivo* para o estudo de mecanismos patológicos em diversas desordens neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Esclerose Amiotrófica lateral, entre outras (DIMITRIADI E HART, 2010).

Existem diversas cepas de *C. elegans* disponíveis, dentre elas a N2, que é a cepa selvagem mais comum utilizada em pesquisas, porém o estudo da AD se concentra principalmente no uso de animais transgênicos, que expressam construções que contêm a região codificadora do peptídeo β -amilóide humano (DIMITRIADI E HART, 2010). A cepa transgênica de *C. elegans*, GMC 101, *dvIs100* [pCL354(*unc-54:DA-A β 1-42*) + pCL26(*mtl-2: GFP*)], difere dos modelos existentes $A\beta$ que predominantemente expressam amino- $A\beta_{3-42}$ truncados, a $A\beta_{1-42}$ é expressa em células do músculo da parede do corpo, onde ela oligomeriza, agregada e resulta em grave, e penetrante paralisia progressiva. *In vivo* acumulação de $A\beta_{1-42}$ também apresenta marcadores para corantes amilóides, consistentes com a formação de fibrilas. A cepa, também transgênica, CL2122; *dvIs15(mtl-2: GFP)* é utilizada como controle transgênico (MC COLL, 2012). Todas as cepas trabalhadas são obtidas do Caenorhabditis Genetics Center (CGC), da University of Minnesota, EUA.

Considerando os diversos estudos que relacionam a exposição ao AI e a etiologia de doenças neurodegenerativas, como a AD, o objetivo deste trabalho é analisar alterações comportamentais e enzimáticas, como AChE, no modelo experimental *C. elegans*, a partir de sua exposição ao AI.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito toxicológico da exposição ao alumínio utilizando *C. elegans* como modelo de estudo para doenças neurodegenerativas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração de Al a qual os nematódeos serão expostos durante o tratamento;
- Avaliar a letalidade dos nematódeos após exposição ao Al;
- Avaliar o comportamento locomotor dos nematódeos *C. elegans* após exposição ao Al.
- Avaliar a regulação do ciclo de defecação dos nematódeos *C. elegans* após exposição ao Al.
- Avaliar os batimentos faríngeos dos nematódeos *C. elegans* após exposição ao Al.
- Determinar a atividade da enzima Acetilcolinesterase após exposição do nematódeo ao Al.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 PREPARAÇÃO DAS CEPAS DE *C. ELEGANS*

Os nematódeos usados no estudo são do tipo selvagem N2, GMC101 e CL2122, originalmente obtidos a partir do “Caenorhabditis Genetics Center” (USA), os quais foram mantidos em meio de crescimento para nematódeos (NGM) com Ágar e *Escherichia coli* OP50 a 20°C, como descrito por Brenner (1974).

Os vermes foram sincronizados em fase larval L-1, como mostrado na Figura 3, com sincronização completa (~ 95%), conforme descrito por Donkin e Dusenbery (1993), adaptada, onde os vermes são expostos a uma solução de sincronização e agitados até a lise e liberação dos ovos.



Figura 3: Vermes sincronizados.

Fonte: próprio autor.

6.2 TRATAMENTO

A exposição ao AlSO_4 , foi determinada pela Dose Letal 50, onde as concentrações selecionadas foram: 0,5 mM, 1,0 mM, 2,5 mM e 5 mM. Para a exposição crônica a população em L1 foi transferida para placa com NGM e *E. coli* OP50, com 200 μl da solução de AlSO_4 ou água ultrapura (controle). A cepa N2 foi mantida a 20 °C até o final

dos testes, já as cepas transgênicas foram mantidas a 20 °C até o estágio L3, onde então a temperatura foi elevada à 25 °C para induzir a A β expressão. Para a exposição aguda as cepas em L3 foram transferidas para as soluções de AlSO₄, nas mesmas concentrações, e agitadas por 1 hora, logo após as análises foram realizadas.

A avaliação da toxicidade será feita através da análise de parâmetros citados abaixo.

6.3 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

6.3.1 Batimento faríngeo

O ensaio seguiu protocolo baseado na literatura (WANG *et al.*, 2008). O batimento faríngeo foi medido sobre o tapete de bactérias, para cada tempo e condição, em microscópio (x100). O número de contrações do bulbo posterior da faringe de cada verme foi contado por um período de 10 segundos, em triplicata, e a média multiplicada por seis, resultando no número de contrações/minuto.

6.3.1 Ciclo de Defecação

Foi avaliado de acordo com protocolo previamente estabelecido pela literatura (WANG *et al.*, 2008). A defecação foi identificada pelo padrão estereotipado de contração peristáltica que ocorre no intestino do animal seguida da expulsão das fezes. 10 vermes de cada cepa e tratamento foram examinados em microscópio e contado o tempo de 3 defecações consecutivas.

6.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE

Após a análise comportamental os vermes foram preparados, através de lavagens, congelamento e sonicação para o rompimento da cutícula e então dosagem de proteína pelo método de Azul de Coomassie descrito por Bradford e posterior medição da atividade da acetilcolinesterase, por ensaio colorimétrico, descrita por Cole (2004) com adaptações.

6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA- oneway), utilizando o GraphPad Prism, seguida do teste Tukey ao nível mínimo de 95% de significância ($p < 0,05$).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho serão apresentados em formato de artigo, que será submetido à Revista *Physiology and Behavior*, revista oficial da International Behavioral Neuroscience Society, intitulado “The Aluminum and the etiology of Alzheimer’s disease in the nematode *Caenorhabditis elegans*.”

**The Aluminum and the etiology of Alzheimer's disease in the nematode
*Caenorhabditis elegans***

^aVanessa Ecléa de Oliveira, ^bNatália Piva Zancan, ^bMichele Toniollo, ^bAni Carla Concato,
^cDaniele Coradini Zamberlan, ^cFélix Alexandre Antunes Soares, ^aHelen Treichel,
^{a,b}Rosilene Rodrigues Kaizer

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul,
Erechim, Rodovia ERS 135, km 72, nº 200, 99700-970. Erechim, RS, Brazil.

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – IFRS Campus Sertão, Rodovia
ERS 135, km 25, 99170-000. Sertão, RS, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas,
Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, nº 1000, 97105-900. Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding author:

Rosilene Rodrigues Kaizer

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – IFRS
Campus Sertão, Rodovia ERS 135, km 25.

e-mail address: rosikaizer@gmail.com

Fax: +55-54-3345-8090.

Abstract

Aluminum is one of the most abundant metals in the earth's crust, showing no known biological function, but it's known for neurotoxic potential. Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder that results in progressive impairment and disability. For toxicological studies of the nematode *C. elegans* exposure has been quite promising. This study examined behavioral and enzymatic changes of *C. elegans* from its exposure to aluminum, and the result relation with Alzheimer's disease. After chronic and acute exposure to Al, the results indicated that Al alters the cholinergic status and behavior parameters of the nematode, suggesting a relationship between exposure to Al and the etiology of AD.

Keywords: Metal. Neurological disorders. *C. elegans*. Acetylcholinesterase. Behavioral analysis.

1. Introduction

The metals are present in practically any environment, some are essential and others considered toxic, among these the aluminum (Al) that despite composing 8% of the earth's crust remain's still not have known biological function [1]. However, it is recognized as a neurotoxic agent causing encephalopathies, psychomotor and neurodegenerative diseases, among these the Alzheimer's Disease (AD) [2]. Al highest levels were found in brain areas of patients with senile plaques and neurofibrillary tangles characteristic of AD [3].

The AD is a prevalent neurodegenerative disorder in the elderly population. It is characterized clinically by progressive loss of memory and other cognitive abilities; histopathologically is identified by the presence of senile plaques, composed mainly by the toxic species of the β -amyloid peptide ($A\beta$) and neurofibrillary tangles consisting of the aggregate forms and hyperphosphorylated T protein in the brain of affected individuals [4]. According to the IBGE (2012) [5] no data on the incidence of AD in Brazil, but by IBGE data and research in other countries, we can estimate that 1.2 million people suffer from the disease, increasing about 100 thousand cases for year. So there is the importance of studies about etiology of the disease, in this sense, new study methodologies are employed, and for this new experimental models are used, and one of them is the nematode *C. elegans*.

The *C. elegans* has long been used as a model for research in toxicology, molecular biology, pharmacology, among others, in studies of AD has a related gene APP (amyloid precursor protein), called APP-1, however, this lacks the coding region of the $A\beta$ -peptide [6]. For this reason, transgenic models this nematode are used for expressing $A\beta$ toxic species, to study AD [7].

The increased longevity of the population brings with it the increased prevalence of neurodegenerative diseases, causing concern since many of them do not have treatment or they are ineffective [8]. The evidence that Al is a neurotoxic element are corroborated by several studies reporting his involvement in the etiology of AD [9]. However, the Al has a high biological reactivity thus a wide range of potential binders to form Al (III) which could induce neurotoxicity [10]. Therefore, the induction mechanism of neurotoxicity of the Al remains unknown.

Thus, considering the importance of understanding of the relation between Al and the etiology of the AD, in addition to the growing number of cases of the disease and the

difficulty of diagnosis of patients with AD, it is fundamental to develop animal models that can be used to the study of this disorder. The use of *C. elegans* is a promising alternative to traditional experimental models of neurodegenerative diseases in humans, because vertebrate brain and maintenance of your neurological mechanisms are more complex [11], the main advantages that the *C. elegans* provides to its members are: very small size, transparency, fast time of generation, short life, ability to be frozen, simple and measurable behavior, extensive biological characterization, genetic traceability [12], high homology with the gene of mammals, such rate being 60-80% [13], by these characteristics, *C. elegans* was chosen as an experimental model in this study.

Accordingly, the present study aims to assess the neurotoxic potential of A β and its role in the etiology of Alzheimer's disease (AD), through behavioral analysis and cholinergic nervous system, using the analysis of acetylcholinesterase activity, in wild strains and AD model transgenic lines of nematode *C. elegans*.

2. Experimental Procedures

2.1 Chemical and reagents

Acetylthiocholine iodide and 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) were purchased from Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA). All others reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.2 Worm cultures and treatments

The wild-type *C. elegans* strain N2 (Bristol) and transgenic worms, GMC 101 *dvl/s100* [unc-54p::A-beta-1-42::unc-54 3'-UTR + mtl-2p::GFP], and CL2122 (unc-54 vector+mtl-2::GFP) were obtained from the *C. elegans* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA). All strains were cultured at 20°C on NGM (Nematode Growth Medium - 0.032 M KCl, 0.051 M NaCl, 0.1 M CaCl₂, 0.1 M MgSO₄, 2.5% Bacto-peptone, 0.17% Bacto-agar, and 0.01% cholesterol) with *E. coli* (strain OP50) to serve as food and maintained at 20°C [14]. The strain GMC 101 expresses the A-beta-1-42 peptide in bodywall muscle cells that aggregates, for this to happen on the first day of adulthood populations were exposed at 25°C. Age synchronous populations were obtained by the collection and culturing of eggs laid by emergent dauer larva using bleaching solution (1% NaOCl, 0.25 M NaOH) [15].

The worms were exposed to four different aluminum sulfate ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) solution concentrations, defined through the lethal dose 50 (LD 50) test (data not shown), the concentrations selected were: 0.5 mM, 1.0 mM, 2.5 mM and 5 mM.

In long term exposure the population in larval stage 1 were transferred to 20 mL NGM plates seeded with *Escherichia coli* OP50 as a food source and 200 μl of $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ at 0.5, 1.0, 2.5 and 5 mM or ultrapure water (control group) and allowed to develop until 1-day adult. The wild-type N2 was maintained at 20°C, and GMC 101 and CL2122 strain were maintained at 20 °C until larval stage 3 and then increased to 25 °C to induced A β expression, leading to paralysis characteristic of AD. For the acute exposure, the strains in L3 were transferred for the $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ solution in the same concentrations and shaken for 1 h, after the analyzes were conducted.

2.3 Behavioral Analyses

2.3.1 Defecation Cycle

For defecation cycle length analysis, synchronously grown young adults were examined with a microscope (x100), the time between each defecation was counted, for this 10 worms were examined per strain and treatment; each animal was observed for 3 consecutive defecation cycles [16].

2.3.2 Pharyngeal Pumpings

During feeding, worms suck the bacteria and grind in the terminal bulb, one complete cycle of synchronous contraction and relaxation of the terminal bulb is called a pump. For count the pharyngeal pumpings per minute was used a microscope (100x) and observed the pump of the 10 worms, per strain and treatment, for ten seconds, three times, after obtaining the average is multiplies for six [16].

2.4 Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford (1976) [17] using bovine serum albumin as standard.

2.5 Acetylcholinesterase assay

AChE activity in adult wild-type and transgenic worms was analyzed with a colorimetric assay [18] with adaptations [19]. After exposure period, adult worms were washed three times in M9 buffer and transferred to microcentrifuge tubes. The samples

were frozen three times in ultrafreezer previous to sonification 5 times for 15 seconds with 10 seconds breaks on ice at 30% amplitude, centrifuged for 30 min at 15,000 rpm, and the supernatants were collected. A 160 μ l portion of the sample was mixed with 1200 μ l of 0.25 mM 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and 40 μ l of 156 mM acetylthiocholine iodide (ASChI) and incubated at 30°C for 5 minutes. The rate of change in absorbance was measured at 405 nm at 30-s intervals for 4 min by spectrophotometry. Kinetic measurement were recorded and converted to total cholinesterase activity using the extinction coefficient for the colored product, 5-thio-2-nitro-benzoic acid (II) (DTNB) [18].

2.6 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Significance was assessed by a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's Multiple Comparison Test for post hoc comparison. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1 Behavioral Analysis

After the exposure to the aluminum the behavioral parameters were analyzed from both chronic and acute exposure in three different strains of *C. elegans*, to known: wild-type (N2) strain, the transgenic worms GMC101 and CL2122. Although of the results of LD 50 tests, the worms exposed to 5 mM concentration of Al for 48 hours (long-term exposure) died, in both behavioral parameters, pharynx pumping and defecation cycle, that are behavior mediated for ACh.

3.1.1 Pharynx Pumping

After acute exposure, the pharynx pumping rate was enhanced at 22% in the CL2122 strain, in both concentrations 1.0 and 5.0 mM, when compared with the own control. At the same time, in 0.5 mM concentration as compared to 1.0 and 5.0 mM concentrations, showed a decrease of the rate of feeding (pharynx pumping) in 14%, for both groups. The wild-type (N2) strain do not showed significant difference between the groups. Additionally, the pharynx pumping rate in the transgenic worms (GMC101) at 0.5 mM was significantly increased at 33% as compared to the control group. Besides, the pharynx pumping rate in the 2.5 and 5.0 mM groups, were enhanced at 28% and 40%, when compared to the own control, respectively (Fig. 1). In long-term exposure, the

pharynx pumping rate presented a decrease in CL2122 strain in the 1.0 mM concentration, when compared to the 0.5 (78%) and 2.5 mM (75.8%) concentrations. In fact, in the transgenic GMC101 strain was found a similar result, in 1.0 mM group when compared to the control (26%), 0.5 mM (26%) and 2.5 mM (30.2%) presented a decrease of this parameter. At last, in the wild-type (N2) strain was observed a decrease in the pharynx pumping rate in all groups, 0.5 mM (11%), 1.0 mM (14%) and 2.5 mM (15%), in comparison with the control group (Fig 2). Thus, we could be considerer that the long-term exposure to AI can induce damage and elicit the progression of AD that disrupt the feeding rate.

3.1.2 Defecation Cycle

The defecation cycle length in CL2122 strain was altered after 1 h of treatment in 0.5 mM group, when compared to the all groups, except the 1.0 mM. Thus, was found that the 0.5 mM group presents a decrease of defecation cycle length as compared to control (25%), 2.5 mM (21%) and 5.0 mM (21%) groups, respectively. In contrast, wild-type (N2) strain showed an increase of the defecation cycle length in the 2.5 mM concentration, when compared to the control (25%). For the transgenic (GMC101) strain was observed a decrease of this parameter in the 2.5 mM concentration when compared to 0.5 (21%) and 5.0 mM (19%) concentrations. (Fig. 3). Finally, after the long-term exposure to AI, the defecation cycle length was decreased in CL2122 strain in the 0.5 concentration, as compared with control (43%), 1.0 mM (39%) and 2.5 mM (42%). In the case of the N2 strain, the 1.0 and 2.5 mM groups were increased in 42% in both concentrations, when compared to the control, $p < 0.05$. The GMC101 strain showed an increase in the defecation cycle length in 1.0 mM concentration, as compared to control (29%), 0.5 mM (126%), and 2.5 mM (67%) groups, $p < 0.05$ (Fig. 4).

3.2 Acetylcholinesterase activity

The AChE activity was measured in three strain of *C. elegans*, wild-type (N2), in transgenic (GCM101) strains and in their control, the CL2122 strain, in both acute and chronic exposure to AI. After 1 h of exposure, the CL2122 strain has a significantly increased in AChE activity at 0.5 mM concentration ($p < 0.05$) (116%), (44%), (27%) and (128%) as compared to the control, 1.0 mM, 2.5 mM and 5.0 mM groups in the same strain, respectively. The same behavior was found in 1.0 mM concentration, when compared with the control (49%), and 5.0 mM (57%) groups. Moreover, the 5.0 mM

concentration group showed an inhibition of enzyme activity after acute exposure to Al when compared to the 0.5 mM (56%), 1.0 mM (36%) and 2.5 mM (44%). The AChE activity in wild-type (N2) strain in the 0.5 and 1.0 concentrations, were inhibited when compared to the N2 control, (69%) and (36%), respectively, and also the 0.5 group showed a decrease when compared to the 2.5 mM group (38%). Additionally, in 1.0 mM concentration was observed a decrease in the enzyme activity when compared to the 2.5 (70%) and 5.0 mM (64%) groups. Moreover, in the transgenic strain (GMC101) the AChE activity showed an enhanced in 0.5 mM group, when compared to the all groups of the same strain. This difference at 0.5 mM as compared to the control (80%), 1.0 mM (87%), 2.5 mM (155%) and 5.0 mM (76%) groups, respectively (Fig. 5).

After long-term exposure to Al, the CL2122 strain in the 5.0 mM concentration showed an enhanced in enzyme activity, in comparison with the control group (90%). However, the 2.5 mM concentration presents an inhibition of AChE activity when compared to the control group (56%). At the same time, the N2 strain presented a decrease in the enzyme activity in 2.5 mM group, when compared to the all groups, except the 5.0 mM concentration, such as compared to control (67%), 0.5 mM (72%) and 1.0 mM (67%), respectively. Newly, thus as the acute exposure, the AChE activity in the 0.5 mM concentration in transgenic strain (GMC101) showed an enhanced, at control (91%), 1.0 mM (385.7%), 2.5 mM (105.2%) and 5.0 mM (108.8%), respectively, indicating that the transgenic *C. elegans* expressing Ab(1-42) have increased AChE activity, suggesting that Al toxicity is associated with similar characteristics of AD (Fig. 6).

4. Discussion

In the present study, we investigated the deleterious effects of aluminum (Al) in *C. elegans* model of A β -induced toxicity and wild-type (N2) strain. *In vivo* A β -induced toxicity in *C. elegans* has been used as a model of AD [20]. These worms constitutively and upon increases in temperature express A β in the muscles of the body wall, and progressive paralysis [21]. Studies was shown that aluminum alters the activity of AChE binds to the polar portions of cell membranes, damaging transport processes and cell metabolism [22].

In this study, we found increase AChE levels in all exposures of transgenics strain on acute exposure and at higher concentrations in chronic exposure, show that wild strains exposed to aluminum have elevation this cholinergic marker, as well as in AD patients that have a reduced activity of the ACh in the cerebral cortex, as described [23].

The CL2122 and GMC101 strains there was activation of the AChE activity in both chronic exposure, as in acute exposure in the control or other exposures, it should be noted the increase of AChE in 0.5 mM concentration, revealing a possible biphasic effect where lower doses increase their activities, whereas higher doses can reduce or otherwise alter compatible data with said by Kumar (1998) [24] where rats underwent aluminum intoxication showed effect on AChE activity in brain regions studied, which was characterized by an increased response at low dose and a decrease in response at the high dose.

Pharynx pumping and cycle of defecation are behavior mediated for ACh [25]. This study also showed a correlation between pharyngeal pumping and defecation cycle behavior. Defecation in the *C. elegans* is achieved by a cyclical stereotyped motor program. The first step in each cycle is contraction of a set of posterior body muscles, followed by contraction of a set of anterior body muscles, and finally contraction of specialized anal muscles that open the anus and expel intestinal contents [26]. The results of the cycle defecation it showed faster in CL2122 in concentrations 0.5 mM versus 2.5 and 5 mM and also GMC101 strain in exposition 2.5 mM versus 0.5 mM and 5 mM, while in N2 strain it more slow in 2.5 mM in comparing to the control. In chronic exposition was observed more fast in CL2122 in the concentrations 0.5 mM versus 0.0 mM, 1mM and 2.5 mM, while there was more slow in concentrations 1mM and 2.5 mM versus 0.0 mM in N2 strain, and GMC also was faster in the concentration 1mM versus all the expositions. Mutants with déficit of choline acetyltransferase, who is responsible for the synthesis of ACh are small, slow growing, and uncoordinated, they also have an irregular pharyngeal pumping and defecation cycle [27].

The increase in acute exposition in pharynx pumping in CL2122 strain in contrations 1mM and 5mM versus the control and increase of the pharynx pumping in GMC101 strain in concentrations 0.5mM, 1mM and 5mM found in this research showed that accumulation of ACh in synapse results in over stimulation of muscarinic and nicotinic cholinergic as reported [28].

Genetic and physiologic similarities have been established between the cholinergic nervous system of *C. elegans* and higher organisms and it has also been shown sensitive to a variety of known neurotoxic chemicals [29]. In this investigation, we hypothesized that the acute or chronic exposure to Al induces mechanism toxicity in *C. elegans* changing rates of AChE. This study shows that the Al exposure, chronic or acute, on the wild-type

(N2) strain of the worm *C. elegans* to aluminum decreased the activity of the enzyme acetylcholinesterase, responsible for degradation of neurotransmitter acetylcholine, leading to its accumulation in the synaptic cleft. The fact that AChE inhibitors for the peripheral site and both the peripheral and the active site had a similar inhibition of the AChE-dependent β -APP induction suggests that the effect of AChE was mediated mainly by the peripheral site of the enzyme [30]. Additionally, Helmcke and Aschner (2010) [31], studying the role of methylmercury toxicity on *C. elegans* reported that the hormesis refers to a process where a low doses of stressors renders an organism resistant to subsequent stress. In this case, the results obtained in wild-type (N2) strain can be related with the biphasic effect.

For other hand, the mutant's strains present an increase in AChE activity, after long term and acute exposure to Al, which results in inhibition the behavioral parameters, pharynx pumping rate and defecation cycle length, mainly in low doses. Additionally, Aluminum is able to increase the activity of AChE [32] and concomitantly AChE increases A β aggregation [33]; [34] and promotes the generation of amyloid aggregates by accelerating the assembly of A β peptide into A β fibrils [35]; [36]. Take together, these results indicate that the Al toxicity can be associated with characteristics of AD. Thus, we could suggesting that the Al is correlated with the etiology of AD.

5. Conclusion

This study shows that exposure, chronic or acute, alters the cholinergic status, and from the AChE activity and this fact is corroborated through the results obtained in behavioral parameters, the pharynx pumping rate and defecation cycle length. In fact, as the AD is considered a systemic disorder the alterations found in behavioral parameters confirm the progression of Al toxicity. Moreover, it was observed the biphasic effect of the Al mainly in the wild-type (N2) strain that present an inhibition of analyzed parameters in low doses.

Moreover, in both transgenic strains was observed an increase of the AChE activity, mainly in doses of 0.5 and 1.0 mM, in comparison with the controls groups. This fact, can be related with the characteristics of transgenic strains whereby the Al toxicity is more prominent, promoting the Ab generation and elicit the AD progress. Thus, we can suggest that these results obtained support the relation between the Al and the etiology of AD.

Acknowledgments

The authors are thankful to Brazilian national Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Universal #458483/2014-1, and Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – IFRS *Campus Sertão*, for providing financial assistance to this work.

References

- [1] SUWALSKY, M. *et al.* Aluminum fluoride affects the structure and functions of cell membranes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 925-933, 2004.
- [2] EXLEY, C.; KORCHAZHKINNA, O.V. Promotion of formation of amyloid fibrils by aluminum adenosine triphosphate (Al-ATP). **Journal Inorganic Biochemical**, v. 84, p. 215-224, 2001.
- [3] ZATTA, P. I. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. **Brain Research Bulletin**, v. 62, p. 15-28, 2003.
- [4] VICKERS, J. C. *et al.* The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. **Program Neurobiology**, v. 60, p. 139-165, 2000.
- [5] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Síntese de Indicadores Sociais Uma Análise das Condições de Vida da População Brasileira**. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.
- [6] DAIGLE, I.; LI, C. Apl-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 12045-12049, 1993.
- [7] WU, Y; *et al.* Amyloid-beta-induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761 and ginkgolides in *transgenic Caenorhabditis elegans*. **Journal Neuroscience**, v. 26, p. 13102–13113, 2016.
- [8] DIMITRIADI, M.; HART, A. C. Neurodegenerative disorders: Insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Neurobiology Diseases**, v. 40, p. 4-11, 2010.
- [9] BONDY, S. C. Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration, **Neurotoxicology**, 2015.

- [10] EXLEY, C. Darwin, natural selection and the biological essentiality of aluminum and silicon. **Trends in Biochemical Sciences**, v.34, p. 589-593, 2009.
- [11] PARK, K. W.; LI, L. Cytoplasmic expression of mouse prion protein causes severe toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, p. 697-702, 2008.
- [12] HOPE I. A. **Background on Caenorhabditis elegans**, em: I.A. Hope (Ed.), *C. elegans: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, p. 1–15,1999.
- [13] KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 387-98, 2006.
- [14] BRENNER, S. The Genetics of *CAENORHABDITIS ELEGANS*. **Genetics**, v.77, p. 71–94, 1974.
- [15] DONKIN, S. G., WILLIAMS, P. L. Influence of developmental stage, salts and food presence on various end points using *Caenorhabditis elegans* for aquatic toxicity testing. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 14, p. 2139–2147, 1995.
- [16] WANG, M. C.; O'ROURKE, E. J.; RUVKUN, G. Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. **Science**, p. 957-60, 2008.
- [17] BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p.248–254, 1976.
- [18] ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, J. R. V.; FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, p.88–95, 1961.
- [19] COLE, R. D.; ANDERSON, G. L.; WILLIAMS, P. L. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 194, p. 248–256, 2004.
- [20] ABBAS, S.; WINK, M. Epigallocatechin gallate inhibits beta amyloid oligomerization in *Caenorhabditis elegans* and affects the daf-2/insulin-like signaling pathway. **Phytomedicine** v. 17, p.02–909, 2010.
- [21] LINK, C. D. *et al.* Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. **Neurobiology Aging**, v. 24, p.397–413, 2003.
- [22] SAVORY, J.; HERMAN, M. M.; GHRIBI, O. Mechanisms of aluminum-induced neurodegeneration in animals: Implications for Alzheimer's disease. **Journal Alzheimers Disease**, v. 10, p. 135-44, 2006.

- [23] AULD, D. S. *et al.* Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. **Program Neurobiology**, v. 68, p. 209-45, 2002.
- [24] KUMAR, S. Biphasic effect of aluminum on cholinergic enzyme of rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 248, p. 121–123, 1998.
- [25] RAND, J. B. **WormBook**: The Online Review of *C. elegans* Biology. Acetylcholine Program in Molecular, Cell and Developmental Biology, Oklahoma City: Oklahoma Medical Research Foundation, 2007.
- [26] THOMAS, J. H. Genetic analysis of Defecation in *Caenorhabditis elegans*. **Gctwtic**, v. 124, p. 855-872, 2010.
- [27] RIDDLE, D. L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER, B. J.; PREISS, J. R. *C. elegans* II, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, New York, 1997.
- [28] COSTA, L. G. Current issues in organophosphate toxicology. **Clinica Chimica Acta** V.366, p. 1-13, 2006.
- [29] BARGMANN, C. I. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. **Science**, v. 282, p. 2028– 2033, 1998.
- [30] von BERNHARDI, R. *et al.* Acetylcholinesterase induces the expression of the β -amyloid precursor protein in glia and activates glial cells in culture. **Neurobiology of Disease**, v. 14, p. 447-457, 2003.
- [31] HELMCKE, K. J.; ASCHNER, M. Hormetic effect of methylmercury on *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 248, p. 156-164, 2010.
- [32] SIMPSON, J. *et al.* Biochemical studies on rabbits with aluminum induced neurofilament accumulation. **Neurochemical Research**, v. 10, p.229-238, 1985.
- [33] ALVAREZ, A. *et al.* Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid- β -peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. **Journal of Molecular Biology**, v. 272, p. 348-361, 1997.
- [34] DE FERRARI, G. V. *et al.* A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid- β -peptide fibril formation. **Biochemistry**, v. 40, p.10447-10457, 2001.
- [35] INESTROSA, N. C. *et al.* Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- β -Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. **Neuron**, v. 16, p. 881-891, 1996.
- [36] BARTOLI, A. *et al.* Effect of trichostatin a and 5'-azacytidine on transgene reactivation in U937 transduced cells. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 111-118, 2003.

Figures

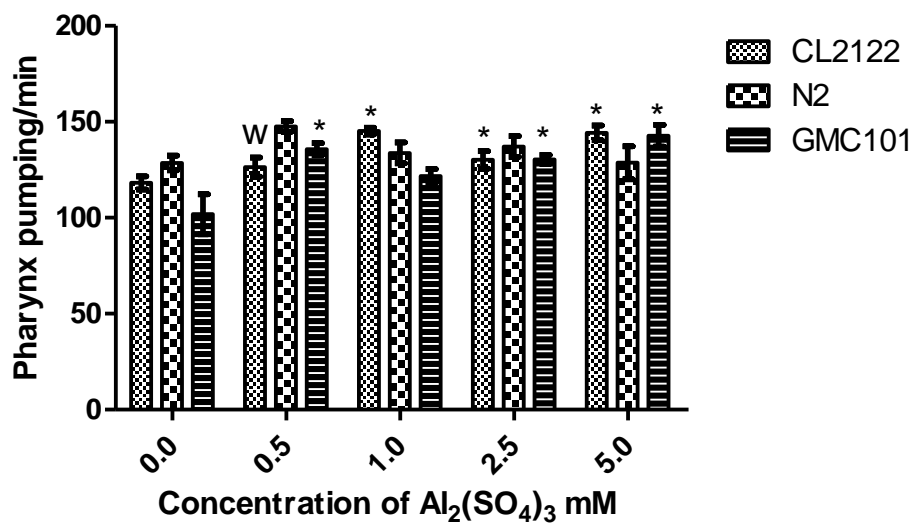


Figure 1

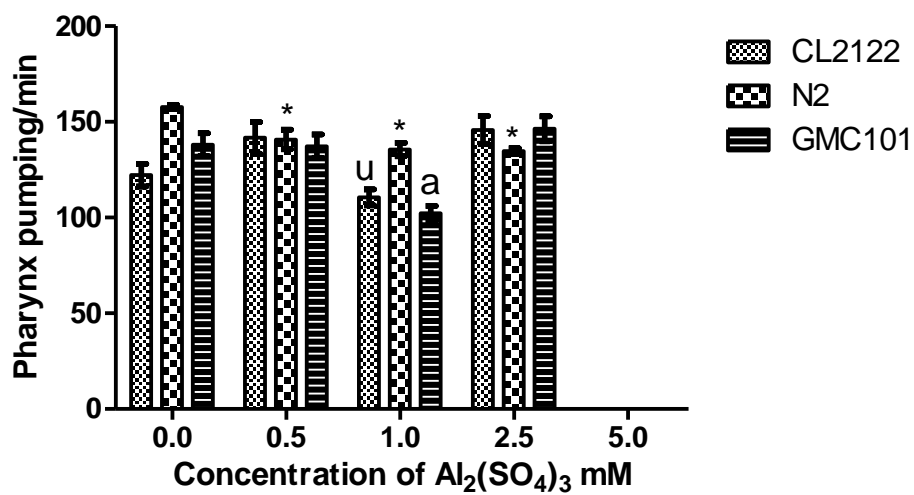


Figure 2

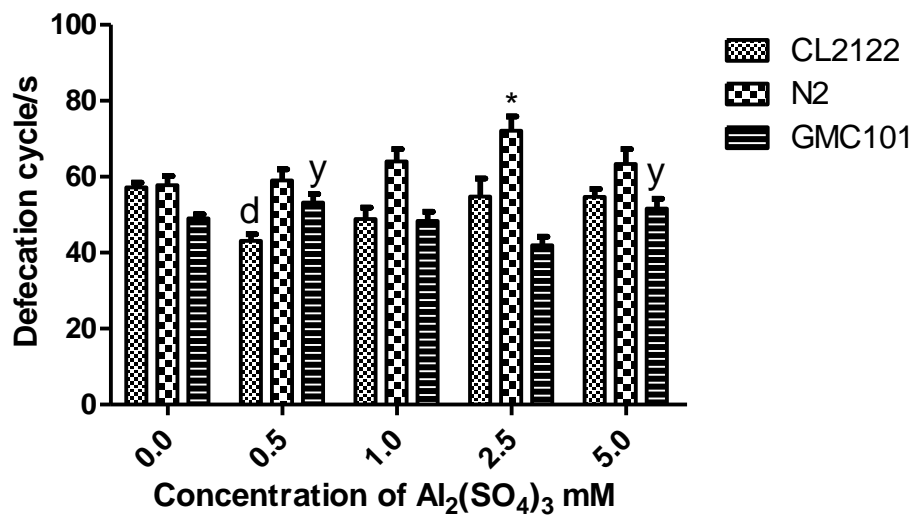


Figure 3

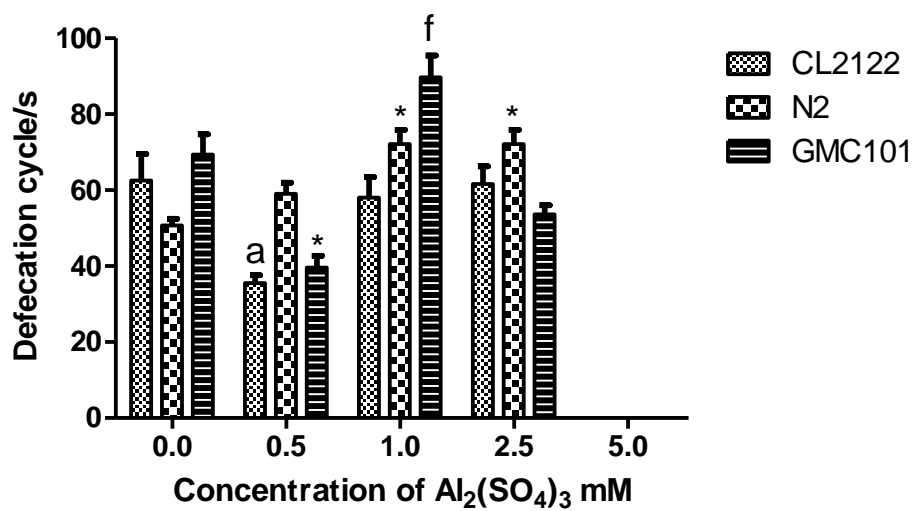


Figure 4

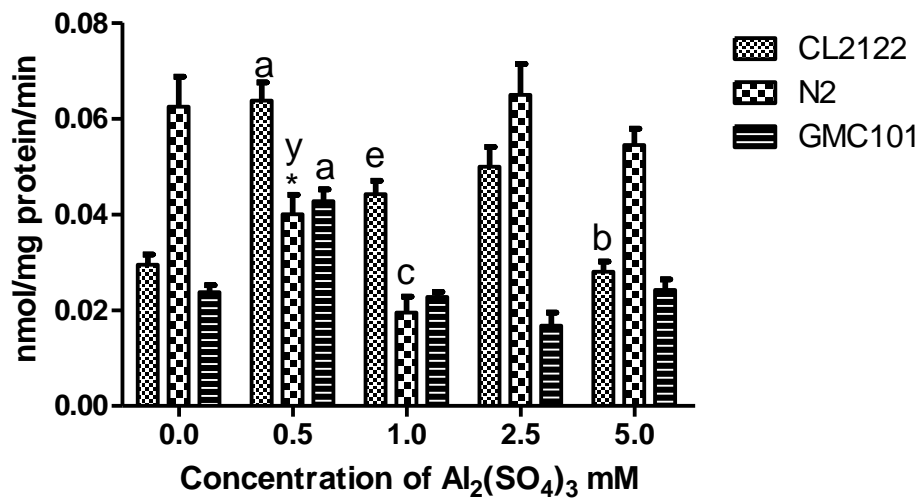


Figure 5

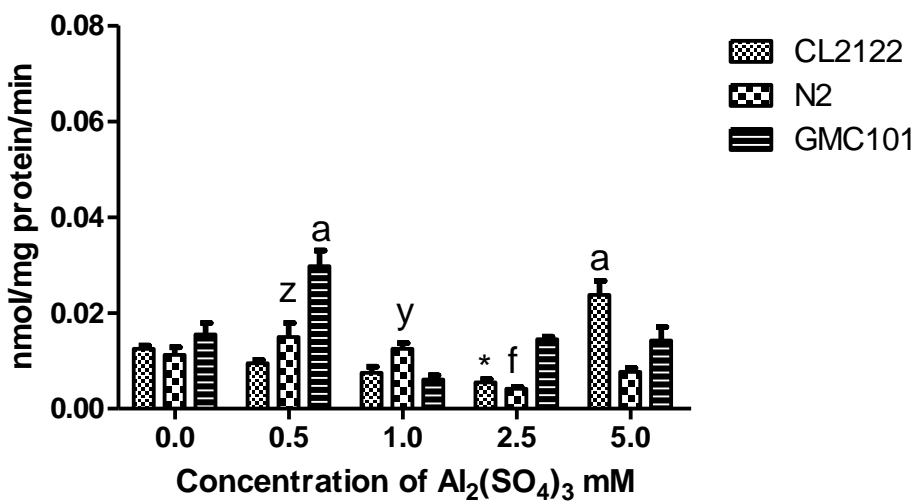


Figure 6

Legends

Figure 1 and 2. Pharynx pumping rate in *C. elegans* adults after 1 h (1) and 48 h (2) of exposure to the $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ on the CL2122 control, wild-type and transgenic GMC101

strains. Values are displayed as the mean \pm SEM (n=3 independent experiments, with 10 nematodes scored per group in the behavior assay). (w) indicates a significant difference from the 1.0 and 5.0 mM concentration, (u) $p < 0.05$ versus 0.5 and 2.5 mM, and (a) $p < 0.05$ versus all groups, (*) $p < 0.05$ versus control group from the same strain. This results were determined by a one-way ANOVA that was followed by a Tukey's Multiple Comparison test ($p < 0.05$).

Figure 3 and 4. Defecation cycle length in *C. elegans* adults after 1 h (3) and 48 h (4) of exposure to the $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ in CL2122 control, wild-type and transgenic GMC101 strains. Values are displayed as the mean \pm SEM (n=3 independent experiments, with 10 nematodes scored per group in the behavior assay). (a) indicates a significant difference from the all groups; (d) indicates a significant difference from the all groups except 1.0 mM concentration; (f) present a significant difference from the all groups except 5.0 mM concentration; (y) $p < 0.05$ versus 2.5 mM; and (*) $p < 0.05$ versus control group from the same strain. This results were determined by a one-way ANOVA that was followed by a Tukey's Multiple Comparison test ($p < 0.05$).

Figure 5 and 6. Acetylcholinesterase activity in wild-type strain (N2), and transgenic worms GMC101 and CL2122 of *C. elegans* adults after 1 h (5) and 48 h (6) of exposure to the $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. Values are displayed as the mean \pm SEM (n=4, from four independent assay). (a) indicates a significant difference from the all groups; (b) indicates a significant difference from the all groups except 0.0 mM; (c) indicates a significant difference from the all groups except 0.5 mM; (e) indicates a significant difference from the all groups except 2.5 mM (f) indicates a significant difference from the all groups except 5.0 mM; (y) $p < 0.05$ versus 2.5 mM; and (z) $p < 0.05$ versus 2.5 and 5.0 mM. This results were determined by a one-way ANOVA that was followed by a Tukey's Multiple Comparison test ($p < 0.05$).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho aqui exposto foi desenvolvido para elucidar a relação da exposição ao alumínio e a etiologia da doença de Alzheimer.

Este estudo mostrou que o nematóide *C. elegans* se mostra bastante interessante para estudos toxicológicos, pelos excelentes resultados apresentados e facilidade de manipulação.

Em relação à exposição ao alumínio os resultados mostraram que, sendo crônica ou aguda, há inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase, levando à um acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica e, portanto, diminuição dos impulsos nervosos. Resultado refletido na análise comportamental do nematódeo.

Portanto, os resultados obtidos, em conjunto com outros estudos, indicam que a exposição ao alumínio pode estar relacionada à etiologia da doença de Alzheimer.

Mais estudos são necessários para que se possa esclarecer os danos do alumínio ao sistema neurológico e o desenvolvimento dessa patologia neurodegenerativa, para isso o passo seguinte pretende utilizar microscopia confocal afim de observar alterações mais específicas no sistema nervoso do nematóide, além de técnicas de PCR em tempo real.

REFERÊNCIAS

ALBERTSON, D. G., THOMSON, J. N. The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, n. 275, p. 299-325, 1976.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO ALUMÍNIO. **Alumínio e saúde**. 2ªed. São Paulo, SP: ABAL, 2000.

AVERY D.G., THOMAS, J.H. Feeding and defecation. **C. elegans**, v.2, p. 679-716. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

AVERY, L., YOU, Y.J. C. *elegans* feeding. **WormBook**, ed. The C. *elegans* Research Community, 2012.

ÁVILA, D.S. *et al.* Anti-aging effects of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a C. *elegans* model. **Toxicology Letters**. v. 211, p. 319-324, 2012.

BAKAR, C.; *et al.* Effect of High Aluminum Concentration in Water Resources on Human Health, Case Study: Biga Peninsula, Northwest Part of Turkey. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 935-944, 2010.

BARRETO, F. C.; ARAÚJO, S. M. H. A. Intoxicação alumínica na DRC. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.33 n .2, 2011.

BHASKARAN, S. *et al.* Breaking *Caenorhabditis elegans* the easy way using the Balch homogenizer: Na old tool for a new application. **Analytical Biochemistry**, v. 413, p. 123–132, 2011.

BOHRER, D. *et al.* Tissue digestion for aluminum determination in experimental animal studies. **Analytical Biochemistry**. v. 377, p. 120–127, 2008.

BONDY SC, Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration, **Neurotoxicology**, 2015.

BROWNE, S.E.; BEAL, M.F. Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis, *Antioxid.* **Redox Signal**, p. 2061–2073, 2006.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. Porto Alegre: Artmed. 2012.

DAIGLE, I.; LI, C. Apl-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America**, v. 90, p. 12045-12049, 1993.

DIMITRIADI, M.; HART, A.C. Neurodegenerative disorders: Insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Neurobiology Diseases**, v. 40, p. 4-11, 2010.

DOSANJH LE, *et al.* Behavioral phenotyping of a transgenic *Caenorhabditis elegans* expressing neuronal amyloid-beta. **Journal Alzheimers Disease**, v. 19, p. 681–690, 2010.

DRAKE, J., LINK, C. D., BUTTERFIELD, D. A. Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. **Neurobiol Aging**, v. 24, p. 415-420, 2003.

EXLEY, C.; KORCHAZHKINNA, O.V. Promotion of formation of amyloid fibrils by aluminum adenosine triphosphate (Al-ATP). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 84, p. 215-224, 2001.

EXLEY, C. Darwin, natural selection and the biological essentiality of aluminum and silicon. **Trends in Biochemical Sciences**, v.34, p. 589-593, 2009.

EXLEY, C., MOLD, M. The binding, transport and fate of aluminum in biological cells. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 30, p. 90-95, 2015.

FELIPO, V. in: C. Exley (Ed.), **Aluminum and Alzheimer's Disease**, Elsevier, Amsterdam, 2001.

FORLENZA, O.V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, p. 137-148, 2005.

GILL, M.S.*et al.* An automated lighththroughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 558-565, 2003.

GONÇALVES, P.P.; SILVA, V.S. Does neurotransmission impairment accompany aluminum neurotoxicity? **Journal Inorganic Biochemistry**, v. 101, p. 1291-1338, 2007.

GUPTA, V. B. *et al.* Aluminum in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 143-158, 2005.

GUPTA, V. K.; ALI, I. Environmental Water: Advances in Treatment, Remediation and Recycling. **Elsevier**. 232, 2013.

HEALTH CANADA. **Aluminum**, em: Guidelines for Canadian drinking water quality. Environmental Health Directorate, 1998.

HEMAT, R. **Water**. Dublin, Ireland: Urotext, 2009.

HOPE, I.A. **Background on Caenorhabditis elegans**, em: I.A. Hope (Ed.), *C. elegans: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, p. 1–15, 1999.

HOPKIN, S.P. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. **Elsevier**, New York, 1989.

HUANG Y, MUCKE L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. **Cell**, v. 148, p. 1204–1222, 2012.

IMRAY, P *et al.* **Aluminum: Report of an International Meeting**. Australia: National Environmental Health Forum, 1998.

INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE. Evaluation des risques sanitaires liés à l'exposition de la population française à l'aluminium. **Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments**, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Síntese de Indicadores Sociais Uma Análise das Condições de Vida da População Brasileira**. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.

JA-LIANG, L. *et al.* Aluminum utensils contribute to aluminum accumulation in patients with renal disease. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 30, p. 653-658, 1997.

KAIZER, R.R. *et al.* The effect of aluminum on NTPDase and 5'-nucleotidase activities from rat synaptosomes and platelets. **International Journal of Developmental Neurosciece**, v. 25, p. 381-386, 2007.

KAIZER, R.R. *et al.* Diet-induced changes in AChE activity after long-term exposure. **Neurochemical Research**, v.29, p. 2251-2255, 2004.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M.O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 387-98, 2006.

KISS, T.; HOLLOSI, M. in: C. Exley (Ed.), **Aluminum and Alzheimer's Disease**, Elsevier, Amsterdam, 2001.

KREWSKI, D. *et al.* Human Health Risk Assessment for Aluminum, Aluminum Oxide, and Aluminum Hydroxide. **Journal Toxicology Enviromental Health**, v. 10, p. 1-269, 2007.

LI J., LE W. Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Neurology**, v. 250, p. 94-103, 2013.

LIMA, D. A. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. v. 7, n.1, 2008.

LINK, E.M. *et al.* Therapeutic target discovery using *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacogenomics**, v. 1, p. 203-217, 2000.

MATTSON, M. P. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, p. 631-639, 2004.

MCCOLL G, *et al.* Utility of an improved model of amyloid-beta (A β (1)()(4)(2)) toxicity in *Caenorhabditis elegans* for drug screening for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegener**, v. 7, 2012.

MCGHEE, J.D. The *C. elegans* intestine. **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, 2007.

MENDES, B.; OLIVEIRA, J. F. **Qualidade da água para consumo humano**. Portugal: LIDEL, Edições Técnicas, Ltda, 2004.

MESULAM, M.M. *et al.* Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, p. 627-639, 2002.

MOREIRA, P.I *et al.* Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease. **CNS Neurological Disorders Drug Targets**, v.7, p.3–10, 2008.

MORETTO, M. B. *et al.* Effect of subchronic treatment with mercury chloride on NTPDase, 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase from cerebral cortex of rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 17, p. 255-260, 2004.

NASS, R.; BLAKELY, R.B. The *Caenorhabditis elegans* dopaminergic system: Opportunities for insights into dopamine transport and neurodegeneration. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, p. 521-544, 2003.

NATIONAL ENVIRONMENTAL HEALTH FORUM. **Report of an International Meeting**. National Environmental Health Forum, 1995.

NEUMANN, S. M. F.; DIAS, C. M. S. B. Doença de Alzheimer: o que muda na vida do familiar cuidador? **Revista Psicologia e Saúde**, v.5 n.1, 2013.

PARK, K.W.; LI, L. Cytoplasmic expression of mouse prion protein causes severe toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, p. 697-702, 2008.

PETRONILHO, E. C.; PINTO, A. C.; VILLARA, J. D. F. Acetilcolinesterase: alzheimer e guerra química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, 2011.

PRICE, D.L., *et al.* Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. **Annual Reviews of Genetics**, v. 32, p.461-93, 1998.

RAND, J.B.; JOHNSON, C.D. Genetic pharmacology: interactions between drugs and gene products in *Caenorhabditis elegans*. **Methods Cell Biology**, v. 48, p. 187–204, 1995.

RAND, J.B. Acetylcholine. **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; **Drogas que Inibem a Cholinesterase**, e. 4, p. 110-115, Guanabara Koogan, 2001.

REZABAL, E. *et al.* A theoretical study of the principles regulating the specificity for Al(III) against Mg(II) in protein cavities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, n.101, p.1192–1200, 2007.

RIDDLE, D.L. *et al.* **C. elegans II**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor**, New York, 1997.

RONDEAU, V. *et al.* Relation between Aluminum Concentrations in Drinking Water and Alzheimer's Disease: An 8-year Follow-up Study. **American Journal of Epidemiology**, v.152, n.1, p. 59–66, 2000.

ROSALINO, M R. R. **Potenciais Efeitos da Presença de Alumínio na Água de Consumo Humano**. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente, Perfil Sanitário)-Faculdade de Ciência e Tecnologias, Universidade de Lisboa. Lisboa, 2011.

SERENIKI A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, 2008.

SOREQ, H. SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

SRINIVASAN, P.; VIRARAGHAVAN, T.; SUBRAMANIAN, K. Aluminum in drinking water: An overview. **Water SA**, v. 25, No. 1, 1999.

SUWALSKY, M. *et al.* Effects of AlCl₃ on toad skin, human erythrocytes, and model cell membranes. **Brain Research Bulletin**, v.55, p. 205-210, 2000.

SUWALSKY, M. *et al.* Aluminum fluoride affects the structure and functions of cell membranes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 925-933, 2004.

THE C. *ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. **Science**, v. 282, p. 2012-2018, 1998.

VAJRESWARI, A., RUPALATHA, M., RAO, P.S. Effect of altered dietary n-6-to-n-3 fatty acid ratio on erythrocyte lipid composition and membrane-bound enzymes. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 48, p. 365-370, 2002.

VICKERS, J.C. *et al.* The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 60, p. 139-165, 2000.

WANG, W *et al.* Effects of fulvic acid and humic acid on aluminum speciation in drinking water. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, p. 211–217, 2010.

WANG, Z. *et al.* Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. **Neuroscience letters**, v. 610, p. 200-296, 2016.

WARBY, R.; JOHNSON, C. E.; DRISCOLL, C. T. Changes in Aluminum Concentrations and Speciation in Lakes Across the Northeastern U.S. Following Reductions in Acidic Deposition. **Environmental Science and Technology**, p. 8668-8674, 2008.

WENG, L.; TEMMINGHOFF, E. J.; VAN RIEMSDIJK, W. H. Aluminum speciation in natural waters: measurement using Donnan membrane technique and modeling using NICA-Donnan. **Water Research**, p. 4215-4226, 2002.

WHO (World Health Organization). **Aluminum in Drinking Water**, de World Health Organization, 2003.

WHO (World Health Organization). **Dementia: a public health priority**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: United Kingdom, 2012.

WILSON M. A. *et al.* Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**. v. 5, p. 59–68, 2006.

WINOCUR, G, GREENWOOD, CE. The effects of high fat diets and environmental influences on cognitive performance in rats. **Behavioural Brain Research**, v.101, p.153-16, 1999.

WU, Y., *et al.* Amyloid-beta-induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Journal Neuroscience**, v. 26, p. 13102–13113, 2006.

YUAN, H. *et al.* Pathogenesis of Parkinson's disease: oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory processes. **Neuroscience Bulletin**, v.23, p. 125–130, 2007.

ZATTA P. *et al.* In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. **Brain Research Bulletin**, v. 59, p. 41-45, 2002.

ZATTA, P. i. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. **Brain Research Bulletin**, v. 62, p. 15-28, 2003.