



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**EFEITOS DO ETANOL E/OU METILMERCÚRIO NO
DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL:
ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS
EM RATOS ADULTOS**

Cristiane do Socorro Ferraz Maia

**Brasília-DF
2009**

Cristiane do Socorro Ferraz Maia

**EFEITOS DO ETANOL E/OU METILMERCÚRIO NO
DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL:
ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS
EM RATOS ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Vania Maria Moraes Ferreira

**Brasília-DF
2009**

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Marinília**
e **José**, às minhas irmãs, **Helen** e **Mary**, ao meu
marido **Júnior** e minha filha **Giulia**.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela compreensão nos momentos de ausência.

À Profª. Vania Ferreira, pela orientação e por cada momento de aprendizado neste transcurso do Doutorado.

Ao Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz, pela dedicação no ensinar.

À Greice Lucena, Flávia Menezes e Cíntia Matos, pela amizade, apoio e cumplicidade.

Ao Prof. Dr. João Batista de Souza, pela oportunidade nos dada em realizar nossas pesquisas no Laboratório de Cirurgia Experimental, da Faculdade de Medicina.

Ao Sr. Dedé e Dona Maria pelos cuidados com os animais experimentais.

À FINATEC e CAPES pelo apoio financeiro dado a esta pesquisa.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a Deus, pela força a mim dada nos momentos de fraqueza. Por sempre colocar em meu caminho as pessoas certas e nos momentos exatos. Agradeço a Ele, que tornou possível, a convivência da mãe, irmãs, marido, filha e amigos que possuo.

Obrigada Senhor!

“Um dia você ... Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que se quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa onde já chegou, mas aonde você está indo...”

William Shakespeare

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUÇÃO	01
1. Álcool e Alcoolismo: considerações gerais.....	02
2. Neurotoxicidade do etanol.....	05
3. Mercúrio e metilmercúrio: considerações gerais.....	08
4. Neurotoxicidade do metilmercúrio.....	12
5. Etanol e/ou metilmercúrio: comportamento e morfologia.....	15
6. Etanol e/ou metilmercúrio: efeitos nos sistemas fisiológicos.....	19
II. OBJETIVOS.....	23
III. METODOLOGIA.....	25
1. Animais.....	26
2. Tratamento.....	26
3. Pesagens das proles.....	29
4. Avaliação comportamental.....	29
❖ Atividade locomotora.....	29
❖ Labirinto em T elevado.....	31
❖ Esquiva inibitória.....	34
5. Análises morfológicas.....	37
6. Análise estatística.....	40
IV. RESULTADOS.....	41

1. Pesagens das proles.....	42
2. Avaliação comportamental.....	44
❖ Atividade locomotora	44
❖ Labirinto em T elevado	45
❖ Esquiva inibitória.....	53
3. Peso dos encéfalos.....	54
4. Análises morfológicas.....	54
V. DISCUSSÃO.....	62
VI. CONCLUSÕES.....	75
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
VIII. ANEXOS.....	96
- Comprovante do Comitê de Ética de Uso Animal.....	97
- Artigo publicado.....	98

LISTA DAS FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Figura 1 – Ilustração de criança com síndrome alcoólico-fetal.....	03
Figura 2 – Ciclo do mercúrio.....	09
Figura 3 – Esquema de tratamento administrado às grávidas.....	28
Figura 4 – Teste da atividade locomotora.....	30
Figura 5 – Teste do labirinto em T elevado.....	31
Figura 6 – Teste da esquiva inibitória.....	34
Figura 7 – Esquema de tratamento e avaliação comportamental.....	36
Figura 8 – Perfusão.....	37
Figura 9 – Fotomicrografia do estriado.....	56
Figura 10 – Fotomicrografia do hipocampo.....	58
Figura 11 – Fotomicrografia do cerebelo.....	60
Gráfico 1 – Peso corpóreo das proles.....	43
Gráfico 2 – Atividade locomotora.....	44
Gráfico 3 – Re-exposições no labirinto em T elevado.....	46
Gráfico 4 – Avaliação da aquisição de esquiva no labirinto em T elevado.....	47
Gráfico 5 – Escape do braço aberto do labirinto em T elevado.....	49
Gráfico 6 – Testes e retestes no labirinto em T elevado.....	50

Gráfico 7 – Avaliação de risco no labirinto em T elevado.....	52
Gráfico 8 – Esquiva inibitória.....	53
Gráfico 9 – Peso dos encéfalos.....	54
Gráfico 10 – Atividade nitrérgica no estriado.....	56
Gráfico 11 – Atividade nitrérgica no hipocampo.....	58
Gráfico 12 – Atividade nitrérgica no cerebelo.....	60
Tabela 1 – Atividade nitrérgica no estriado.....	57
Tabela 2 – Atividade nitrérgica no hipocampo.....	59
Tabela 3 – Atividade nitrérgica no cerebelo.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AV	Área anteroventral do estriado
AD	Área anterodorsal do estriado
AR	Avaliação de risco
BDNF	Fator neuronal de desenvolvimento cerebral
B-NADP	1,6-Diidronicotinamida-Adenina Dinucleotideo
CA1	Corno de Amon 1
CA3	Corno de Amon 3
Ca⁺²	Cálcio
Ca⁺²-CAM	Cálcio-calmodulina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EtOH	Etanol
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FAS	Síndrome Alcoólico-Fetal
GABA_A	Ácido Gama-Amino Butírico do tipo A
Gr	Camada granular do cerebelo
GrDG	Camada granular do giro denteado
Hg⁰	Mercúrio elementar
Hg⁺¹/ Hg⁺²	Mercúrio inorgânico
5-HT₃	5-Hidroxitriptamina do tipo 3
LCE	Labirinto em cruz elevado
LTE	Labirinto em T elevado
LTP	Potenciação de Longa Duração
LTD	Depressão de Longa Duração
L-NAME	N _G -nitro-L-arginina metil-éster

L-NOARG	L-N _G -nitro-arginina
MeHg	Metilmercúrio
Mol	Camada molecular do cerebelo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NADPH-d	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-diaforase
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSn	Óxido nítrico sintase neuronal
NOSe	Óxido nítrico sintase endotelial
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PO	Camada polimófica do hipocampo
PV	Área pósteroventral do estriado
PD	Área pósterodorsal do estriado
RNA	Ácido ribonucleico
R1	Reteste de 24 horas após treino
R7	Reteste de 7 dias após treino
SCPD	Substância cinzenta periaquedutal dorsal
SL	Estrato lacunoso do hipocampo
SM	Estrato molecular do hipocampo
SNC	Sistema Nervoso Central
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
T1	Teste de 24 horas após treino
T7	Teste de 7 dias após treino
T_{máx}	Transmitância máxima
T_{mín}	Transmitância mínima

RESUMO

Estudos envolvendo o álcool e suas interações com outros neurotóxicos representam o foco de muitas pesquisas, devido ao fato do álcool, algumas vezes, levar a sérios problemas de saúde. A exposição fetal ao álcool e ao mercúrio tem uma alta incidência em algumas regiões do Brasil, especialmente nas áreas próximas à mineração, onde há mulheres grávidas que são dependentes em álcool. Este estudo foi realizado para examinar as alterações comportamentais e morfológicas nos cérebros de ratos adultos, expostos ao etanol (EtOH) e/ou metilmercúrio (MeHg) durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Ratas grávidas receberam, por gavagem, água de torneira ou EtOH durante a gravidez e a amamentação. No 15º dia da gravidez, a metade de cada grupo recebeu 8 mg/Kg de MeHg. Os grupos foram: Controle, EtOH, MeHg e EtOH+MeHg. Os testes comportamentais consistiram de campo aberto, labirinto em T elevado (LTE) e esQUIVA inibitória do tipo *step-down*. As análises morfológicas foram usadas para avaliar a atividade nitrérgica no hipocampo, estriado e cerebelo. Os resultados demonstraram que a exposição ao EtOH e/ou MeHg pode ser um risco para os déficits associados à locomoção e às funções neurocognitivas, da mesma forma que altera a atividade nitrérgica no cérebro de ratos adultos em diferentes vias, dependendo da região e da camada do SNC. Essas alterações podem estar relacionadas às diferentes propriedades metabólicas locais. A administração do EtOH durante a vida fetal parece induzir um aumento das enzimas sintetizadoras de NO, enquanto o MeHg parece reduzi-las, alterando a homeostase na fase adulta. O grupo EtOH+MeHg induziu uma redução da atividade nitrérgica somente na camada molecular do cerebelo quando comparado ao grupo controle. Em conjunto, esses resultados sugerem uma possível interação entre o EtOH e o MeHg, com consequências regionais no cérebro adulto, que deve ser dependente de diferenças metabólicas intra e interregionais, mas que merecem posteriores investigações.

Palavras-chave: Atividade nitrérgica, locomoção, memória, metilmercúrio, Síndrome alcoólico-fetal.

ABSTRACT

Studies involving alcohol and its interactions with other neurotoxicants represent the focus of several researches due to the fact that the use of alcohol can sometimes lead to serious health problems. Fetal exposure to alcohol and mercury has a high incidence in some regions of Brazil, especially in mining areas habited by alcoholics pregnant women. This study was performed in order to examine behavioral and morphological alterations in the brain of adult rats, exposed to ethanol (EtOH) and methylmercury (MeHg) during developing central nervous system (CNS). Pregnant rats received, by gavage, tap water or EtOH during pregnancy and breast-feeding. On the 15th day of pregnancy, half of each group received 8 mg/kg of MeHg. The groups were as follows: Control, EtOH, MeHg and EtOH+MeHg. The behavioral tests consisted of open field, elevated T-maze (ETM) and step-down inhibitory avoidance. Morphological analyses were used in order to evaluate the nitrenergic activity in the hippocampus, striatum and cerebellum. The results demonstrated that the exposure to EtOH and/or MeHg may be a risk for deficits associated with locomotion and neurocognitive functions and also alters nitrenergic activity in the adult rat brain in different ways, depending on the CNS region and layer. These alterations might be related to different local metabolic properties. EtOH administration during fetal life seems to induce an upregulation of NO synthetic enzymes, whereas MeHg seem to downregulate this induction, altering the homeostasis in adulthood. The EtOH+MeHg group induced a reduction of nitrenergic activity only in the molecular layer of the cerebellum, compared to control groups. Taken together, the results suggest possible prenatal interactions between EtOH and MeHg with regional consequences in the adult brain that may be dependent of intra- and interregional metabolic differences that deserve further investigation.

Keywords: Nitrenergic activity, locomotion, memory, methylmercury, Fetal alcohol syndrome.

I. INTRODUÇÃO

1. ÁLCOOL E ALCOOLISMO: CONSIDERAÇÕES GERAIS

O consumo de substâncias psicoativas se constitui em um dos fenômenos mais frequentes na população mundial (Elliott e Bower, 2008; Khalsa e *cols.*, 2008; Sanchis e *cols.*, 2007; Uhart e Wand, 2009). Considerando-se o etanol (EtOH), a grande frequência de consumo ocorre na adolescência, principalmente pela quantidade e facilidade na aquisição desta droga que, quando utilizada cronicamente, pode levar a um quadro conhecido como alcoolismo (Carvalho e *cols.*, 1995; Sanchis e *cols.*, 2007; Schuckit, 2009).

O alcoolismo é um distúrbio crônico que pode causar severos efeitos prejudiciais ao funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC), cuja origem pode ser genética, caracterizada pela tolerância aos efeitos do álcool, prejuízo no controle motor, síndrome de abstinência (quando há parada ou redução no consumo alcoólico) e dificuldade em controlar o consumo em decorrência do grande desejo ou compulsão pelo mesmo (Knopik e *cols.*, 2009; Tobamidanik e Zabkiewicz, 2009).

Apesar da grande quantidade de informações sobre os efeitos deletérios decorrentes do consumo dessa droga, no Brasil ainda são escassas as pesquisas clínicas relacionadas à intoxicação intrauterina. Não existe um nível seguro estabelecido para o consumo desta substância na gravidez. O período gestacional é relevante para as consequências dos efeitos dessa droga (Monsen, 2009; Williams e Ross, 2007). Mulheres que consomem bebidas alcoólicas em excesso, estão mais suscetíveis a gerar filhos com anormalidades no desenvolvimento físico e mental (Centers for Disease Control and Prevention, 2004; Pollard, 2007; Rasmussen e *cols.*, 2009; Whitehall, 2007).

A literatura mostra que nos Estados Unidos, aproximadamente, 10% de mulheres grávidas consomem bebida alcoólica, sendo que 2% delas estão envolvidas com o consumo frequente ou excessivo (Centers for Disease Control and Prevention, 2004). O Brasil, de acordo com Galduroz e Caetano (2004), está situado na 63ª posição no mundo em consumo de álcool *per capita* para pessoas com 15 anos ou mais de idade, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Os autores chamam a atenção para o fato de que o consumo de álcool no Brasil cresceu 74,5% entre 1970 e 1990. No entanto, não há dados epidemiológicos em nosso país referentes ao consumo do EtOH por parte de mulheres grávidas.

As exposições intrauterinas ao EtOH causam uma síndrome neurotóxica conhecida como Síndrome Alcoólica Fetal (do inglês *Fetal Alcohol Syndrome- FAS*), que é dependente da severidade da exposição do feto àquele neurotóxico. Este quadro pode resultar na ocorrência de mortalidade, ainda na vida intrauterina, ou em graves problemas de desenvolvimento, anormalidades faciais, pequenas fissuras palpebrais e microencefalia (**figura 1**).

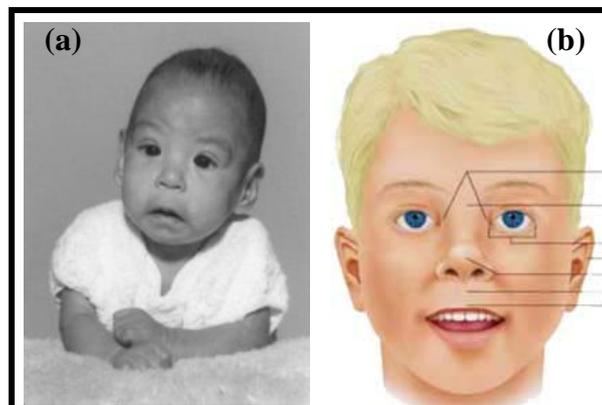


Figura 1 - Fotografia (a) e figura esquemática (b) de criança apresentando características de FAS: dismorfias craniofaciais, com fissura palpebral pequena, nariz pequeno e curvado para cima, lábio superior fino, fenda labial lisa, restrição de crescimento. Fonte: <http://embryology.med.unsw.edu.au/Defect/page5a.htm>; <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/thumb/f/f3/FASbaby.jpg/200px-FASbaby.jpg>

Além das características físicas diferenciadas, alterações comportamentais também são encontradas, tais como hiperatividade, disfunção motora, déficit de atenção, aprendizagem e memória (Green, 2007; Momino *e cols.*, 2008; Niccols, 2007). Mesmo crianças que não apresentaram FAS, mas que foram expostas ao EtOH no período pré-natal, apresentaram déficits de memória e aprendizado verbal (Neese *e cols.*, 2004; Willford *e cols.*, 2004).

As pesquisas clínicas relacionadas às implicações do EtOH na intoxicação intrauterina ainda são pontuais. Os efeitos durante a fase de pré-implantação do zigoto não estão claramente elucidados (Becker *e cols.*, 1996). O período da pré-organogênese compreende os seis primeiros dias da gestação em ratos. Em humanos corresponde, aproximadamente, às duas primeiras semanas da gravidez. Este estágio da embriogênese é iniciado com a fertilização e culmina com a formação do zigoto (Becker *e cols.*, 1996).

As consequências da exposição ao EtOH, na fase previamente mencionada, são muitas vezes negligenciadas, devido ao fato de culminar, geralmente, em aborto espontâneo ou reabsorção do embrião. Tal fato, porém, deve ser considerado como o mais extremo efeito adverso de exposição gestacional àquela droga, porque pode resultar na morte embrionária e finalização da gravidez (Becker *e cols.*, 1996; Burd e Wilson, 2004). Quando estes aspectos mais trágicos não ocorrem, retardos no crescimento e anormalidades na estrutura cerebral podem ser observados, acarretando alterações centrais e/ou comportamentais (Coles *e cols.*, 2009; Herman *e cols.*, 2008; Jirikowic *e cols.*, 2008; Nayak e Murthy, 2008).

O SNC é vulnerável aos danos causados pelo EtOH, onde certas estruturas cerebrais, tais como o hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal e estriado parecem ser seletivamente afetadas (Fadda e Rossetti, 1998) e esta vulnerabilidade pode culminar em neurotoxicidade, que pode ocorrer durante períodos específicos da maturação. Em ratos, o período pré-natal corresponde aos primeiros dois trimestres da gestação humana, e o período imediato ao pós-natal (P4-P10) aproxima-se ao terceiro trimestre em humanos, quando há um período dinâmico do crescimento do SNC (Mitchell e cols., 2000).

2. MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE DO EtOH

Por suas características químicas e farmacocinéticas, o EtOH pode atravessar livremente a bicamada lipídica das células e afetar alguns alvos celulares, incluindo entre os principais receptores: o ácido gama-aminobutírico A (GABA_A), N-metil-D-aspartato (NMDA), glicina, nicotínicos neuronais, e serotoninérgico 5-HT₃ afetando, conseqüentemente, seus ligantes (Davis, 2008; Engleman e cols., 2008; Foll e cols., 2009; Valenzuela, 1997; Vengeliene e cols., 2008). Dentre estes sistemas de neurotransmissores, os mais afetados pelo EtOH são os gabaérgicos e glutamatérgicos (Cuzon e cols., 2008; Gass e Olive, 2008; Lobo e Harris, 2008; Sanderson e cols., 2009).

Nos receptores glutamatérgicos, o EtOH tem efeitos nas respostas neuronais mediadas pelos receptores NMDA (Gass e Olive, 2008) que estão envolvidos em processos fundamentais do SNC, como a atividade neurotrófica (Hardingham e Bading, 2003) e a plasticidade sináptica (Zhuo, 2009). A exposição aguda a este neurotóxico reduz as correntes iônicas ativadas por este receptor

(Lovinger e cols., 1989), causando alterações na homeostase do cálcio (Ca^{+2}) em várias regiões cerebrais (Kelm e cols., 2007).

Os sistemas glutamatérgicos possuem íntima interação com as vias nitrérgicas, onde várias isoformas de óxido nítrico sintase (NOS) têm sido descritas e representam os produtos de três genes distintos (Marletta, 1994; Nathan e Xie, 1994), sendo duas formas constitutivas, a óxido nítrico sintase neuronal (NOSn) e a óxido nítrico sintase endotelial (NOSe), e uma induzida que consiste na óxido nítrico sintase induzida (NOSi), e as suas produções estão intimamente relacionadas aos receptores NMDA (Frade e cols., 2008).

As interações entre os receptores NMDA e o óxido nítrico (do inglês *nitric oxide-NO*) devem ocorrer devido à presença de proteínas que se ligam às subunidades NR2A e NR2B dos receptores NMDA e que sinalizam moléculas, tais como a NOS (Hu e cols., 2008; Takagi e cols., 2000). Entre as formas constitutivas de NOS dependentes de cálcio-calmodulina (Ca^{+2} -CAM), incluem as constitutivas, onde a NOSn foi identificada primeiramente em neurônios e estava presente em quase todas as regiões do SNC, tais como: cerebelo, córtex, estriado, bulbo olfatório, hipocampo, hipotálamo e prosencéfalo basal (Dawson e cols., 1991; Southam e Garthwaite, 1993). Estudos demonstram que o NO está diretamente envolvido nos efeitos agudos e crônicos do álcool e que doses sistêmicas deste neurotóxico reduzem a liberação de NO (Jang e cols., 2005; Rossetti e Crespi, 2004).

O NO é formado pela enzima NOS, utilizando como substrato a L-arginina, reação esta que requer a presença de oxigênio, nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADPH), e outros fatores como a tetraidrobiopterina, e o

grupamento heme para formar NO e citrulina (Marletta, 1994). Em baixas concentrações ($<1 \mu\text{m}$), o NO exerce primordialmente seus efeitos diretos, com atividade positiva para neurogênese, crescimento e diferenciação celular, sendo esta concentração a responsável por inibir a ativação da NOSi. Porém, quando ocorre um dano, os níveis das NOS constitutivas decaem, ocasionando a ativação da NOSi e aumento das concentrações de NO local ($>1 \mu\text{m}$) onde, a partir daí, ele exercerá principalmente seus efeitos indiretos, induzindo ao estresse oxidativo (Davis e cols., 2001)

Além do NMDA, os receptores GABA_A também são importantes alvos para o EtOH no SNC e parecem ocupar um lugar central na mediação de seus efeitos farmacológicos. O provável mecanismo decorrente da ativação desses receptores gabaérgicos parece ser por ativar a neurodegeneração difusa por apoptose em diversas áreas do encéfalo em desenvolvimento (Young e cols., 2008). Os exatos mecanismos geradores da extensão da apoptose deflagrada ainda são obscuros e alvos de estudos (Conti e cols., 2009).

Segundo Ikonomidou e cols. (2000), a vulnerabilidade do SNC ao EtOH coincide com o período de sinaptogênese que, em humanos, se estende desde o sexto mês de gestação até vários anos após o nascimento. Em ratos se inicia no nascimento e alcança as três primeiras semanas pós-natal (Dobbing e Sands, 1979). Durante este período, a exposição transitória àquela droga poderia promover a morte de milhões de neurônios no cérebro em formação (Milotova e cols., 2008), o que ajudaria a explicar a massa cerebral reduzida e os distúrbios neurocomportamentais associados com a FAS (Jacobson e cols., 2008).

Em cérebros adultos, drogas gabamiméticas têm efeitos diferenciados aos observados em cérebros em desenvolvimento. Essas drogas protegem cérebros adultos contra neurotoxicidade por excitotoxicidade das drogas agonistas NMDA (Farber e cols., 2004; Ishimaru e cols., 1995; Kim e cols., 1999). Em cérebros em desenvolvimento, as drogas gabamiméticas agem em consenso com drogas antagonistas NMDA para produzirem respostas aditivas de neurodegeneração apoptótica (Ikonomidou e cols., 2000). Esses pesquisadores relataram que o EtOH parece agir durante o neurodesenvolvimento através de um mecanismo dual, que envolve o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e ativação excessiva de receptores do tipo GABAA.

A relação entre o EtOH e a neurodegeneração envolve o desequilíbrio dos sistemas neuroquímicos regulatórios, destacando-se entre eles o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Factor Neuronal Development Brain*) e a geração de espécies reativas do oxigênio (EROS) e radicais livres que são gerados durante o seu metabolismo, resultando em peroxidação de lipídios por estresse oxidativo no fígado, cérebro, coração e músculos esqueléticos (Adachi e cols., 2000; Calabrese e cols., 1998; Davis, 2008; Mansouri e cols., 2001).

3. MERCÚRIO E METILMERCÚRIO: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A utilização progressiva do mercúrio, no último século, passou a representar um problema para o meio ambiente, visto que em virtude de sua volatilidade, é capaz de interagir com ciclos geoquímicos e cadeias tróficas (**figura 2**), elevando suas concentrações na natureza através de sua forma

metilada de metilmercúrio (MeHg). A partir dessas características, pode permanecer por vários anos na natureza sem sofrer ação e/ou degradação de fatores ambientais (bioacumulação), podendo ser detectado na atmosfera e em algumas regiões do planeta (Azevedo, 2003).

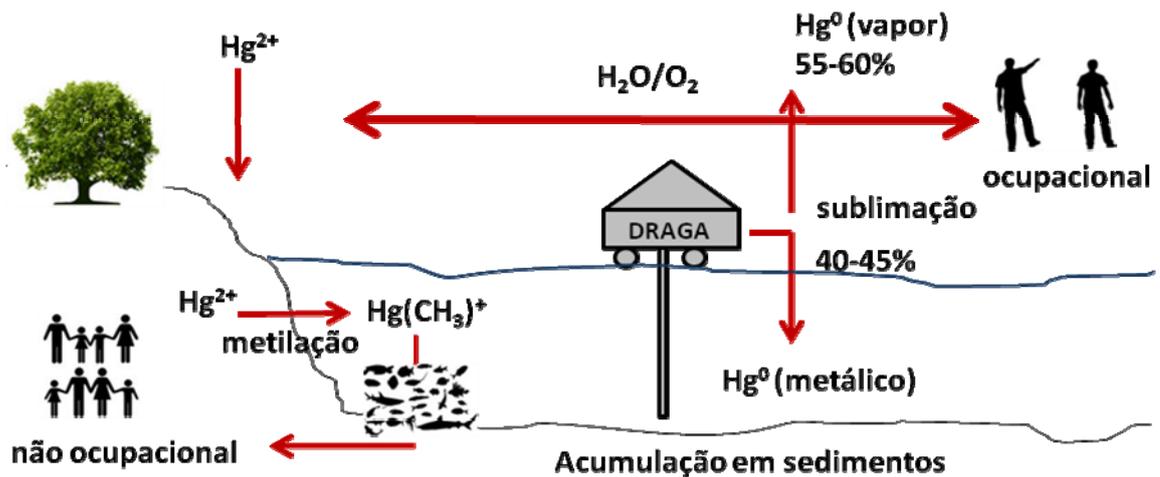


Figura 2 - Figura esquemática do ciclo do mercúrio. As emissões atmosféricas de mercúrio elementar (Hg^0) ocorrem através de eventos naturais ou através de atividades antropogênicas. O vapor de mercúrio presente no ar atmosférico pode sofrer oxidação, transformando-se em mercúrio inorgânico (Hg^{2+}), que é depositado no solo ou rios e lagos. Nos sistemas aquáticos, o Hg^{2+} pode sofrer metilação, transformando-se em metilmercúrio (MeHg) e depositar-se nos plânctons, que são fonte alimentar dos animais marinhos. Desta forma, o consumo de peixes contaminados pelo MeHg pode ser fonte de contaminação dos seres humanos (Fitzgerald e Clarkson, 1991). Fonte: adaptado de http://www.cetem.gov.br/mercúrio/semiquanti/por/img/mercurio-ciclo_01.gif

Todos os seres vivos estão sujeitos à exposição de pequenas doses de mercúrio (Clarkson, 1993, 1997). O mercúrio ocorre em três formas: o elemento metálico (Hg^0 – mercúrio elementar); sal inorgânico (Hg^{1+} e Hg^{2+}); e compostos orgânicos como MeHg, etilmercúrio e fenilmercúrio. A solubilidade, reatividade e toxicidade variam entre estas formas (Goldman e Shannon, 2001).

Esta habilidade do mercúrio, associada à capacidade do composto inorgânico em sofrer metilação em ambientes aquáticos (e nesta condição ser

bioacumulado), faz com que ele alcance teores extremamente elevados no topo da cadeia alimentar. Dessa forma, a ação dos compostos mercuriais no meio ambiente ocasionou vários episódios de intoxicação e contaminação no ecossistema (Azevedo, 2003).

Com o desenvolvimento industrial, a utilização do mercúrio e de seus compostos foi progressivamente difundida. Atualmente, ele é empregado na área médica como conservante de vacinas, medicamentos e cosméticos, entre outros. Está sendo empregado também em diversas ramificações industriais como as metalúrgicas, petroquímicas e de produção de papel; como componente de inseticidas na agricultura; na área odontológica, por formar amálgamas com metais nobres, sendo exatamente por esta propriedade que o mercúrio ainda é amplamente utilizado em garimpos. O vasto emprego ocupacional causa a emissão natural para a biosfera, conferindo a este metal importância na toxicologia ocupacional e ambiental (Barkay e Wagner-Dobler, 2005; Drum, 2009; Faria, 2003).

O mercúrio representa um grave problema ambiental devido à sua bioacumulação na cadeia alimentar aquática e pelo elevado risco à exposição em baixas doses, por um longo período de tempo (Berlin, 1986; Knobeloch e *col/s.*, 2005). A principal fonte da exposição materna ao mercúrio orgânico, na forma de MeHg, é o consumo de peixes, inalação de vapores de mercúrio e o uso de cremes tópicos que contêm este metal (Dórea, 2008; Drum, 2009; Kal e *col/s.*, 2008; Li e *col/s.*, 2009; Srogi, 2007).

O MeHg é um neurotóxico que pode interferir no desenvolvimento do feto. É transportado pelos eritrócitos (90%), com uma pequena fração ligada às

proteínas do plasma. Por ser lipossolúvel, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e placentária, acumulando-se no SNC e no embrião (Castoldi e cols., 2008; Cernichiari e cols., 2007; Dewailly e cols., 2008; Huang e cols., 2008; Myren e cols., 2007), sendo que no sistema nervoso fetal é possível encontrar concentrações maiores que no sistema nervoso materno (Feng e cols., 2004).

Evidências observadas nas consequências dos desastres ocorridos em Minamata e Niigata (Japão) e também no Iraque e em Seychelles, causados pelo consumo de peixes contaminados por MeHg, alertou o mundo para o potencial tóxico mercurial (Bertossi e cols., 2004; Huang e cols., 2005). Nesses locais verificou-se que houve contaminação de embriões por MeHg através da via placentária. As vítimas apresentaram sintomas semelhantes à paralisia cerebral, caracterizados por grave deficiência mental; disfunções motoras e convulsões (Bertossi e cols., 2004; Davidson e cols., 2004); e distúrbios somatossensoriais (Takaoka e cols., 2008). O exame histopatológico dos casos ocorridos no Japão revelou destruição neuronal generalizada do SNC (Matsumoto e cols., 1964; Takeuchi e Eto, 1999). Nos casos ocorridos no Iraque, observou-se um arranjo anormal dos neurônios no cérebro e no cerebelo (Choi, 1989; Choi e cols., 1978).

No Brasil, a contaminação de rios e lagos, principalmente na região Amazônica, deve-se à utilização do mercúrio na atividade garimpeira. Grandes quantidades de mercúrio líquido são utilizadas na captação do ouro. Neste processo, o ambiente pode ser contaminado de duas formas: 1) pelo mercúrio líquido, durante a formação da amálgama, que facilita a separação do ouro de sedimentos dos rios e solo; 2) pelo vapor de mercúrio, oriundo posteriormente da queima da amálgama, com o objetivo de separar o mercúrio do ouro. A

contaminação do ecossistema dessa região, por esses processos, tem sido bem documentada, bem como sua participação na intoxicação humana (Pinheiro e cols., 2008; Silbergeld e cols., 2002).

Dentro deste contexto, o consumo de peixes em áreas próximas à atividade garimpeira, tem sido considerado uma via importante de exposição humana ao MeHg (Pinheiro e cols., 2008). Concentrações elevadas, muito acima do valor de referência definido pela OMS, foram encontradas em peixes da região do rio Tapajós, no estado do Pará (Pinheiro e cols., 2008), onde a cada 450 gramas de ouro extraídas dos rios da Amazônia, aproximadamente o dobro da quantidade de mercúrio é despejado nos rios. Assim, estima-se que cerca de 70 a 170 toneladas desse metal é lançada anualmente no meio ambiente, na região dos garimpos (Azevedo, 2003; Lacerda e cols., 2004).

O MeHg, quando ingerido, é quase totalmente absorvido pelo trato gastrointestinal (em torno de 95%), estendendo-se aos outros tecidos em apenas quatro dias. É lentamente desmetilado a mercúrio inorgânico, principalmente através de macrófagos presentes no intestino e enzimas do fígado fetal, e exerce mecanismos de neurotoxicidade ainda não totalmente conhecidos (Counter e Buchanan, 2004; Grandjean, 2007).

4. MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE DO MeHg

De acordo com Bertossi e cols. (2004), o dano celular no cerebelo de embriões tratados com MeHg, subsidia a afirmação de que esse neurotóxico exerce sua ação nas populações neuronais e gliais, através de um ou mais mecanismos. Um dos efeitos primários do MeHg sobre a transmissão sináptica é

o aumento, seguido de diminuição, da liberação de neurotransmissores, tais como o glutamato (Faro e cols., 2007; Yuan e Atchison, 1993). Dentre os efeitos moleculares mais relevantes estão eventos apoptóticos e necróticos, ação nos microtúbulos, ação na sinalização de Ca^{+2} , ação no estresse oxidativo, alteração no sistema glutamatérgico, muscarínico e dopaminérgico (Aschner e cols., 2007; Castoldi e cols., 2000; Ceccatelli e cols., 2007).

A alta afinidade do MeHg por grupos tióis, faz com que proteínas e peptídeos comportem-se susceptivelmente às modificações estruturais e funcionais causadas pelo MeHg. Alguns alvos no mecanismo de toxicidade deste composto químico são propostos para o SNC, tais como: a barreira hematoencefálica; o citoesqueleto; o transporte axonal; alterações em receptores; a produção, secreção, captação e metabolismo de neurotransmissores; a sinalização celular; a síntese de proteínas, ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA); e sistemas respiratórios e geradores de energia (Castoldi e cols., 2001).

Existem relatos de que este neurotóxico é capaz de alterar, de forma consistente, a homeostase intracelular do Ca^{+2} em vários tipos celulares. A morte de células da camada granulosa do cerebelo, induzida pelo MeHg, tem sido associada ao crescente e severo influxo de Ca^{+2} intracelular e por alterações da homeostase do Ca^{+2} , conforme resultados de estudos *in vitro*. Neste sentido, tem-se observado que o MeHg causa um aumento bifásico característico de Ca^{+2} intracelular, a partir de duas etapas: uma "primeira-fase" em que ocorre a liberação inicial de Ca^{+2} intracelular de uma ou mais organelas citoplasmáticas, e

por uma "segunda-fase" relacionada ao influxo secundário de Ca^{+2} extracelular (Limke e *cols.*, 2003; Marty e Atchison, 1997; Yuan e Atchison, 2007).

A homeostase do Ca^{+2} nos sistemas orgânicos é de extrema importância, pois o seu aumento intracelular causa morte da célula neuronal. Isto inclui a ativação de enzimas degradativas como as fosfolipases, proteases e endonucleases, disfunções mitocondriais e perturbação na organização do citoesqueleto (Orrenius e Nicotera, 1994). Associado ao prejuízo na homeostase do Ca^{+2} , o MeHg causa distúrbios relacionados às vias nitrérgicas, onde a intoxicação aguda ou crônica mercurial provoca alterações da atividade do NO, induzindo o estresse oxidativo (Huang e *cols.*, 2008), assim como afetando a síntese e/ou transporte de NOS no SNC (Freire e *cols.*, 2007; Kuo e *cols.*, 2002).

A degeneração neuronal causada pela exposição ao MeHg tem sido relatada por ocorrer tanto por necrose (Miura e Imura, 1987), quanto por apoptose (Castoldi e *cols.*, 2000; Miura e *cols.*, 1999). Foi observado que altas doses de MeHg (de 3 a 10 μM) causam um rápido prejuízo da atividade mitocondrial e lise da membrana plasmática, resultando em extensiva morte necrótica (Castoldi e *cols.*, 2000). Já a exposição às baixas doses de MeHg (menor ou igual a 1 μM) provoca morte de células granulares cerebelares por apoptose (Castoldi e *cols.*, 2000; Kunimoto, 1994).

Finalmente, sabe-se que o MeHg também afeta a transmissão sináptica através do comprometimento funcional das enzimas de síntese de neurotransmissores (Omata e *cols.*, 1982; Tsuzuki, 1981; Vas e Monestier, 2008). Esta resposta deve-se à sua característica de possuir afinidade por ligantes contendo grupos tióis, de tal forma que ele inativa as enzimas com grupos sulfidril,

assim comprometendo o metabolismo celular, a síntese de neurotransmissores, a transmissão sináptica, a homeostase de íons e a síntese proteica, assim como todos os fenômenos dependentes de enzimas que são alvos deste neurotóxico (Atchison e Hare, 1994; Feldman, 1999).

5. ALTERAÇÕES NEUROMORFOLÓGICAS E REFLEXOS NO COMPORTAMENTO RELACIONADOS AO ETOH E MEHg

Muitas regiões do SNC, afetadas pelos neurotóxicos, pertencem ao sistema límbico, que está envolvido com o comportamento emocional humano. Qualquer desequilíbrio neste sistema pode alterar tanto o seu estímulo quanto a sua resposta elétrica, levando ao desenvolvimento de doenças psicossomáticas (Rónai e cols., 2002). Constituem esse sistema a área septal, amígdala, hipocampo, corpos mamilares, giro do cíngulo e o giro para-hipocampal, que possuem conexões com o hipotálamo, córtex pré-frontal e o tálamo que, por sua vez, possui conexões com os núcleos da base (Suyama e cols., 2009; Yelnik, 2008).

O estriado é um núcleo da base que é constituído pelas estruturas denominadas putâmen e núcleo caudado. Participa da alça motora direta, a quem é atribuída a facilitação da iniciação de movimentos voluntários (Wichmann e DeLong, 1996). Estudos demonstram que o estriado também está envolvido no aprendizado de hábitos e na memória de procedimentos, juntamente com o cerebelo (Knowlton e cols., 1996; Shutoh e cols., 2006).

O cerebelo é uma estrutura localizada dorsalmente ao tronco encefálico. É formado pelo córtex e pela substância branca cerebelar. O córtex cerebelar é formado pelas camadas granular e molecular das células de Purkinje. O cerebelo

está fundamentalmente envolvido no controle do movimento, porém esta estrutura é considerada um sítio importante do aprendizado motor e a memória de procedimentos (Shutoh e cols., 2006).

Outra estrutura de fundamental importância para o aprendizado e memória é o hipocampo, que se localiza medialmente ao ventrículo lateral e consiste em duas finas camadas de neurônios, dobradas uma sobre a outra. Uma camada é denominada de corno de Amon (que se divide em 4 porções) e a outra camada é denominada de giro denteado. Estudos sugerem que essa estrutura está envolvida com a circuitaria que envolve a emoção (Lombardo e cols., 2001), aprendizado e memória (Bear, 1996; Rezayat e cols., 2009).

Fenômenos fundamentais para o aprendizado e memória acontecem no hipocampo, estriado e cerebelo. Estes mecanismos são chamados de potencial de longa duração (LTP, do inglês *long term potentiation*) e Depressão de Longa Duração (LTD, do inglês *long term depression*) e estão correlacionados com a plasticidade sináptica, onde estes efeitos são dependentes de NO (Susswein e cols., 2004).

Entre as estruturas cerebrais, uma das que mais se destacam pela sensibilidade ao EtOH é o hipocampo (Miki e cols., 2008; Singh e cols., 2009), que expressa altos níveis de receptores NMDA e onde, conseqüentemente, acontece de forma consistente os fenômenos de LTP com altas concentrações de NO tecidual (Mulholland e cols., 2009). O EtOH bloqueia os receptores NMDA afetando estruturas que os expressam de forma considerável, assim como os efeitos fisiológicos dependentes deles (Miki e cols., 2008). Como o aprendizado e a memória são dependentes de LTP, que é um fenômeno dependente de

receptores glutamatérgicos, esta função cognitiva pode ser afetada pela exposição ao EtOH (Gass e Olive, 2008).

O MeHg, por sua vez, conhecido por causar alterações morfológicas no SNC, preferencialmente se acumula nos astrócitos, no qual inibe a recaptção de aminoácidos excitatórios (Aschner e cols., 2007; Mutkus e cols., 2005). A consequente elevação dos níveis de glutamato no espaço extracelular estimula ou acelera processos de neurodegeneração por excitotoxicidade (Aschner e cols., 2007; Brookes, 1992). Além do glutamato, o MeHg causa elevação dos níveis de NO no espaço extracelular, que pode facilitar ou acelerar processos de neurodegeneração por excitotoxicidade (Castoldi e cols., 2001; Jie e cols., 2007). Na intoxicação pelo MeHg, o cerebelo é a estrutura que esse neurotóxico apresenta tropismo, e que também apresenta fenômenos relacionados ao aprendizado e memória, tais como o LTP e LTD (Castoldi e cols., 2001).

Estudos envolvendo a memória demonstram que há diferenças na sua constituição e classificação. McGaugh (1966) estabeleceu o conceito de três sistemas de memória: imediata, de curta duração (que se desenvolve em poucos segundos ou minutos e dura por apenas algumas horas), e de longa duração (que se consolida vagarosamente e é relativamente permanente). A memória imediata dura segundos ou alguns poucos minutos (Gold e cols., 1975) e é hoje identificada como memória de trabalho (Gold e cols., 1975; Goldman-Rakic, 1992) que pode ser avaliada através de modelos experimentais (Izquierdo e cols., 1998).

A memória de trabalho é primariamente dependente da atividade elétrica das células do córtex pré-frontal (Fuster, 1998; Gold e cols., 1975; Goldman-

Rakic, 1992), associadas às células de outras regiões do cérebro (Goldman-Rakic, 1992). As memórias de curta e longa duração utilizam sistemas e estruturas complexas para se estabelecer, porém com mecanismos diferentes (Izquierdo e cols., 1999).

Outros pesquisadores dão ênfase a dois tipos de memória: a espacial e a operacional, que são severamente atingidos pelo EtOH (Fadda e Rossetti, 1998; Jacobson e cols., 1990). Em doses agudas essa droga diminui a memória de longa duração, que é dependente do LTP e dos receptores NMDA no hipocampo (Singh e cols., 2009; Xie e cols., 2009).

Uma das classificações mais recentes menciona que, de acordo com seu conteúdo, a memória pode ser: 1) declarativa ou explícita, que pode ser episódica (que está relacionada aos fatos, também considerada como memória autobiográfica) ou semântica (que está relacionada a eventos e conhecimento geral); 2) e de procedimentos ou implícita, que se relaciona com procedimentos motores (memória de procedimentos), condicionamentos clássicos e aprendizado não-associativo (Izquierdo e cols., 1999, 2008).

Em relação ao tempo de duração, a memória pode ser classificada em memória de curta e longa duração (Banich e cols., 2008). Em referência à sua natureza, a memória classifica-se em transitória ou armazenada (Gold e McGaugh, 1977; Goldman-Rakic, 1992).

Diante de todas essas interferências é possível observar, diante dos prejuízos neuronais, várias alterações comportamentais, observadas por irritabilidade, depressão, ansiedade, dificuldade de concentração e distúrbios

relacionados ao aprendizado e memória (Carratù e cols. 2008; Onishchenko e cols., 2007). Essas alterações são perfeitamente detectáveis não somente em humanos, mas também em animais experimentais (Chang e cols., 2008; Fonseca e cols., 2008; Maia e cols., 2009). Para tal, nesses últimos utilizam-se equipamentos elaborados para a pesquisa com protocolos validados, de acordo o comportamento a ser analisado e respeitando-se as características inerentes a cada espécie (Lapiz-Bluhm e cols., 2008; Rygula e cols., 2008).

6. EtOH E MeHg: REPERCUSÕES PARA O SNC E OUTROS SISTEMAS

Embora a toxicidade desses dois compostos seja relativamente bem estudada isoladamente, a interação entre eles ainda não é bem entendida, principalmente quanto aos seus efeitos combinados sobre a função do SNC. Este tipo de questão ganha importância em virtude de haver regiões no Brasil onde há uso indiscriminado do mercúrio associado ao abuso de bebidas alcoólicas. Um exemplo bem típico são os garimpos da Amazônia, em virtude do consumo de peixes provenientes de rios contaminados com os organometais (Pinheiro e cols., 2008).

É bem sabido que nessas áreas de garimpos o consumo de bebidas alcoólicas é consideravelmente alto (Corbett e cols., 2007), e é evidente o risco de contaminação aguda ou crônica através do consumo de alimentos contaminados pelo mercúrio (Cheng e cols., 2009; Harmelin-Vivien e cols., 2009; Mathews e Fisher, 2008; Pinheiro e cols., 2008).

Além da importância direta da ação tóxica do EtOH e do MeHg para a saúde humana, os compostos mercuriais recebem cuidado especial pelo fato de

possuir grande habilidade de atravessar facilmente as membranas plasmática, encefálica e placentária, e acumular-se em tecidos específicos, gerando intoxicações no SNC, rins, fígado, baço, cabelo, coração, unhas e ossos dos recém-nascidos (Azevedo, 2003; Stern, 2005).

Mulheres grávidas que vivem em áreas de risco de contaminação mercurial, além de serem suscetíveis à exposição a estes contaminantes, de forma ativa ou passiva, também podem consumir bebidas alcoólicas e assim expor seus filhos à mortalidade ainda durante a vida intrauterina ou a problemas futuros muito mais graves de desenvolvimento, como alterações comportamentais, comprometimentos renais, imunológicos e cardiovasculares (Bailey, 2004; Chan e Egeland, 2004; Landmark e Aursnes, 2004).

A toxicidade da associação desses dois compostos ainda é obscura, apesar de avanços nos estudos dos dois neurotóxicos isoladamente. Entre os resultados encontrados em pesquisas anteriores, foram observados os efeitos do EtOH quanto à morbimortalidade e distribuição do mercúrio nos tecidos de ratos tratados oralmente com dose diária de 5 mg/kg de MeHg, por 10 dias consecutivos. O EtOH potencializou a toxicidade do MeHg em relação às manifestações neurológicas e mortalidade (Tamashiro e cols., 1986). Além disso, esta associação apresentou inicialmente um ganho, seguida de perda, dos pesos corporais de ratos, os quais apresentaram intensa ataxia (Turner e cols., 1981), dados estes observados em outros estudos com potencialização dos efeitos deletérios no SNC (Fazakas e cols., 2005; Papp e cols., 2005).

Os efeitos do cloreto de MeHg no metabolismo do EtOH também aparece como alvo de pesquisa. Dose diária de 10 mg/kg do primeiro neurotóxico,

administrado intraperitonealmente por dois dias consecutivos, e 0,4 g/kg do segundo neurotóxico, administrado intravenosamente, 24 horas após o pré-tratamento, mostrou que o MeHg teve pouca influência no metabolismo do EtOH devido às suas ligações não-específicas com grupo sulfidril no organismo (Ohmiya e Nakai, 1977). Grandjean e Weihe (1993) já afirmavam que o EtOH aumenta a formação de vapor de Hg^0 a partir de mercúrio iônico no sangue, onde alguma concentração é exalada, causando diminuição mercurial no sangue após ingestão de EtOH.

Maia e cols. (2009), por sua vez, demonstraram que as concentrações mercuriais em pelos de ratos tratados diminuíram quando foi administrado o EtOH conjuntamente com o MeHg. Em estudos comportamentais, os autores demonstraram que a intoxicação concomitante de EtOH+MeHg durante o neurodesenvolvimento em ratos, causou distúrbios relacionados à ansiedade na vida adulta.

As associações dessas substâncias também foram investigadas quanto à função e histologia renal. A nefrotoxicidade ficou mais evidente nos animais que receberam a associação das substâncias do que naqueles que receberam as drogas isoladas (Rumbeiha e cols., 1991, 1992). Esses resultados, entretanto, não foram observados por outros pesquisadores (Turner e cols., 1990), assim como ainda busca-se respostas aos outros aspectos dessas interações (McNeil e cols., 1988; Sano e cols., 1990).

Uma vez que o EtOH é um agente neurotóxico amplamente consumido, há a necessidade de aprofundamento de estudos que visem examinar os efeitos no desenvolvimento do SNC, visto que a literatura acerca da sua interação com

MeHg é escassa. Desta forma, os estudos aqui propostos pretendem investigar possíveis alterações comportamentais e morfológicas ocasionadas pela contaminação entre os dois neurotóxicos, em contraposição aos seus efeitos isolados.

Em virtude da possibilidade de intoxicação de grávidas pelo MeHg, onde há um potencial risco de consumo de EtOH em regiões de garimpo (Bisinoti e Jardim, 2004; Brabo *et al.*, 2000; Corbett *et al.*, 2007; Dórea, 2003; Harada *et al.*, 2001), este estudo adquire uma importância fundamental no intuito de contribuir com a observação das possíveis alterações decorrentes destas intoxicações, visto que, como comentado anteriormente, mulheres grávidas que vivem nessas áreas e que consomem bebidas alcoólicas, expõem os filhos à mortalidade na vida intrauterina ou a problemas futuros graves no desenvolvimento com alterações comportamentais, tais como hiperatividade, disfunção motora, déficit de atenção e aprendizagem.

II. OBJETIVOS

a) Geral

Analisar as respostas comportamentais e as possíveis alterações morfológicas dos cérebros dos ratos adultos decorrentes da exposição de EtOH e/ou MeHg, durante o desenvolvimento do SNC.

b) Específicos

- ❖ Avaliar as interferências nos pesos corpóreos e nos encéfalos das proles adultas
- ❖ Observar as possíveis alterações na locomoção espontânea;
- ❖ Investigar as alterações em processos cognitivos de memória;
- ❖ Verificar se os comportamentos de ansiedade e de aumento da emocionalidade estavam presentes nessas mesmas proles;
- ❖ Analisar possíveis alterações na avaliação de risco em todos os estágios dos testes comportamentais;
- ❖ Observar as prováveis alterações morfológicas e densitométricas, através da análise da atividade nitrérgica da circuitaria intrínseca cerebral.

III. METODOLOGIA

1. Animais de Experimentação

Ratos Wistar, machos e fêmeas, 3 meses, provenientes do Biotério Setorial da Faculdade de Ciências da Saúde (FS)/Faculdade de Medicina (FM), da Universidade de Brasília (UnB), foram mantidos em condições padronizadas de temperatura, exatidão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, água e comida *ad libitum*. Nas salas onde ocorreram os experimentos comportamentais foram utilizadas lâmpadas fluorescentes para iluminação.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA), do Instituto de Biologia, da Universidade de Brasília (ver comprovante na página 97), obedecendo aos critérios, de acordo com as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental (CIEEX), da FM/UnB; e no Laboratório de Neuroanatomia, da Universidade Federal do Pará (UFPA).

2. Tratamento adotado às fêmeas grávidas

Ratos machos (n=20) e fêmeas (n=20) foram colocados em casais para copular no período da manhã, em caixas isoladas sem serragem, protegidas internamente por uma grade, para proteger os animais do contato das fezes/urina e facilitar a localização dos tampões vaginais liberados pelas fêmeas, após a cópula. No dia seguinte, tão logo era detectada a presença dos referidos tampões nas caixas, as fêmeas foram consideradas como prováveis grávidas e separadas individualmente em caixas devidamente identificadas, conforme os tipos de tratamento, todos feitos por gavagem (**figura 3**):

- **GRUPO I** (Grupo Controle) – fêmeas tratadas apenas com água de torneira durante os 21 dias de gravidez e por mais 21 dias de amamentação;
- **GRUPO II** (Grupo EtOH) – fêmeas tratadas com EtOH (6,5 g/kg/dia; 22,5% p/v), nas mesmas condições do grupo I;
- **GRUPO III** (Grupo MeHg) – fêmeas tratadas apenas com água de torneira durante os 21 dias de gravidez e por mais 21 dias de amamentação, sendo que no 15º dia de gravidez recebeu dose única de 8 mg/kg de MeHg;
- **GRUPO IV** (Grupo EtOH+MeHg) – fêmeas tratadas com 6,5 g/kg/dia de EtOH (22,5% p/v) durante os 21 dias de gravidez e por mais 21 dias de amamentação, e com 8 mg/kg de MeHg no 15º dia de gravidez.

As doses de EtOH e de MeHg foram baseadas na literatura (Cagiano e cols., 1990; Maier e West, 2001; Zanolli e cols., 1994) e em resultados pilotos realizados no Laboratório de Neurofarmacologia, da UFPa. As substâncias (EtOH = código 459836; MeHg = código 442534) utilizadas no estudo foram oriundas da Companhia Farmacêutica SIGMA.

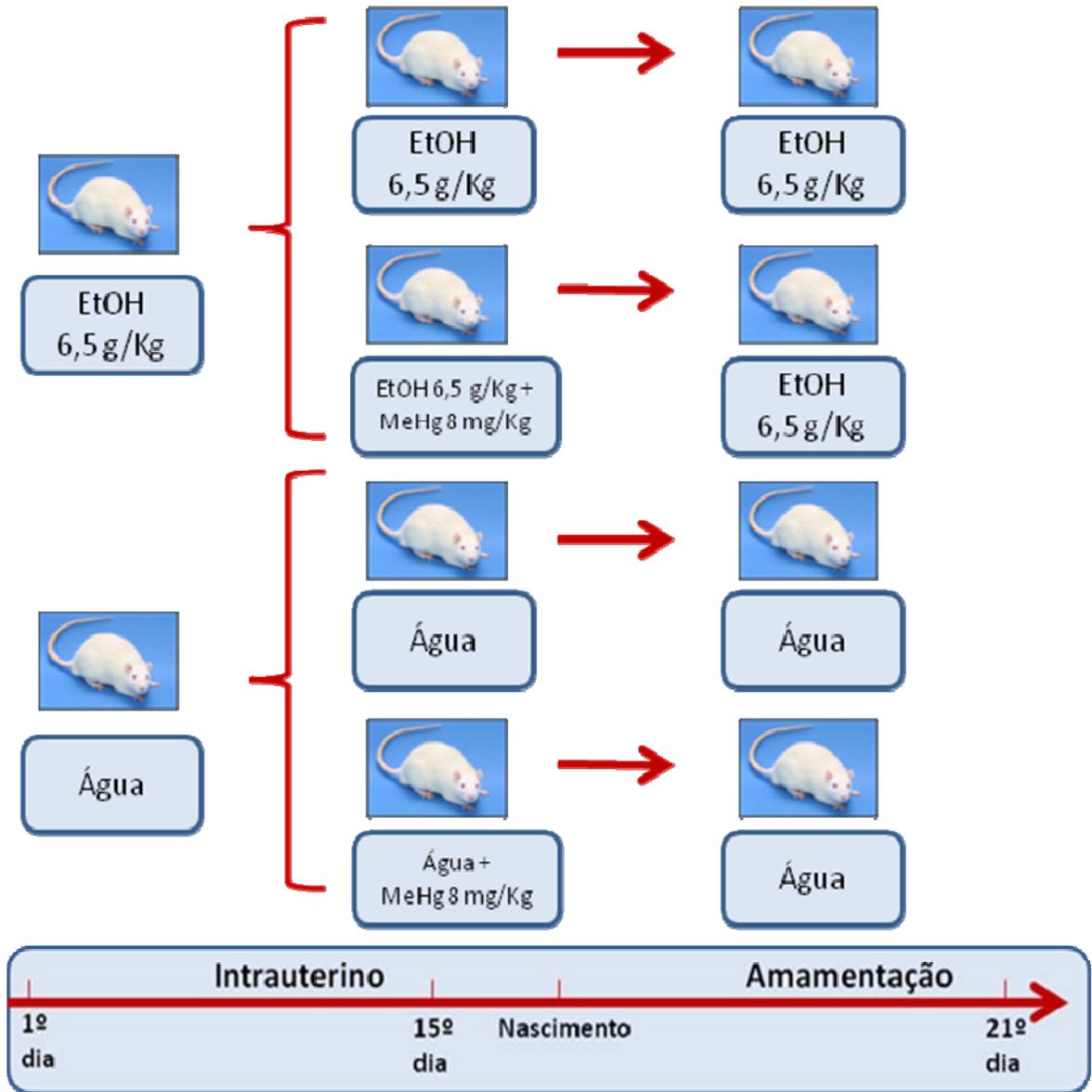


Figura 3 – Esquema de tratamento administrado às grávidas – Após cruzamento, as ratas provavelmente grávidas (n=20) receberam por gavagem: água de torneira ou etanol durante todo o período da gravidez e da amamentação. No 15º dia pré-natal, metade de cada grupo recebeu 8 mg/Kg de metilmercúrio. Os grupos consistiram em: controle (C), etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg).

3. Pesagens das proles

A primeira pesagem das proles foi realizada no primeiro dia pós-natal. Todos os recém-natos foram retirados individualmente de suas caixas e colocados em uma balança previamente forrada com toalhas de papel, para favorecer uma condição de conforto. O pesquisador tinha o cuidado de utilizar luvas, para evitar o contato direto dos animais com as mãos, reduzindo assim, a possibilidade de rejeição das proles por parte das mães. As proles foram mantidas junto às mães até o 21º dia pós-natal quando, então, foram realizados os desmames e as sexagens (separação por sexo), para evitar o cruzamento entre os machos e fêmeas da mesma ninhada. A seguir, as proles foram mantidas em caixas com cerca de 5 animais, sendo todos sempre do mesmo sexo.

O controle dos pesos foi monitorado a cada 5 dias (do nascimento até 21 dias de amamentação) e quando atingiram 1 e 2 meses. Os testes comportamentais foram realizados com as proles adultas (n=48) aos 2 meses de idade. Todos os experimentos foram conduzidos entre 8:00 e 12:00 horas, com o objetivo de evitar as variações circadianas, que poderiam interferir com os resultados experimentais.

4. Avaliação comportamental

❖ Teste da atividade locomotora espontânea

A finalidade de realizar o teste experimental da atividade locomotora consistiu em: 1) favorecer a exploração dos animais no teste do LTE; 2) observar

se a mobilidade deles estava afetada diante dos tratamentos que receberam na vida intrauterina.

O aparato (**figura 4**) para a realização deste experimento consistiu em um campo aberto de madeira (60x60x35 cm), com a base dividida em 9 quadrantes. Antes do início dos experimentos, os animais foram conduzidos ao Laboratório do CIEX por um período mínimo de uma hora, para aclimação e habituação ao ambiente do teste.

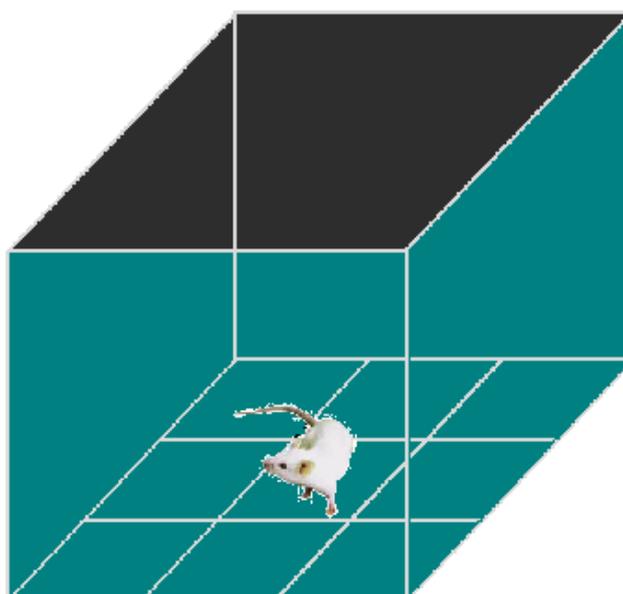


Figura 4 - Teste da atividade locomotora – A arena (campo aberto) dividida em 9 quadrantes para a contagem da locomoção dos animais. Este comportamento era considerado quando o animal colocava as quatro patas em um dos quadrantes.

Após habituação, o teste da atividade locomotora foi iniciado, onde os animais foram colocados no quadrante central do campo aberto e o deslocamento para outro quadrante do equipamento foi contabilizado. Não foi considerada locomoção quando o animal colocava uma, duas ou três patas em um dos quadrantes, com retorno ao quadrante original. O teste foi realizado em 3 etapas, por um período máximo de 5 minutos por sessão. Os animais foram avaliados nos

dias 1 (basal), 2 (24 horas) e 7 (uma semana). O objetivo da utilização desses intervalos de tempo foi verificar se haveria alteração na mobilidade dos mesmos e que, conseqüentemente, poderia interferir no comportamento dos animais a serem avaliados no teste do labirinto, descrito a seguir.

❖ **Teste do Labirinto em T elevado (LTE)**

O LTE é um equipamento em madeira, elevado 50 cm do chão, com um braço fechado (50x10x40 cm) e dois abertos (50x10 cm), circundados por acrílico de 1 cm de altura (**figura 5**). Este aparato foi adaptado do LCE e foi validado como modelo experimental de memória e ansiedade (Graeff e cols., 1993).

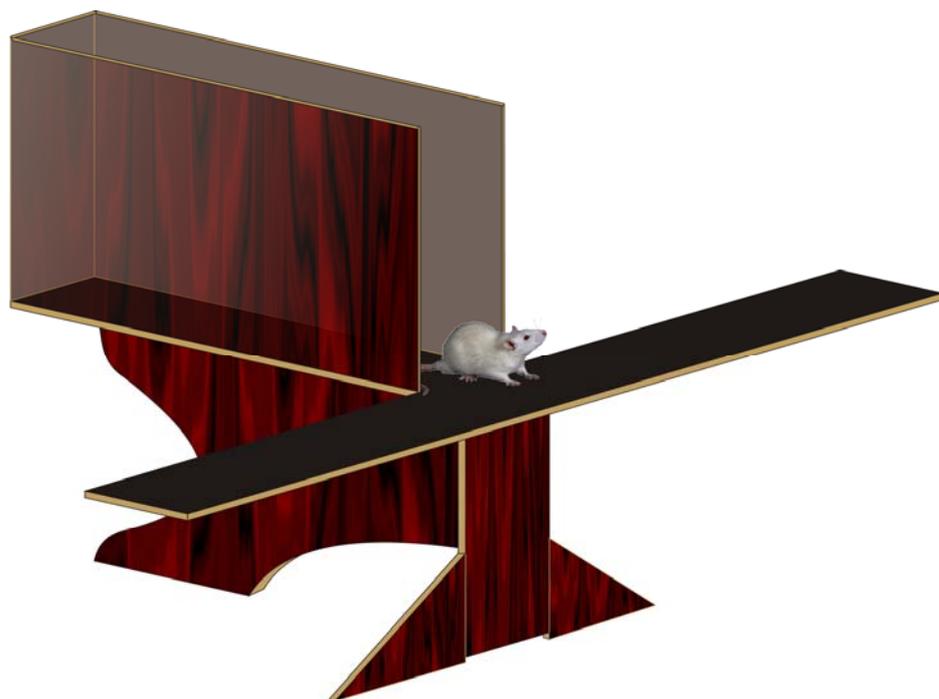


Figura 5 - Teste do labirinto em T elevado – O aparato é constituído por dois braços abertos e um braço fechado, para facilitar a observação do conflito de esquia, aprendizado e esquia de inibição

O LTE, construído com pelo menos 2 ambientes e com diferentes níveis de aversão, frequentemente provoca medo e favorece o comportamento exploratório, levando a um conflito de esquiva (Handley e Mcblane, 1993; Montgomery, 1955). A ausência de paredes e a impossibilidade de girar com as patas traseiras parecem ser a base da aversão de roedores a espaços abertos, sugerindo que esta característica deva ser a base do comportamento de esquiva em relação aos braços abertos do LTE (Graeff, 1999; Treit e *cols.*, 1993).

Considerando os fatores anteriormente citados, pelo menos 3 processos psicológicos sequenciais e básicos podem ser observados: 1) conflito de esquiva; 2) aprendizado; e 3) esquiva de inibição (Sanson e Carobrez, 1999). Todos esses parâmetros contribuem para as pesquisas experimentais de memória. Eles podem contribuir para as avaliações das drogas neurotóxicas, que estão servindo de enfoque neste estudo.

De acordo com o protocolo de Sanson e Carobrez (1999), com adaptação de Takahashi e *cols.* (2005), cada animal era posicionado no campo aberto de madeira por 300 segundos e, em seguida, colocado no braço fechado do LTE. No protocolo experimental de aquisição de memória (treinamento), o rato poderia explorar o braço fechado do LTE por um tempo máximo de 300 segundos. Quando, deixando o braço fechado, o animal posicionava as quatro patas em um dos braços abertos, o teste era finalizado e o animal retornava para o campo aberto de madeira por 30 segundos. Os ratos foram submetidos novamente, no mesmo dia, a tantos testes quanto fossem necessários para alcançar o critério de permanecer 300 segundos no braço fechado (critério de esquiva).

Imediatamente após a aquisição do critério de esquiva, o animal foi colocado em um dos braços abertos do LTE, sendo cronometrado o tempo de entrada no braço fechado. Após esses procedimentos os animais retornavam às suas gaiolas para serem testados no dia seguinte.

Após 24 horas do treinamento, foi realizado o primeiro teste (T1), onde os animais foram posicionados no final do braço fechado e cronometrado o tempo de saída com as quatro patas para um dos braços abertos. Após 30 segundos, foi realizado um reteste (R1), no qual cada animal foi recolocado no braço fechado do LTE, adotando-se o mesmo procedimento anterior. Após 7 dias do treinamento, os animais foram novamente posicionados no final do braço fechado e realizado os mesmos procedimentos do teste e reteste (T7 e R7) realizados após 24 horas do treinamento (Takahashi e cols., 2005).

Uma avaliação adicional realizada foi a tentativa de saída do braço fechado, considerada quando o rato se esticava do braço fechado, colocando 1, 2 ou 3 patas em um dos braços abertos e então retornava para sua posição original. O rato exibe uma estratégia de defesa denominada avaliação de risco (AR), caracterizada pela exploração cautelosa, com dorso estirado e ventre rente ao solo, comportamento este que é afetado por medicamentos ansiolíticos (Graeff, 1999).

Após a observação de cada animal, o LTE era limpo com álcool 10% (v/v). O comportamento de AR foi interpretado como a frequência de tentativas no braço fechado (Sanson e Carobrez, 1999), de acordo com a fórmula a seguir:

$$AR = \frac{\text{frequência de tentativas} \times 100}{\text{tempo de esquiva}}$$

❖ Teste da Esquiva Inibitória do tipo *step-down*

Este teste baseia-se num modelo de aprendizado e memória, que utiliza estímulo aversivo como fator para a obtenção da resposta comportamental (Izquierdo e Medina, 1997). Os animais foram submetidos ao aparato, que consistia de uma caixa de alumínio (50x50x35 cm), com o assoalho constituído por barras de cobre paralelas, distribuídas com uma distância de 1 cm entre si, conectadas a um estimulador elétrico. Sobre as grades do assoalho, no centro do equipamento, foi colocada uma plataforma de madeira cilíndrica (15x5 cm), revestida de material impermeável (*figura 6*).



Figura 6 - Teste da esquiva inibitória – À esquerda, a vista lateral do equipamento e o sensor de controle do tempo e da intensidade do choque; À direita (vista superior), a plataforma de madeira sobre as grades de ferro.

O protocolo utilizado foi adaptado de Costa e Tomaz (1998). Na primeira exposição ao equipamento, os animais foram habituados por um período de 300 segundos. Após 24 horas, eles foram treinados em 2 etapas: a primeira consistiu em colocar o animal sobre a plataforma de madeira e cronometrar o tempo que o animal descia com as quatro patas para o assoalho do aparato. Após 5 minutos, o segundo estágio do treinamento foi realizado, no qual o animal foi recolocado na plataforma do equipamento, porém imediatamente após a descida, foi aplicado um choque elétrico de 1 miliampére (1mA) durante 1 segundo nas patas do rato. Em seguida, o animal foi retirado do aparato.

A retenção do aprendizado da esquiva inibitória foi avaliada no estágio do teste, que ocorreu 24 horas após o treinamento, quando o animal foi reposicionado na plataforma e foi mensurado o seu tempo de descida com as quatro patas para o assoalho do equipamento. O limite de tempo para descida foi de 300 segundos.

A **figura 7** demonstra um esquema dos procedimentos adotados no estudo, delineando o tratamento adotado desde o cruzamento dos ratos machos e fêmeas e os testes experimentais com as proles adultas. A ilustração mostra também a sequência dos testes realizados, que teve início com o campo aberto e foi finalizado com a perfusão dos ratos testados (n=4) nos protocolos comportamentais.

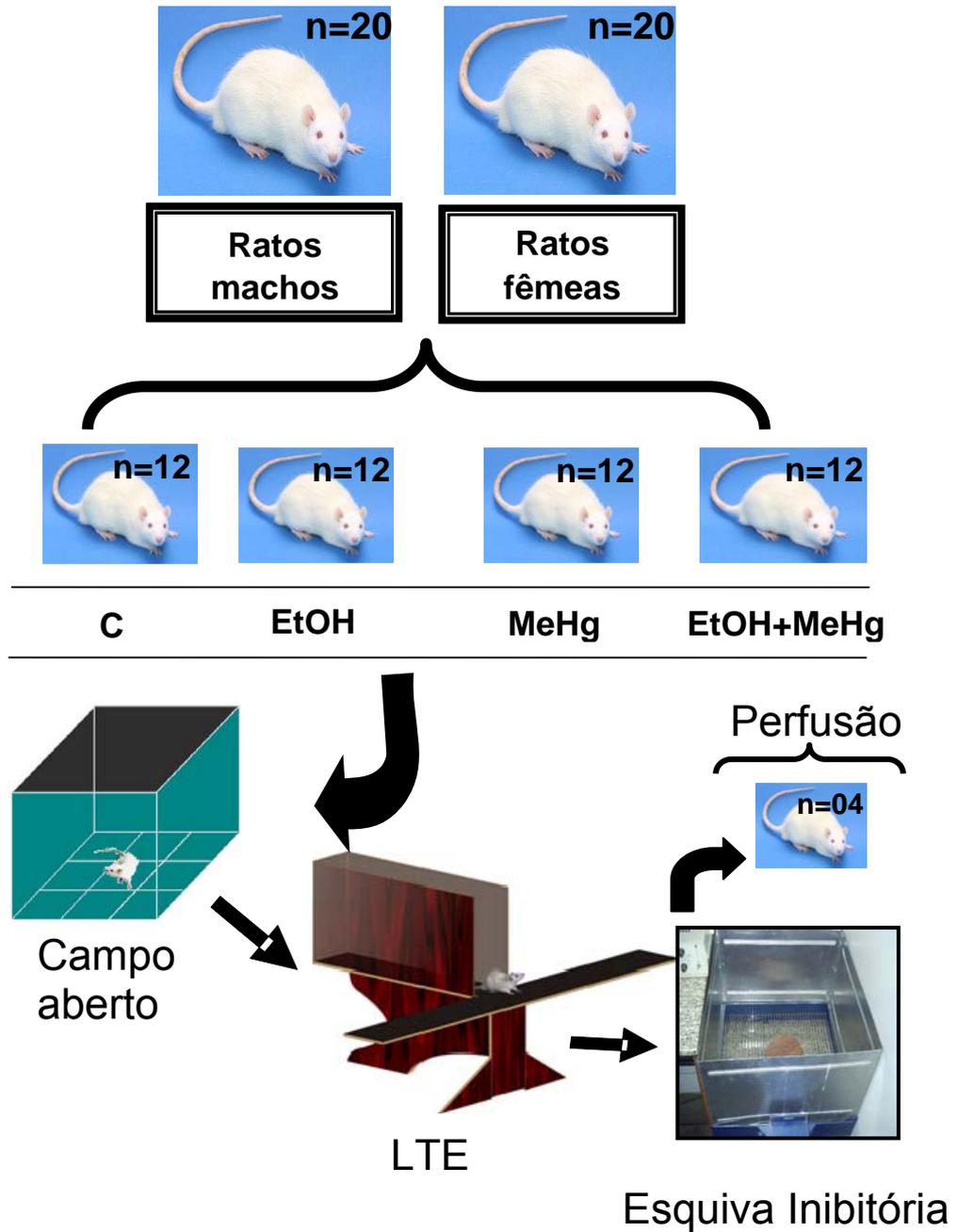
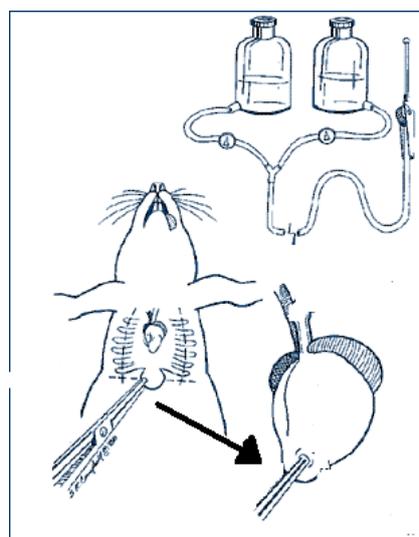


Figura 7 – Esquema de tratamento e avaliação comportamental – Após cruzamento, as ratas provavelmente grávidas (n=20) receberam por gavagem: água de torneira - controle (C), etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Os testes comportamentais foram realizados com as proles adultas (n=12/tratamento) conforme segue: campo aberto, labirinto em T elevado (LTE) e esquiva inibitória. Ao final dos testes comportamentais, 4 animais/grupo foram perfundidos para a retirada dos cérebros e análises morfológicas.

5. Análises morfológicas e densitométricas dos cérebros

❖ Perfusão

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de quetamina (100 mg/Kg; Cristália) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg; Cristália), sendo, em seguida, transfundidos transcardiacamente com solução salina heparinizada (1000 UI/L- Cristália) durante 10 minutos, seguidos de fixação aldeídica (paraformaldeído 4%, pH 7,2-7,4 e em solução tampão fosfato 0,1M, durante 30 minutos; Sigma referência BCR5534), conforme **figura 8**.



Perfusion Setup Diagram

Figura 8 – Procedimento de perfusão. Após a anestesia, cada animal foi perfundido transcardiacamente com salina heparinizada, seguido de fixação aldeídica, para posterior craniotomia. A seta indica o posicionamento que a agulha foi inserida no coração. Fonte: <http://www.neuroscienceassociates.com/images/Graphics/perfusion.gif>

A craniotomia foi realizada após a perfusão, quando os cérebros foram retirados e pesados. Os hemisférios cerebrais, posteriormente, também foram separados, pesados e seccionados com vibrátomo no plano parassagital, com 150 micrômetros de espessura. Os cortes obtidos foram armazenados em

solução tampão fosfato 0,1M e PH 7,4 e incubados imediatamente nas reações histoquímicas.

As secções obtidas pelo vibrátomo foram sujeitas ao método málico indireto modificado (Scherer-Singler e cols., 1983), no qual as secções foram coletadas em solução fosfato 0,1M e PH 7,4 e incubadas a 37°C na mistura da reação histoquímica, que consistiu em: 0,6% de ácido málico em tampão tris(hidroximetil)aminometano (TRIS; Sigma 252859) 0,1M, com o PH final em 8,0, ao qual foi adicionado (1,6-Diidronicotinamida-Adenina Dinucleotideo) B-NADP (0,1% p/v; Sigma N5755); cloreto de manganês (0,04% p/v); e *nitroblue tetrazolium* (0,03% p/v; Sigma N6639), previamente diluído em dimetilsulfóxido-DMSO (0,3% p/v; Sigma D8418). O triton X-100 (0,1% v/v; Sigma T9284) foi adicionado à mistura e as secções foram incubadas nesta solução, acima descrita, a 37°C em contínua agitação, por um tempo médio de 6 horas.

A inspeção microscópica foi utilizada para inferir quando o produto da reação estava visível e assim as camadas hipocampais e as células e fibras do estriado estavam bem definidas. A reação foi finalizada lavando-se as secções por 3 vezes (10 minutos cada) em solução tampão fosfato 0,1M, PH 7,4. As secções foram montadas e embebidas em glicerol, colocadas entre lâmina e lamínula e, posteriormente, seladas com esmalte de unha.

A reação histoquímica de nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-diaforase (NADPH-d) fundamenta-se na fixação aldeídica para promover a inibição de outros tipos de óxido-redutases dependentes de NADPH-d. A utilização de paraformaldeído a 4% inibe a atividade de outras enzimas diaforases, assim como aumenta a deposição de formazan. A técnica

histoquímica para NADPH-d permite a mensuração da atividade nitrérgica, porém sem a especificidade da NOS detectada, ou seja, a marcação enzimática ocorre para todos os tipos de NOS presentes no tecido a ser analisado (Buwalda e cols., 1995).

❖ **Atividade histoquímica relativa**

Foram selecionadas para as análises densitométricas 8 a 10 secções contendo o Corno de Amon 1 (CA1), o giro denteado do hipocampo dorsal, o estriado e o cerebelo de cada grupo experimental. Com o objetivo de mensurar a densidade do produto da reação, através da transmissão da luz nas diferentes camadas dos tecidos estudados, utilizou-se um fotômetro (Tektronix, modelo J17), com probe de luminância J1803, acoplado a um microscópio. As análises das 8 a 10 secções foram executadas obtendo-se a média dos valores de transmitância para cada animal, em um total de 4 animais por grupo experimental.

A reação de NADPH-d estava sujeita às variabilidades entre as reações e diminuição da atividade, conforme o tempo decorrido. Além disso, em função das análises comparativas dos tecidos não terem sido reagidas ao mesmo momento, e por este motivo poder ter havido algumas diferenças nas condições experimentais, foi adotada uma escala relativa normalizada, baseada na escolha de uma região de menção controlada interna em cada secção, que não era afetada significativamente pela reação. Assim, foi permitida a realização de comparações entre secções reagidas em diferentes momentos do experimento.

A luz transmitida através da camada granular do giro denteado foi escolhida como controle interno e foi designada de transmitância máxima (Tmax).

A transmitância da camada em estudo do hipocampo foi designada de transmitância mínima (Tmin). O índice de contraste (C) foi calculado de acordo com a equação: $C=(T_{max}-T_{min})/(T_{max}+T_{min})$ (Borba e cols., 2000).

6. Análise estatística

Todos os dados dos testes comportamentais e morfológicos foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via. Para as comparações múltiplas *post hoc* utilizou-se o teste de Tukey. Os dados de cada grupo experimental foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 12 animais (6 machos e 6 fêmeas) para os protocolos comportamentais e 4 animais (2 machos e 2 fêmeas) para as análises morfológicas. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de $p<0,05$. Como a ANOVA não detectou diferença estatística entre os resultados obtidos para os ratos machos e fêmeas, os dados foram agrupados.

IV. RESULTADOS

1. Pesagens das proles

A primeira pesagem ocorreu no dia do nascimento (D1) e a cada 5 dias do período de amamentação (D5, D10, D15, D20), e continuando com a verificação dos pesos após o período pós-desmame (D30 e D60). Observa-se no **gráfico 1** que os animais dos grupos tratados com EtOH, MeHg ou EtOH+MeHg não acompanharam a faixa de ganho de peso corpóreo, quando comparados ao grupo controle, em quase a totalidade dos períodos avaliados. No nascimento, o grupo EtOH+MeHg apresentou peso menor que o grupo controle ($F_{(3,47)} = 8,959$; $p < 0,001$) e que os grupos EtOH ($F_{(3,47)} = 6,550$; $p < 0,001$) e MeHg ($F_{(3,47)} = 6,626$; $p < 0,001$).

Após 5, 10 e 15 dias do nascimento, estas diferenças se mantiveram, onde os grupos EtOH [5 dias ($F_{(3,47)} = 11,86$; $p < 0,001$); 10 dias ($F_{(3,47)} = 9,523$; $p < 0,001$) e 15 dias ($F_{(3,47)} = 8,096$; $p < 0,001$)] e EtOH+MeHg [5 dias ($F_{(3,47)} = 11,19$; $p < 0,001$); 10 dias ($F_{(3,47)} = 10,83$; $p < 0,001$) e 15 dias ($F_{(3,47)} = 8,104$; $p < 0,001$)] apresentaram ganho de peso inferiores ao grupo controle, sendo que o grupo EtOH+MeHg apresentou pesos corpóreos reduzidos quando comparados também ao MeHg [5 dias ($F_{(3,47)} = 9,196$; $p < 0,001$); 10 dias ($F_{(3,47)} = 9,614$; $p < 0,001$) e 15 dias ($F_{(3,47)} = 8,527$; $p < 0,001$).

A partir dos 20 dias pós-natal, todos os grupos apresentaram redução nos ganhos de peso quando comparados ao grupo controle [EtOH 20 dias ($F_{(3,47)} = 9,056$; $p < 0,001$); EtOH 30 dias ($F_{(3,47)} = 55,29$; $p < 0,001$); EtOH 60 dias ($F_{(3,47)} = 39,67$; $p < 0,001$); MeHg 20 dias ($F_{(3,47)} = 5,462$; $p < 0,001$); MeHg 30 dias ($F_{(3,47)} = 31,63$; $p < 0,001$); MeHg 60 dias ($F_{(3,47)} = 22,97$; $p < 0,001$); EtOH+MeHg 20 dias ($F_{(3,47)} = 11,36$; $p < 0,001$); EtOH+MeHg 30 dias ($F_{(3,47)} = 74,07$; $p < 0,001$);

EtOH+MeHg 60 dias ($F_{(3,47)} = 54,01$; $p < 0,001$)]. Nestes períodos, o grupo EtOH+MeHg também apresentou diminuições significativas em seus ganhos de peso corpóreo em relação aos grupos tratados com os neurotóxicos de forma isolada [MeHg 20 dias ($F_{(3,47)} = 5,893$; $p < 0,001$); EtOH 30 dias ($F_{(3,47)} = 18,78$; $p < 0,001$); MeHg 30 dias ($F_{(3,47)} = 42,44$; $p < 0,001$); EtOH 60 dias ($F_{(3,47)} = 14,34$; $p < 0,001$); MeHg 60 dias ($F_{(3,47)} = 31,04$; $p < 0,001$)].

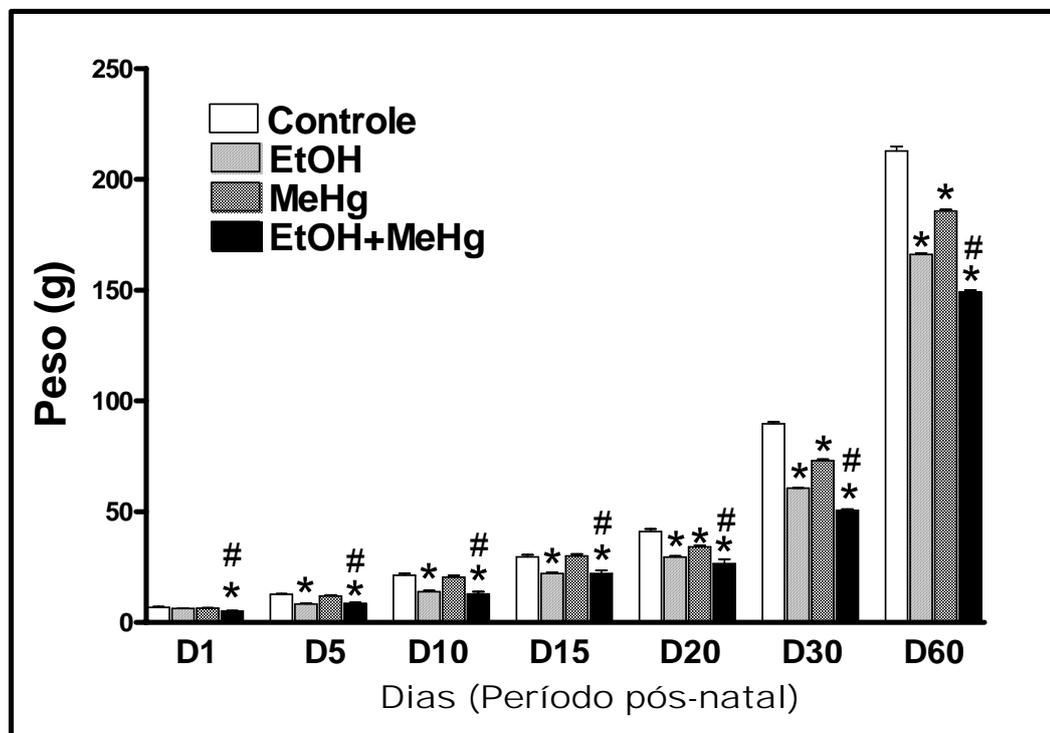


Gráfico 1 – Pesos das proles dos grupos controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg) no 1º (D1), 5º (D5), 10º (D10), 15º (D15), 20º (D20), 30º (D30) e 60º (D60) dias pós-natal. Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 12 animais. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle, tratado com água de torneira. # $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo EtOH e/ou MeHg (ANOVA, Teste de Tukey).

2. Avaliação comportamental

❖ Atividade Locomotora

No teste do campo aberto, a ANOVA mostrou que a exposição com MeHg durante a vida intrauterina, aumentou a atividade locomotora basal das proles ($F_{(3,47)} = 4,410$; $p < 0,05$), em comparação aos animais controles, (**gráfico 2A**).

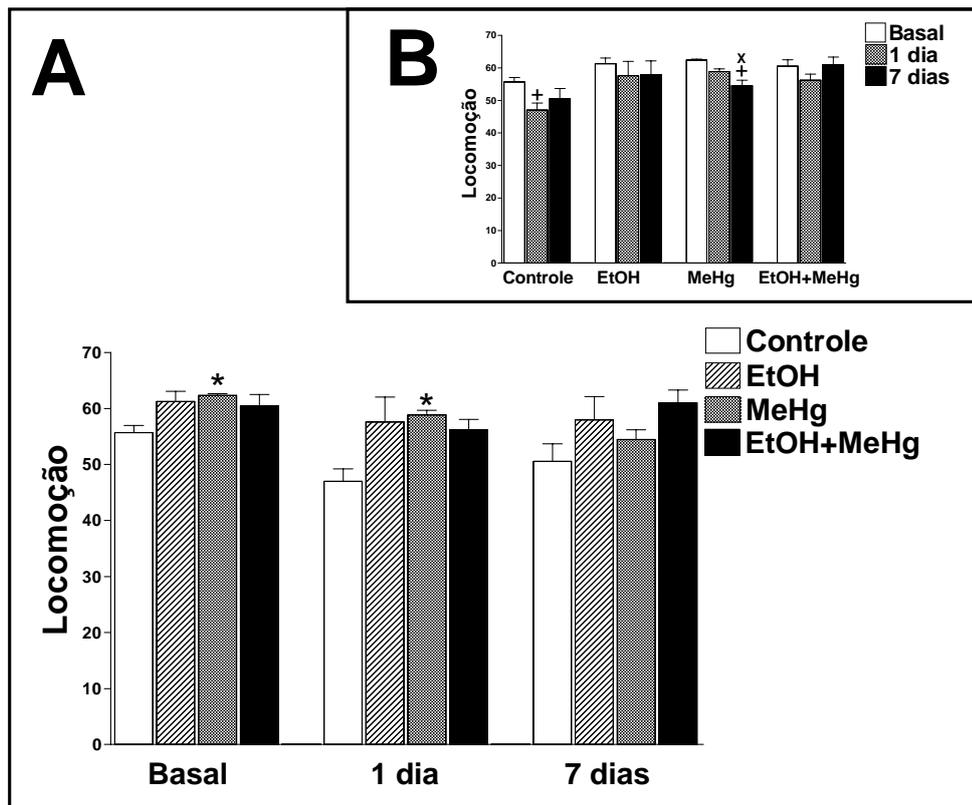


Gráfico 2 – Efeitos do EtOH e/ou MeHg em ratos (proles adultas) avaliados no campo aberto. **A)** Atividade locomotora das proles realizada em 3 estágios: Basal, 1 dia e 7 dias onde as comparações foram feitas entre os grupos em cada fase do teste. **B)** Atividade locomotora das proles realizada em 3 estágios: Basal, 1 dia e 7 dias onde as comparações foram feitas no mesmo grupo de tratamento. Os grupos considerados foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra apresenta a média \pm e.p.m. de 12 animais. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle, tratado com água de torneira. + $p < 0,05$ comparado à linha de base de cada fase. $\times p < 0,05$ comparado à segunda exposição ao campo aberto (ANOVA, Teste de Tukey).

A segunda exposição a este teste ocorreu com 24 horas após a primeira exposição (**gráfico 2A**), e os resultados foram similares à bateria de testes do dia

anterior. O grupo MeHg novamente apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ($F_{(3,47)}= 4,416$; $p<0,05$). Foi observado, nesta etapa do teste, que os animais tratados com os neurotóxicos não apresentaram diferenças significativas na locomoção quando comparados aos seus tempos basais, onde apenas o grupo controle ($F_{(2,35)}= 3,732$; $p<0,05$) apresentou diminuição nos números de quadrantes cruzados (**gráfico 2B**).

Após 7 dias, ocorreu a terceira exposição ao campo aberto (**gráfico 2A**), onde não foram observadas alterações significativas entre os grupos tratados com os neurotóxicos e o grupo controle. O **gráfico 2B** demonstra que o grupo MeHg apresentou diferença significativa nesta fase do teste em relação à sua atividade locomotora basal ($F_{(2,35)}= 6,948$; $p<0,001$) e de 24 horas ($F_{(2,35)}= 3,844$; $p < 0,05$).

❖ LTE

No teste do LTE, os parâmetros avaliados foram o número de re-exposições para a aquisição do estado de esquiva inibitória, o tempo de esquiva ao braço aberto nas 3 primeiras exposições, e o tempo de fuga dos braços abertos. O tempo de esquiva a um dos braços abertos, após 24 horas e 7 dias da primeira exposição ao labirinto, também foi analisado e ocorreu através de 2 estágios (teste e reteste), com um intervalo de 30 segundos entre eles. Outro parâmetro observado foi a AR nas três primeiras exposições do dia de treinamento, nos testes e retestes de 24 horas e 7 dias.

No **gráfico 3** observa-se que o grupo EtOH+MeHg foi significativamente mais re-exposto ao LTE que o grupo controle ($F_{(3,47)}= 5,530$; $p<0,05$), sendo necessárias, aproximadamente, 4 exposições para que os animais deste grupo

adquirissem o estado de esquia, permanecendo 300 segundos no braço fechado do labirinto. Quando comparados ao grupo controle, os grupos EtOH e MeHg não apresentaram diferenças significativas em relação ao número de re-exposições ao braço fechado do LTE, em que a média foi de 3 exposições para a aquisição do critério de esquia.

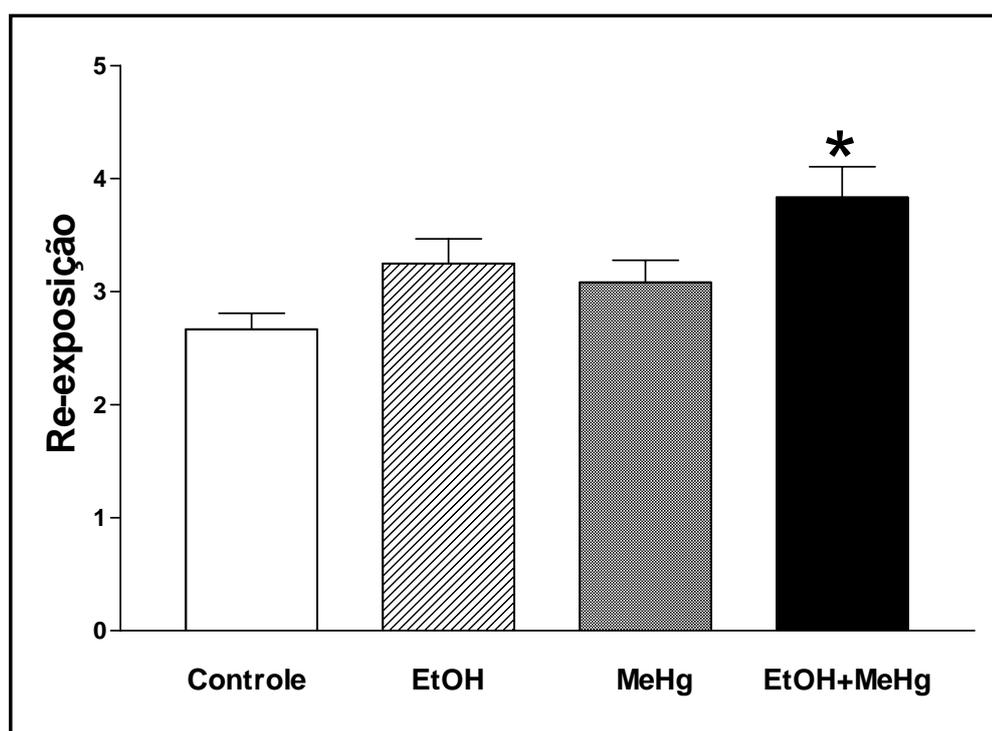


Gráfico 3 – Número de re-exposições necessárias para adquirir o estado de esquia. Grupos expostos foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 12 animais. * $p < 0,05$ representa diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste de Tukey).

No **gráfico 4A**, observa-se que na primeira exposição ao LTE para avaliação do nível basal do tempo de esquia, os grupos MeHg e EtOH+MeHg apresentaram diferenças significativas em relação ao controle [MeHg ($F_{(3,47)} = 3,975$; $p < 0,05$); EtOH+MeHg ($F_{(3,47)} = 7,310$; $p < 0,001$)]. O grupo EtOH+MeHg também apresentou redução no tempo de permanência no braço fechado quando comparado ao grupo EtOH ($F_{(3,47)} = 4,093$; $p < 0,05$).

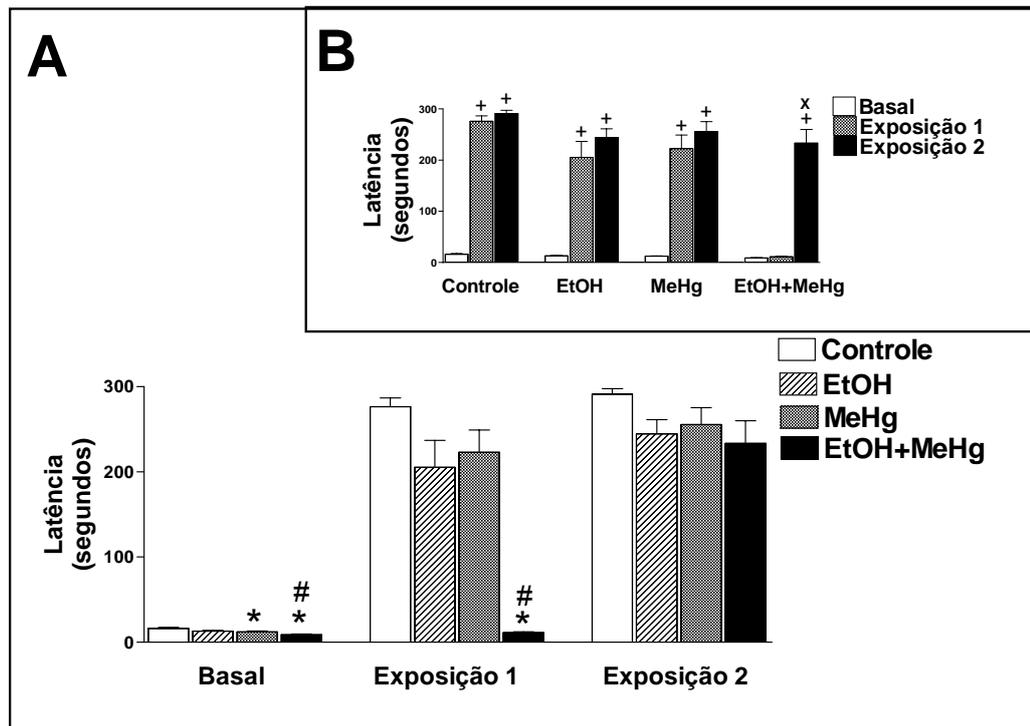


Gráfico 4 – Efeitos do EtOH e/ou MeHg em ratos (proles adultas) na aquisição de esquia no LTE. O teste consistiu na avaliação das 3 primeiras exposições, com intervalos de 30 segundos e mediu a latência no braço fechado. **A)** Aquisição de esquia nas proles, comparando os grupos tratados com os neurotóxicos entre si. **B)** Aquisição de esquia nas proles, comparando os três estágios do teste em cada grupo de tratamento. Os grupos considerados foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra representa a média±e.p.m. de 12 animais. *p<0,05 representa diferença significativa em relação ao grupo controle, tratado com água de torneira. #p<0,05 representa diferença significativa em relação aos grupos: EtOH no estágio basal ou MeHg na exposição 1. +p<0,05 representa diferença significativa em relação ao estágio basal do teste para o mesmo tratamento. *p<0,05 representa diferença significativa em relação à exposição 1 do teste para o mesmo tratamento (ANOVA, Teste de Tukey).

Após 30 segundos do teste para avaliação do nível basal, os animais foram novamente submetidos ao braço fechado do LTE para avaliação do tempo da primeira exposição (exposição 1). Observou-se que o grupo da associação apresentou diminuição significativa do tempo de esquia, tanto em relação ao grupo controle ($F_{(3,47)} = 12,51$; $p < 0,001$), quanto em relação aos grupos EtOH ($F_{(3,47)} = 9,163$; $p < 0,001$) e MeHg ($F_{(3,47)} = 9,978$; $p < 0,001$).

Na terceira re-exposição (exposição 2), após 30 segundos da obtenção do tempo de esquiva 1, todos os grupos elevaram a latência no braço fechado, onde as diferenças dos grupos tratados com os neurotóxicos em relação ao controle não se restabeleceram, não havendo diferença significativa entre os grupos.

O **gráfico 4B** apresenta uma análise comparativa entre os três períodos de teste de acordo com cada grupo tratado. Todos os grupos apresentaram aumento significativo dos tempos de latência nas etapas de exposição 1 e 2 em relação ao seus tempos de esquiva basal, com exceção do grupo EtOH+MeHg que apresentou o aumento do tempo de esquiva apenas na exposição 2 [basal ($F_{(2,35)} = 14,63$; $p < 0,001$); exposição 1 ($F_{(2,35)} = 14,47$; $p < 0,001$)], demonstrando que o grupo da associação com os dois neurotóxicos necessitou de mais exposições para elevar seu tempo de latência no braço fechado.

O **gráfico 5** demonstra o tempo de escape dos animais a partir do braço aberto do LTE. Observou-se que todos os grupos tratados com os neurotóxicos apresentaram menor tempo na exploração dos braços abertos do que o grupo controle [EtOH ($F_{(3,47)} = 11,67$; $p < 0,05$); MeHg ($F_{(3,47)} = 11,52$; $p < 0,05$); EtOH+MeHg ($F_{(3,47)} = 12,68$; $p < 0,05$)].

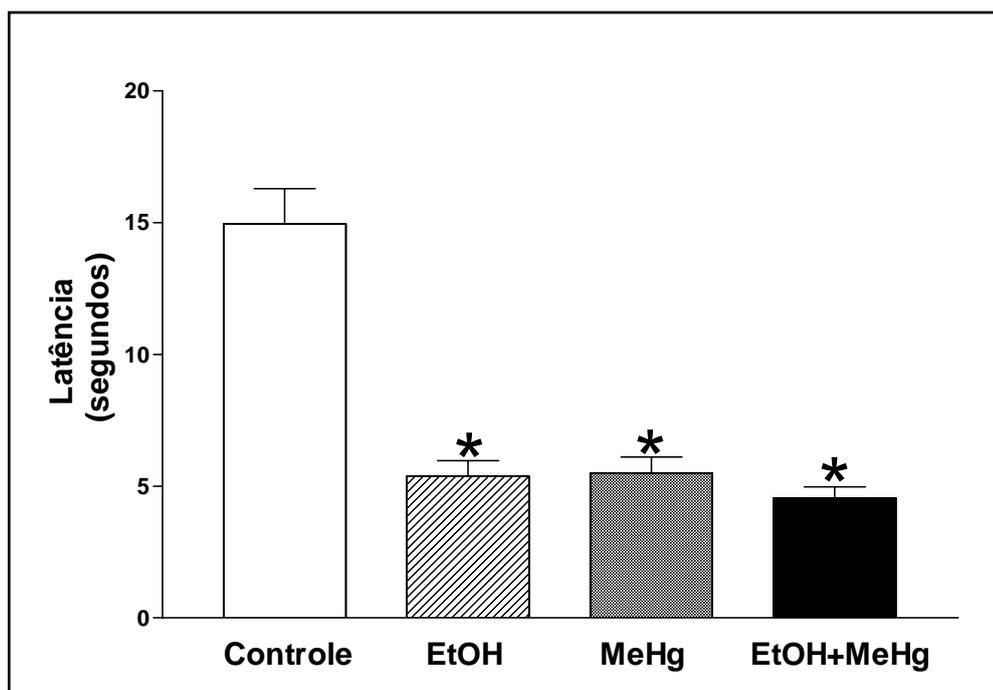


Gráfico 5 – Tempo de escape do braço aberto. Os grupos expostos foram controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 12 animais.* $p < 0,05$ representa diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA, Teste de Tukey).

O **gráfico 6** representa o teste e o reteste realizados 24 horas e 7 dias após o treino. No teste realizado 1 dia após o treino (T1), todos os grupos tratados com os neurotóxicos apresentaram latências no braço fechado significativamente menores que o grupo controle [EtOH ($F_{(3,47)} = 6,307$; $p < 0,001$); MeHg ($F_{(3,47)} = 6,940$; $p < 0,001$); EtOH+MeHg ($F_{(3,47)} = 7,234$; $p < 0,001$)]. Após 30 segundos, os animais foram re-submetidos ao reteste (R1) com os mesmos procedimentos realizados para o teste. Os grupos MeHg e EtOH+MeHg novamente apresentaram tempo de permanência diminuído no braço fechado em relação ao grupo controle [MeHg ($F_{(3,47)} = 5,517$; $p < 0,01$); EtOH+MeHg ($F_{(3,47)} = 6,853$; $p < 0,001$)], porém, o grupo da associação apresentou também diminuição do tempo de permanência no braço fechado em relação ao grupo EtOH ($F_{(3,47)} = 4,258$; $p < 0,05$).

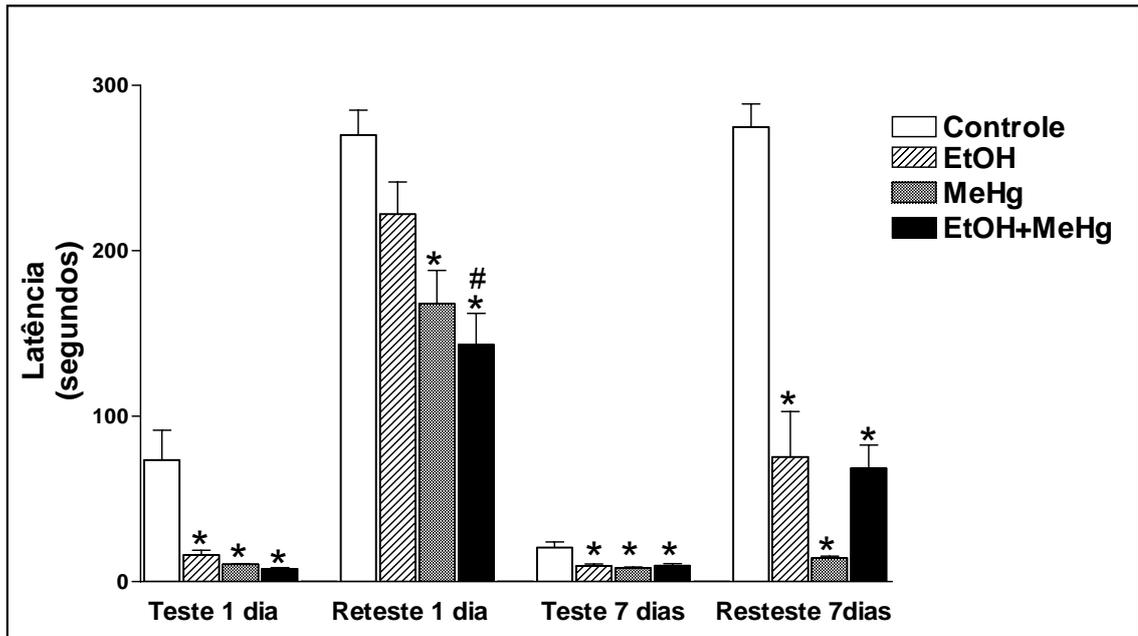


Gráfico 6 – Efeitos do EtOH e/ou MeHg em ratos (proles adultas) no teste e reteste realizados no LTE, 1 e 7 dias após o treino, com intervalos de 30 segundos. O teste consistiu na avaliação da latência de permanência no braço fechado do LTE. Os grupos expostos foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra representa a média \pm epm de 12 animais. * $p < 0,05$ representa diferença significativa em relação ao grupo controle, tratado com água de torneira. # $p < 0,05$ representa diferença significativa comparada ao grupo EtOH (ANOVA, Teste de Tukey).

Após 7 dias, os animais foram, mais uma vez, submetidos aos testes e retestes, realizados anteriormente. Na fase do teste (T7), todos os grupos tratados com os neurotóxicos apresentaram alterações significativas no tempo de permanência no braço fechado em comparação ao controle [EtOH ($F_{(3,47)} = 5,654$; $p < 0,01$); MeHg ($F_{(3,47)} = 6,329$; $p < 0,001$); EtOH+MeHg ($F_{(3,47)} = 5,516$; $p < 0,01$)].

Na fase de reteste (R7), todos os grupos analisados repetiram os resultados da fase de teste, apresentando diminuição significativa no tempo de permanência no braço fechado em relação ao grupo controle [EtOH ($F_{(3,47)} = 11,79$; $p < 0,001$); MeHg ($F_{(3,47)} = 15,41$; $p < 0,001$); EtOH+MeHg ($F_{(3,47)} = 12,20$; $p < 0,001$)].

O **gráfico 7** apresenta a AR nos estágios de exposição ao LTE: basal, exposição 1, exposição 2, T1, R1, T7 e R7. Os resultados demonstraram que o comportamento de AR basal estava diminuído em todos os grupos tratados com

os neurotóxicos em relação ao grupo controle [EtOH ($F_{(3,47)} = 6,452$; $p < 0,001$); MeHg ($F_{(3,47)} = 6,452$; $p < 0,001$); EtOH+MeHg ($F_{(3,47)} = 6,452$; $p < 0,001$)].

Na etapa seguinte (exposição 1), a maioria dos grupos obtiveram aumento no percentual da AR porém, novamente, todos os grupos tratados com os neurotóxicos não atingiram o nível no percentual de AR do grupo controle [EtOH ($F_{(3,47)} = 4,120$; $p < 0,05$); MeHg ($F_{(3,47)} = 5,988$; $p < 0,001$); EtOH+MeHg ($F_{(3,47)} = 10,82$; $p < 0,001$)]. Na exposição 1 também se observou que o grupo EtOH+MeHg obteve percentuais significativamente menores que os grupos EtOH ($F_{(3,47)} = 6,69$; $p < 0,05$) e MeHg ($F_{(3,47)} = 4,829$; $p < 0,01$).

Na exposição 2, o grupo EtOH atingiu percentual próximo do grupo controle, sem que o teste da ANOVA detectasse diferença significativa entre eles. Os grupos MeHg ($F_{(3,47)} = 4,459$; $p < 0,05$) e EtOH+MeHg ($F_{(3,47)} = 8,518$; $p < 0,001$) permaneceram com diminuições significativas nos percentuais de AR em relação ao grupo controle. Nesta etapa do teste, o grupo MeHg+EtOH foi significativamente menos reativo à AR do que os grupos EtOH ($F_{(3,47)} = 6,974$; $p < 0,001$) e MeHg ($F_{(3,47)} = 4,059$; $p < 0,05$) (**gráfico 7**).

Após 24 horas da determinação dos níveis basais e das exposições 1 e 2, foi avaliado o comportamento de AR nos procedimentos de teste e reteste. No T1, observou-se que todos os grupos avaliados apresentaram diminuição no percentual desse comportamento, no qual o controle apresentou resultados comparados aos seus níveis basais. Os grupos de tratamento MeHg ($F_{(3,47)} = 5,812$; $p < 0,001$) e EtOH+MeHg ($F_{(3,47)} = 5,812$; $p < 0,001$) apresentaram diminuições significativas nos percentuais de AR em relação ao grupo controle. Na fase de R1 todos os grupos tratados com os neurotóxicos apresentaram níveis

inferiores no percentual de AR em relação ao grupo controle [EtOH ($F_{(3,47)} = 6,404$; $p < 0,001$); MeHg ($F_{(3,47)} = 7,400$; $p < 0,001$); EtOH+MeHg ($F_{(3,47)} = 8,397$; $p < 0,001$)] (**gráfico 7**).

Após 7 dias, foram analisados a AR nos testes e retestes (**gráfico 7**). No T7, os grupos tratados com os neurotóxicos obtiveram valores de AR significativamente inferiores ao grupo controle [EtOH ($F_{(3,47)} = 4,163$; $p < 0,05$); MeHg ($F_{(3,47)} = 3,992$; $p < 0,05$)], enquanto na fase de R7, eles apresentaram resultados diminuídos de AR em comparação ao grupo controle [EtOH ($F_{(3,47)} = 6,524$; $p < 0,001$); MeHg ($F_{(3,47)} = 6,407$; $p < 0,001$); EtOH+MeHg ($F_{(3,47)} = 6,582$; $p < 0,001$)].

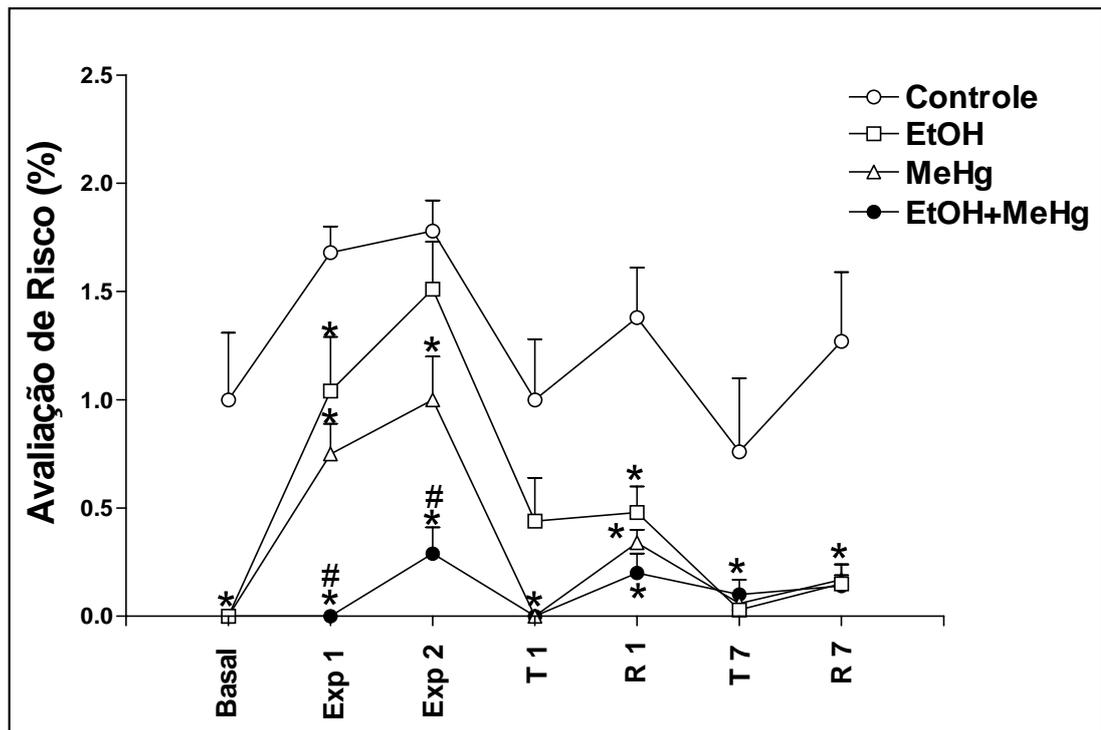


Gráfico 7 – Efeitos do EtOH e/ou MeHg em ratos (proles adultas) na avaliação de risco (AR). O teste consistiu na avaliação das tentativas dos animais para explorarem os braços abertos do LTE, nos estágios basal, exposição 1 (Exp 1), exposição 2 (Exp 2), teste de 24 horas (T1), reteste de 24 horas (R1), teste de 7 dias (T7) e reteste de 7 dias (R7). Os grupos expostos foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra representa a média \pm epm de 12 animais. * $p < 0,05$ representa diferença significativa em relação ao grupo controle, tratado com água de torneira. # $p < 0,05$ representa diferença significativa comparada ao grupo EtOH e/ou MeHg (ANOVA, Teste de Tukey).

❖ Esquiva Inibitória do tipo *step-down*

O **gráfico 8** demonstra os resultados do protocolo de esquiva inibitória, no qual há a utilização de estímulo aversivo (choque). Foi observada que a retenção do aprendizado da esquiva inibitória estava um pouco prejudicada nos grupos EtOH e MeHg, visto que o tempo de permanência na plataforma de madeira do aparato ficou abaixo dos 20 segundos, porém não houve diferença significativa em relação ao controle, que apresentou tempo de permanência na plataforma em torno de 25 segundos. Entretanto, quando da associação dos dois neurotóxicos, o grupo EtOH+MeHg apresentou diminuição significativa no tempo de permanência na plataforma do equipamento, tanto em relação ao grupo controle [$F_{(3, 47)} = 6,117$; $p < 0,001$], quanto em relação aos grupos tratados com os neurotóxicos de forma isolada [EtOH $F_{(3,47)} = 3,759$; $p < 0,05$; MeHg $F_{(3,47)} = 3,522$; $p < 0,05$].

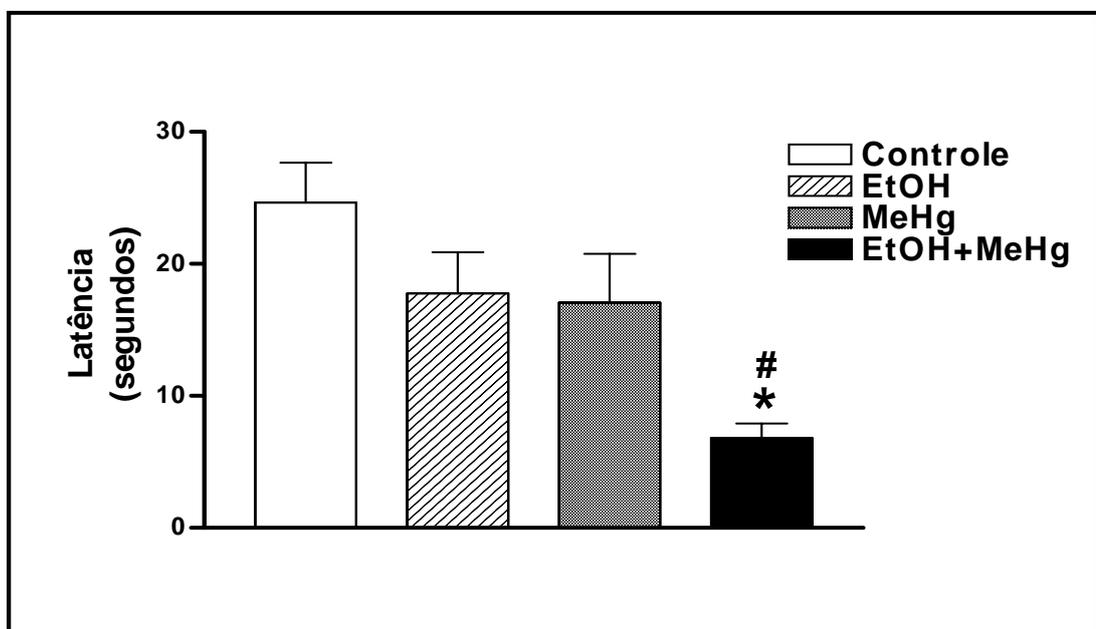


Gráfico 8 – Efeitos do EtOH e/ou MeHg em ratos (proles adultas) na esquiva inibitória do tipo *step-down*. O teste consistiu na avaliação da retenção do aprendizado da esquiva inibitória, após estímulo aversivo. Os grupos expostos foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 12 animais. * $p < 0,05$ representa a diferença significativa dos grupos tratados com os neurotóxicos em relação ao controle. # $p < 0,05$ representa diferença significativa comparada ao grupo EtOH e/ou MeHg (ANOVA, teste de Tukey).

3. Peso dos encéfalos

Em relação aos pesos dos encéfalos frescos dos animais, o grupo EtOH ($F_{(3,15)} = 6,418$; $p < 0,01$) apresentou redução dos mesmos quando comparados aos dos animais pertencentes ao grupo controle (ver **gráfico 9**).

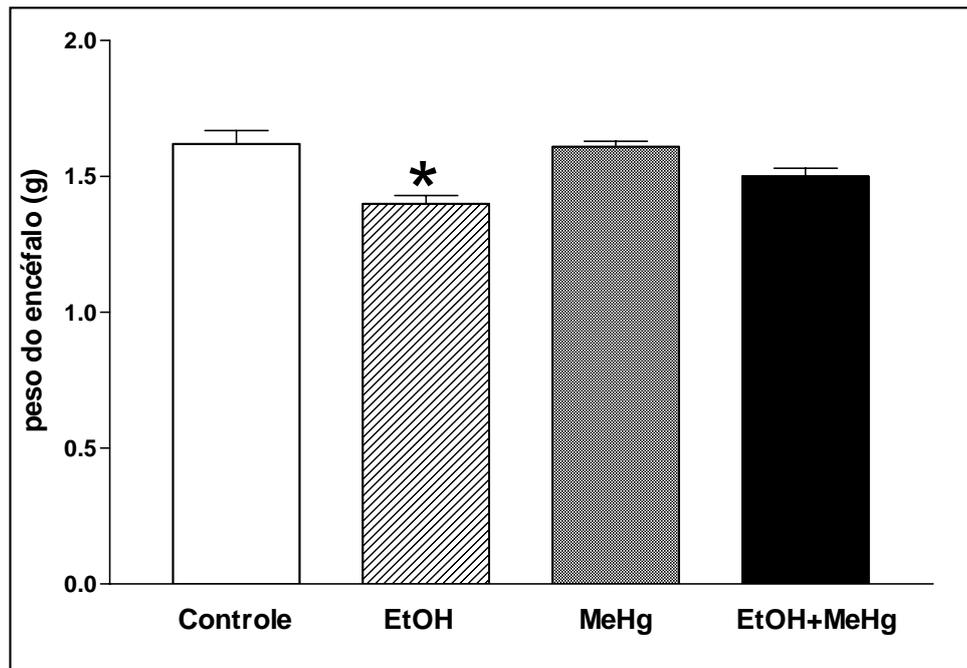


Gráfico 9 – Peso (em gramas) dos encéfalos frescos. Os grupos expostos foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra apresenta a média \pm e.p.m. de 4 animais. * $p < 0,05$ representa a diferença significativa em relação ao controle (ANOVA, teste de Tukey).

4. Análises morfológicas

Diante das condições analisadas, foi possível observar que algumas estruturas centrais, aqui avaliadas, foram mais suscetíveis às interferências nitrégicas diante da ação de neurotóxicos do que outras, como foi o caso do cerebelo que se mostrou menos afetado pelas ações do NO do que o estriado e o hipocampo.

A administração de EtOH aumentou a atividade nitrérgica em todas as quatro regiões do estriado do rato (pósterodorsal (PD) [$F_{(3,15)}= 9,295$; $p<0,001$]; anterodorsal (AD) [$F_{(3,15)}= 5,416$; $p<0,05$]; anteroventral (AV) [$F_{(3,15)}= 6,600$; $p<0,01$]; pósteroventral (PV) [$F_{(3,15)}= 15,28$; $p<0,001$]), enquanto o grupo MeHg diminuiu a atividade nitrérgica na região AV [$F_{(3,15)}= 4,243$; $p<0,05$].

A região posterior do estriado foi afetada no grupo EtOH+MeHg, mostrando aumento nos valores de contraste na região PV [$F_{(3,15)}= 8,292$; $p<0,001$] quando comparados aos valores do grupo controle (**gráfico 10** e **tabela 1**). Observa-se novamente no **gráfico 10** que o grupo da associação com os dois neurotóxicos apresentou diminuição acentuada nos valores de contraste em relação ao grupo EtOH nas regiões PD [$F_{(3,15)}= 6,713$; $p<0,01$], AV [$F_{(3,15)}= 7,542$; $p<0,001$] e PV [$F_{(3,15)}= 6,983$; $p<0,01$]. Quando comparado ao grupo MeHg, o grupo EtOH+MeHg apresentou aumento significativo dos valores de contraste nas regiões PD [$F_{(3,15)}= 6,197$; $p<0,01$] e PV [$F_{(3,15)}= 12,22$; $p<0,001$].

A **figura 9** demonstra uma fotomicrografia para ilustrar um corte da região AV do estriado das proles submetidas aos testes comportamentais. A figura demonstra também os valores médios de transmitância, que é inversamente proporcional à pigmentação tecidual, ou seja, quanto maior os valores de transmitância, menor será o nível de opacidade do tecido fotomicrografado. Pode-se notar na fotomicrografia que o EtOH apresentou uma maior intensidade na coloração da região AV do estriado.

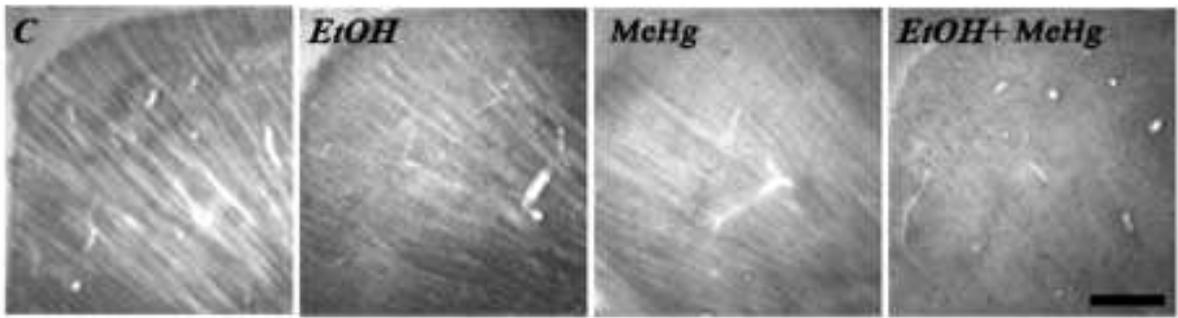


Figura 9 – Fotomicrografia da região anteroventral (AV) das secções que foram seleccionadas para ilustrar o estriado do rato, baseado nos valores médios de transmitância de cada grupo experimental. Os grupos expostos foram: controle (C), etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg).

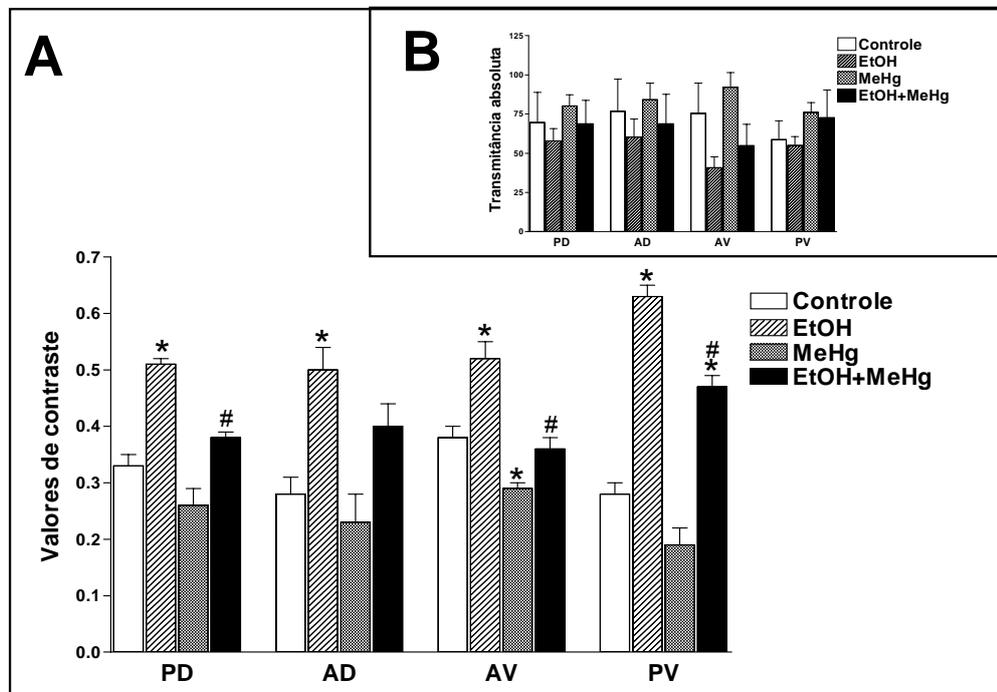


Gráfico 10 – Atividade histoquímica de NADPH-diaforase no estriado. **A)** Valores de contraste de NADPH-diaforase para cada grupo experimental. **B)** Média dos valores de transmitância de NADPH-diaforase para cada grupo experimental. Os grupos expostos foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra apresenta a média±e.p.m. de 4 animais. * $p < 0,05$ representa a diferença significativa em relação ao controle. # $p < 0,05$ representa a diferença significativa em relação ao EtOH ou MeHg. PD – estriado posterodorsal; AD – estriado anterodorsal; AV – Anteroventral; PV – Posteroventral (ANOVA, Teste de Tukey).

Valores de contraste				
Regiões do estriado	Controle	EtOH	MeHg	EtOH+MeHg
PD	0,33±0,02	0,51±0,01*	0,26±0,03	0,38±0,01 [#]
AD	0,28±0,03	0,50±0,04*	0,23±0,05	0,40±0,04
AV	0,38±0,02	0,52±0,03*	0,29±0,01*	0,36±0,02 [#]
PV	0,28±0,02	0,63±0,02*	0,19±0,03*	0,47±0,02 ^{*#}
Valores de transmitância				
Regiões do estriado	Controle	EtOH	MeHg	EtOH+MeHg
PD	69,62±19,20	57,95±7,72	80,12±7,19	68,83±14,84
AD	76,66±20,56	60,35±11,54	84,21±10,44	68,72±18,84
AV	75,45±19,22	40,81±6,89	92,17±9,37	54,78±13,66
PV	58,70±12,03	54,91±5,63	76,05±6,22	72,68±17,71

Tabela 1 – Atividade histoquímica de NAPH-diaforase no estriado. Acima: valores de contrastes. Abaixo: valores de transmitância. Os grupos expostos foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra apresenta a média±e.p.m. de 4 animais. *p<0,05 representa a diferença significativa em relação ao controle. #p<0,05 representa a diferença significativa em relação ao EtOH ou MeHg. PD – estriado posterodorsal; AD – estriado anterodorsal; AV – Anteroventral; PV – Posteroventral (ANOVA, Teste de Tukey).

O hipocampo foi mais sensível ao EtOH do que ao MeHg ou ao EtOH+MeHg (**gráfico 11** e **tabela 2**). Nestas regiões, o estrato lacunoso (SL) do CA1 [$F_{(3,15)}= 6,441$; $p<0,01$] e o estrato molecular (SM) [$F_{(3,15)}= 5,714$; $p<0,01$] do giro denteado aumentaram a atividade nitrérgica após o tratamento com o EtOH. O grupo EtOH+MeHg apresentou diminuição dos valores de contraste da atividade nitrérgica na região do SM [$F_{(3,15)}= 4,571$; $p<0,05$] e do SL [$F_{(3,15)}= 5,041$; $p<0,05$], em relação ao grupo EtOH.

A **figura 10** ilustra os valores médios de transmitância dos grupos tratados com os neurotóxicos, através da fotomicrografia do CA1 e suas camadas hipocampais. Nota-se o aumento na intensidade da tonalização da coloração no grupo EtOH, nas camadas SL e SM, compatível com o aumento da atividade nitrérgica.

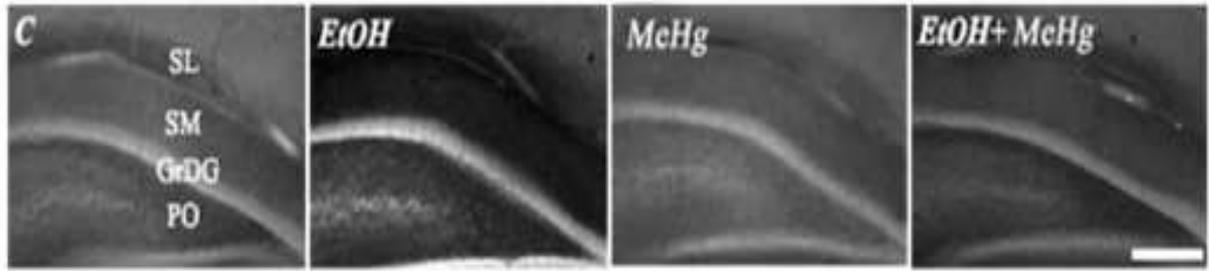


Figura 10 – Fotomicrografia da camada granular do giro denteado (GrDG); Camada polimórfica (PO); Estrato molecular (SM); estrato lacunoso molecular (SL) do Corno de Amon 1 (CA1) de secções que foram selecionadas para ilustrar as camadas hipocâmpais dos ratos, baseado nos valores médios de transmitância de cada grupo experimental. Os grupos expostos foram: controle (C), etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg).

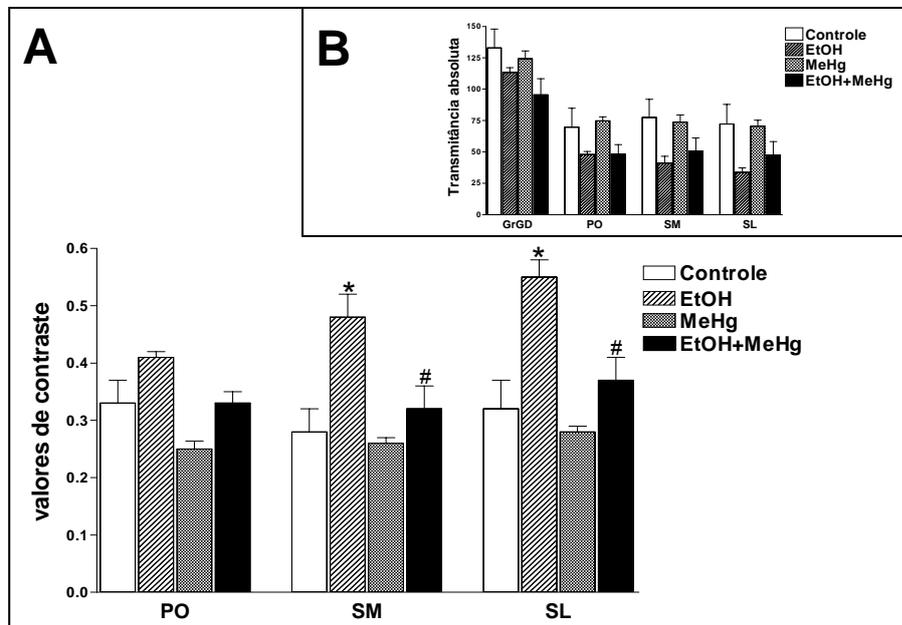


Gráfico 11 – Atividade histoquímica de NAPH-diaforase no hipocampo. **A)** Valores de contraste de NADPH-diaforase para cada grupo experimental. **B)** Média dos valores de transmitância de NADPH-diaforase para cada grupo experimental. Os grupos expostos foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra apresenta a média±e.p.m. de 4 animais. *p<0,05 representa a diferença significativa em relação ao controle. #p<0,05 representa a diferença significativa em relação ao EtOH. GrDG – Camada granular do giro denteado; PO – Camada polimórfica; SM – estrato molecular; SL – estrato lacunoso molecular (ANOVA, Teste de Tukey).

Valores de contraste				
Regiões do hipocampo	Controle	EtOH	MeHg	EtOH+MeHg
PO	0,33 ±0,04	0,41±0,01	0,25±0,014	0,33±0,02
SM	0,28±0,04	0,48±0,04*	0,26±0,01	0,32±0,04 [#]
SL	0,32±0,05	0,55±0,03*	0,28±0,01	0,37±0,04 [#]
Valores transmitância				
Regiões do hipocampo	Controle	EtOH	MeHg	EtOH+MeHg
GrDG	132,89±14,96	113,28±3,83	124,32±6,21	95,45±12,89
PO	69,77±15,00	47,98±2,23	74,77±3,13	48,11±7,66
SM	77,31±14,69	41,08±5,35	73,70±5,72	50,59±10,45
SL	72,19±15,58	33,65±3,63	70,48±4,83	47,46±10,73

Tabela 2 – Atividade histoquímica de NAPH-diaforase no hipocampo. Acima: valores de contrastes. Abaixo: valores de transmitância. Os grupos expostos foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra apresenta a média±e.p.m. de 4 animais. *p<0,05 representa a diferença significativa em relação ao controle. #p<0,05 representa a diferença significativa em relação ao EtOH. GrDG – Camada granular do giro denteado; PO – Camada polimórfica; SM – estrato molecular; SL – estrato lacunoso molecular (ANOVA, Teste de Tukey).

No cerebelo, os grupos EtOH e MeHg não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle, em nenhuma das camadas cerebelares. Somente o grupo EtOH+MeHg interferiu na atividade nitrérgica no cerebelo na camada molecular, quando comparado ao grupo EtOH [$F_{(3,15)} = 5,241$; $p < 0,05$], diminuindo a atividade nitrérgica naquele local (**gráfico 12, tabela 3**).

A **figura 11** ilustra os valores médios de transmitância através das camadas cerebelares, em que os grupos tratados com os neurotóxicos apresentam aproximadamente o mesmo nível de coloração, sem diferenças significativas. Nota-se que a camada granular do grupo controle apresenta um nível de pigmentação maior que os grupos tratados, compatível com os resultados de contraste obtidos, porém não foi suficiente para apresentar significância em relação aos grupos tratados com os neurotóxicos.

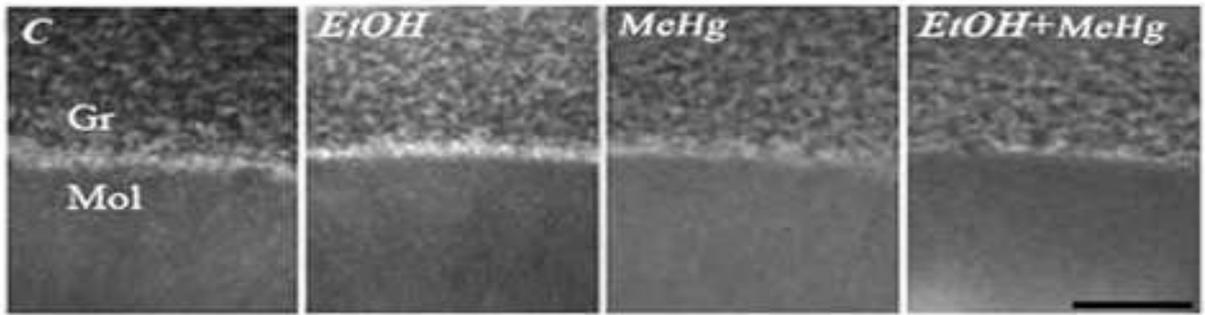


Figura 11 – Fotomicrografia da camada granular (Gr); Camada molecular (Mol) de secções que foram selecionadas para ilustrar as camadas cerebelares dos ratos, baseado nos valores médios de transmitância de cada grupo experimental. Grupos expostos são controle (C), etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg).

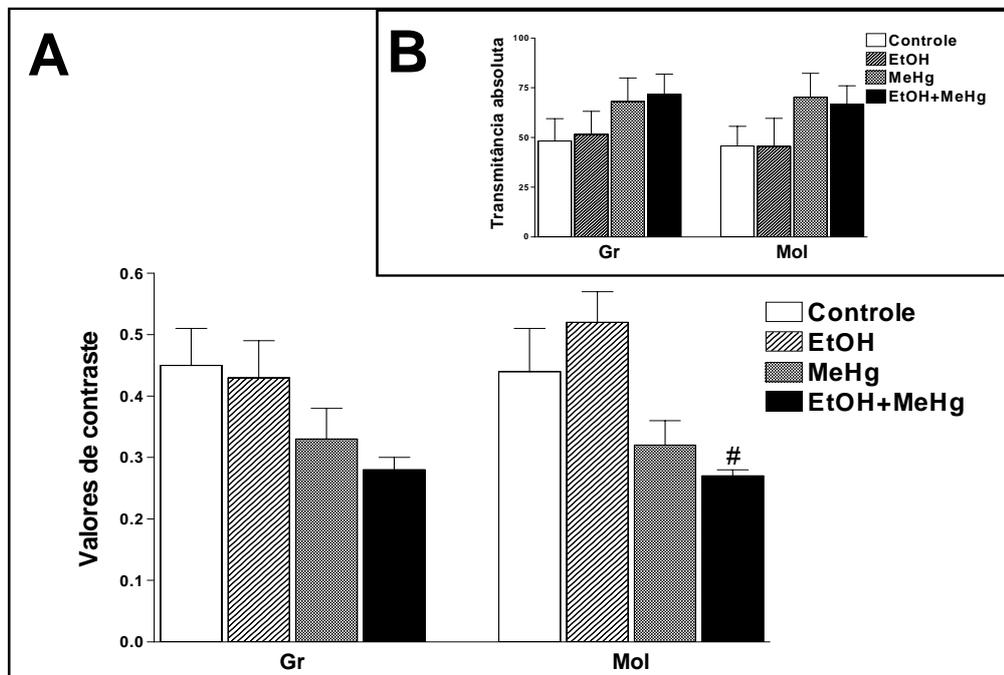


Gráfico 12 – Atividade histoquímica de NADPH-diaforase no cerebelo. **A)** Valores de contraste de NADPH-diaforase para cada grupo experimental. **B)** Média dos valores de transmitância de NADPH-diaforase para cada grupo experimental. Os grupos expostos foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra apresenta a média±e.p.m. de 4 animais. # $p < 0,05$ representa a diferença significativa em relação ao EtOH. Gr – Camada granular; Mol – camada molecular (ANOVA, Teste de Tukey).

Valores de contraste				
Regiões do cerebello	Controle	EtOH	MeHg	EtOH+MeHg
Gr	0,45±0,06	0,43±0,06	0,33±0,05	0,28±0,02
Mol	0,44±0,07	0,52±0,05	0,32±0,04	0,27±0,01 [#]
Valores transmitância				
Regiões do cerebello	Controle	EtOH	MeHg	EtOH+MeHg
Gr	48,2±11,25	51,56±11,61	68,09±11,8	71,68±10,25
Mol	45,77±9,87	45,49±14,21	70,26±12,00	66,75±9,31

Tabela 3 – Atividade histoquímica de NAPH-diaforase no cerebello. Acima: valores de contrastes. Abaixo: valores de transmitância. Os grupos expostos foram: controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e etanol associado ao metilmercúrio (EtOH+MeHg). Cada barra apresenta a média±e.p.m. de 4 animais. #p<0,05 representa a diferença significativa em relação ao EtOH. Gr – Camada granular; Mol – camada molecular (ANOVA, Teste de Tukey).

V. DISCUSSÃO

Os dados obtidos sugerem que a intoxicação pelo EtOH e/ou MeHg está correlacionado aos déficits no aprendizado (aquisição), na retenção da memória de curta e longa duração (explícitas e implícitas) e no comportamento sugestivo de aumento da emocionalidade, observados nas proles adultas de ratas contaminadas com aqueles neurotóxicos durante o período pré-natal. Outras alterações, como aquelas envolvendo os pesos corpóreos e dos encéfalos dos animais, se tornaram fundamentais como fatores críticos indicativos para a detecção da FAS nos animais tratados de forma isolada com EtOH, que também apresentaram atividade nitrérgica aumentada no hipocampo e estriado.

No período D1 até D60, as proles de todos os grupos tratados com EtOH e/ou MeHg, apresentaram diferenças em seus pesos corpóreos em relação ao controle. No entanto, no grupo EtOH+MeHg foi onde a diferença observada foi mais evidente, visto que os animais não conseguiram acompanhar o ganho de pesos dos demais grupos tratados com água de torneira ou com os neurotóxicos de forma isolada. As diferenças no ganho de peso entre o controle e os grupos EtOH e MeHg já haviam sido relatadas previamente na literatura (Kim e cols., 2000; Margret e cols., 2005).

Analisando-se os dados morfológicos, observou-se uma redução no peso dos encéfalos das proles adultas do grupo EtOH. Estes resultados confirmam observações anteriores que demonstram uma redução no peso do encéfalo de animais expostos durante o período pré-natal àquele neurotóxico (Butters e cols., 2003). A relação da microencefalia, observada na intoxicação por EtOH, e os efeitos na produção de NOSn vem sendo estudada, pois acredita-se que esta enzima constitui um sistema de defesa contra a morte neuronal induzida pelo

EtOH (Bonthius *et cols.*, 2008), porém a presença de algum dano nestes sistemas fisiológicos, induz à produção de NOSi, que induz ao estresse oxidativo com possível perda neuronal (Davis *et cols.*, 2001).

O teste da atividade locomotora foi realizado em três fases, com intervalo de 24h e 7 dias, sempre anteriormente à exposição ao LTE. Este procedimento favorece a exploração do animal nos testes que envolvem labirintos. Na primeira exposição, os animais que receberam MeHg na vida intrauterina cruzaram mais quadrantes comparados ao grupo controle, demonstrando clara evidência de estresse (Maia *et cols.*, 2009) ou possível ansiedade (Stringari *et cols.*, 2006).

Na segunda exposição ao aparato, todos os grupos tratados com os neurotóxicos apresentaram o mesmo nível de locomoção, exceto o grupo controle. Este comportamento apresentado pelos grupos tratados com os neurotóxicos reflete déficits na habituação, que é uma memória implícita de procedimentos, que é dependente da atividade primordialmente do estriado e do cerebelo. Entretanto, após sete dias da avaliação da locomoção basal, apenas o grupo MeHg apresentou habituação ao teste, diminuindo a locomoção, onde novamente os grupos EtOH e EtOH+MeHg apresentaram distúrbios na habituação.

Estudos demonstram que a habituação em modelos experimentais pode ser revertida após o transcurso de tempo. O aumento da atividade locomotora após 7 dias da primeira exposição ao campo aberto poderia ocasionar o efeito de diminuição da habituação dos animais.

Quando os animais foram transferidos para o LTE, objetivando-se fazer as

avaliações relacionadas à memória, observou-se que o número de re-exposições ao braço fechado daquele aparato, necessário para atingir o critério de esquiwa, foi maior no grupo EtOH+MeHg, demonstrando dificuldade no aprendizado de esquiwa. Estudos demonstram que o número de re-exposições para alcançar o critério de esquiwa sugere relação próxima entre o nível de reatividade (diminuição do número de testes) e aumento da memória no LTE (Conde e cols., 2000), assim como o aumento no número de re-exposições para a permanência do animal no braço fechado correlaciona-se com a capacidade de aprendizado (Sanson e Carobrez, 1999; Takahashi e cols., 2005).

Quando avaliado o tempo de permanência do animal no braço fechado, nas 3 primeiras exposições do treino, observou-se que o nível basal de esquiwa foi diferente entre os grupos tratados com os neurotóxicos em relação ao controle, demonstrando comportamento natural alterado, antes mesmo de passar pelas demais etapas do teste. O grupo EtOH+MeHg apresentou comportamento mais exacerbado que todos os demais grupos. Estudos demonstram que a primeira latência do LTE é sempre menor que as subseqüentes tentativas, devido à falta de habituação da exploração nos braços abertos, quando comparado ao braço fechado (Graeff e cols., 1998).

Na segunda exposição (exposição 1), o comportamento de aversão aos espaços abertos foi alterado em todos os grupos, com exceção do EtOH+MeHg que não houve resposta aprendida após um estímulo aversivo. De acordo com Graeff e cols. (1998), as exposições subseqüentes à primeira geralmente são aumentadas. Este perfil de resposta foi observado com os grupos EtOH e MeHg, porém não foi evidenciado no grupo EtOH+MeHg, onde seu nível de reatividade

ao estímulo aversivo (braço aberto) estava prejudicado, com latências diminuídas na segunda exposição, sugestivo de déficits na memória de curta-duração.

Na terceira exposição ao braço fechado do LTE (exposição 2), todos os grupos tratados com os neurotóxicos, de forma isolada ou combinada, aumentaram o tempo de permanência no braço fechado, aproximando-se aos valores do grupo controle. De acordo com Graeff *e cols.* (1998), a aversão aos braços abertos permanece como fator crítico que conduz ao aprendizado da esquiva inibitória no LTE.

Existem na literatura substanciais evidências demonstrando que drogas que aumentam a atividade nos braços abertos de LCE são compostos ansiolíticos, enquanto drogas que diminuem a atividade nos braços abertos são ansiogênicas (Carobrez e Bertoglio, 2005; Kalueff *e cols.*, 2007; Nascimento Häckl e Carobrez, 2007, Stern *e cols.*, 2008). No LTE, a diminuição no tempo de exploração do braço aberto é indicativa de comportamento sugestivo de pânico (Conde *e cols.*, 2000). Quando analisado o parâmetro de tempo de permanência no braço aberto do LTE nos animais tratados com EtOH e/ou MeHg, foi observado que todos os grupos tratados com os neurotóxicos apresentaram tempo de escape do braço aberto significativamente inferior ao grupo controle, sendo este comportamento sugestivo de desordens caracterizadas pelo aumento da emocionalidade.

Considerando que Deakin e Graeff (1991) sugeriram que desordens generalizadas de ansiedade estão correlacionadas ao medo condicionado, enquanto desordens de pânico estão correlacionadas com o medo não condicionado, os resultados aqui obtidos demonstraram que o comportamento

avaliado relaciona-se às desordens não condicionadas, sugestivas de aumento de emocionalidade.

Maia e cols. (2009) demonstraram que ratos tratados no período do neurodesenvolvimento com EtOH e/ou MeHg apresentaram comportamentos relacionados à ansiedade. Os resultados obtidos foram baseados no fato de que os animais tratados com os neurotóxicos apresentaram reduzidas latências nos braços abertos do LCE. O medo dos animais aos braços abertos faz parte de seu repertório natural de defesa, onde há a tendência da permanência em lugares que possuam paredes verticais (Falter e cols., 1992; Treit e cols., 1993), comportamento este que produz padrões em testes experimentais específicos em detectar alterações comportamentais, tais como os labirintos para ratos (File, 1992).

Foi detectado também em nosso estudo, o medo condicionado dos animais para atingir o estado de esquiva (permanecer 300 segundos no braço fechado), havendo uma mudança de comportamento dos mesmos, que pode ser atribuída ao aprendizado através da experiência da exploração, da mesma forma como foi observado por Carobrez e Bertoglio (2005).

Essas características comportamentais, apresentadas pelos animais submetidos ao LTE, podem ser explicadas pelas respostas não condicionadas (observadas no LCE), que são atribuídas ao medo espontâneo que este tipo de aparato provoca, observado durante sessões de cinco minutos regulares, nas quais existe uma clara preferência para o animal permanecer no braço fechado, mais do que no braço aberto (Carobrez e Bertoglio, 2005).

Estudos envolvendo o EtOH em testes de ansiedade, como no LCE, já estão bem descritos na literatura (Bertoglio e Carobrez, 2002; Da Silva e *cols.*, 2005; Pohorecky, 2008), em que a administração de EtOH, anteriormente à exposição ao protocolo experimental, produz efeito ansiolítico, aumentando o tempo de exploração dos animais nos braços abertos do LCE. A exposição intrauterina ao EtOH, por sua vez, produz efeito ansiogênico em proles adultas testadas no LCE (Maia e *cols.*, 2009).

Quando foi avaliada a memória de 24 horas (longa duração), os grupos tratados com os neurotóxicos apresentaram menor retenção de memória, demonstrada pelos valores reduzidos do tempo de esquiva ao braço aberto em relação ao controle. De acordo com Izquierdo e *cols.* (1999), para que a memória de longa duração seja consolidada, são necessárias algumas horas para que ocorram as modificações bioquímicas necessárias ao processo de consolidação e posterior armazenamento, podendo ser recuperada após alguns dias ou até mesmo meses após o estímulo aversivo.

No reteste de 24 horas, 30 segundos após o teste de 24 horas, observou-se que todos os grupos apresentaram aumento da latência no braço fechado, sendo que os grupos MeHg e EtOH+MeHg continuavam apresentando dificuldades na retenção de memória. O aumento nas latências na fase de reteste são características deste modelo experimental, onde após a fase de teste há o aumento nos tempos de permanência no braço fechado (Takahashi e *cols.*, 2005).

Após 7 dias, quando os grupos foram submetidos novamente ao LTE, os animais apresentaram comportamentos similares àqueles ocorridos com 24 horas do teste. Quando foi realizado o reteste de 7 dias, observou-se um aumento

substancial do tempo de esquivas ao braço aberto no grupo controle, que não foi seguido pelos grupos tratados com os neurotóxicos, mostrando a clara diferença em relação à memória de *primer* (que é uma memória implícita), de acordo com Takahashi e cols. (2005).

De acordo com Takahashi e cols. (2005), é possível que após 7 dias, os traços de memória da esquivas permaneçam parcialmente estocados. É provável que isto justifique os valores baixos nos tempos de permanência no braço fechado, e requeira um estímulo para ser recuperado. Isso foi notado nos animais avaliados neste estudo. A primeira exposição ao LTE (teste) pode facilitar a recuperação da memória na segunda exposição, agindo como uma memória *primer* (Haller e cols., 2002).

Graeff e cols. (Graeff e cols., 1993; Zangrossi e Graeff, 1997) descreveram o LTE como um novo método para investigar comportamentos relacionados às emoções e processos que delimitam aprendizado. Assim, o LTE gera distintas características comportamentais, associadas ao medo e memória, que podem estar relacionadas aos diferentes tipos de desordens psiquiátricas e, então, serem diferentemente afetados por drogas distintas (Conde e cols., 2000). Este modelo experimental animal, portanto, é capaz de separar os comportamentos típicos de ansiedade e de pânico (Graeff e cols., 1996; Roemer e Orsillo, 2007; Viana e cols., 1994).

O comportamento de AR, por sua vez, tem sido interpretado como um comportamento de conflito, produzido por simultâneas ativações de impulsos exploratórios e de medo, que faz parte do repertório da defesa natural dos animais (Blanchard e cols., 1990; Blanchard e Blanchard, 1989). Representou um

importante parâmetro para se qualificar o comportamento de esquiva, enquanto os ratos encontram-se no braço fechado do LTE (Sanson e Carobrez, 1999).

Os dados deste estudo demonstram um prejuízo do comportamento natural dos ratos de todos os grupos tratados com os neurotóxicos, nos quais a função biológica do comportamento de AR, responsável por uma das estratégias de informações de situações de perigo (Blanchard e *cols.*, 1990), encontra-se diminuída em todas as fases avaliadas.

Os dados observados através da utilização da esquiva inibitória, que se fundamenta no choque como estímulo, para obtenção de aprendizado, demonstraram que o grupo da associação com os dois neurotóxicos obteve alterações mnemônicas neste teste comportamental, significando um claro prejuízo na memória de longa duração (Maia e *cols.*, 2009), porém sem alterações na atividade nitrérgica hipocampal.

Nossos resultados estão em consonância com a literatura, visto que os animais tratados com os neurotóxicos apresentaram diminuição nos indicadores de aprendizado, com tempos diminuídos de aquisição de esquiva, principalmente na exposição 1; tempos de escape dos braços abertos significativamente diminuídos, denotando comportamento sugestivo de desordens características de aumento da emocionalidade; e memória de curto e de longo prazo comprometidas, demonstradas através da diminuição significativa dos tempos de esquiva ao braço aberto nos testes e retestes realizados após 24 horas e 7 dias do treino para aquisição do comportamento de esquiva (Carobrez e Bertoglio, 2005; Takahashi e *cols.*, 2005). Estudos têm demonstrado que ratos estão aptos

a aprender a esquivar de inibição, tão cedo quanto algumas horas após o nascimento, evidenciando memória parcial de 24 horas (Myslivecek, 1997).

O grupo EtOH+MeHg foi o mais afetado nos testes comportamentais, mesmo quando foram utilizados estímulos como o choque, para a retenção da memória de 24 horas, quando os animais permaneceram em média 8 segundos na plataforma do equipamento (Maia e cols., 2009). Muitos estudos têm sido propostos com o objetivo de explicar o possível mecanismo através do qual a exposição pré-natal ao EtOH produz alterações nas respostas comportamentais, interferindo com um grande número de processos celulares e intercelulares. Em nossas pesquisas, decidiu-se por focar nas atividades do NO, como um dos principais alvos para responder as questões aqui abordadas, visto que os fenômenos de LTP e LTD, que são dependentes de NO, tem papel fundamental nos processos cognitivos de aprendizagem e memória (Izquierdo e cols., 1999), assim como desordens relacionadas à ansiedade (Okva e cols., 2004).

Em relação à análise histoquímica, deve-se observar que o método histoquímico utilizado não permitia a identificação de qual isoforma de NOS estava presente no tecido estudado. O EtOH apresentou atividade nitrérgica aumentada no estriado e hipocampo em relação ao grupo controle, com presença de diminuição de peso encefálico, resultado este já observado em estudos anteriores (Bonthius e cols., 2008), porém contradizendo outros acerca desta interação (Jang e cols., 2005; Rossetti e Crespi, 2004). De acordo com outros estudos, a administração de EtOH ocasiona uma redução na produção de NO no SNC (Deng e Deitrich, 2007), porém este aumento da atividade nitrérgica pode

ser consequência da compensação do SNC adulto, em virtude da intoxicação no neurodesenvolvimento.

Estudos demonstram que o EtOH, administrado de forma crônica, causa um aumento dos níveis de glutamato e NMDA (Davis, 2008), que estão diretamente relacionados à produção de NO. Estas alterações nitrérgicas não podem ser atribuídas como responsável pelos efeitos comportamentais observados neste estudo, visto que animais que foram tratados com MeHg e EtOH+MeHg e que não apresentaram aumento da atividade nitrérgica em nenhuma das regiões cerebrais estudadas, demonstraram prejuízo comportamental e cognitivo, sugerindo haver outra cascata de sinalização que esteja interferindo com os comportamentos analisados.

Em relação à memória, o envolvimento hipocampal está presente no comportamento de esquiva inibitória. Tal observação pode ser levada em consideração diante dos resultados demonstrando que lesões na porção dorsal do CA1 ou porção ventral do Corno de Amon 3 (CA3) reduzem a consolidação do aprendizado da esquiva inibitória (Martínez e cols., 2002). Outros estudos demonstraram que lesões no hipocampo comprometem os comportamentos relacionados ao medo (Richmond e cols., 1999; Trivedi e Coover, 2004) em virtude de suas densas conexões anatômicas subcorticais (hipotálamo, amígdala e *nucleus accumbens*) envolvidas na defesa e emoção.

Existem também fortes evidências na literatura que indicam um papel do estriado no comportamento de esquiva inibitória e aprendizado, que está relacionado com a consolidação das condições aversivas (Diaz Del Guante e cols., 1993). O EtOH demonstrou que altera esta região podendo comprometer o

circuito corticoestriatal, alterando as atividades comportamentais (Xie e cols., 2009).

A presença de NO no SNC pode ocasionar efeitos comportamentais variáveis. Mudanças na sinalização do NO têm sido relatadas, tanto por aumentar quanto por diminuir comportamentos relacionados à ansiedade. Estudos com injeções sistêmicas de L-NAME, que reduz a produção de NO, aumentou o nível de ansiedade no LCE (Czech e cols., 2003). O tratamento sistêmico administrado de forma aguda (Faria e cols., 1997; Guimarães e cols., 1994; Volke e cols., 1998) e sub-crônica (Dunn e cols., 1998) com inibidores da enzima NOS, aumentou o tempo de exploração dos animais aos braços abertos do LCE.

A precisa contribuição da sinalização do NO para o comportamento deve ser obtida utilizando manipulações anatomicamente mais precisas. Quando o L-NOARG, outro inibidor da síntese de NO, foi infundido no hipocampo de ratos, foi observada uma diminuição no tempo de exploração dos braços abertos do LCE (Monzón e cols., 2001). Isso significa que existem na literatura dados contraditórios em relação ao NO e as alterações comportamentais (Del Bel e cols., 2005). Esta correlação entre o NO e os comportamentos aqui testados não apresentaram correlação, visto que os animais que não apresentaram alterações na atividade nitrérgica, demonstraram prejuízo mnemônico e de comportamento similares quando comparado ao EtOH, que apresentou microencefalia e aumento da atividade nitrérgica.

Grandjean e Weihe (1993) realizaram um estudo com 1.000 crianças, na ilha Faroe, e encontraram dados que demonstravam que o consumo de EtOH por mulheres grávidas causou uma diminuição nas concentrações de mercúrio no

cordão umbilical, que eles atribuíram à interação toxicocinética entre o EtOH e o mercúrio. Esta afirmação não foi reproduzida pelos testes comportamentais em ratos utilizados em nossas pesquisas, porém na análise morfológica, o grupo EtOH+MeHg apresentou reduções nas alterações observadas em relação aos dados obtidos, quando os neurotóxicos foram administrados de forma isolada. O grupo EtOH+MeHg apresentou aumento da atividade nitrérgica em apenas uma região do estriado, mais precisamente em sua porção posterior, sendo suficiente para interferir com as respostas comportamentais.

A despeito dos resultados obtidos pela exposição combinada de EtOH+MeHg durante o desenvolvimento do SNC em ratos, existem diferenças marcantes entre as espécies que tornam difícil extrapolar as conclusões para os seres humanos. Porém, estes dados dão suporte aos estudos clínicos, demonstrando que, independente das alterações comportamentais e morfológicas, intervenções em mulheres que utilizam álcool durante a gravidez são necessárias, em função da redução de risco da ocorrência da FAS. Entretanto, mais pesquisas são necessárias para elucidar os efeitos teratogênicos gerais do EtOH e as associações com outros neurotóxicos.

O avanço nas pesquisas dos mecanismos moleculares, que envolvem a neurotransmissão no SNC, tem permitido um melhor entendimento do sistema de neurotransmissores envolvidos nas ações do EtOH e MeHg, porém o preciso mecanismo que delinea os efeitos da combinação destes dois neurotóxicos merecem ser mais investigados.

VI. CONCLUSÕES

- Os pesos dos animais que receberam os neurotóxicos, de forma isolada ou combinada, foram claramente afetados, de tal forma que os animais não conseguiram acompanhar os ganhos de pesos observados nos animais controles.
- Os pesos dos encéfalos encontraram-se diminuídos no grupo tratado com EtOH, provavelmente decorrente do aumento da atividade do NO na maioria das regiões cerebrais avaliadas, que pode acarretar efeitos indiretos, com aumento do estresse oxidativo e possível perda neuronal.
- Todos os animais tratados com os neurotóxicos apresentaram défictis na habituação ao teste do campo aberto, sugestivo de prejuízo na memória de procedimentos, que é dependente do estriado. O grupo MeHg, por sua vez, apresentou um aumento da atividade locomotora, sugestivo de comportamento relacionado ao estresse e/ou ansiedade.
- Os animais que receberam EtOH+MeHg apresentaram dificuldades de aprendizado, quando foram submetidos à aquisição de esquiva. Apresentaram também distúrbios de memória de curta e longa duração, quando submetidos aos protocolos utilizando estímulos aversivos e não-aversivos, uma vez que apresentaram redução nos tempos de permanência no braço fechado do LTE e na plataforma central da esquiva inibitória.
- Os grupos das proles submetidas à intoxicação intrauterina por EtOH, MeHg e EtOH+MeHg apresentaram comportamento relacionado às desordens características de aumento da emocionalidade, quando

submetidos ao braço aberto do LTE, visto que apresentaram redução no tempo de exploração do braço aberto do LTE.

- O grupo EtOH+MeHg apresentou aumento da atividade nitrérgica na região pósterovernal do estriado e interferência em todos os testes comportamentais realizados, confirmando a alteração na região do estriado, responsável pela regulação do comportamento emocional.
- Quando os neurotóxicos foram administrados de forma isolada, o grupo EtOH apresentou aumento da atividade nitrérgica no estriado e hipocampo, com reflexos nas análises comportamentais, enquanto o grupo MeHg apresentou atividade nitrérgica diminuída no estriado, com alterações comportamentais características de aumento da emocionalidade e deficiências de memória de curta e longa duração, sugerindo a possibilidade de haver outros mecanismos, além da via nitrérgica, que afetem o comportamento, e que ainda não estão elucidados.

Em conjunto, estes resultados demonstraram que a intoxicação com EtOH e/ou MeHg em ratos, no período do neurodesenvolvimento, causou prejuízos nas análises comportamentais referentes às memórias de curta e longa duração, de procedimentos e nas avaliações de risco, onde o grupo EtOH+MeHg apresentou ainda déficits de aprendizado. Todos estes dados comportamentais não apresentaram correlações com a atividade nitrérgica avaliada no hipocampo, estriado e cerebelo, visto que o grupo EtOH apresentou aumento da NOS, onde

os demais grupos tratados com os neurotóxicos apresentaram esta atividade enzimática em níveis normais na maioria das estruturas analisadas.

Estudos complementares são necessários para avaliar outras vias de sinalização que possam estar alteradas e que possam explicar essas respostas comportamentais encontradas, assim como a identificação enzimática causadora da diminuição no peso do encéfalo de ratos tratados pelo EtOH de forma isolada, investigando também se fatores apoptóticos e/ou necróticos estão presentes. Além disso, as interferências químicas e/ou farmacocinéticas entre o EtOH e/ou MeHg também merecem ser levadas em consideração, visando reduzir as possíveis variáveis que estejam interferindo com os possíveis sinergismos entre estes toxicantes e que levaram aos efeitos deletérios comportamentais observados neste estudo.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI J, ASANO M, UENO Y, REILLY M, MANTLE D, PETERS TJ, PREEDY VR. 7a and 7b-hydroperoxycholest-5-en-3b-ol in muscle as indices of oxidative stress: response to ethanol dosage in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 675-681.
- ASCHNER M, SYVERSEN T, SOUZA DO, ROCHA JB, FARINA M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 285-291.
- ATCHISON WD, HARE MF. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. *FASEB* 1994; 8: 622-629.
- AZEVEDO FA. Toxicologia do mercúrio. São Paulo: RIMA 2003; 272 p.
- BAILEY KP. The brain's rewarding system and addiction. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv* 2004; 42: 14-18.
- BANICH MT, MACKIEWICZ KL, DEPUE BE, WHITMER AJ, MILLER GA, HELLER W. Cognitive control mechanisms, emotion and memory: A neural perspective with implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* 2008 [Epub ahead of print].
- BARKAY T, WAGNER-DOBLER I. Microbial transformations of mercury: potentials, challenges, and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. *Adv Appl Microbiol* 2005; 57: 1-52.
- BEAR MF. A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13453-13459.
- BECKER HC, DIAZ-GRANADOS JL, RANDALL CL. Teratogenic actions of ethanol in the mouse: a minireview. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 55: 501-513.
- BERLIN M. Mercury. In: L Friberg, GF Nordberg, VB Vouk (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*, Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 1986: 387-445.
- BERTOGLIO LJ, CAROBREZ AP. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73: 963-969.
- BERTOSSI M, GIROLAMO F, ERREDE M, VIRGINTINO D, ELIA G, AMBROSI L, RONCALI L. Effects of methylmercury on the microvasculature of the developing brain. *Neurotoxicology* 2004; 25: 849-857.
- BISINOTI MC, JARDIM WF. O comportamento do metilmercúrio no ambiente. *Quim. Nova* 2004; 27: 593-600.
- BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC, RODGERS J, WEISS SM. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 1990; 14: 463-472.
- BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol* 1989; 103: 70-82.
- BONTHIUS DJ, BONTHIUS NE, LI S, KARACAY B. The protective effect of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) against alcohol toxicity depends upon the NO-cGMP-PKG pathway and NF-kappaB. *Neurotoxicology* 2008; 29: 1080-1091.

- BORBA JM, ARAUJO MS, PICANÇO-DINIZ CW, MANHAE-DE-CASTRO R, GUEDES RC. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. *Brain Res Bull* 2000; 53: 193-201.
- BRABO ES, SANTOS EO, JESUS IM, MASCARENHAS AFS, FAIAL KF. Mercury contamination of fish and exposures of an Indigenous Community in Para State, Brazil. *Environ Res* 2000; 84: 197-203.
- BROOKES N. In vitro evidence for the role of glutamate in the CNS toxicity of mercury. *Toxicology* 1992; 76: 245-56.
- BURD L, WILSON H. Fetal, infant, and child mortality in a context of alcohol use. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004; 127: 51-58.
- BUTTERS NS, REYNOLDS JN, BRIEN JF. Effects of chronic prenatal exposure on cGMP content and glutamate release in the hippocampus of the neonatal guinea pig. *Neurotoxicol Teratol* 2003; 25: 59-68.
- BUWALDA B, NYAKAS C, GAST J, LUITEN PG, SCHMIDT HH. Aldehyde fixation differentially affects distribution of diaphorase activity but not of nitric oxide synthase immunoreactivity in rat brain. *Brain Res Bull* 1995; 38: 467-473.
- CAGIANO R, DE SALVIA MA, RENNA G, TORTELLA E, BRAGHIROLI D, PARENTI C, ZANOLI P, BARALDI M, ANNAU Z, CUOMO V. Evidence that exposure to methyl mercury during gestation induces behavioral and neurochemical changes in offspring of rats. *Neurotoxicol Teratol* 1990; 12: 23-28.
- CALABRESE V, RENIS M, CALDERONE A, RUSSO A, REALE S, BARCELLONA ML, RIZZA V. Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cellular injury after chronic ethanol administration in rat. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1159-1167.
- CAROBREZ AP, BERTOGLIO LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29: 1193-1205.
- CARRATÙ MR, COLUCCIA A, MODAFFERI AM, BORRACCI P, SCACCIANOCE S, SAKAMOTO M, CUOMO V. Prenatal methylmercury exposure: effects on stress response during active learning. *Bull Environ Contam Toxicol* 2008; 81: 539-542.
- CARVALHO V, PINSKY I, DE SOUZA E SILVA R, CARLINI-COTRIM B. Drug and alcohol use and family characteristics: a study among Brazilian high-school students. *Addiction* 1995; 90: 65-72.
- CASTOLDI AF, BARNI S, TURIN L, GRANDINI C, MANZO L. Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *J Neurosci Res* 2000; 60: 775-787.
- CASTOLDI AF, COCCINI T, CECCATELLI S, MANZO L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull* 2001; 55: 197-203.
- CASTOLDI AF, ONISHCHENKO N, JOHANSSON C, COCCINI T, RODA E, VAHTER M, CECCATELLI S, MANZO L. Neurodevelopmental toxicity of methylmercury: Laboratory animal data and their contribution to human risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008; 51:

215-229.

- CECCATELLI S, TAMM C, ZHANG Q, CHEN M. Mechanisms and modulation of neural cell damage induced by oxidative stress. *Physiol Behav* 2007; 92: 87-92.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Alcohol consumption among women who are pregnant or who might become pregnant—United States, 2002. *MMWR Morb Mort Wkly Rep* 2004; 53: 1178-1181.
- CERNICHIARI E, MYERS GJ, BALLATORI N, ZAREBA G, VYAS J, CLARKSON T. The biological monitoring of prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology* 2007; 28: 1015-1022.
- CHAN HM, EGELAND GM. Fish consumption, mercury exposure, and heart diseases. *Nutr Rev* 2004; 62: 68-72.
- CHANG JW, PAI MC, CHEN HL, GUO HR, SU HJ, LEE CC. Cognitive function and blood methylmercury in adults living near a deserted chloralkali factory. *Environ Res* 2008; 108: 334-339.
- CHENG J, GAO L, ZHAO W, LIU X, SAKAMOTO M, WANG W. Mercury levels in fisherman and their household members in Zhoushan, China: Impact of public health. *Sci Total Environ* 2009; 407: 2625-2630.
- CHOI BH, LAPHAM LW, AMIN-ZAKI L, SALEEM T. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J Neuropathol Exp Neurol* 1978; 37: 719-733.
- CHOI BH. The effects of methylmercury on the developing brain. *Prog Neurobiol* 1989; 32: 447-470.
- CLARKSON TW. Mercury: major issues in environmental of health. *Environ Health Perspect* 1993; 100: 31-38.
- CLARKSON TW. The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1997; 34: 369-403.
- COLES CD, KABLE JA, TADDEO E. Math Performance and Behavior Problems in Children Affected by Prenatal Alcohol Exposure: Intervention and Follow-Up. *J Dev Behav Pediatr* 2009; 30: 7-15.
- CONDE C, COSTA V, TOMAZ C. Effects of emotional reactivity on inhibitory avoidance in the elevated T-maze. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 233-236.
- CONTI AC, YOUNG C, OLNEY JW, MUGLIA LJ. Adenylyl cyclases types 1 and 8 promote pro-survival pathways after ethanol exposure in the neonatal brain. *Neurobiol Dis* 2009; 33: 111-118.
- CORBETT CE, EL KHOURI M, COSTA AN, GYURICZA JV, CORBETT JF, FRIZZARINI R, DE ARAÚJO ANDRADE DC, CORDEIRO Q, STRAVOGIANNIS A, CHASSOT CA, VIEIRA JL, PINHEIRO MDA C. Health evaluation of gold miners living in a mercury-contaminated village in Serra Pelada, Pará, Brazil. *Arch Environ Occup Health* 2007; 62: 121-128.

- COSTA JC, TOMAZ C. Posttraining administration of substance P and its N-terminal fragment block the amnesic effects of diazepam. *Neurobiol Learn Mem* 1998; 69: 65-70.
- COUNTER SA, BUCHANAN LH. Mercury exposure in Children: a review. *Toxicol Applied Pharmacol* 2004; 198: 209-230.
- CUZON VC, YEH PW, YANAGAWA Y, OBATA K, YEH HH. Ethanol consumption during early pregnancy alters the disposition of tangentially migrating GABAergic interneurons in the fetal cortex. *J Neurosci* 2008; 28: 1854-1864.
- CZECH DA, JACOBSON EB, LESUEUR-REED KT, KAZEL MR. Putative anxiety-linked effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME in three murine exploratory behavior models. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 75: 741-748.
- DA SILVA GE, Vendruscolo LF, Takahashi RN. Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2005; 77: 693-706.
- DAVIDSON PW, MYERS GJ, WEISS B. Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics* 2004; 113: 1023-1029.
- DAVIS MI. Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers. *Pharmacol Ther* 2008; 118: 36-57.
- DAVIS KL, MARTIN E, TURKO IV, MURAD F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol toxicol* 2001; 41: 203-236.
- DAWSON TM, BREDT DS, FOTUHI M, HWANG PM, SNYDER SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7797-7801.
- DEAKIN JFW, GRAEFF FG. 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol* 1991; 5: 305-315.
- DEL BEL EA, GUIMARAES FS, BERMUDEZ-ECHEVERRY M, GOMES MZ, SCHIAVETO-DE-SOUZA A, PADOVAN-NETO FE, TUMAS V, BARION-CAVALCANTI AP, LAZZARINI M, NUCCI-DA-SILVA LP, DE PAULA-SOUZA D. Role of Nitric Oxide on Motor Behavior. *Cell Mol Neurobiol* 2005; 25: 371-392.
- DE-MELLO N, CAROBREZ AP. Elevated T-maze as an animal model of memory: effects of scopolamine. *Behav Pharmacol* 2002; 13: 139-148.
- DENG XS, DEITRICH RA. Ethanol metabolism and effects: nitric oxide and its interaction. *Curr Clin Pharmacol* 2007; 2: 145-153.
- DEWAILLY E, SUHAS E, MOU Y, DALLAIRE R, CHATEAU-DEGAT L, CHANSIN R. High fish consumption in French Polynesia and prenatal exposure to metals and nutrients. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008; 17: 461-470.
- DIAZ DEL GUANTE MA, CARBONELL-HERNANDEZ C, QUIRARTE G, CRUZ-MORALES SE, RIVAS-ARANCIBIA S, PRADO-ALCALA RA. Intrastratial injection of choline accelerates the acquisition of positively rewarded behaviors. *Brain Res Bull* 1993; 30: 671-675.

- DOBBING J, SANDS J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 1979; 3: 79-83.
- DÓREA JG. Community-directed risk assessment of mercury exposure: gold mining, fish, and unsuspected ethylmercury. *Rev Panam Salud Publica* 2008; 24: 220-221.
- DÓREA JG. Fish are central in the diet of Amazonian riparians: should we worry about their mercury concentrations?. *Environ Res* 2003; 92: 232-244.
- DRUM DA. Are toxic biometals destroying your children's future? *Biometals* 2009 [Epub ahead of print].
- DUNN RW, REED TA, COPELAND PD, FRYE CA. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. *Neuropharmacology* 1998; 37: 889-904.
- ELLIOTT EJ, BOWER C. Alcohol and pregnancy: the pivotal role of the obstetrician. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2008; 48: 236-239.
- ENGLEMAN EA, RODD ZA, BELL RL, MURPHY JM. The role of 5-HT3 receptors in drug abuse and as a target for pharmacotherapy. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008; 7: 454-467.
- FADDA F, ROSSETTI ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 385-341.
- FALTER U, GOWER AJ, GOBERT J. Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. *Behav Pharmacol* 1992; 3: 123-128.
- FARBER NB, HEINKEL C, DRIBBEN WH, NEMMERS B, JIANG X. In the adult CNS, ethanol prevents rather than produces NMDA antagonist-induced neurotoxicity. *Brain Res* 2004; 1028: 66-74.
- FARIA MAM. Mercurialismo metálico crônico ocupacional. *Rev Saúde Públ* 2003; 37: 116-127.
- FARIA MS, MUSCARA MN, MORENO JR H, TEIXEIRA AS, DIAS HB, DE OLIVEIRA B, GRAEFF FG, DE NUCCI G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *Eur J Pharmacol* 1997; 323: 37-43.
- FARO LR, RODRIGUES KJ, SANTANA MB, VIDAL L, ALFONSO M, DURÁN R. Comparative effects of organic and inorganic mercury on in vivo dopamine release in freely moving rats. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 1361-1365.
- FAZAKAS Z, LENGYEL Z, NAGYMAJTÉNYI L. Combined effects of subchronic exposure to lead, mercury and alcohol on the spontaneous and evoked cortical activity in rats. *Arh Hig Rada Toksikol* 2005; 56: 249-56.
- FELDMAN RG. Metabolic disorders and neurotoxicology. *Curr Opin Neurol* 1999; 12: 723.
- FENG W, WANG M, LI B, LIU J, CHAI Z, ZHAO J, DENG G. Mercury and trace element distribution in organic tissues and regional brain of fetal rat after in utero and weaning exposure to low dose of inorganic mercury. *Toxicol Lett* 2004; 152: 223-234.

- FILE SE. Usefulness of animal models with newer anxiolytics. *Clin Neuropharmacol* 1992; 15: 525-526.
- FITZGERALD WF, CLARKSON TW. Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. *Environ Health Perspect* 1991; 96: 159-166.
- FOLL BL, GALLO A, LE STRAT Y, LU L, GORWOOD P. Genetics of dopamine receptors and drug addiction: a comprehensive review. *Behav Pharmacol* 2009; 20: 1-17.
- FONSECA MF, DÓREA JG, BASTOS WR, MARQUES RC, TORRES JP, MALM O. Poor psychometric scores of children living in isolated riverine and agrarian communities and fish-methylmercury exposure. *Neurotoxicology* 2008; 29: 1008-1015.
- FRADE JG, BARBOSA RM, LARANJINHA J. Stimulation of NMDA and AMPA glutamate receptors elicits distinct concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal slices. *Hippocampus* 2008 [Epub ahead of print].
- FREIRE MA, OLIVEIRA RB, PICANÇO-DINIZ CW, PEREIRA A JR. Differential effects of methylmercury intoxication in the rat's barrel field as evidenced by NADPH diaphorase histochemistry. *Neurotoxicology* 2007; 28: 175-181.
- FUSTER JM. Distributed memory for both short and long term. *Neurobiol Learn Mem* 1998; 70: 268-274.
- GASS JT, OLIVE MF. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 218-265.
- GOLD PE, MCGAUGH JL. Hormones and memory. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1977; 17: 127-143.
- GOLD PE, VAN BUSKIRK RB, MCGAUGH JL. Effects of hormones on time-dependent memory storage processes. *Prog Brain Res* 1975; 42: 210-211.
- GOLDMAN LR, SHANNON MW. Committee on Environmental Health. Technical report: mercury in the environment: implications for pediatricians. *Pediatrics* 2001; 108: 197-205.
- GOLDMAN-RAKIC PS. Working memory and the mind. *Sci Am* 1992; 267: 110-117.
- GRAEFF FG, VIANA MB, TOMAZ C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res* 1993; 26: 67-70.
- GRAEFF FG, VIANA MB, MORA PO. Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 53: 171-177.
- GRAEFF FG, NETTO CF, ZANGROSSI JR H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 1998; 23: 237-246.
- GRAEFF FG. Bases Psicológicas In: Fundamentos de Psicofarmacologia. Ed. Atheneu. São Paulo, 1999.
- GRANDJEAN P, WEIHE P. Neurobehavioral effects of intrauterine mercury exposure: potential sources of bias. *Environ Res* 1993; 61: 176-183.

- GRANDJEAN P. Methylmercury toxicity and functional programming. *Reprod Toxicol* 2007; 23: 414-420.
- GREEN JH. Fetal alcohol spectrum disorders: understanding the effects of prenatal alcohol exposure and supporting students. *J Sch Health* 2007; 77: 103-108.
- GUIMARÃES FS, DE AGUIAR JC, DEL BEL EA, BALLEJO G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport* 1994; 5: 1929-1932.
- HALLER J, BAKOS N, SZIRMAY M, LEDENT C, FREUND TF. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 1395-1398.
- HANDLEY SL, MCBLANE JW. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993; 29: 129-138.
- HARADA M, NAKANISHI J, YASODA E, PINHEIRO MCN, OIKAWA T, GUIMARÃES GA, CARDOSO BS, KIZAKI T, OHNO H. Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects. *Environ Intern* 2001; 27: 285-290.
- HARDINGHAM GE, BADING H. The yin and yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 2003; 26: 81-89.
- HARME LIN-VIVIEN M, COSSA D, CROCHET S, BĂNARU D, LETOURNEUR Y, MELLON-DUVAL C. Difference of mercury bioaccumulation in red mullets from the north-western Mediterranean and Black seas. *Mar Pollut Bull* 2009 [Epub ahead of print].
- HERMAN LE, ACOSTA MC, CHANG PN. Gender and attention deficits in children diagnosed with a Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Can J Clin Pharmacol* 2008; 15: 411-419.
- HU M, SUN YJ, ZHOU QG, CHEN L, HU Y, LUO CX, WU JY, XU JS, LI LX, ZHU DY. Negative regulation of neurogenesis and spatial memory by NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurochem* 2008; 106: 1900-1913.
- HUANG CF, HSU CJ, LIU SH, LIN-SHIAU SY. Neurotoxicological mechanism of methylmercury induced by low-dose and long-term exposure in mice: oxidative stress and down-regulated Na⁺/K⁺-ATPase involved. *Toxicol Lett* 2008; 176: 188-197.
- HUANG L, COX C, MYERS GJ, DAVIDSON PW, CERNICHIARI E, SHAMLAYE CF, SLOANE-REEVES J, CLARKSON TW. Exploring nonlinear association between prenatal methylmercury exposure from fish consumption and child development: evaluation of the Seychelles Child Development Study nine-year data using semiparametric additive models. *Environ Res* 2005; 97: 100-108.
- IKONOMIDOU C, BITTIGAU P, ISHIMARU MJ, WOZNIAC DF, KOCH C, GENZ K, PRICE MT, STEFOVSKA V, HORSTER F, TENKOVA T, DIKRANIAN K, OLNEY JW. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 2000; 287: 1056-1060.
- ISHIMARU M, FUKAMAUCHI F, OLNEY JW. Halothane prevents MK-801 neurotoxicity in the rat cingulate cortex. *Neurosci Lett* 1995; 193: 1-4.

- IZQUIERDO I, MEDINA JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 1997; 68: 285-316.
- IZQUIERDO I, BARROS DM, MELLO E SOUZA T, DE SOUZA MM, IZQUIERDO LA, MEDINA JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature* 1998; 393: 635-636.
- IZQUIERDO I, MEDINA JH, VIANNA MR, IZQUIERDO LA, BARROS DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 1999; 103: 1-11.
- IZQUIERDO I, BEVILAQUA LR, ROSSATO JI, DA SILVA WC, BONINI J, MEDINA JH, CAMMAROTA M. The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but not in the basolateral amygdala or the neocortex. *Neurotox Res* 2008; 14: 273-294.
- JACOBSON RR, ACKER CF, LISHMAN WA. Patterns of neuropsychological deficit in alcoholic Korsakoff's syndrome. *Psychol Med* 1990; 20: 321-334.
- JACOBSON SW, STANTON ME, MOLTENO CD, BURDEN MJ, FULLER DS, HOYME HE, ROBINSON LK, KHAOLE N, JACOBSON JL. Impaired eyeblink conditioning in children with fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 2008; 32: 365-372.
- JANG MH, LEE MH, KIM H, LEE SJ, SIM YJ, KIM CJ, PARK SK, KIM J, KIM EH. Maternal alcohol administration suppresses expression of nitric oxide synthase in the hippocampus of offspring rats. *J Pharmacol Sci* 2005; 98: 459-462.
- JIE XL, JIN GW, CHENG JP, WANG WH, LU J, QU LY. Consumption of mercury-contaminated rice induces oxidative stress and free radical aggravation in rats. *Biomed Environ Sci* 2007; 20: 84-89.
- JIRIKOWIC T, KARTIN D, OLSON HC. Children with fetal alcohol spectrum disorders: a descriptive profile of adaptive function. *Can J Occup Ther* 2008; 75: 238-248.
- KAL BI, EVCIN O, DUNDAR N, TEZEL H, UNAL I. An unusual case of immediate hypersensitivity reaction associated with an amalgam restoration. *Br Dent J* 2008; 205: 547-550.
- KALUEFF AV, WHEATON M, MURPHY DL. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behav Brain Res* 2007; 179: 1-18.
- KELM MK, CRISWELL HE, BREESE GR. Calcium release from presynaptic internal stores is required for ethanol to increase spontaneous gamma-aminobutyric acid release onto cerebellum Purkinje neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 323: 356-364.
- KHALSA JH, TREISMAN G, MCCANCE-KATZ E, TEDALDI E. Medical consequences of drug abuse and co-occurring infections: research at the National Institute on Drug Abuse. *Subst Abus* 2008; 29: 5-16.
- KIM CY, NAKAI K, KASANUMA Y, SATOH H. Comparison of neurobehavioral changes in three inbred strains of mice prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicol Terat* 2000; 22: 397-403.

- KIM SH, PRICE MT, OLNEY JW, FARBER NB. Excessive cerebrocortical release of acetylcholine induced by NMDA antagonists is reduced by gabaergic and α 2-adrenergic agonists. *Psychiatry* 1999; 4: 344-352.
- KNOBELOCH L, ANDERSON HA, IMM P, PETERS D, SMITH A. Fish consumption, advisory awareness, and hair mercury levels among women of childbearing age. *Environ Res* 2005; 97: 220-227.
- KNOPIK VS, JACOB T, HABER JR, SWENSON LP, HOWELL DN. Paternal alcoholism and offspring ADHD problems: a children of twins design. *Twin Res Hum Genet* 2009; 12: 53-62.
- KNOWLTON BJ, MANGELS JA, SQUIRE LR. A neostriatal habit learning system in humans. *Science* 1996; 273: 1353-1354.
- KUNIMOTO M. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; 204: 310-317.
- KUO TC, HUANG CI, LIN-SHIAU SY. Methylmercury inhibits nitric oxide production mediated by Ca(2+) overload and protein kinase A activation. *Toxicology* 2002; 176: 113-122.
- LACERDA LD, SOUZA M, RIBEIRO MG. The effects of land use change on mercury distribution in soils of Alta Floresta, Southern Amazon. *Environm Poll* 2004; 129: 247-255.
- LANDMARK K, AURSNEIS I. Mercury, fish, fish oil and the risk of cardiovascular disease. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2004; 124: 198-200.
- LAPIZ-BLUHM MD, BONDI CO, DOYEN J, RODRIGUEZ GA, BÉDARD-ARANA T, MORILAK DA. Behavioural assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 1115-1137.
- LI P, FENG X, QIU G, SHANG L, LI G. Human hair mercury levels in the Wanshan mercury mining area, Guizhou Province, China. *Environ Geochem Health* 2009. [Epub ahead of print]
- LIMKE TL, OTERO-MONTANEZ JKL, ATCHISON WD. Evidence for interactions between intracellular calcium stores during methylmercury-induced intracellular calcium dysregulation in rat cerebellar granule neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 949-958.
- LOBO IA, HARRIS RA. GABA(A) receptors and alcohol. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90: 90-94.
- LOMBARDO KA, HERRINGA RJ, BALACHANDRAN JS, HSU DT, BAKSHI VP, ROSEBOOM PH, KALIN NH. Effects of acute and repeated restraint stress on corticotropin-releasing hormone binding protein mRNA in rat amygdala and dorsal hippocampus. *Neurosci Lett* 2001; 302: 81-84.
- LOVINGER DM, WHITE G, WEIGHT FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 1989; 243: 1721-1724.

- MAIA CSF, LUCENA GMRS, CORRÊA PBF, SERRA RB, MATOS RWM, MENEZES FC, SANTOS SN, SOUSA JB, COSTA ET, FERREIRA VMM. Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. *Neurotoxicology* 2009; 30: 23-30.
- MAIER SE, WEST JR. Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. *Alcohol* 2001; 23: 49-57.
- MANSOURI A, SABINE AMSELLEM CD, PESSAYRE D, FROMENTY B. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 737-743.
- MARGRET CP, LI CX, ELBERGER AJ, MATTA SG, CHAPPELL TD, WATERS RS. Prenatal alcohol exposure alters the size, but not the pattern, of the whisker representation in neonatal rat barrel cortex. *Exp Brain Res* 2005; 165: 167-178.
- MARLETTA MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78: 927-930.
- MARTÍNEZ I, QUIRARTE GL, DÍAZ-CINTRA S, QUIROZ C, PRADO-ALCALÁ. RA. Effects of lesions of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiology* 2002; 46: 97-103.
- MARTY MS, ATCHISON WD. Pathways mediating Ca²⁺ entry in rat cerebellar Granule cells following *in vitro* exposure to methyl mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 7: 319-330.
- MATHEWS T, FISHER NS. Evaluating the trophic transfer of cadmium, polonium, and methylmercury in an estuarine food chain. *Environ Toxicol Chem* 2008; 27: 1093-1101.
- MATSUMOTO H, KOYA G, TAKEUCHI T. Fetal minamata disease. A neuropathological study of two cases of intrauterine intoxication by a methyl mercury compound. *J Neuropathol Exp Neurol* 1964; 24: 563-574.
- MCGAUGH JL. Time-dependent processes in memory storage. *Science* 1966; 153: 1351-1358.
- MCNEIL SI, BHATNAGAR MK, TURNER CJ. Combined toxicity of ethanol and methylmercury in rat. *Toxicology* 1988; 53: 345-363.
- MIKI T, YOKOYAMA T, SUMITANI K, KUSAKA T, WARITA K, MATSUMOTO Y, WANG ZY, WILCE PA, BEDI KS, ITOH S, TAKEUCHI Y. Ethanol neurotoxicity and dentate gyrus development. *Congenit Anom (Kyoto)* 2008; 48: 110-117.
- MILOTOVA M, RILJAK V, BORTELOVA J, MARESOVA D, POKORNY J, LANGMEIER M. Changes of hippocampal neurons after perinatal exposure to ethanol. *Physiol Res* 2008; 57: 275-282.
- MITCHELL JJ, PAIVA M, HEATON MB. Effect of neonatal ethanol exposure on parvalbumin-expressing GABAergic neurons of the rat medial septum and cingulate cortex. *Alcohol* 2000; 21: 49-57.
- MIURA K, IMURA N. Mechanisms of methylmercury cytotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 1987; 18: 161-188.

- MIURA K, KOIDE N, HIMENO S, NAKAGAWA L, IMURA N. The involvement of microtubular disruption in methylmercury-induced apoptosis in neuronal and non-neuronal cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 160: 279-288.
- MOMINO W, SANSEVERINO MT, SCHÜLER-FACCINI L. Prenatal alcohol exposure as a risk factor for dysfunctional behaviors: the role of the pediatrician. *J. Pediatr. (Rio J)* 2008; 84: S76-79.
- MONSEN RB. Prevention is best for fetal alcohol syndrome. *J Pediatr Nurs* 2009; 24: 60-61.
- MONTGOMERY KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol* 1955; 48: 254-260.
- MONZÓN ME, VARAS MM, DE BARIOGLIO SR. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in the rat brain. *Peptides* 2001; 22: 1043-1047.
- MULHOLLAND PJ, CARPENTER-HYLAND EP, WOODWARD JJ, CHANDLER J. Ethanol disrupts NMDA receptor and astroglial EAAT2 modulation of Kv2.1 potassium channels in hippocampus. *Alcohol* 2009; 43: 45-50.
- MUTKUS L, ASCHNER JL, SYVERSEN T, ASCHNER M. Methylmercury alters the in vitro uptake of glutamate in GLAST- and GLT-1-transfected mutant CHO-K1 cells. *Biol Trace Elem Res* 2005; 107: 231-245.
- MYREN M, MOSE T, MATHIESEN L, KNUDSEN LE. The human placenta--an alternative for studying foetal exposure. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 1332-1340.
- MYSLIVECEK J. Inhibitory learning and memory in newborn rats. *Prog Neurobiol* 1997; 53: 399-430.
- NASCIMENTO HÄCKL LP, CAROBREZ AP. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. *Neurobiol Learn Mem* 2007; 88: 177-185.
- NATHAN C, XIE QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78: 915-918.
- NAYAK RB, MURTHY P. Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Indian Pediatr* 2008; 45: 977-983.
- NEESE S, LA GRANGE L, TRUJILLO E, ROMERO D. The effects of ethanol and silymarin treatment during gestation on spatial working memory. *BMC Complement Altern Med* 2004; 4: 4.
- NICCOLS A. Fetal alcohol syndrome and the developing socio-emotional brain. *Brain Cogn* 2007; 65: 135-142.
- OHMIYA Y, NAKAI K. Effect of methylmercury on the ethanol elimination from the blood and the activity of alcohol dehydrogenase. *Jpn J Pharmacol* 1977; 27: 545-551.
- OKVA K, LANG A, POKK P, VÄLI M, NEVALAINEN T. Litter has an effect on the behavioural changes caused by the administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine and ethanol in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28: 1171-1179.

- OMATA S, HIRAKAWA E, DAIMAON Y, UCHIYAMA M, NAKASHITA H, HORIGOME T, SUGANO I, SUGANO H. Methylmercury induced changes in the activities of neurotransmitter enzymes in nervous tissue of the rat. *Arch Toxicol* 1982; 51: 285-294.
- ONISHCHENKO N, TAMM C, VAHTER M, HÖKFELT T, JOHNSON JA, JOHNSON DA, CECCATELLI S. Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice. *Toxicol Sci* 2007; 97: 428-437.
- ORRENIUS S, NICOTERA P. The calcium ion and cell death. *J Neural Transm* 1994; 43: 1-11.
- PAPP A, PECZE L, VEZER T. Acute effects of lead, mercury and manganese on the central and peripheral nervous system in rats in combination with alcohol exposure. *Arh Hig Rada Toksikol* 2005; 56: 241-248.
- PINHEIRO MC, MACCHI BM, VIEIRA JL, OIKAWA T, AMORAS WW, GUIMARÃES GA, COSTA CA, CRESPO-LÓPEZ ME, HERCULANO AM, SILVEIRA LC, DO NASCIMENTO JL. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon. *Environ Res* 2008; 107: 53-59.
- POHORECKY LA. Psychosocial stress and chronic ethanol ingestion in male rats: effects on elevated plus maze behavior and ultrasonic vocalizations. *Physiol Behav* 2008; 94: 432-447.
- POLLARD I. Neuropharmacology of drugs and alcohol in mother and fetus. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12: 106-113.
- RASMUSSEN SA, ERICKSON JD, REEF SE, ROSS DS. Teratology: From science to birth defects prevention. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009; 85: 82-92.
- REZAYAT M, NIASARI H, AHMADI S, PARSAEI L, ZARRINDAST M. N-methyl-D-aspartate receptors are involved in lithium-induced state-dependent learning in mice. *J Psychopharmacol* 2009. [Epub ahead of print]
- RICHMOND MA, YEE BK, POUZET B, VEENMAN L, RAWLINS JNP, FELDON J, BANNERMAN DM. Dissociating context and space within the hippocampus: Effects of complete, dorsal, ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. *Behav Neurosci* 1999; 113: 1189-1203.
- ROEMER L, ORSILLO SM. An Open Trial of an Acceptance-Based Behavior Therapy for Generalized Anxiety Disorder. *Behav Ther* 2007; 38: 72-85.
- RÓNAI AZ, GYIRES K, BARNA I, MULLNER K, REICHART A, PALKOVITS M. Gyrus cinguli transaction abolishes delta-opioid receptor-induced gastroprotection and alters alpha 2 adrenoceptor activity in the lower brainstem in rats. *Brain Res* 2002; 947: 90-99.
- ROSSETTI ZL, CRESPI F. Inhibition of nitric oxide release in vivo by ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 1746-1751.
- RUMBEIHA WK, GENTRY PA, BHATNAGAR MK. The effects of administering methylmercury in combination with ethanol in the rat. *Vet Hum Toxicol* 1992; 34: 21-25.

- RUMBEIHA WK, YAMASHIRO S, BHATNAGAR MK. The renal histology and ultrastructure in rats given methylmercury and ethanol in combination. *Vet Hum Toxicol* 1991; 33: 539-544.
- RYGULA R, ABUMARIA N, HAVEMANN-REINECKE U, RÜTHER E, HIEMKE C, ZERNIG G, FUCHS E, FLÜGGE G. Pharmacological validation of a chronic social stress model of depression in rats: effects of reboxetine, haloperidol and diazepam. *Behav Pharmacol* 2008; 19: 183-196.
- SANCHIS C, ARAGÓN CM. What we drink when we drink? The role of the acetaldehyde in the alcohol consumption. *Adicciones* 2007; 19: 5-11.
- SANDERSON JL, DONALD PARTRIDGE L, FERNANDO VALENZUELA C. Modulation of GABAergic and glutamatergic transmission by ethanol in the developing neocortex: An in vitro test of the excessive inhibition hypothesis of fetal alcohol spectrum disorder. *Neuropharmacology* 2009; 56: 541-555.
- SANO K, SHIMOJO N, YAMAGUCHI S. Effects of methylmercury on ethanol-induced sleeping time of mice. *Nippon Eis Zass* 1990; 45: 717-722.
- SANSON LT, CAROBREZ AP. Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T-maze model of anxiety. *Behav Brain Res* 1999; 101: 59-64.
- SCHERER-SINGLER U, VINCENT SR, KIMURA H, MCGEER EG. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods* 1983; 9: 229-234.
- SCHUCKIT MA. Alcohol-use disorders. *Lancet* 2009; 373: 492-501.
- SHUTOH F, OHKI M, KITAZAWA H, ITOHARA S, NAGAO S. Memory trace of motor learning shifts transsynaptically from cerebellar cortex to nuclei for consolidation. *Neuroscience* 2006; 139: 767-777.
- SILBERGELD EK, NASH D, TREVANT C, STRICKLAND GT, SOUZA JM, SILVA RSU. Mercury exposure and malaria prevalence among gold miners in Pará, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 421-429.
- SINGH AK, GUPTA S, JIANG Y, YOUNUS M, RAMZAN M. In vitro Neurogenesis from Neural Progenitor Cells Isolated from the Hippocampus Region of the Brain of Adult Rats Exposed to Ethanol during Early Development through Their Alcohol-Drinking Mothers. *Alcohol Alcohol* 2009 [Epub ahead of print].
- SOUTHAM E, GARTHWAITE J. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. *Neuropharmacology* 1993; 32: 1267-1277.
- SROGI K. Mercury content of hair in different populations relative to fish consumption. *Rev Environ Contam Toxicol* 2007; 189: 107-130.
- STERN AH. A review of the studies of the cardiovascular health effects of methylmercury with consideration of their suitability for risk assessment. *Environ Res* 2005; 98: 133-142.

- STERN CA, CAROBREZ AP, BERTOGLIO LJ. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90: 545-550.
- STRINGARI J, MEOTTI FC, SOUZA DO, SANTOS AR, FARINA M. Postnatal methylmercury exposure induces hyperlocomotor activity and cerebellar oxidative stress in mice: dependence on the neurodevelopmental period. *Neurochem Res* 2006; 31: 563-569.
- SUYAMA S, TAKANO E, IWASAKI Y, NAKATA M, YADA T. [Roles and functional interplay of the gut, brain stem, hypothalamus and limbic system in regulation of feeding]. *Nippon Rinsho* 2009; 67: 277-286.
- SUSSWEIN AJ, KATZOFF A, MILLER N, HURWITZ I. Nitric oxide and memory. *Neuroscientist* 2004; 10: 153-162.
- TAKAGI N, LOGAN R, TEVES L, WALLACE M, GURD JW. Altered interaction between PSD-95 and the NMDA receptor following transient global ischemia. *J Neurochem* 2000; 74:169-178.
- TAKAHASHI RN, PAMPLONA FA, FERNANDES MS. The cannabinoid antagonist SR 141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci Lett* 2005; 380: 270-275.
- TAKAOKA S, KAWAKAMI Y, FUJINO T, OH-ISHI F, MOTOKURA F, KUMAGAI Y, MIYAOKA T. Somatosensory disturbance by methylmercury exposure. *Environ Res* 2008; 107: 6-19.
- TAKEUCHI T, ETO K. A Tragic Story of Water Pollution. In: *The Pathology of Minamata Disease*, Kyushu University Press, Fukuoka, 1999; 51-174.
- TAMASHIRO H, ARAKAKI M, AKAGI H, MURAO K, HIRAYAMA K, SMOLENSKY MH. Effects of ethanol on methyl mercury toxicity in rats. *J Toxicol Environ Health* 1986; 18: 595-605.
- TOBAMIDANIK L, ZABKIEWICZ D. Indicators of sense of coherence and alcohol consumption-related problems: the 2000 U.S. National alcohol survey. *Subst. Use Misuse* 2009; 44: 357-373.
- TREIT D, MENARD J, ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 44: 463-469.
- TRIVEDI MA, COOVER GD. Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. *Neurobiol Learn Mem* 2004; 81: 172-184.
- TSUZUKI Y. Effects of chronic methylmercury exposure on activities of neurotransmitter enzymes in rat cerebellum. *Toxicol Applied Pharmacol* 1981; 60: 379-381.
- TURNER CJ, BHATNAGAR MK, SPEISKY H. Effect of subchronic administration of ethanol and methylmercury in combination on the tissue distribution of mercury in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1990; 68: 1558-1562.
- TURNER CJ, BHATNAGAR MK, YAMASHIRO S. Ethanol potentiation of methyl mercury toxicity: a preliminary report. *J Toxicol Environ Health* 1981; 7: 665-668.

- UHART M, WAND GS. Stress, alcohol and drug interaction: an update of human research. *Addict Biol* 2009; 14: 43-64.
- VALENZUELA CF. Alcohol and neurotransmitter interactions. *Alcohol Health Res World* 1997; 21: 144-148.
- VAS J, MONESTIER M. Immunology of mercury. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 240-267.
- VENGELIENE V, BILBAO A, MOLANDER A, SPANAGEL R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 299-315.
- VIANA MB, TOMAZ C, GRAEFF FG. The elevated T-maze: an animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 49: 549-554.
- VOLKE V, SOOSAAR A, KOKS S, VASAR E, MANNISTO PT. L-Arginine abolishes the anxiolytic-like effect of diazepam in the elevated plus-maze test in rats. *Eur J Pharmacol* 1998; 351: 287-290.
- WHITEHALL JS. National guidelines on alcohol use during pregnancy: a dissenting opinion. *Med J Aust* 2007; 186: 35-37.
- WICHMANN T, DELONG MR. Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 751-758.
- WILLFORD JA, RICHARDSON GA, LEECH SL, DAY NL. Verbal and visuospatial learning and memory function in children with moderate prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 497-507.
- WILLIAMS JH, ROSS L. Consequences of prenatal toxin exposure for mental health in children and adolescents: a systematic review. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2007; 16: 243-253.
- XIE GQ, WANG SJ, LI J, CUI SZ, ZHOU R, CHEN L, YUAN XR. Ethanol attenuates the HFS-induced, ERK-mediated LTP in a dose-dependent manner in rat striatum. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33: 121-128.
- YELNIK J. Modeling the organization of the basal ganglia. *Rev Neurol (Paris)* 2008; 164: 969-976.
- YOUNG C, STRAIKO MM, JOHNSON SA, CREELEY C, OLNEY JW. Ethanol causes and lithium prevents neuroapoptosis and suppression of pERK in the infant mouse brain. *Neurobiol Dis* 2008; 31: 355-360.
- YUAN Y, ATCHISON WD. Disruption by methylmercury of membrane excitability and synaptic transmission of CA1 neurons in hippocampal slices of the rat. *Toxicol Applied Pharmacol* 1993; 120: 203-215.
- YUAN Y, ATCHISON WD. Methylmercury- Induced Increase of Intracellular Ca²⁺ Increases Spontaneous Synaptic Current Frequency in Rat Cerebellar Slices. *Mol Pharmacol* 2007; 71: 1109-1121.
- ZANGROSSI H, GRAEFF FG. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new model of anxiety. *Brain Res Bull* 1997; 44: 1-5.

ZANOLI P, TRUZZI C, VENERI C, BRAGHIROLI D, BARALDI M. Methyl mercury during late gestation affects temporarily the development of cortical muscarinic receptors in rat offspring. *Pharmacol Toxicol* 1994; 75: 261-264.

ZHUO, M. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Mol Brain* 2009; 2: 4.

VIII. ANEXOS



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA - IBDB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

29 de junho de 2005.

A QUEM POSSA INTERESSAR

Declaramos que o projeto intitulado "INTERAÇÃO ÁLCOOL X METILMERCÚRIO: UM FATOR DE RISCO NA GRAVIDEZ", foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'V. Garrafa', is positioned above the printed name.

Prof. Volnei Garrafa
Presidente do CEUA