

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

MICHELLE NUNES DO AMARAL
RAFAEL LIMA KAHWAGE

INTERAÇÕES DO MERCÚRIO E ETANOL DURANTE O
DESENVOLVIMENTO CEREBRAL: IMPACTOS SOBRE MEMÓRIA E
ANSIEDADE E SUA RELAÇÃO COM A ATIVIDADE NITRÉRGICA
DO HIPOCAMPO, ESTRIADO E CEREBELO, EM RATOS ADULTOS.

Belém
2008

MICHELLE NUNES DO AMARAL
RAFAEL LIMA KAHWAGE

INTERAÇÕES DO MERCÚRIO E ETANOL DURANTE O
DESENVOLVIMENTO CEREBRAL: IMPACTOS SOBRE MEMÓRIA E
ANSIEDADE E SUA RELAÇÃO COM A ATIVIDADE NITRÉRGICA
DO HIPOCAMPO, ESTRIADO E CEREBELO, EM RATOS ADULTOS.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para obtenção do
grau em Medicina pela
Universidade Federal do Pará.

Orientador: Cristovam W.

Picanço Diniz.

Co-orientador: Cristiane Maia.

Belém
2008

MICHELLE NUNES DO AMARAL
RAFAEL LIMA KAHWAGE

INTERAÇÕES DO MERCÚRIO E ETANOL DURANTE O
DESENVOLVIMENTO CEREBRAL: IMPACTOS SOBRE MEMÓRIA E
ANSIEDADE E SUA RELAÇÃO COM A ATIVIDADE NITRÉRGICA
DO HIPOCAMPO, ESTRIADO E CEREBELO, EM RATOS ADULTOS.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para obtenção do
grau em Medicina pela
Universidade Federal do Pará.
Orientador: Cristovam W.
Picanço Diniz.
Co-orientador: Cristiane Maia.

BANCA EXAMINADORA:

1. _____
Orientador
2. _____
Nome/Instituição
3. _____
Nome/Instituição

Aprovado em: ___/___/_____

Conceito: _____

Aos meus pais, Marli e Tarciso Amaral,
pelo apoio incondicional, sem importar o tempo nem a distância.
Ao meu companheiro de todas as horas, Kelven Lopes,
pela cumplicidade e compreensão nos momentos difíceis.
Aos meus irmãos, Luciana, Jéssica, Tarciso e Pollyana,
pelo carinho e torcida nessa jornada.
Aos meus sobrinhos Stacy e Kevin,
por trazer sempre esperança e amor ao meu coração.

Michelle Nunes do Amaral

Ao meu pai, Rui Kahwage,
pelo exemplo de homem e médico dedicado.
À minha mãe, Silvia Kahwage,
pelo incentivo e apoio em todas as horas difíceis.
Às minhas irmãs Nathália e Tharuel,
pelo carinho e amizade.

Rafael Lima Kahwage

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e proteção durante esta jornada.

Ao Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz pelo seu exemplar incentivo à realização deste trabalho.

À Cristiane Maia pelo brilhante trabalho de orientação e por sua presença e paciência em todos os momentos.

À Profa. Vânia Ferreira pelo esforço proporcionado para construção desta obra e à parceria com o Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Pará.

A todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

O saber é saber que nada se sabe. Este é a definição do verdadeiro conhecimento.
(Confúcio)

RESUMO

Não há estudos detalhados sobre comportamento e atividade nitrérgica em modelos experimentais de intoxicação por metilmercúrio e etanol durante o desenvolvimento cerebral. O presente estudo examinou mudanças comportamentais e a atividade histoquímica diaforase-NADPH no hipocampo, estriado e cerebelo em proles de fêmeas de ratos grávidas intoxicadas por metilmercúrio (MeHg) e etanol (EtOH). Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Nado Forçado (NF) e Teste de Esquiva Inibitória (TEI) foram usados para examinar locomoção, ansiedade, depressão e memória. Após os testes comportamentais, cérebros com 2 meses de idade foram processados para histoquímica NADPH-d e avaliados segundo densitometria da neurópila do hipocampo, estriado e cerebelo. As fêmeas de ratos receberam 22,5% p/v (6,5g/Kg por dia, por gavagem) durante o período de gestação até o 21º dia pós-natal. No 15º dia de gestação, receberam 8mg/Kg de MeHg. Grupos experimentais de *EtOH* e *MeHg* reduziram a frequência e o tempo gasto nos braços abertos em LCE. *MeHg* aumentou a atividade locomotora e a imobilidade no teste do NF; ao mesmo passo que *EtOH+MeHg* mostrou uma maior redução na frequência e no tempo gasto nos braços abertos no teste de LCE e maior latência no TEI. A atividade nitrérgica no giro denteado foi reduzida na camada polimórfica do *MeHg*, mas aumentou no *EtOH* nas camadas polimórfica e molecular do giro denteado e na camada lacunoso molecular do CA1. A atividade nitrérgica aumentou em todos os segmentos estriatais do *EtOH* e apenas na região anterior de *EtOH+MeHg*, mas demonstrou-se reduzida na maioria das regiões estriatais de *MeHg*.

Palavras-chave: intoxicação, gravidez, testes comportamentais, atividade nitrérgica.

ABSTRACT

Behavior and nitrenergic activity in experimental models of combined methyl mercury and ethanol intoxication during brain development has not been studied in detail. The present study examined behavioral changes and NADPH-diaphorase histochemical activity in the hippocampus, cerebellum and striatum, resulting from ethanol (EtOH) and methyl mercury (MeHg) intoxication of pregnant female rat offspring. Open field (OF), elevated plus maze (EPM), forced swim (FS), and inhibitory avoidance tests (IA), were used to examine locomotion, anxiety, depression and memory. After behavioral tests brains of 2 months old subjects were processed for NADPH-d histochemistry and densitometry of the neuropil of the hippocampus, striatum and cerebellum. Female rats were given EtOH 22.5% w/v (6.5 g/kg per day, by gavages) during the gestational period until the 21st post-natal day. At day 15th of pregnancy, they received 8 mg/kg of MeHg. *EtOH* and *MeHg* experimental groups reduced the frequency and time spent in the open arms in the EPM test. *MeHg* increased locomotor activity and immobility at FS test, whereas *EtOH+MeHg* showed a greater reduction in the frequency and time spent in the open arm at EPM and smaller latency in the IA trials. Dentate gyrus nitrenergic activity was reduced in the polymorphic layer of the *MeHg*, but increased in *EtOH* in both polymorphic and molecular layer of dentate gyrus and in the lacunosum molecular of CA1. Nitrenergic activity was increased in all striatal segments of *EtOH*, in the anterior region in *EtOH+MeHg* but reduced in most regions of the striatum in the *Hg*.

Key-words: intoxication, pregnancy, behavior tests, nitrenergic activity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 OBJETIVOS.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 ÁLCOOL, METILMERCÚRIO E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO.....	12
2.2 ATIVIDADE NITRÉRGICA, NEURODEGENERAÇÃO E INTERAÇÃO ÁLCOOL E MEHG.....	16
3. MATERIAL E MÉTODO.....	20
3.1 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	21
3.2 PERFUSÃO E PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS	23
3.3 ATIVIDADE HISTOQUÍMICA EM HIPOCAMPO, ESTRIADO E CEREBELO	24
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
3.5 DOSAGEM DE ETANOL E METILMERCÚRIO.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1 CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E METILMERCÚRIO.....	27
4.2 PESO CORPORAL E PESO DOS ENCÉFALOS.....	28
4.3 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	30
4.4 ATIVIDADE HISTOQUÍMICA NADPH-DIAPHORASE.....	34
5. DISCUSSÃO.....	40
5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	40
5.2 PESO CORPORAL E PESO ENCEFÁLICO.....	41
5.3 COMPORTAMENTO ANSIOSO E OXIDO NITRICO SINTASE.....	41
5.4 INTERAÇÕES ENTRE ÁLCOOL E METILMERCÚRIO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	46
7. REFERÊNCIAS.....	48
8.APÊNDICE A.....	59
9.APÊNDICE B.....	60

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia Brasileira é recortada pela atividade garimpeira que se desloca a cada nova descoberta de ouro, arrastando consigo danos ambientais de proporções ainda não completamente avaliados. É sabido que nessas regiões, o consumo de bebidas alcoólicas é elevado, assim como é grave também o problema da contaminação ambiental pelo mercúrio, utilizado na amalgamação durante o processo de extração do ouro (BISINOTI; JARDIM, 2004; BRABO et al., 2000; DOREA, 2003; HARADA et al., 2001). É evidente o risco de contaminação aguda ou crônica, através do consumo de alimentos contaminados pelo mercúrio (TAVARES et al., 2005). Portanto, mulheres grávidas que vivem nessas áreas, e que consomem bebidas alcoólicas, expõem os filhos à mortalidade na vida intrauterina ou a distúrbios do desenvolvimento incluindo alterações comportamentais futuras, tais como hiperatividade, disfunção motora, déficit de atenção e aprendizagem (COSTA et al., 2004; SATOH, 2003; LANDMARK; AURSNEs, 2004).

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) é um período crítico para a formação da circuitaria nervosa básica e é mais vulnerável à neurotoxicidade causada por substâncias neurotóxicas do que no SNC de adultos (GOODLETT et al., 2005). Neste estágio do desenvolvimento, os sistemas orgânicos incluindo os neurais crescem em tamanho e volume e se tornam maduros em relação às suas funções. Durante esta fase, a exposição a determinados neurotóxicos, como por exemplo, o etanol (EtOH) e o metilmercúrio (MeHg), pode resultar em retardos do crescimento e anormalidades estruturais cerebrais (PORSOLT, 1998) que podem ser manifestadas, entre outros aspectos, através de alterações comportamentais (BECKER et al., 1996; PELLOW, 1985) e fisiológicas (RECHTSCHAFFEN, 2002). Os efeitos podem se apresentar através de anormalidades funcionais e estruturais que caracterizam a Síndrome Alcoólica Fetal (SAF), que incluem retardo do crescimento, má formação cranio-facial e anormalidades do SNC (JONES; SMITH, 1973; JONES; SMITH, 1975). Essa síndrome pode produzir permanentes déficits neuropsicológicos em humanos e em modelos experimentais e a severidade destas manifestações é dependente do tempo de exposição, da quantidade de álcool ingerido pela mãe, do genótipo e de fatores de desenvolvimento intrínsecos (OLSON et al., 1998;

PONNAPPA; RUBIN, 2000; STROMLAND; PINAZO-DURAN, 2002; SULIK, 2005). É bem conhecido que a exposição aguda e crônica ao etanol (EtOH) resulta em diferentes respostas fisiológicas e comportamentais, em experimentos em animais e humanos (STREISSGUTH et al., 1980; STREISSGUTH et al., 1991; MACHO et al., 2003). Em ratos e humanos, a idade no desenvolvimento de embriões ou fetos pode ser comparada entre si, com ênfase na fase de desenvolvimento rápido, onde neurônios e glia nas duas espécies são similares na aparência, ainda que as suas exatas idades cronológicas sejam diferentes (BAYER et al., 1993).

Portanto, o entendimento dos efeitos deletérios centrais de curta ou longa duração resultantes de qualquer interferência no desenvolvimento cerebral, requer não somente conhecimento de sua natureza, mas também do órgão ou região no momento em que este sofre a agressão (RODIER, 1980).

Além da importância direta da ação tóxica do EtOH e do MeHg para a saúde humana, os compostos mercuriais possuem grande habilidade de atravessar facilmente as membranas plasmática, encefálica e placentária, e acumular-se em tecidos específicos, gerando intoxicações no SNC, rins, fígado, baço, coração, cabelos, unhas e ossos dos recém-nascidos (AZEVEDO, 2003; STERN, 2005).

Muito embora a toxicidade desses dois compostos isolados seja relativamente bem estudada, a interação entre EtOH e MeHg ainda não é bem entendida, principalmente quanto aos seus efeitos combinados sobre o SNC. Neste estudo analisa-se em particular as ações deletérias sobre a atividade das enzimas de síntese do óxido nítrico, um neuromodulador com impacto direto sobre o desenvolvimento e a plasticidade neural.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Investigar possíveis alterações comportamentais e das enzimas de síntese do óxido nítrico em ratos adultos que foram submetidos simultaneamente à intoxicação pelo etanol e pelo metilmercúrio durante o período perinatal.

1.1.2 Específicos

- Investigar possíveis efeitos comportamentais nos testes de campo aberto (atividade locomotora), labirinto em cruz elevado, nado forçado e esquiva inibitória de ratos adultos submetidos à intoxicação alcoólica e mercurial no período perinatal.
- Investigar possíveis efeitos sobre a atividade NADPH-diaforásica no hipocampo, giro denteado, cerebelo e estriado dos ratos submetidos à contaminação aos dois neurotóxicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÁLCOOL, METILMERCÚRIO E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO

Há algum tempo está estabelecido que o padrão de formação sináptica entre axônios em crescimento e seus alvos são dependentes da estabilização das conexões sinápticas e estas últimas estão relacionadas à ativação dos circuitos que as contém. A ausência de tal ativação pode ser fatal para essas conexões impedindo sua estabilização (PURVES et al., 2000).

O impacto do álcool sobre tais conexões relacionadas à Síndrome Alcoólica Fetal é de extrema importância para compreensão da fisiopatologia da neurointoxicação relacionada. Anomalias do desenvolvimento do sistema nervoso associada à exposição materna ao álcool têm sido extensivamente estudadas usando modelos animais.

Os sítios-alvos principais da toxicidade do etanol no sistema nervoso central (SNC) são os núcleos da base, o cerebelo e o hipocampo (MATTSON et al, 2001).

No hipocampo, estudos neuroanatômicos têm mostrado redução no número de neurônios, diminuição da densidade de espinhas dendríticas, e diminuição da resposta plástica normalmente aumentada após enriquecimento ambiental (BERMAN; HANNIGAN, 2000; MIKI et al., 2003). A exposição crônica pré-natal ao álcool diminui o número de células piramidais do hipocampo (região CA1) em porcos-da-índia jovens (GIBSON et al., 2000) e adultos (ABDOLLAH et al., 1993).

Com relação ao metabolismo dopaminérgico do estriado, a injeção pré-natal de etanol no oitavo dia, reduz a liberação de dopamina e aumenta a sensibilidade dos receptores pós-sinápticos de dopamina. (FULGINITI et al., 1994).

No cerebelo, a exposição pré-natal ao etanol inibe a neurogênese durante o desenvolvimento, afetando a expressão das maquinarias de síntese do ciclo celular no período pós-natal (ELFERING et al., 2002).

No que concerne às sintases do óxido nítrico (SON), de interesse para o presente trabalho, a ativação dos receptores do NMDA parece desempenhar um papel importante na regulação da sobrevivência neuronal, no crescimento dendrítico e axonal, na plasticidade sináptica e sinaptogênese no hipocampo. (REYNOLDS; BRIEN, 1995; KIMURA et al., 2000). A atividade enzimática da sintase de óxido nítrico está presente e aumentada durante a vida fetal, alcançando atividade máxima durante a vida pós-natal recente, e que persiste durante a fase adulta (KIMURA et al., 1999).

O etanol afeta fisiologicamente e patologicamente os eventos cerebrais mediados pela SON-n (sintase do óxido nítrico neuronal) através da inibição da atividade do receptor do NMDA, associado à redução do influxo de cálcio e posterior redução da atividade da SON-n cálcio-calmodulina dependente (DAVIS; SYAPIN, 2005). Os efeitos neurotóxicos da exposição crônica pré-natal ao etanol associados às mudanças na SON-n podem promover mudança transitória ou permanente da atividade da SON-n, dependente do período de vida, da região cerebral e das doses deste neurotóxico (KIMURA et al., 2000; PHILLIPS et al., 2000; NAASSILA et al., 2003; JANG et al., 2005).

É possível também que um dos mecanismos de toxicidade do EtOH esteja associado à geração de espécies reativas do oxigênio (EROS) e outros radicais livres que são gerados durante o seu metabolismo, causando peroxidação de lipídios por estresse oxidativo, no fígado, cérebro, coração e músculos esqueléticos (ADACHI et al., 2000; CALABRESE et al., 1998; MANSOURI et al., 2001).

Por outro lado o MeHg igualmente afeta de forma violenta o sistema nervoso em desenvolvimento. Humanos expostos a altas concentrações de metilmercúrio durante a gestação apresentam déficits neuropsicológicos pós-natais, incluindo déficits de linguagem, atenção, memória, distúrbios motores e visuo-espaciais. (ETO, 2000; COSTA et al., 2004; DAVIDSON et al., 2004). A análise sistemática desses dados tem mostrado que o SNC em desenvolvimento no período pré-natal é consideravelmente mais sensível aos efeitos tóxicos

do MeHg que os cérebros maduros (CLARKSON; STRAIN, 2003; DAVIDSON et al., 2004).

De acordo com Bertossi e cols. (2004), o 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. A interferência observada do MeHg no movimento neuronal e na diferenciação celular, pode ser resultado do impedimento da repolarização e formação dos microtúbulos (CASTOLDI et al., 2001; CLARKSON, 1993; WHO, 1990). Os efeitos na migração neuronal em culturas de células revelam cessação do movimento celular a partir da concentração 10 μMol de MeHg (COSTA et al., 2004). Vários são os alvos celulares e moleculares da exposição ao MeHg no sistema nervoso, incluindo barreira hematoencefálica; citoesqueleto; transporte axonal; produção, secreção, captação e metabolismo dos neurotransmissores; sinalização celular; síntese de proteínas, DNA e RNA; sistemas respiratórios e geração de energia (COUNTER; BUCHANAN, 2004; SHAFER et al., 2002).

Os efeitos moleculares da intoxicação pelo MeHg incluem distúrbios na homeostase do cálcio relacionado ao acúmulo intracelular (YUAN; ATCHINSON, 2007), formação de radicais livres, danos ao sistema de microtúbulos e inibição competitiva do sistema muscarínico colinérgico, danos na produção de receptores dopaminérgicos em cérebros de ratos adultos, assim como induzem a elevação dos níveis de óxido nítrico e glutamato no espaço extracelular (CASTOLDI et al., 2001).

Um dos efeitos primários do MeHg sobre a transmissão sináptica é o aumento, seguido de diminuição, da liberação de neurotransmissor, assim como da liberação provocada pelo impulso nervoso (JUANG; YONEMURA, 1975; YUAN; ATCHISON, 1993). A diminuição provocada pela liberação de neurotransmissor tem sido associada à redução da quantidade disponível para a liberação (ATCHISON; NARAHASHI, 1982), ao bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem que controlam a exocitose das vesículas sinápticas e à diminuição da excitabilidade da membrana neuronal (HARE; ATCHISON, 1992; SHAFER; ATCHISON, 1989).

O aumento da liberação espontânea de neurotransmissor, observado no início da exposição ao MeHg, parece depender do aumento da concentração intracelular de cálcio, a

partir da liberação deste íon por organelas intracelulares e não apenas pela sua entrada através da membrana plasmática, uma vez que o aumento da concentração extracelular de cálcio e o bloqueio dos canais de cálcio da membrana plasmática não previnem completamente esse efeito (ATCHISON, 1986; ATCHISON; NARAHASHI, 1982; MIYAMOTO, 1983).

O MeHg também inibe a recaptção do neurotransmissor ou de seus precursores pelo botão sináptico (LEVESQUE et al., 1992; O'KURSKY, 1989). Este efeito parece ser devido ao comprometimento da bomba de Na^+/K^+ ATPase e, portanto, à diminuição do gradiente eletroquímico criado por esta enzima, necessário ao funcionamento dos transportadores de neurotransmissores da membrana plasmática (RAJANNA; HOBSON, 1985). Em ratos adultos o MeHg se acumula nos astrócitos, interferindo na captação de glutamato, resultando em altas concentrações do neurotransmissor no meio extracelular perturbando a homeostase neuronal (COSTA et al., 2004; JUAREZ et al., 2005).

É bem conhecido que os astrócitos têm um papel ativo no desenvolvimento e função do SNC, que por haver a presença de junções do tipo gap, há um trabalho funcional que mantém a composição fisiológica do fluido extracelular que, entre outras funções, preserva os neurônios da excitotoxicidade mediada pelo glutamato, que tem sua recaptção inibida pelo MeHg (JUAREZ et al., 2005). A redução de astrócitos diante da contaminação pelo MeHg, pode ser resultante mais do prejuízo de suas células percussoras, do que da degeneração da astróglia. (ASCHNER; KIMELBERG, 1996; BARRES; BARDE, 2000; RANSOM et al., 2003).

Além disso, sabe-se que o MeHg também afeta a transmissão sináptica através do comprometimento funcional das enzimas de síntese de neurotransmissores (OMATA et al., 1982; TSUZUKI, 1981). Esta resposta deve-se à sua grande afinidade por ligantes contendo grupos tióis, com subsequente inativação das enzimas com grupos sulfidril, comprometendo o metabolismo celular, a síntese de neurotransmissores, a transmissão sináptica, a homeostase de íons e a síntese protéica, assim como todos os fenômenos dependentes de enzimas alvos deste neurotóxico (ATCHINSON; HARE, 1994; FELDMAN, 1999).

Finalmente, em modelos animais, tem sido demonstrado que elevados níveis de óxido nítrico relacionado à ativação de receptores NMDA e atividade da SON-n cálcio-calmodulina dependente pode estar relacionado ao importante papel no processo de degeneração

ocasionada pela intoxicação pelo metilmercúrio (YAMASHITA et al., 1997). A reação do óxido nítrico com ânions superóxido, metais ou grupos sulfidrílicos, produz uma variedade de produtos secundários que inclui peroxinitrito, que é um componente ativo do estresse oxidativo (KIM et al., 2002). Óxido nítrico (ON) em níveis fisiológicos parece desempenhar um papel-chave na plasticidade sináptica, no potencial de longa duração (LTP) e na depressão de longa duração (LTD) e esses eventos eletrofisiológicos estão relacionadas com a aprendizagem e memória. Estes mecanismos parecem ser dependentes de óxido nítrico no estriado, cerebelo e hipocampo (DANIEL et al., 1993; DANIEL et al., 1998; HAWKINS et al., 1998; CALABRESI et al., 2000; BON; GARTHWAITE, 2003; SUSSWEIN et al., 2004).

Apesar das fortes evidências da neurotoxicidade, os mecanismos pelos quais os danos ao SNC ocorrem permanecem por ser elucidados em detalhes. Tomados em conjunto, os dados sugerem, entretanto, que tanto o metilmercúrio quanto o etanol de forma isolada afetam as enzimas de síntese do óxido nítrico, tornando-se interessante investigar de que forma a ação combinada desses neurotóxicos durante o neurodesenvolvimento, poderia afetar o comportamento e a morfologia de algumas estruturas do SNC na fase adulta.

2.2 ATIVIDADE NITRÉRGICA, NEURODEGENERAÇÃO E INTERAÇÃO ÁLCOOL E MEHG

Estudos anteriores da atividade nitrérgica demonstraram níveis alterados das enzimas de síntese do óxido nítrico (ON) em doenças neurodegenerativas. Uma das hipóteses que se tem investigado é de que os efeitos neurotóxicos sejam conseqüências da geração excessiva de radicais livres (MONCADA; BOLANOS, 2006). O ON reage com ânions superóxidos para formar peroxinitrito através da cascata peroxinitrito/poli-ADP-ribose (ELIASSON et al., 1999; SZABO et al., 1996). O peroxinitrito produzido através da síntese descontrolada de ON também afeta o fluxo sanguíneo cerebral produzindo vasoconstrição ou bloqueio das reações vasomotoras (SZABO et al., 1996). O ON pode produzir nitrosilação de uma variedade de proteínas, inibindo a fosforilação e a via glicolítica comprometendo a produção de energia celular (BARANANO; SNYDER, 2001). O ON age como mensageiro retrógrado induzindo liberação de glutamato em terminais pré-sinápticos induzindo a uma retroalimentação positiva

para excitotoxicidade. A excessiva liberação de ON especialmente em resposta à ativação do receptor de NMDA pode levar a morte neuronal sob condições neurotóxicas.

A família de enzimas denominadas Sintases do Óxido Nítrico (SON), é responsável pela síntese estequiométrica de citrulina e ON a partir da L-arginina em uma reação que é dependente de NADPH (ALDERTON et al., 2001; BREDT et al., 1991; LOWENSTEIN e SNYDER, 1992). Foram descritas três diferentes isoformas nessa família a forma constitutiva neuronal (SONn) a forma induzida imunológica (SONi) e a forma constitutiva endotelial (SONe). Enquanto a SON imunológica é independente de cálcio, as outras duas enzimas são dependentes deste íon. A forma imunológica das sintases ocorre em níveis fisiológicos muito baixos, mas é induzida fortemente diante de um quadro infeccioso. A SON neuronal é encontrada sobretudo nos dendritos e no soma dos interneurônios, mas também nos terminais axonais de projeções corticais ou sub-corticais. A SON imunológica é encontrada, sobretudo em macrófagos, mas também em outras células. A SON endotelial principalmente nas células endoteliais (ALDERTON et al., 2001).

A NADPH diaforase tem sido caracterizada bioquimicamente e imunohistoquimicamente como uma sintase do óxido nítrico (BREDT; SNYDER, 1989; DAWSON et al., 1991; HOPE et al., 1991). Faber-Zuschratter (FABER-ZUSCHRATTER et al., 1996) demonstrou em estudos que a NADPH diaforase está localizada nas membranas pré- e pós-sinápticas após a potenciação de longo prazo (LTP). O óxido nítrico é um gás livremente difusível e extremamente permeável à membrana que atua em neurotransmissores retrógrado e anterógrado (WANG et al., 2005). Em consequência dessa natureza gasosa, tentativas para localização de seu sítio de produção são mais bem sucedidas quando se tenta localizar suas enzimas sintéticas.

A degeneração neuronal causada pela exposição ao MeHg tem sido documentada como consequência de mecanismos de necrose (MIURA; IMURA, 1987; NAKADA; IMURA, 1983) e de apoptose (CASTOLDI et al., 2000; KUNIMOTO, 1994; MIURA et al., 1999). Foi observado que altas doses de MeHg (de 3 a 10 μ M) causam um rápido prejuízo da atividade mitocondrial e lise da membrana plasmática, resultando em extensiva morte necrótica. Já a exposição a baixas concentrações de MeHg (menor ou igual a 1 μ M) pode induzir morte de células granulares cerebelares por apoptose (CASTOLDI et al., 2000). Com

a perda neuronal, são observadas alterações como irritabilidade, depressão, ansiedade e dificuldade no aprendizado e na concentração (FARIA, 2003).

Dentro deste contexto, o consumo de peixes em áreas próximas à atividade garimpeira, tem sido considerado uma via importante de exposição humana ao MeHg. Concentrações elevadas, acima dos valores aceitáveis definidos pela Organização Mundial da saúde (OMS), foram documentadas em peixes da região do rio Tapajós, no estado do Pará (PINHEIRO et al., 2000). A cada 450 gramas de ouro extraídas dos rios da Amazônia, aproximadamente o dobro de mercúrio é despejado nos rios. Assim sendo, estima-se que cerca de 70 a 170 toneladas desse metal são lançados anualmente no meio ambiente, na região dos garimpos (AZEVEDO, 2003; LACERDA et al., 2004).

Estudos acerca da interação entre metilmercúrio e etanol são escassos. Em estudos realizados por Tamashiro e colaboradores (1986), 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 quanto às manifestações neurológicas e mortalidade. Além disso, essa associação levou inicialmente a um ganho, seguida de uma perda, dos pesos corporais de ratos que apresentaram intensa ataxia (TURNER et al., 1981). Os efeitos do cloreto de MeHg no metabolismo do EtOH também aparece como alvo de pesquisas. Dose diária de 10 mg/kg do cloreto de MeHg, administrado intraperitonealmente por dois dias consecutivos e 0,4 g/kg de EtOH administrado intravenosamente, 24 hs após o pré-tratamento de MeHg, mostrou que o MeHg teve pouca influência no metabolismo do EtOH devido as suas ligações não-específicas com grupo sulfidril no organismo (OHMIYA ; NAKAI, 1977).

As associações dessas substâncias também foram investigadas quanto à função e histologia renal, onde a nefrotoxicidade ficou mais evidente nos animais que receberam a associação das substâncias do que naqueles que receberam as drogas isoladas (RUMBEIHA et al., 1991, 1992). Esses resultados, entretanto, não foram observados por outros pesquisadores (TURNER et al., 1990), enquanto outros tentam entender outros aspectos dessas interações (MCNEIL et al., 1988; SANO et al., 1990).

Uma vez que o etanol e o metilmercúrio são atores neurotóxicos cuja interação é relativamente comum em garimpos na região amazônica, tornou-se interessante realizar

estudos com o intuito de tentar identificar alterações neurais (hipocampais, cerebelares e estriatais) tardias (ratos de 60 dias), induzidas pela ingestão alcoólica e pela contaminação mercurial de nutrízes, para estabelecer um modelo experimental de interesse epidemiológico. Dessa maneira, a pesquisa proposta pretende colaborar no sentido de preencher parte da carência de dados em estudos dedicados à interação etanol/metilmercúrio durante o desenvolvimento. A idéia central é investigar se há possíveis interações toxicocinéticas entre os dois elementos que alterem a função neural no hipocampo, estriado e cerebelo, gerando conseqüências cognitivas e comportamentais tardias a partir de lesões impostas durante o desenvolvimento.

3. MATERIAL E MÉTODO

Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados conforme as recomendações do Instituto Nacional de Saúde (INS - USA) tendo sido o projeto previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com animais de experimentação. Um total de 40 ratos Wistar (20 fêmeas e 20 machos) com 3 meses de idade foram doados pelo Instituto Evandro Chagas (Belém-PA, Brasil) para a realização de todo o experimento.

Após a cópula, as fêmeas foram examinadas na manhã seguinte quanto à presença de um tampão vaginal. Caso o mesmo estivesse presente, esse dia era considerado o primeiro dia da gestação.

Os animais obtiveram livre acesso à ração comercial (NUVILAB, 23% de proteínas) e à água de torneira. Os animais foram mantidos em um ciclo diário de 12 h em luz artificial e 12 h no escuro durante todo o experimento.

As fêmeas com tampões vaginais foram abrigadas individualmente e divididas em 4 grupos de tratamento: metilmercúrio (*MeHg*, n=5), etanol (*EtOH*, n=5), etanol + metilmercúrio (*EtOH+MeHg*, n=5) e controle (*C*, n=5).

Tratamento para o grupo *MeHg*: administrou-se 8mg/Kg aos ratos, em dose única oral, por gavagem no 15º dia da gestação para ambos os grupos *MeHg* e *EtOH+MeHg*.

Tratamento para o grupo *EtOH*: administrou-se 6,5g/Kg (22,5% p/v) às ratas, por gavagem, diariamente durante a gestação e lactação (21 dias da gestação e 21 dias da lactação) para ambos os grupos *EtOH* e *EtOH+MeHg*.

O grupo controle recebeu por gavagem apenas água de torneira durante o mesmo período descrito para o grupo *EtOH*.

As mães foram sacrificadas após o fim do período de lactação e as proles aos dois meses de idade.

3.1 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Após o nascimento, os filhotes foram mantidos com suas mães e foram pesados a cada cinco dias até o 21º dia pós-natal, quando foram agrupados por sexo e regime de tratamento e foram, neste momento, removidos da companhia da mãe.

No 60º dia pós-natal, os animais foram pesados e todas as cobaias dos diferentes grupos experimentais foram submetidas aos seguintes testes: campo aberto, labirinto em cruz elevado, nado forçado e teste da esquiiva inibitória. Foram realizadas análises às cegas por dois observadores diferentes, com respeito ao grupo experimental de origem, para avaliar o desempenho dos ratos nos diferentes testes.

3.1.1 Campo Aberto

A arena do campo aberto consistia em uma base quadrada de madeira (60x60x35 cm) dividida em nove quadrantes. Imediatamente após o rato ser colocado no centro do campo aberto dava-se início a marcação da locomoção. Era considerado um cruzamento completo a outro quadrante quando o rato ultrapassava a linha com as quatro patas. O número total de quadrantes cruzados foi registrado manualmente. O teste foi executado em sessões de 5 minutos.

3.1.2 Labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) foi conduzido em um local específico para testes comportamentais, livre de ruídos. O aparato consistia em dois braços abertos (50 cm comprimento x 10 cm de largura) e dois braços fechados (50 cm comprimento x 10 cm de largura) com uma intersecção central (5x5 cm) elevado a 50 cm do chão. Durante o teste, os animais foram posicionados individualmente no centro do LCE, de frente para um dos braços fechados. A duração do teste foi de 5 minutos, durante os quais os ratos eram livres para explorar o labirinto. Utilizou-se etanol a 10% v/v para limpar o aparato entre as sessões do teste individual. Os dados foram coletados manualmente. As medidas incluem o número de entradas e o tempo que os animais permaneceram nos braços aberto e fechado. O aumento do tempo no braço aberto foi interpretado como comportamento do tipo ansiolítico (PELLOW et al., 1985; LISTER, 1990).

3.1.3 Nado Forçado

O teste do nado forçado (TNF) é um teste amplamente utilizado no rastreamento do comportamento do tipo depressivo em roedores. Quando os roedores são posicionados em um cilindro de água sem oportunidade de fuga, eles tipicamente expõem uma postura imóvel que parece refletir um estado de “desespero comportamental”.

Como paradigma do nado forçado, os ratos foram individualmente forçados a nadar dentro de cilindros verticais e transparentes tipo Plexiglass, contendo 35 cm de água mantida a $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 5 minutos na água, eles eram removidos e secos antes de retornar às suas caixas. O tempo de duração total da postura imóvel foi contabilizado nos últimos 3 minutos. Os primeiros 2 minutos foram considerados como um período de habituação. O rato era considerado imóvel sempre que permanecia flutuando passivamente na água com as costas levemente arqueadas, mas em uma posição ereta apenas com a cabeça acima da superfície.

3.1.4 Esquiva Inibitória

A esquiiva inibitória é um modelo de teste comportamental animal motivado por escape e memória (IZQUIERDO; MEDINA, 1997). O aparato consiste em uma caixa confeccionada em alumínio (50x50x35 cm), com assoalho de barras de cobre, distribuídas a uma distância de 0,9 cm entre si, conectadas a um estimulador elétrico. Sobre as grades do assoalho foi colocado uma plataforma cilíndrica, de madeira impermeável (15x5 cm).

Com 60 dias de idade os animais foram submetidos ao teste da esquiiva inibitória. Neste primeiro dia de teste, os ratos foram simplesmente posicionados por 5 minutos dentro do aparato para habituação. No dia do treinamento, os animais foram posicionados na plataforma de madeira e foi registrado o tempo de permanência na plataforma (este tempo foi designado linha de base 1 - LB1). Após a descida da plataforma, os animais foram retirados do aparato por 5 minutos e após este período, houve a recolocação do rato na plataforma de madeira, porém imediatamente após a descida da plataforma foi aplicado um choque de 1 miliampère (1 mA), durante 1 segundo, procedimento este denominado de linha de base 2 (LB2). No dia seguinte, os ratos foram posicionados na plataforma de madeira onde foi registrado novamente o tempo gasto para alcançarem o assoalho do aparato, com as quatro patas (sessão de teste).

3.2 PERFUSÃO E PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Ao final do teste da esquiiva inibitória, com 61 dias de vida, todos os ratos foram pesados e anestesiados com mistura de cloridrato de cetamina (100mg/Kg) e cloridrato de tiazina (10mg/Kg), (Laboratórios Konig), e perfundidos transcardiacamente com solução salina heparinizada durante 10 minutos, seguida de solução fixadora de paraformaldeído a 4% (ph 7,2-7,4, em solução tampão fosfato 0,1M) por 30 minutos.

A reação histoquímica de NADPH-diaforase requer fixação aldeídica para promover a inibição de outros tipos de óxido-redutases dependentes de NADPH-diaforase, que também convertem os sais de tetrazolium a produtos coloridos e insolúveis por mecanismos redutores. A utilização de paraformaldeído a 4% inibe a atividade das outras diaforases ao mesmo tempo em que aumenta a deposição de formazan em populações NOS-positiva (BUWALDA et al., 1995).

Após a perfusão e craniotomia, os cérebros foram removidos, pesados imediatamente, e submersos durante a noite à 4°C em tampão fosfato 0,1M, com pH 7,2-7,4. Secções parassagittais dos hemisférios direitos de 150 µm de espessura foram obtidas no vibrátomo e processadas para a reação histoquímica de NADPH-diaforase, seguindo modelo presente na literatura (SCHERER-SINGLER et al., 1983).

Em resumo, as secções foram recolhidas em solução de tampão fosfato 0,1M pH 7,4 e então incubadas à 37° C na mistura da reação histoquímica. A solução histoquímica constituía-se de: 0.6% de ácido málico em tampão TRIS 0,1 M, com o pH final 8,0, ao qual foi adicionado βNADP (0.1% p/v), cloreto de manganês (0.04% p/v) e nitroblue tetrazolium (0.03% p/v), previamente diluídos em DMSO (0.3% p/v). Ao final da preparação, triton X-100 a 0,1% v/v foi adicionado à mistura e as secções foram, então, incubadas nessa solução à 37° C, em contínua agitação.

A fim de minimizar as prováveis variações da reação em diferentes grupos, foram mantidas todas as secções dos diferentes grupos experimentais na mesma solução durante o mesmo período de tempo, a cada dia. As reações foram interrompidas quando, com a inspeção através do microscópio, no produto da reação foi visualizado os dendritos distais (prolongamentos de segunda e terceira ordem).

A reação terminou após a neutralização das secções, lavando-as três vezes por 10 min cada, em solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,4.

As secções foram montadas em lâminas, embebidas em glicerol, e seladas com esmalte de unha.

É válido lembrar que todos os produtos químicos empregados no presente trabalho foram supridos pela companhia farmacêutica SIGMA (Poole, UK).

3.3 ATIVIDADE HISTOQUÍMICA EM HIPOCAMPO, ESTRIADO E CEREBELO

Em cada grupo experimental foram selecionadas de 8 a 12 secções do hipocampo, estriado e cerebelo de cada animal para densitometria. Para determinar a densidade do produto da reação, mediu-se a transmitância de luz através das secções de regiões anatômicas similares usando-se um fotômetro (Tektronix mod J17) com probe de luminância (J1803) acoplado a um microscópio óptico (Zeiss), com valores expressos em candelas/ μm^2 . A objetiva foi escolhida de acordo com a permanência da janela circular do diafragma do microscópio em cada uma das camadas em estudo (hipocampo, estriado e cerebelo), sem avançar às camadas vizinhas.

Após estimar a faixa linear do fotômetro através de séries de secções reagidas histoquimicamente, o controle de intensidade de luz do microscópio foi mantido constantemente em 10 v. Este valor foi escolhido para assegurar que existiria uma relação linear entre os depósitos de formazan e os valores de transmitância. Deste modo, quando a atividade nitrérgica, associada a maiores depósitos de formazan, aumenta em uma determinada área, o valor de transmitância correspondente diminui.

Para obter uma média para cada animal, foram realizadas análises de 8 a 12 secções do hipocampo, estriado e cerebelo e, posteriormente, foi calculada a média para o número de animais de cada grupo experimental com o objetivo de obter uma média final por grupo.

A reação NADPH-d está sujeita à variabilidade e demonstra um decréscimo na atividade com o decorrer do tempo. Desta maneira, com a finalidade de realizar uma análise comparativa de tecidos que não foram sujeitos à reação histoquímica ao mesmo tempo e, portanto, submeteram-se a condições experimentais discretamente diferentes, foi adotada uma escala relativa e normalizada, com base na escolha de uma medida de controle interna em cada secção, a qual não estaria significativamente afetada pela reação. Isto permitiu a comparação entre secções reagidas em diferentes momentos. Para a análise da neurópila, foi escolhida como medida de controle interno a transmitância luminosa através da camada granular do giro denteado, designada T_{max}, para minimizar o efeito da reação entre as secções de um mesmo animal, dentro de mesmos grupos experimentais e entre os mesmos. A transmitância de uma camada particular do hipocampo, estriado e cerebelo, era designada como T_{min}. Um índice de contraste (C) foi calculado de acordo com uma equação previamente publicada na literatura (BORBA et al., 2000):

$$C = (T_{\max} - T_{\min}) / (T_{\max} + T_{\min}).$$

Com relação à análise do cerebelo e do estriado, limitamos a análise da transmitância à região situada entre a linha mediana e um ponto localizado 3,0 mm lateral a ela, onde essas estruturas permanecem integradas na mesma fatia junto com o hipocampo. Assim, foi estimado os valores de contraste para as camadas molecular e granular do cerebelo e para o estriado em relação ao valor de transmitância da camada granular do giro denteado da mesma secção. As medidas de transmitância na camada molecular e granular foram realizadas fora dos patches (zonas de atividade nitrérgica mais intensa) cerebelares descritas na literatura (HAWKES e TURNER, 1994).

O estriado foi dividido em quatro segmentos para a obtenção da análise regional dos efeitos neurotóxicos sobre a atividade nitrérgica, conforme a seguir: anterior-dorsal (AD), posterior-dorsal (PD), anterior-ventral (AV) e posterior-ventral (PV).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise estatística paramétrica para avaliar o grau de significância dos resultados aplicando-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste *a priori* de Bonferroni, aceitando-se como significantes as diferenças entre grupos com intervalo de confiança mínimo de 95% ($p < 0,05$).

3.5 DOSAGEM DE ETANOL E METILMERCÚRIO

A concentração sérica de etanol foi dosada após todos os procedimentos experimentais, porém antes da fixação. Para isso foi utilizado o procedimento de Widmarck ligeiramente modificado (BROUWER, 2004). A concentração de metilmercúrio foi estimada em pêlos de animais adultos por absorção atômica em espectrofotômetro pelo método da amalgamação em ouro, utilizando um Analisador de Mercúrio (modelo SP3D/Nippon Instruments Corporation).

4. RESULTADOS

4.1 CONCENTRAÇÃO DE ETANOL E METILMERCÚRIO

A tabela 1 demonstra os valores médios da concentração sérica de etanol e a média dos desvios padrão encontrada nas progenitoras (no 21º dia pós-parto) e na prole (no 60º dia pós-parto). Não houve significância estatística na concentração alcoólica entre os diferentes grupos experimentais.

TABELA 1 – Concentração sérica de etanol nas mães e proles de ratos Wistar.

<i>Tratamento</i>	<i>Mãe</i>	<i>Proles</i>
<i>EtOH</i>	0.56±	0.47±
<i>EtOH+MeHg</i>	0.57±	0.77±

Fonte: Protocolo de Pesquisa

A tabela 2 revela os valores médios e a média dos desvios padrão da concentração de metilmercúrio em pêlos das mães (no 21º dia pós-natal) e da prole (no 60º dia pós-natal). Note que a concentração pilosa de metilmercúrio no grupo *EtOH+MeHg* para ambos mães e prole, neste momento, é menor que no grupo *MeHg* (ANOVA uma via, Bonferroni *a priori test* $p < 0,05$).

TABELA 2 - Concentração pilosa de metilmercúrio em mães e proles de ratos

Wistar(* $p < 0,05$).

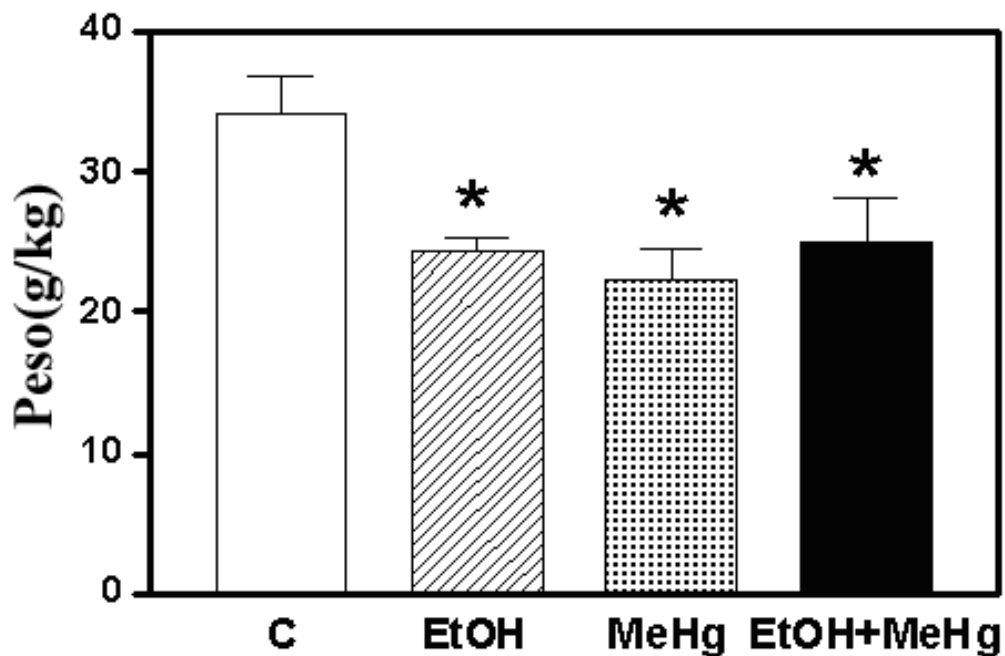
<i>Tratamento</i>	<i>Mães</i>	<i>Proles</i>
<i>MeHg</i>	5.86±2.06	3.82±0.43

<i>EtOH+MeHg</i>	1.91±1.29*	1.63±0.21*
------------------	------------	------------

Fonte: Protocolo de Pesquisa

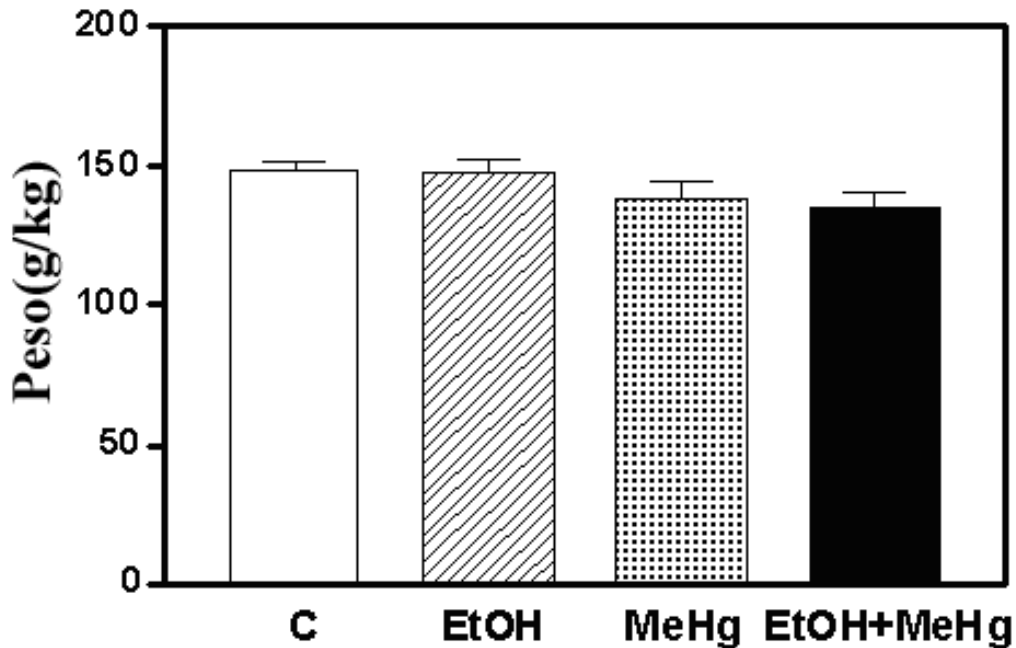
4.2 PESO CORPORAL E PESO DOS ENCÉFALOS

No 21º dia pós-natal, todos os grupos experimentais comparados ao controle apresentaram baixo peso (*C*=34,05±2,84; *MeHg*=24,37± 0,95; *EtOH*=22,29± 2,34; *EtOH+MeHg*=25,13± 3,10; média±d.p.) [F(3,12)=4,48, p<0,05] (Gráfico 1). Esta perda de peso foi completamente recuperada no dia em que os animais foram sacrificados (61º dia pós-natal)(*C*=148,41±2,52; *MeHg*=147,65±4,22; *EtOH*=138,5±5,89; *EtOH+MeHg*=134,91±5,76; média±d.p.) (Gráfico 2).



Fonte: Protocolo de Pesquisa

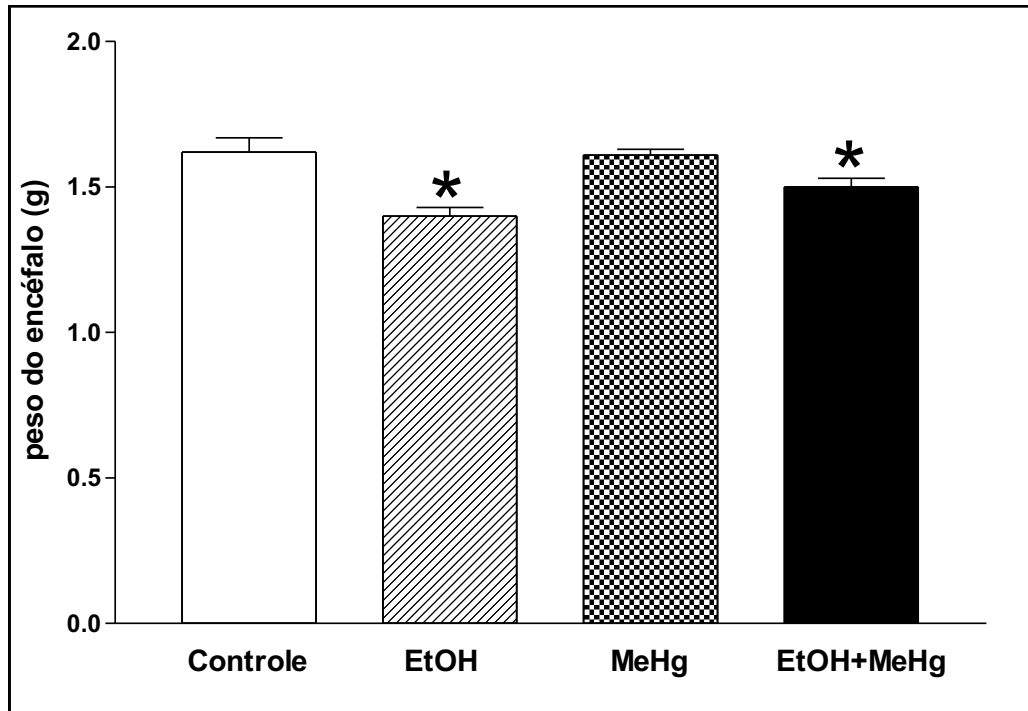
Gráfico 1 - Peso corporal das proles no 21º dia pós-natal. (C = grupo controle, EtOH = grupo etanol, MeHg = grupo metilmercúrio, EtOH+MeHg = grupo metilmercúrio+etanol);(*p<0,05).



Fonte: Protocolo de Pesquisa

Gráfico 2 - Peso corporal das proles no 61º dia pós-natal. (C = grupo controle, EtOH = grupo etanol, MeHg = grupo metilmercúrio, EtOH+MeHg = grupo metilmercúrio+etanol).

O peso dos encéfalos úmidos também apresentaram redução nos grupos *EtOH* e *EtOH+MeHg* comparado aos animais do grupo controle ($C=1,62\pm 0,05$; $MeHg=1,61\pm 0,02$; $EtOH=1,40\pm 0,03$; $EtOH+MeHg=1,50\pm 0,03$; média±d.p.) [$F(3,35)=6,67$, $p<0.05$](Gráfico 3).

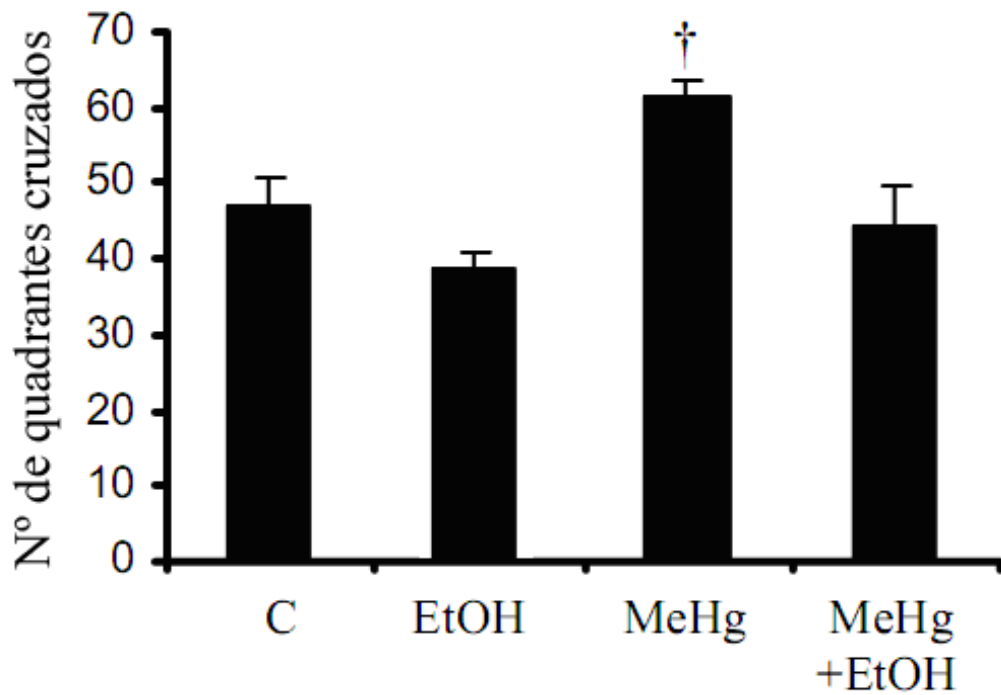


Fonte: Protocolo de Pesquisa

Gráfico 3 - Peso dos encéfalos úmidos das proles. (Controle = grupo controle, EtOH = grupo etanol, MeHg = grupo metilmercúrio, EtOH+MeHg = grupo metilmercúrio+etanol);(*p<0,05).

4.3 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

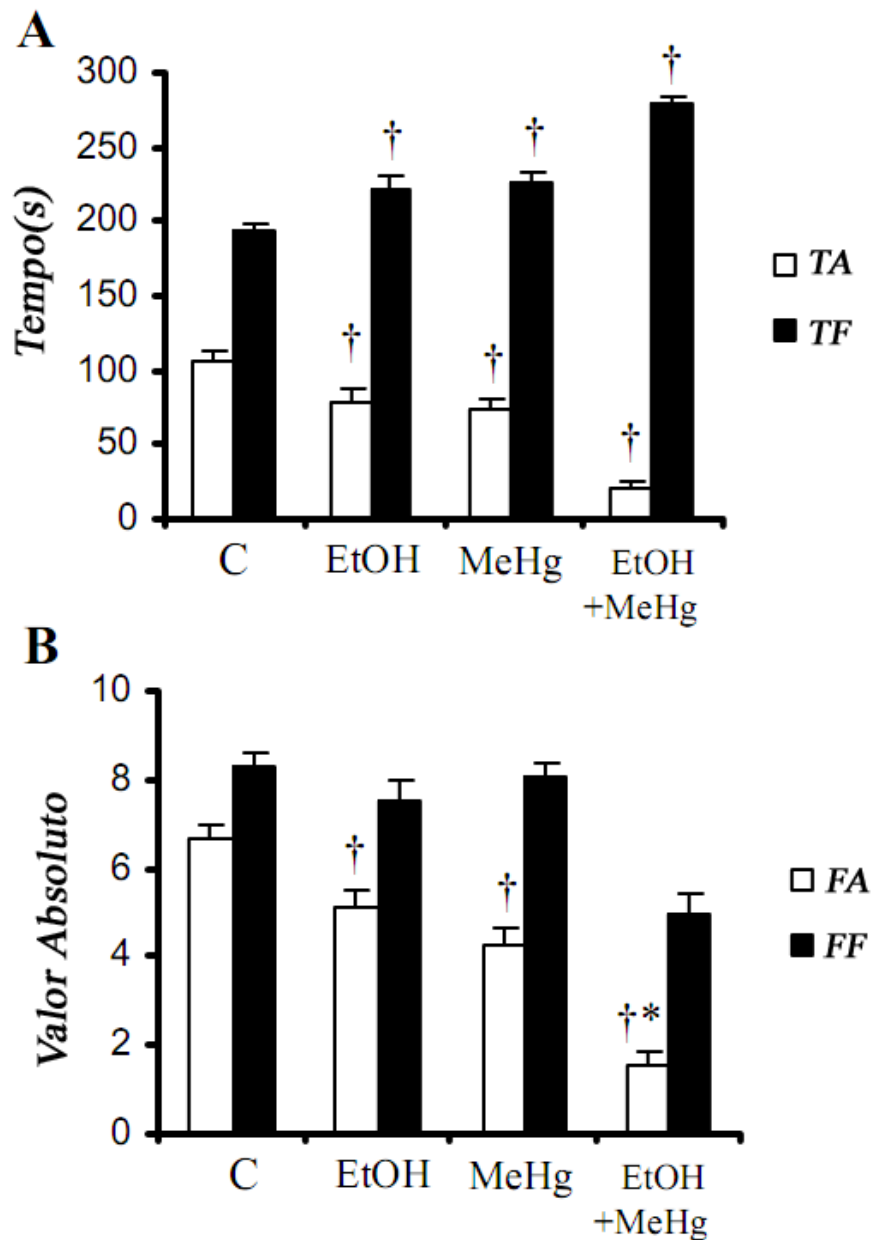
O teste do campo aberto revelou que a prole de adultos jovens a qual foi exposta ao *MeHg* aumentou a atividade espontânea motora, atravessando mais quadrantes em 5 minutos do que os demais grupos (*C*=46,85±3,77, *MeHg*=61,6±2,04, *EtOH*=38,8±2,41, *EtOH+MeHg*=44,6±5,21; média±d.p) [F(3,76)= 7,31, p<0,01] (Gráfico 4).



Fonte: Protocolo de Pesquisa

Gráfico 4 - Teste do campo aberto. (C = grupo controle, EtOH = grupo etanol, MeHg = grupo metilmercúrio, EtOH+MeHg = grupo metilmercúrio+etanol); († $p < 0,01$).

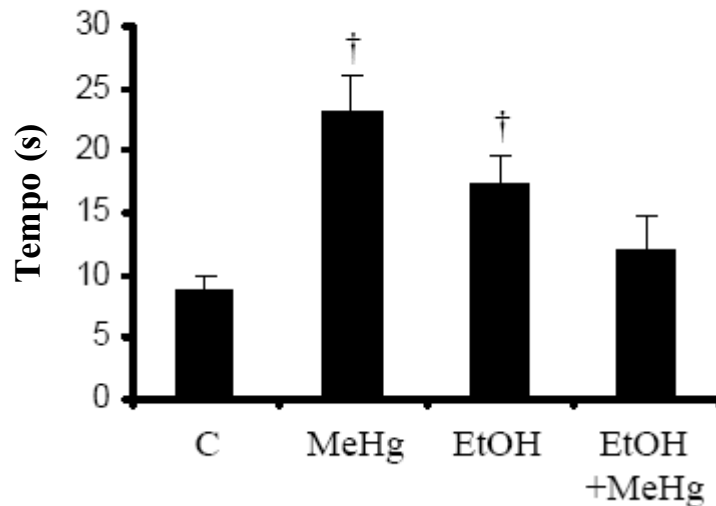
No LCE, todos os grupos reduziram o tempo (TA) [$F(3,76)=27,83$, $p < 0,01$] e a frequência (FA) [$F(3,76)=35,94$, $p < 0,01$] no braço aberto, ao passo que aumentaram o tempo de permanência no braço fechado (TF) [$F(3,76)=27,83$, $p < 0,01$] quando comparados ao grupo controle. Somente o grupo *EtOH+MeHg* reduziu a frequência de entrada no braço fechado (FF) [$F(3,76)=15,46$, $p < 0,05$] (Gráfico 5 A e B).



Fonte: Protocolo de Pesquisa

Gráfico 5 - Teste do labirinto em cruz elevado. A – Tempo de permanência dos ratos nos braços aberto e fechado. B – Frequência de entrada nos braços aberto e fechado. (TA – tempo de permanência no braço aberto, TF – tempo de permanência no braço fechado, FA – frequência de entrada no braço aberto, FF – frequência de entrada no braço fechado); (C = grupo controle, EtOH = grupo etanol, MeHg = grupo metilmercúrio, EtOH+MeHg = grupo metilmercúrio+etanol);(*p<0,05 e †p<0,01).

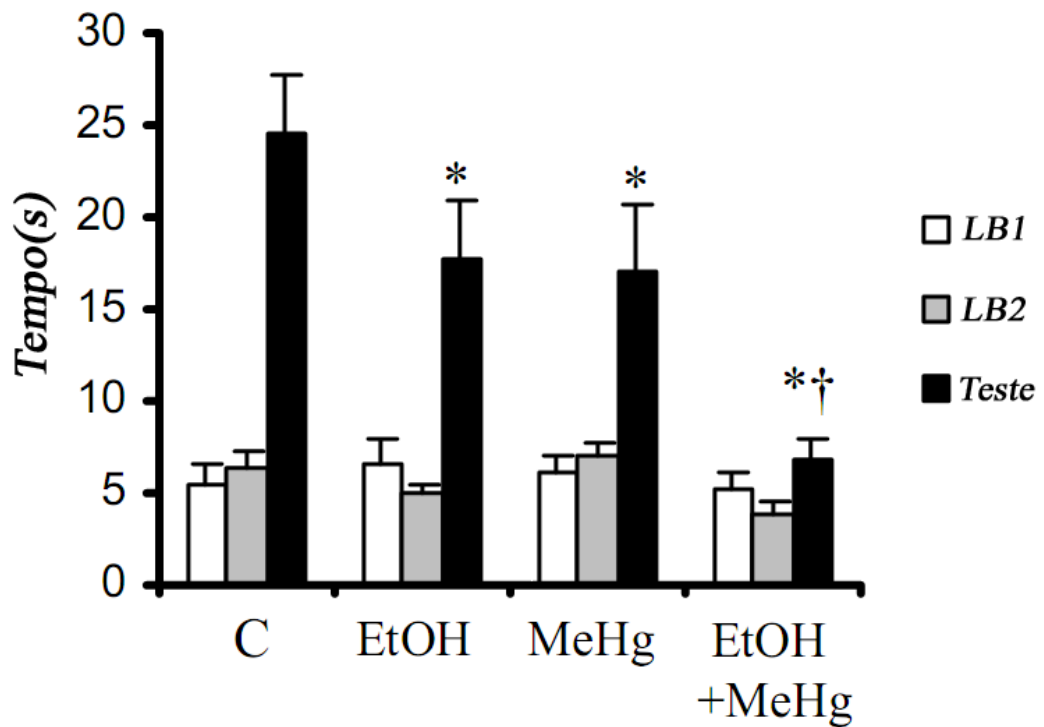
Como mostrado no gráfico 6, os grupos *MeHg* e *EtOH* aumentaram o tempo imóvel no nado forçado, realizando apenas pequenos movimentos para manter a cabeça acima da superfície da água [$F(3,76)= 6,56$, $p<0,01$]. O grupo *EtOH+MeHg* revelou somente uma tendência a um aumento do tempo imóvel quando comparado ao grupo controle ($p>0,05$).



Fonte: Protocolo de Pesquisa

Gráfico 6 - Teste do nado forçado. (C = grupo controle, EtOH = grupo etanol, MeHg = grupo metilmercúrio, EtOH+MeHg = grupo metilmercúrio+etanol); († $p<0,01$).

Os dados relacionados ao teste da esQUIVA inibitória podem ser vistos no gráfico 7. O teste da esQUIVA inibitória revelou diminuição do aprendizado, da consolidação da memória ou de ambos nos grupos tratados com *EtOH*, *MeHg* e *EtOH+MeHg* [$F(3,76)=6,33$, $p<0,05$]. Este último grupo demonstrou uma diferença estatística significante comparado aos grupos *EtOH* [$F(3,76)=6,33$, $p<0,01$] e *MeHg* [$F(3,76)=6,33$, $p<0,01$].



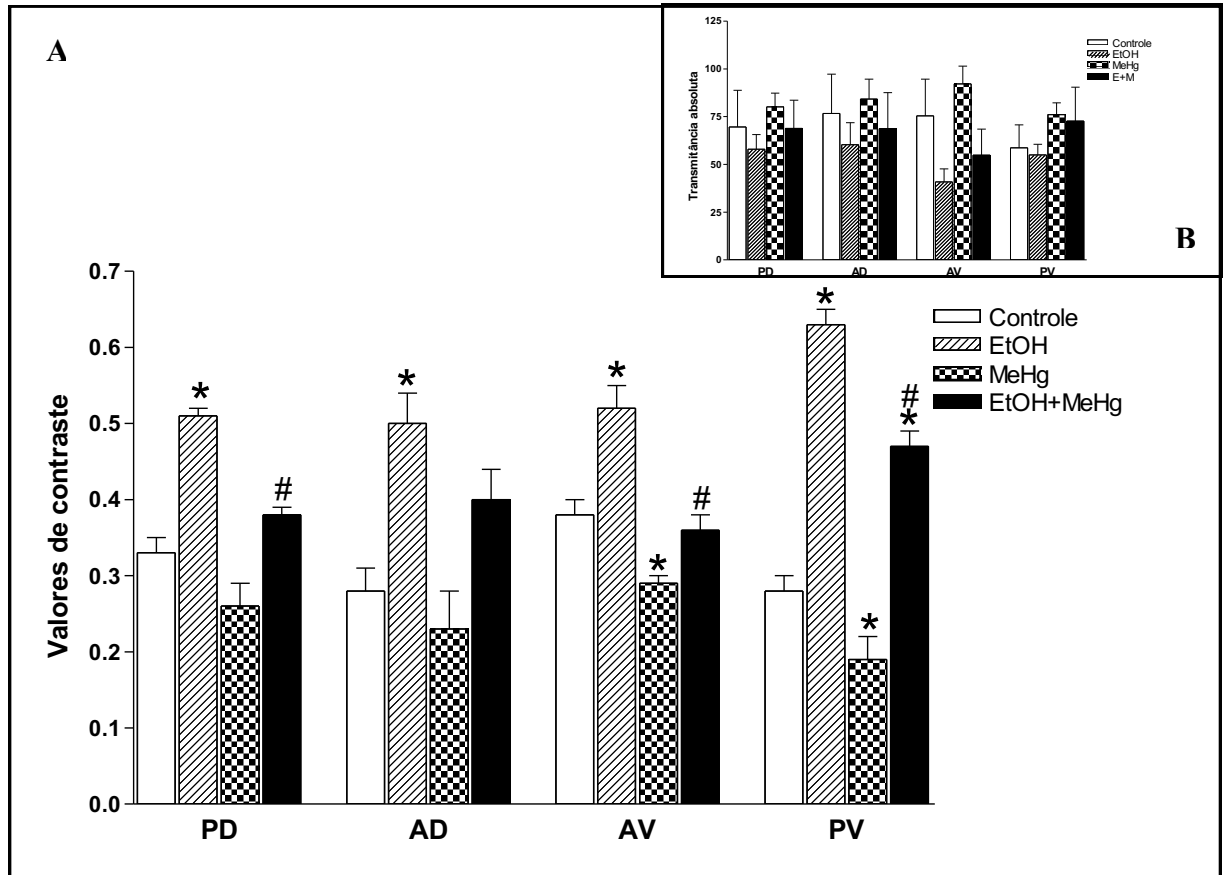
Fonte: Protocolo de Pesquisa

Gráfico 7 - Teste da Esquiva Inibitória. (LB1- linha de base 1, LB2 – linha de base 2, Teste – sessão de teste); (C = grupo controle, EtOH = grupo etanol, MeHg = grupo metilmercúrio, EtOH+MeHg = grupo metilmercúrio+etanol);(* $p < 0,05$ e † $p < 0,01$).

4.4 ATIVIDADE HISTOQUÍMICA NADPH-DIAPHORASE

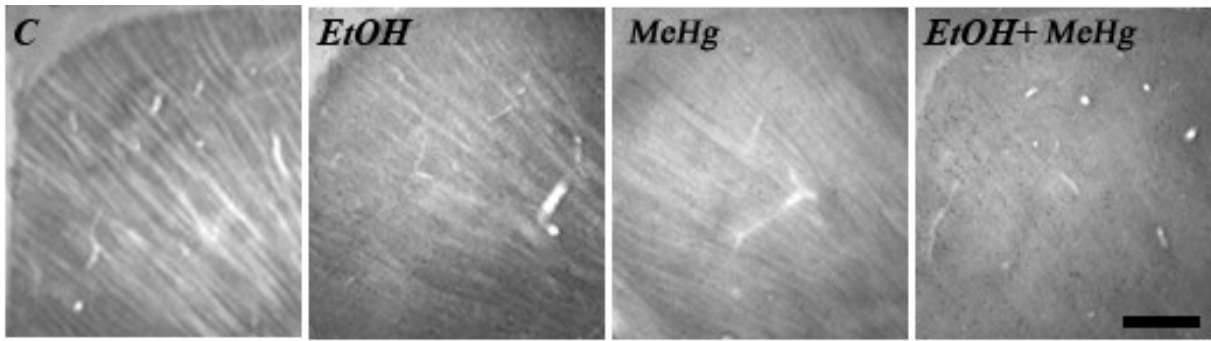
Nas condições experimentais empregadas, a atividade nitrérgica no estriado e no hipocampo foram mais vulneráveis em relação à do cerebelo. A administração de etanol aumentou a atividade nitrérgica em todas as quatro regiões do estriado de ratos (PD [F(3,15)=22,24; $p < 0,01$]; AD [F(3,15)=7,36; $p < 0,01$]; AV [F(3,15)=46,58; $p < 0,01$]; PV [F(3,15)=11,58; $p < 0,01$]), ao passo que o grupo *MeHg* apresentou uma diminuição na atividade nitrérgica em PD [F(3,15)=46,59; $p < 0,05$], AV [F(3,15)=22,25; $p < 0,05$] and AD [F(3,15)=11,58; $p < 0,05$]. Apenas a região anterior do estriado foi afetada no grupo *EtOH+MeHg*, demonstrando um aumento nos valores de contraste nas regiões AD

[F(3,15)=7,36; $p<0,05$] e AV [F(3,15)=46,58; $p<0,01$], quando comparado ao grupo controle (Gráfico 8 A e B e Foto 1).



Fonte: Protocolo de Pesquisa

Gráfico 8 - Atividade histoquímica no estriado. A - Valores de contraste da NADPH-diaforase entre os grupos experimentais nas diferentes regiões do estriado. B – Valores médios de transmitância entre os grupos experimentais nas diferentes regiões do estriado. (AV – região anterior-ventral, AD – região anterior-dorsal, PV – região posterior-ventral, PD – região posterior-dorsal); (Controle = grupo controle, EtOH = grupo etanol, MeHg = grupo metilmercúrio, EtOH+MeHg = grupo metilmercúrio+etanol);(* $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle e # $p<0,05$ quando comparado ao grupo etanol).



Fonte: Protocolo de Pesquisa

Foto 1 - Fotomicrografia da atividade histoquímica NADPH-diaforase na região AV do estriado de secções que ilustram a média dos valores de transmitância entre os grupos experimentais. Escala = 500 μ m.

O hipocampo foi mais sensível ao etanol quando comparado aos grupos *MeHg* e *EtOH+MeHg* (Gráfico 9 A e B e Foto 2). Nesta região, a camada lacunoso molecular de CA1 [F(3,18)=8,52; p<0,01], a camada molecular [F(3,18)=13,87; p<0,01] e a camada polimórfica [F(3,18)=8,21; p<0,05] do giro denteado, obtiveram um aumento na atividade nitrérgica após o tratamento com *EtOH*, enquanto que *MeHg* reduziu a atividade nitrérgica somente na camada polimórfica [F(3,18)=8,21; p<0,05]. *EtOH+MeHg* teve apenas um baixo valor de transmitância na camada polimórfica [F(3,18)=4,62, p<0,05], na camada molecular [F(3,18)=4,06, p<0,05] e na camada lacunosa [F(3,18)=4,90, p<0,05] quando comparado ao grupo controle. (Gráfico 9 e Foto 2).

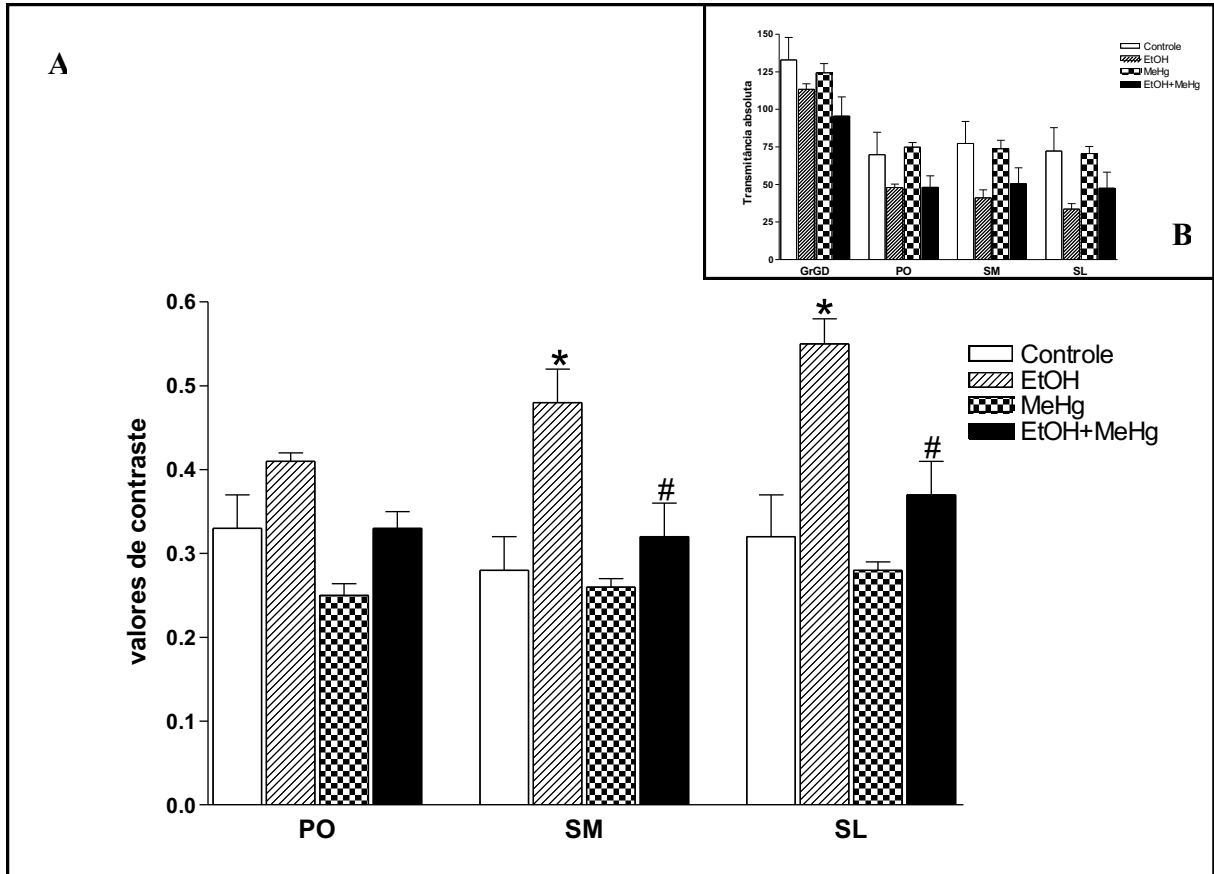
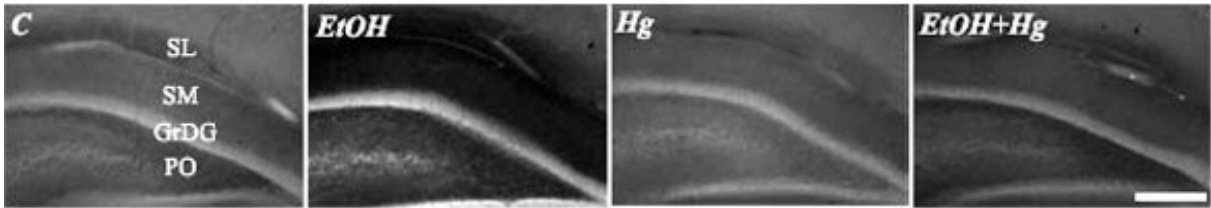


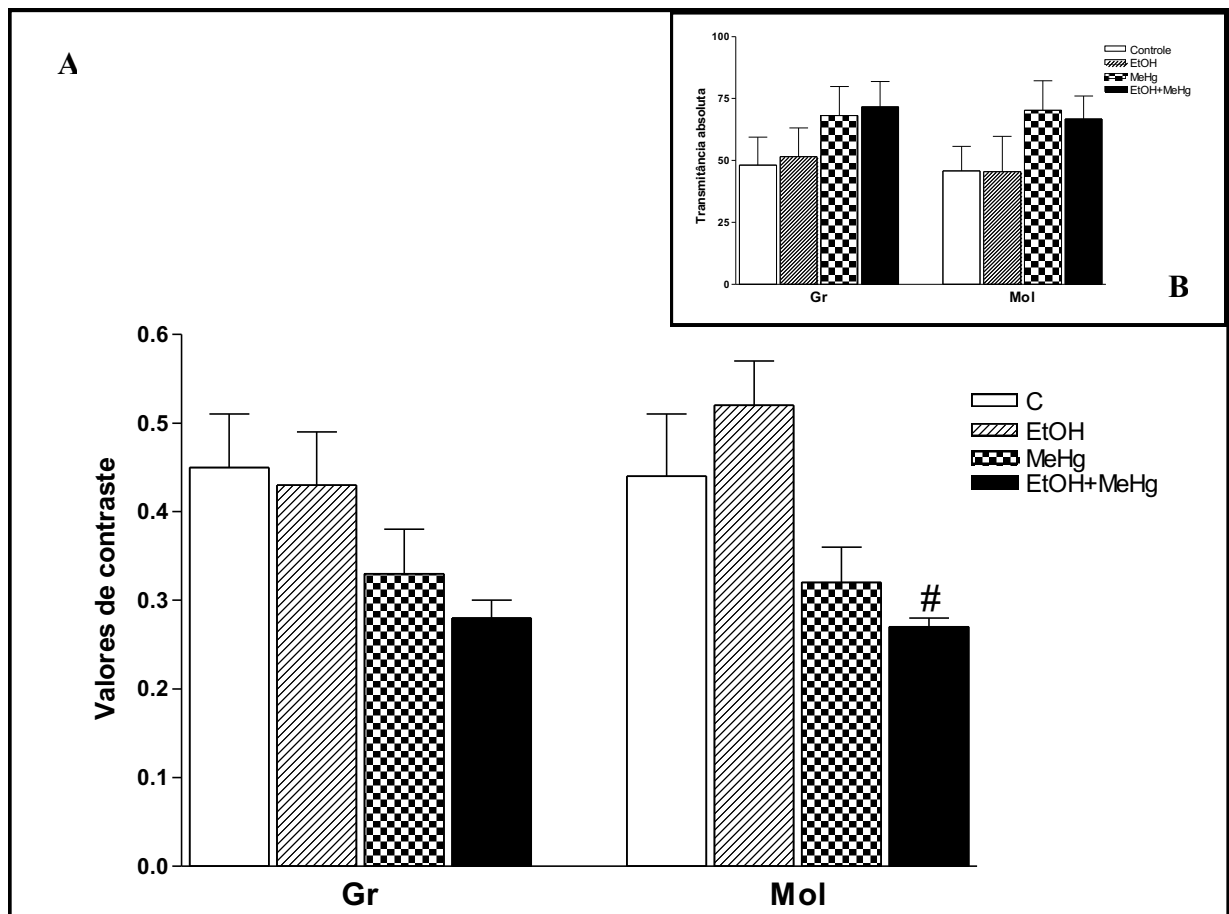
Gráfico 9 - Atividade histoquímica no hipocampo. A – Valores de contraste da NADPH-diaforase entre os grupos experimentais nas diferentes regiões. B – Valores médios de transmitância entre os grupos experimentais nas diferentes regiões. (GnGD – camada granular do giro denteado, PO – camada polimórfica, SM – camada molecular, SL – camada lacunosa); (Controle = grupo controle, EtOH = grupo etanol, MeHg = grupo metilmercúrio, EtOH+MeHg = grupo metilmercúrio+etanol);(*p<0,05 quando comparado ao grupo controle e #p<0,05 quando comparado ao grupo etanol).



Fonte: Protocolo de Pesquisa

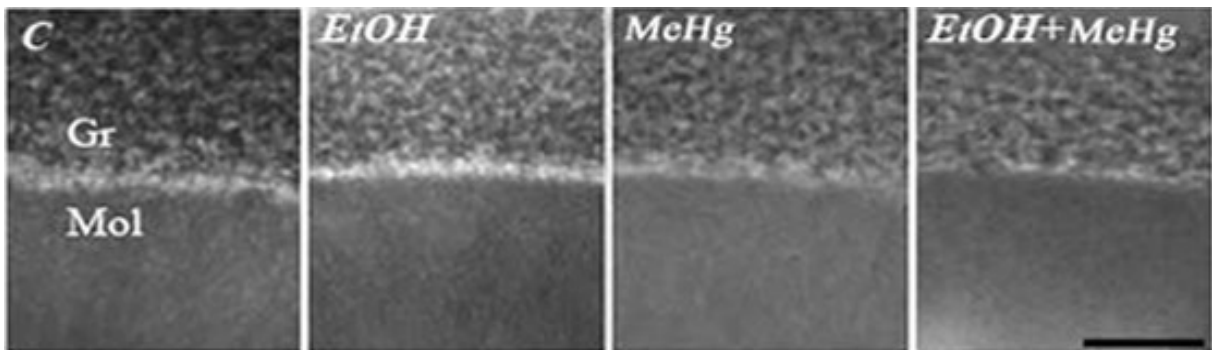
Foto 2 - Fotomicrografia da atividade da NADPH-diaforase no hipocampo de secções que ilustram a média dos valores de transmitância entre os grupos experimentais. Escala = 250 μ m.

Somente a combinação de *EtOH+MeHg* teve impacto na atividade nitrérgica no cerebelo, na camada molecular, quando comparado ao grupo controle [F(3,15)=4.11; p<0.05] (Gráfico 10 A e B e Foto 3).



Fonte: Protocolo de Pesquisa

Gráfico 10 – Atividade histoquímica no cerebelo. A – Valores de contraste da NADPH-diaforase entre os grupos experimentais nas diferentes regiões. B – Valores médios de transmitância entre os grupos experimentais nas diferentes regiões. (Gr – camada granular, Mol – camada molecular); (C = grupo controle, EtOH = grupo etanol, MeHg = grupo metilmercúrio, EtOH+MeHg = grupo metilmercúrio+etanol);(#p<0,05).



Fonte: Protocolo de Pesquisa

Foto 3 – Fotomicrografia da atividade da NADPH-diaforase no cerebelo de secções que ilustram os valores médios de transmitância entre os diferentes grupos experimentais. Escala = 100 μ m.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, observamos mudanças comportamentais e alterações na atividade histoquímica NADPH-diaforase no hipocampo, estriado e cerebelo após a intoxicação com etanol, metilmercúrio e etanol + metilmercúrio por via placentária durante o período de gestação.

Os grupos experimentais *EtOH* e *MeHg* desenvolveram um comportamento do tipo ansiogênico, como notado no LCE, depressivo (no teste do nado forçado) e com prejuízo na memória de longa duração (no teste da esQUIVA inibitória), enquanto que o grupo *EtOH+MeHg* demonstrou um resultado comparado ao efeito sedativo produzido pelas drogas benzodiazepínicas no LCE. A atividade nitrérgica no giro denteado estava reduzida na camada polimórfica do *MeHg*, porém aumentada no grupo *EtOH* em ambas camadas polimórfica e molecular do giro denteado e também na camada molecular de CA1. A atividade nitrérgica estava aumentada também em todos os segmentos estriatais do grupo *EtOH* e na região anterior em *EtOH+MeHg*, porém estava reduzida na maioria das regiões no estriado de *MeHg*.

5.1 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS

As enzimas sintase do óxido nítrico são reconhecidas como enzimas diaforase, e tem-se demonstrado que a fixação aldeídica nos tecidos inibe outras atividades NADPH-d, enquanto intensifica a reação na população SON positiva (BUWALDA et al., 1995). Assim, é aceitável sugerir que as mudanças histoquímicas NADPH-d observadas neste estudo reflete as mudanças na atividade SON. Entretanto, este fato não nos dá qualquer informação sobre qual isoforma SON foi alterada. A dupla reação para NADPH-d e SON mostra que a atividade NADPH-d se superpõe com a imunomarcacão para SON na maioria das camadas do hipocampo. Faz-se exceção a essa regra a camada lacunoso molecular, onde não há dupla marcação (BURETTE et al., 2002; PICANCO-DINIZ et al., 2004). A reação neuronal e a neurópila positiva para NADPH-d na histoquímica do cerebelo superpõe-se com as camadas e células que são imunoreativas para SON neuronal.

No estriado, as injeções intracelulares de biocitina seguidas tanto pela histoquímica para NADPH-diaforase quanto pela imunocitoquímica para SON revelaram que a maioria dos neurônios tipo I, revelados pela histoquímica para NADPH-d, são neurônios positivos para SON-n (KAWAGUCHI, 1993; KUO et al., 1994). Além do mais, a NADPH-d é uma reação dependente da atividade sináptica; as conexões sinápticas têm um maior efeito na atividade SON-n do que a expressão de sua proteína (WERUAGA et al., 2000). O produto das sintases do óxido nítrico é de extrema importância para o modelo de plasticidade sináptica atividade-dependente, estando relacionado à intensificação da neurotransmissão excitatória (VON BOHLEN e HALBACH et al., 2002).

5.2 PESO CORPORAL E PESO ENCEFÁLICO

No presente trabalho, os grupos experimentais *MeHg*, *EtOH* e *EtOH+MeHg* associaram-se a baixo peso corporal no 21º dia pós-natal, confirmando e estendendo descrições prévias para o etanol (MARGRER et al., 2005) e metilmercúrio (KIM et al., 2000).

Encontramos também uma redução no peso encefálico dos animais com 2 meses de idade dos grupos experimentais *EtOH* e *EtOH+MeHg*, corroborando achados prévios que demonstraram uma redução no peso encefálico no início do período pós-natal (BUTTERS et al., 2003).

5.3 COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOGÊNICO E ÓXIDO NÍTRICO SINTASE

Labirinto em Cruz Elevado

Os testes do campo aberto e labirinto em cruz elevado são habitualmente usados para estudar comportamentos relacionados à ansiedade. Esses testes avaliam a motivação em explorar novas áreas e a preferência em evitar locais abertos e com intensa luminosidade (NELSON et al., 2006). Ratos que exibem altos níveis de comportamento relacionado à

ansiedade passam menos tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, e na área central do campo aberto.

No presente estudo, a contagem de quadrantes ultrapassados no campo aberto pelo grupo *MeHg*, com 2 meses de idade, foi maior com relação aos demais grupos experimentais, achado que acrescenta a resultados prévios que demonstraram um comportamento ansioso após intoxicação de MeHg no período pré-natal (KIM et al., 2000). Em nosso estudo, o número de entradas no braço fechado não foi afetado pelo tratamento com etanol ou metilmercúrio, sugerindo que as respostas neurotóxicas destes agentes não foram consequência do efeito não específico na atividade locomotora.

Como discutido por File (1992), a frequência de entradas e o tempo gasto no braço fechado é mais importante do que a medida da atividade geral neste teste, apropriado para avaliar se o efeito da droga é ansiogênico ou ansiolítico. Neste trabalho, as proles que foram expostas ao EtOH ou MeHg, no período intra-uterino, reduziram o número de entradas e o tempo gasto no braço aberto, aumentando o tempo no braço fechado, no teste do LCE, o que sugere um aumento no comportamento do tipo ansioso, possivelmente associado a ambas substâncias, etanol e metilmercúrio. Assim, os resultados aqui encontrados confirmam outros estudos que demonstram um efeito ansiogênico produzido pela exposição a longo prazo ao etanol (DA SILVA et al., 2004). Contudo, a associação de etanol e metilmercúrio, administrada às fêmeas grávidas, evidenciou nas proles adultas um efeito mais significativo. Nesse grupo, a frequência de entradas no braço aberto era menor se comparado aos grupos *EtOH* e *MeHg*, e o tempo de permanência no braço fechado estava aumentado, demonstrando um estado comparado ao efeito sedativo produzido por drogas benzodiazepínicas.

Mudanças na sinalização do óxido nítrico foram observadas tanto quanto ao aumento, quanto à diminuição das respostas comportamentais ansiogênicas no labirinto em cruz elevado. Estudos com injeções sistêmicas de N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), cuja substância reduz a produção de ON, aumentou o comportamento ansiogênico no labirinto em cruz elevado (CZECH et al., 2003).

Tratamentos sistêmicos agudos (GUIMARAES et al., 1994; FARIA et al., 1997; VOLKE et al., 1998) e subcrônicos (DUNN et al., 1998) com inibidores da SON aumentaram o tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.

Existem alguns resultados variáveis relacionados aos testes do LCE com camundongos com deleção gênica para enzima de síntese da SON-n. Dois estudos revelaram não haver diferenças entre estes camundongos e os ratos *Wistar* no labirinto em cruz (NELSON et al. 1995; BILBO et al., 2003), enquanto que um terceiro estudo encontrou um menor tempo gasto nos braços abertos pelos camundongos com deleção gênica em relação aos ratos *Wistar* (BILBO et al. 2003; WEITSDOERFER et al., 2004).

A exata contribuição da sinalização do óxido nítrico em relação ao comportamento ansiosogênico ainda necessita de maiores esclarecimentos através de uma maior produção de estudos precisos.

Quando o NG-nitro-L-arginina (NOARG), outro inibidor da produção de ON, foi infundido no hipocampo de ratos, observou-se um decréscimo no tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (MONZON et al., 2001). Os resultados de nosso trabalho revelaram que as proles expostas ao EtOH ou MeHg, no início do período natal, mostraram, respectivamente, um aumento e uma diminuição da atividade nitrérgica no estriado e hipocampo, porém ambos os neurotóxicos associaram a um aumento do comportamento ansiogênico nos animais testados.

Nado Forçado

O teste do nado forçado (TNF) é um modelo comportamental largamente empregado para avaliar a atividade farmacológica antidepressiva. O TNF é um marcador do comportamento do tipo depressivo proveniente da pesquisa genética. Roedores com sangue puro de sucessivas gerações demonstraram, ao princípio da imobilidade no TNF, uma progressiva divergência comportamental (WEISS et al., 1998). Animais depressivos aumentaram o tempo de imobilidade, quando comparados aos animais do grupo controle (CRYAN et al., 2005). Em nosso trabalho, somente a contaminação por *MeHg per se*

aumentou o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, onde observou-se uma diminuição na atividade nitrérgica no estriado e na camada polimórfica do giro denteado.

Há na literatura, contudo, trabalhos demonstrando que a inibição da sintase do óxido nítrico produz efeito comportamental ora ansiolítico e ora ansiogênico(ou ambos) em uma variedade de paradigmas animais, incluindo o TNF para ratos e camundongos (JEFFERYS e FUNDER, 1996; HARKIN et al., 1999; Da SILVA et al., 2000; YILDIZ et al., 2000; HARKIN et al., 2003).

Esquiva Inibitória

A esquiva inibitória é uma maneira rápida de aprendizagem adquirida, motivada por estímulo aversivo, que envolve inúmeros substratos neurais. O envolvimento hipocampal na esquiva inibitória tem sido demonstrado com lesões pré e pós-treinamento dos campos dorsal de CA1 ou ventral de CA3, pela qual foi observado a redução da consolidação do aprendizado por esquiva inibitória (MARTINEZ et al., 2002). O estriado dorsal também possui papel importante na esquiva inibitória, particularmente na consolidação do aprendizado de escape (DIAZ DEL GUANTE et al., 1993).

No presente trabalho, o teste da esquiva inibitória revelou diminuição do aprendizado, da consolidação da memória ou de ambos nos grupos tratados com *EtOH*, *MeHg* e *EtOH+MeHg*. Estes dados, portanto, corroboram resultados já documentados na literatura, sugerindo uma possível lesão hipocampal após o tratamento com os neurotóxicos.

5.4 INTERAÇÕES ENTRE ETANOL E METILMERCÚRIO

Grandjean, em 1993, realizou um estudo nas ilhas Faroe, envolvendo 1000 crianças. Nestas, o consumo de álcool materno causou um decréscimo na concentração de mercúrio no cordão umbilical, o qual atribui à interação toxicocinética entre o etanol e o metilmercúrio. Em nosso estudo, tanto os testes comportamentais quanto a atividade nitrérgica foram

afetadas pela combinação dos toxicantes. Foram encontrados valores intermediários na atividade nitrérgica, após a administração da combinação de drogas, quando comparados aos grupos *EtOH* e *MeHg* isoladamente. Este fato pode estar associado a uma redução dos níveis de metilmercúrio nas proles devido à interação com o etanol, o que reduz a concentração de MeHg no cordão umbilical (GRANDJEAN, 1993). Entretanto, as mudanças neurocomportamentais exibiram um padrão completamente inesperado. Se esperávamos a potencialização do dano produzido pela intoxicação de EtOH e MeHg, deveríamos encontrar um aumento nos padrões de comportamento ansiogênico. Porém, a interação de ambos neurotóxicos produziu um efeito mais grave: uma reação comparável ao efeito sedativo produzido pelas drogas benzodiazepínicas.

6. CONCLUSÕES

- Os testes comportamentais e a atividade nitrérgica foram afetados pela combinação dos efeitos tóxicos do EtOH e MeHg.
- As alterações na atividade histoquímica da NADPH-diaforase afetaram o hipocampo, estriado e cerebelo após a intoxicação com etanol, metilmercúrio e etanol + metilmercúrio.
- A atividade nitrérgica no giro denteado afetou as camadas de forma específica: com redução na camada polimórfica do *MeHg*, e aumento no grupo *EtOH* em ambas as camadas polimórfica e molecular do giro denteado assim como na camada molecular de CA1.
- A atividade nitrérgica foi afetada de forma distinta nos diferentes grupos experimentais no estriado: aumentou em todos os segmentos estriatais do grupo *EtOH* e na região anterior no grupo *EtOH+MeHg*, porém estava reduzida na maioria das regiões do estriado no grupo *MeHg*.
- Somente a combinação de *EtOH+MeHg* teve impacto na atividade nitrérgica no cerebelo, na camada molecular, quando comparado ao grupo controle.
- A atividade nitrérgica revelou valores intermediários à intoxicação combinada quando comparada aos valores associados à neurointoxicação isolada do álcool e do metilmercúrio.
- As mudanças comportamentais nos testes isolados confirmam dados já existentes, mas revelam após a combinação *EtOH+MeHg*, resultado inesperado que lembra o efeito sedativo das drogas benzodiazepínicas no teste de avaliação ansiogênica.

- Tomados em conjunto os dados demonstram que a sensibilidade às ações combinadas ou isoladas do álcool e do metilmercúrio no SNC dependem possivelmente de fatores locais das regiões alvo e das lâminas no interior de cada qual.

7. REFERÊNCIAS

- ABDOLLAH, S., CATLIN, M.C., BRIEN, J.F. Ethanol neuro-behavioural teratogenesis in the guinea pig: behavioural dysfunction and hippocampal morphologic change. **Can J. Physiol Pharmacol.** 71: 776-782, 1993.
- ADACHI, M., FUKUDA, M., NISHIDA, E., Nuclear Export of MAP Kinase (ERK) Involves a MAP Kinase Kinase (MEK)-dependent Active Transport Mechanism. **The Journal of Cell Biology**, Vol. 148, N. 5, Março 6, 849-856, 2000.
- ADICKES, E.D., MOLLNER, T.J., MAKOID, M.C. Teratogenic effects of during hyperplastic in cardiac myocyte cultures. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, 17: 988-992, 1993.
- ALDERTON, W.K., COOPER, C.E., KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J.** 357(Pt 3):593-615. Review, 2001.
- ASCHNER, M., KIMELBERG, A.K. The role of glia in neurotoxicity. **Boca Raton: CRC Press**, 1996.
- ATCHISON, W.D. Calcium-dependent and -independent effects of methylmercury on spontaneous and potassium evoked release of acetylcholine at the neuromuscular junction. **JPET**, 237: 672-680, 1986.
- ATCHISON, W.D., HARE, M.F. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. **FASEB**, 8:622-629, 1994.
- ATCHISON, W.D., NARAHASHI, T. Methylmercury induced depression of neuromuscular transmission in the rat. **Neurotoxicology**, 3: 37-50, 1982.
- AZEVEDO, F.A. Toxicologia do mercúrio. São Paulo: **RIMA**, 272 p., 2003.
- BARANANO, D.E., SNYDER, S.H. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 98(20):10996-1002. Review, 2001.
- BAYER, S.A., ALTMAN, J., RUSSO, R.J., ZHANG, X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. **Neurotoxicology**, 14(1): 83-144, 1993.

BECKER, H.C., DIAZ-GRANADOS, J.L., RANDALL, C.L. Teratogenic actions of ethanol in the mouse: a minireview. **Pharmacol. Bioch. Behav.**, 55: 501-513, 1996.

BERMAN, R.F., HANNIGAN, J.H. Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus: spatial behavior, electrophysiology, and neuroanatomy. **Hippocampus** 10: 94-110, 2000.

BARRES, B.A., BARDE, Y.A. Neuronal and glial cell biology. **Curr. Opin. Neurobiol.**, 10: 642-648, 2000.

BERTOSSI, M., F. GIROLAMO, M., ERREDE, D., VIRGINTINO, G., ELIA, L., AMBROSI, L. . Effects of Methylmercury on the Microvasculature of the Developing Brain. **Neurotoxicology**, 25: 849-857, 2004.

BISINOTI, M.C., JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercurio no ambiente. **Quim. Nova**, 27: 593-600, 2004.

BON, C.L., GARTHWAITE, J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **J Neurosci**. 23: 1941-1948, 2003.

BORBA, J.M., ARAUJO, M.S., PICANCO-DINIZ, C.W., MANHAES-DE-CASTRO, R., GUEDES, R.C. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. **Brain Res Bull** 53: 193-201, 2000.

BRABO, E.S., SANTOS, E.O., JESUS, I.M., MASCARENHA, S A.F.S., FAIAL, K.F. Mercury contamination of fish and exposures of a Community in Para State, Brasil. **Environ. Res.**, 84: 197-203, 2000.

BREDT, D.S., SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc Natl Acad Sci U S A** 86: 9030-9033, 1989.

CALABRESI, P., CENTONZE, D., GUBELLINI, P., MARFIA, G.A., PISANI, A., SANCESARIO, G., BERNARDI, G. Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. **Prog Eurobiol**. 61: 231-265, 2000.

CASTOLDI, A.F., COCCINI, T., CECCATELLI, S., MANZO, L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain Res Bull** 55: 197-203, 2001.

- CLARKSON, T.W., STRAIN, J.J. Nutritional factors may modify the toxic action of methyl mercury in fish-eating populations. **J Nutr** 133: 1539S-1543S, 2003.
- COSTA, L.G., ASCHNER, M., VITALONE, A., SYVERSEN, T., SOLDIN, O.P. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 44: 87-110, 2004.
- COSTA, J.C., TOMAZ, C. Posttraing administration of substance P and its N-terminal fragment block the amnestic effects of diazepam. **Neurobiol. Learnn. Mem.** 69: 65-70, 1998.
- COSTA, T.C., SAVAGE, D.D., VALENZUELA, C.F. A review of the effects of prenatal or erly posnatal ethanol expouse on brain ligand-gated íon channels. **Alcohol. Clin. Exp. Res.** 24:706-715, 2000.
- COUNTER, A.S., BUCHANAN. Mercury exposure in Children: a review. **Toxicol. Applied Pharmacol.**, 198: 209-230, 2004.
- DANIEL, H., HEMART, N., JAILLARD, D., CREPEL, F. Long-term depression requires nitric oxide and guanosine 3':5' cyclic monophosphate production in rat cerebellar Purkinje cells. **Eur J Neurosci.** 5: 1079-1082, 1993.
- DANIEL, H., LEVENES, C., CREPEL, F. Cellular mechanisms of cerebellar LTD. **Trends Neurosci.** 21: 401-407, 1998.
- DANIELSSON, B.R., FREDRICKSSON, A., DAHLGREN, L., GARDLUND, A.T., OLSSON, L., DENCKER, L., ARCHER, T. Behavioural effects of prenatal metallic mercury exposure in rats. **Neurotoxicol. Teratol.** , 15: 391-396, 1993.
- DAVIDSON, P.W., MYERS, G.J., WEISS, B. Mercury exposure and child development voutcomes. **Pediatrics** 113: 1023-1029, 2004.
- DAVIS, R.L., SYAPIN, P.J. Interactions of alcohol and nitric-oxide synthase in the brain. **Brain Res Brain Res Rev** 49: 494-504, 2005.
- DAWSON, V.L., DAWSON, T.M., LONDON, E.D., BREDET, D.S., SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc Natl Acad Sci USA.** 88(14):6368- 71, 1991.

DAWSON, T.M., BREDT, D.S., FOTUHI, M., HWANG, P.M., SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A** 88: 7797-7801, 1991.

DOBBING, J., SANDS, J. Vulnerability of developing brain not explained by cell number/cell size hypothesis. **Early Hum Dev**, 5(3):227-31, 1981.

DOREA, J.G. Fish are central in the diet of Amazonian riparians: Should we worry about their mercury concentrations?. **Environ. Res.**, 92: 232-244, 2003.

ELFERING, S.L., SARKELA, T.M., GIULIVI, C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. **J Biol Chem**. 277: 38079-38086, 2002.

ELIASSON, M.J., HUANG, Z., FERRANTE, R.J., SASAMATA, M., MOLLIVER, M.E., SNYDER, S.H., MOSKOWITZ, M.A. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. **J Neurosci**. 19(14):5910-8, 1999.

ETO, K. Minamata disease. **Neuropathology**. : 20 Suppl: S14-19, 2000.

FABER-ZUSCHRATTER, H., SEIDENBECHER, T., REYMANN, K., WOLF, G. Ultrastructural distribution of NADPH-diaphorase in the normal hippocampus and after long-term potentiation. **J Neural Transm**. 103: 807-817, 1996.

FARLA M.S., MUSCARA, M.N., MORENO JUNIOR, H., TEIXEIRA, S.A., DIAS, H.B., DE OLIVEIRA, B., GRAEFF, F.G., DE NUCCI, G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. **Eur J Pharmacol**. 323: 37-43, 1997.

FELDMAN, R.G. Occupational and Environmental. **Neurotoxicology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.

FULGINITI, S., MINETTI, S.A., VIRGOLINI, M.B. Effects of acute ethanol intoxication during pregnancy on central dopaminergic system in male rats. **Neurotoxicol Teratol** 16: 385-389, 1994.

GIBSON, M.A., BUTTERS, N.S., REYNOLDS, J.N., BRIEN, J.F. Effects of chronic prenatal ethanol exposure on locomotor activity, and hippocampal weight, neurons, and nitric oxide synthase activity of the young postnatal guinea pig. **Neurotoxicol Teratol**. 22: 183-192, 2000.

GOODLETT, C.R., HORN, K.H., ZHOU, F.C. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. **Exp Biol Med** (Maywood) 230: 394-406, 2005.

HAWKES, R., TURNER, R.W. Compartmentation of NADPH-diaphorase activity in the mouse cerebellar cortex. **J Comp Neurol.** 346: 499-516, 1994.

HARADA, M., NAKANISHI, J., VASODA, E., PINHEIRO, M.C.N., OIKAWA, T., GUIMARÃES, G.A. Mercury pollution in the Tapajós River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects. **Environ. Intern.**, 27: 285-290, 2001.

HARE, M.F., ATCHISON, W.D. Comparative actions of methylmercury and divalent inorganic mercury on nerve terminal and intraterminal mitochondrial membrane potentials. **JPET**, 261: 166-172, 1992.

HOPE, B.T., MICHAEL, G.J., KNIGGE, K.M., VINCENT, S.R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 88: 2811-2814, 1991.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem.** 68: 285-316, 1997.

JANG, M.H., LEE, M.H., KIM, H., LEE, S.J., SIM, Y.J., KIM, C.J., PARK, S.K., KIM, J., KIM, E.H. Maternal alcohol administration suppresses expression of nitric oxide synthase in the hippocampus of offspring rats. **J. Pharmacol Sci** 98: 459-462, 2005.

JONE, K.L., SMITH, D.W. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. **Lancet** 2: 999-1001, 1973.

_____. The fetal alcohol syndrome. **Teratology** 12: 1-10, 1975.

JUANG, M.S., YONEMURA, K. Increased spontaneous transmitter release from presynaptic nerve terminal by methyl mercuric chlorid. **Nature**, 256: 211-213, 1975.

JUAREZ, B.I., PORTILLO-SALAZAR, H., GONZALÉZ-AMARO, R., MANDEVILLE, P., AGUIRRE, J.R., JIMÉNEZ, M.E. Participation of N-methyl-D-aspartate receptors on methylmercury-induced DNA damage in rat frontal cortex. **Toxicol.**, 207: 223-229, 2005.

KIM, K.M., KIM, P.K., KWON, Y.G., BAI, S.K., NAM, W.D., KIM, Y.M. Regulation of apoptosis by nitrosative stress. **J Biochem Mol Biol** 35: 127-133, 2002.

- KIMURA, K.A., REYNOLDS, J.N., BRIEN, J.F. Ontogeny of nitric oxide synthase I and III protein expression and enzymatic activity in the guinea pig hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 116: 211-216, 1999.
- KIMURA, K.A., REYNOLDS, J.N., BRIEN, J.F. Ethanol neurobehavioral teratogenesis and the role of the hippocampal glutamate-N-methyl-D-aspartate receptor-nitric oxide synthase system. *Neurotoxicol Teratol* 22: 607-616, 2000.
- KUNIMOTO, M. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. **Biochem-Biophys-Res-Commun.** Oct 14; 204(1): 310-7, 1994.
- LACERDA, L.D., SOUZA, M., RIBEIRO, M.G. The effects of land use change on Mercury distribution in soils of Alta Floresta, Southern Amazon. **Environm. Poll.**, 129:247-255, 2004.
- LANDMARK, K., AURSNES, I. Mercury, fish, fish oil and the risk of cardiovascular disease. **Tidsskr Nor Laegeforen.** Jan22, 124(2): 198-200, 2004.
- LEGIDO, A., VALENCIA, I., SMITH, J.D. Fetal neurological evaluation. **Rev Neurol**, 39(5):454-64, 2004.
- LEVESQUE, P.C., HARE, M.F., ATCHISON, W.D. Inhibition of mitochondrial Ca^{2+} release diminishes the effectiveness of methylmercury to release acetylcholine from synaptosomes. **Toxicol. Applied Pharmacol.** , 115: 11-20, 1992.
- LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther** 46: 321-340, 1990.
- LOWENSTEIN, C.J., GLATT, C.S., BREDET, D.S., SNYDER, S.H. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 89(15):6711-5, 1992.
- MACHO, L., ZORAD, S., RADIKOVA, Z., PATTERSON-BUCKEDAHL, P., KVETNANSKY, R. Ethanol consumption affects stress response and insulin binding in tissues of rats. **Endocr Regul** 37: 195-202, 2003.
- MANSOURI, A., GAOU, I., DE KERGUENEC, C., AMSELLEM, S., HAOUZI, D., BERSON, A., MOREAU, A., FELDMANN, G., LETTÉRON, P., PESSAYRE, D., AND FROMENTY, B. An alcoholic binge causes massive degradation of hepatic mitochondrial DNA in mice. **Gastroenterology.** vol. 117, p.181-190, 1999.

MATTSON, S.N., SCHOENFELD, A.M., RILEY, E.P. Teratogenic effects of alcohol on brain and behavior. **Alcohol Res Health** 25: 185-191, 2001.

MCNEIL, S.I., BHATNAGAR, M.K., TURNER, C.J. Combined toxicity of ethanol and methylmercury in rat. **Toxicology**, 53: 345-363, 1988.

MIKI, T., HARRIS, S.J., WILCE, P.A., TAKEUCHI, Y., BEDI, K.S. Effects of alcohol exposure during early life on neuron numbers in the rat hippocampus. I. Hilus neurons and granule cells. **Hippocampus** 13: 388-398, 2003.

MIURA, K., IMURA, N. Mechanism of methylmercury cytotoxicity CRC critical reviews in toxicology (**CRC crit. rev. toxicol.**) vol. 18, n^o3, pp. 161-188, 1987.

MIURA K., KOIDE N., HIMENO S., NAKAGAWA L., UMURA N. The involvement of microtubular disruption in methylmercury-induced apoptosis in neuronal and non-neuronal cell lines. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 160:279-288, 1999.

MIYAMOTO, M.D. Hg²⁺ causes neurotoxicity at an intracellular site following entry through Na⁺ and Ca²⁺ channels. **Brain Res.**, 267: 375-379, 1983.

MONCADA, S., BOLANOS, J.P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. **J Neurochem.** 97(6):1676-89. Review, 2006.

NAASSILA, M., PIERREFICHE, O., BEAUGE, F.J., SEBIRE, N., DAOUST, M. Chronic ethanol exposure differentially regulates NOS1 mRNA levels depending on rat brain area. **Neurosci Lett** 338: 221-224, 2003.

NAKADA, S., IMURA, N. Susceptibility of lipids to mercurials. **Journal of Applied Toxicology**. Volume 3, Issue 3, p. 131 – 134, 1983.

OHMIYA, Y., NAKAI, K. Effect of methylmercury on the ethanol elimination from the blood and the activity of alcohol dehydrogenase. **Jpn J. Pharmacol.** 27: 545-551, 1977.

O'KURSKY, J.R. Methylmercury-induced movement and postural disorders in developing rat: high-affinity uptake of choline, glutamate, and aminobutyric acid in the cerebral cortex and caudate putamen. **J. Neurochem.**, 53: 999-1006, 1989.

OLSON, H.C., MORSE, B.A., HUFFINE, C. Development and Psychopathology: Fetal Alcohol Syndrome and Related Conditions. **Semin Clin Neuropsychiatry** 3: 262-284, 1998.

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.**, 51: 285-294, 1982.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E., BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, 14: 149-167, 1985.

PHILLIPS, D.E., CUMMINGS, J.D., WALL, K.A. Prenatal alcohol exposure decreases the number of nitric oxide synthase positive neurons in rat superior colliculus and periaqueductal gray. **Alcohol** 22: 75-84, 2000.

PINHEIRO, M.C.N., NAKANISHI, J., OIKAWA T., GUIMARAES G., QUARESMA M., CARDOSO B., AMORAS W.W., VIEIRA J.L.F. Avaliação da contaminação mercurial mediante análise de teor de Hg em amostras de cabelo em comunidades ribeirinhas do Tapajós, Pará, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 33:181-184, 2000.

PONNAPPA, B.C., RUBIN, E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. **Alcohol Res Health** 24: 93-104, 2000.

PORSOLT, R.D., ANTON, G., BLAVET, N., JALFRE, M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressants treatment. **Eur. J. Pharmacol.**, 47: 379-391, 1978.

RANSOM, B., BEHAR, T., NEDEGAARD, M. New roles for astrocytes (stars at last). **Trends Neurosci.**, 26: 620-622, 2003.

RECHTSCHAFFEN, A., BERGMANN, B.M., EVERSON, C.A., GILLILAND, M.A. Sleep deprivation in the rat: **X. Integration and discussion of the findings**, 25: 68-87, 2002.

REYNOLDS, J.D., BRIEN, J.F. Ethanol neurobehavioural teratogenesis and the role of L glutamate in the fetal hippocampus. **Can J Physiol Pharmacol** 73: 1209-1223, 1995.

PURVES, D., WILLIAMS, S.M., LOTTO, R.B. The relevance of visual perception to cortical evolution and development. **Novartis Found Symp.** ; 228:240-54; discussion 254-8. Review, 2000.

RAJANNA, B., HOBSON, M. Influence of mercury on uptake of [^3H] dopamine and [^3H] norepinephrine by rat brain synaptosomes. **Toxicol. Lett.**, 27: 7-14, 1985.

RODIER, P.M. Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. **Dev Med Child Neurol.**, 22(4):525-45, 1980.

RODIER, P.M. Vulnerable periods and processes during central nervous system development. **Environ Health Perspect**, 102 Suppl 2:121-4, 1994.

RUMBEIHA, W.K., GENTRY, P.A., BHATNAGAR, M.K. The effects of administering methylmercury in combination with ethanol in the rat. **Vet. Hum. Toxicol.** 34: 21-25, 1992.

RUMBEIHA, W.K., YAMASHIRO, S., BHATNAGAR, M.K. The renal histology and ultrastructure in rats given methylmercury and ethanol in combination. **Vet. Hum. Toxicol.**, 33: 539-544, 1991.

SHAFER, T.J., ATCHISON, W.D. Block of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake into synaptosomes by methylmercury: Ca^{2+} and Na^+ -dependence. **JPET**, 248: 696-702, 1989.

SHAFER, T.J., MEACHAM, C.A., BARONE, J.R. Effects prolonged exposure to nanomolar concentrations of methylmercury on voltage-sensitive sodium and calcium currents in PC12 cells. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, 136: 151-164, 2002.

SAKATA-HAGA, H., SAWADA, K., KISANO, S., FUKUI, Y. Administration schedule for an ethanol-containing diet in pregnancy affects types of offspring brain malformations. **Acta Neuropathol (berl)**, 104: 305-312, 2002.

SANO, K., SHIMOJO, N., YAMAGUCHI, S. Effects of methylmercury on ethanol-induced sleeping time of mice. **Nippon Eis. Zass.**, 45: 717-722, 1990.

SATOH, H. Behavioral teratology of mercury and its compounds. **Tohoku J. Exp. Med.**, 201:1-9, 2003.

SOWELL, E.R., THOMPSON, P.M., TESSNE, K.D., JERNIGAN, T.L., RILEY, E.P., TOGA, A.W. Regional brain shape abnormalities persist into adolescence after heavy prenatal alcohol exposure. **Cereb Cortex**, 12: 856-865, 2002.

STERN, M.M. Plasticity of epidermal stem cells: survival in various environments. **Stem Cell**; Review.1(1):71-7. Rev. 2005.

- STREISSGUTH, A.P., AASE, J.M., CLARREN, S.K., RANDELS, S.P., LADUE, R.A., SMITH, D.F. Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults. *Jama* 265: 1961-1967, 1991.
- STREISSGUTH, A.P., LANDESMAN-DWYER, S., MARTIN, J.C., SMITH, D.W. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science* 209: 353-361, 1980.
- STROMLAND, K., PINAZO-DURAN, M.D. Ophthalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: clinical and animal model studies. *Alcohol* 37: 2-8, 2002.
- SULIK, K.K. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Exp Biol Med* (Maywood) 230: 366-375, 2005.
- SZABO, C., ZINGARELLI, B., SALZMAN, A.L. Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. *Circ Res.* 78(6):1051-63, 1996.
- TAMASHIRO, H., ARAKAKI, M., AKAGI, H., MURAO, K., HIRAYAMA, K., SMOLENSKY, M.H. Effects of ethanol on methyl mercury toxicity in rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* 18: 595-605, 1986.
- TAVARES, L.M., CAMARA, V.M., MALM, O., SANTOS, E.C. Performance of neurological development tests by riverine children with moderate mercury exposure in Amazonia, Brazil. *Cad. Saúde Públi.*, 21: 1160-1167, 2005.
- THOMAS, J.D., RILEY, E.P. Fetal Alcohol Syndrome. *Alcohol Health Res. World*, 22: 47-53, 1998.
- TSUZUKI, Y. Effects of chronic methylmercury exposure on activities of neurotransmitter enzymes in rat cerebellum. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 60: 379-381, 1981.
- TURNER, C.J., BHATNAGAR, M.K., YAMASHIRO, S. Ethanol potentiation of methyl mercury toxicity: a preliminary report. *J. Toxicol. Environ. Health.* 7: 665-668, 1981.
- WANG, H.G., LU, F.M., JIN, I., UDO H., KANDEL, E.R., DE VENTE, J., WALTER, U., LOHMANN, S.M., HAWKINS, R.D., Antonova, I. Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins. *Neuron* 45: 389-403, 2005.

WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). Environmental Health Criteria 101 Methylmercury. Geneva: **World Health Organization**, 1990.

_____, IPCS (International Program in Chemical Safety). Environmental Health Criteria 118 Inorganic Mercury. Geneva: **World Health Organization**, 1991.

YAMASHITA, T., ANDO, Y., SAKASHITA, N., HIRAYAMA, K., TANAKA, Y., TASHIMA, K., UCHINO, M., ANDO, M. Role of nitric oxide in the cerebellar degeneration during methylmercury intoxication. **Biochim Biophys Acta** 1334: 303-311, 1997.

YUAN, Y., ATCHISON, W.D. Disruption by methylmercury of membrane excitability and synaptic transmission of CA1 neurons in hippocampal slices of the rat. **Toxicol. Applied Pharmacol.**, 120: 203-215, 1993.

8. APÊNDICE A

Artigo científico produzido apartir dos dados encontrados nas pesquisas realizadas para o TCC.

9. APÊNDICE B