



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR

RAFAEL MONTEIRO FERNANDES

**AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO  
MERCÚRIO INORGÂNICO NA MEMÓRIA SOCIAL E MEMÓRIA  
EMOCIONAL DE RATOS WISTAR MACHOS ADULTOS.**

BELÉM-PA  
2015

RAFAEL MONTEIRO FERNANDES

**AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO  
MERCÚRIO INORGÂNICO NA MEMÓRIA SOCIAL E MEMÓRIA  
EMOCIONAL DE RATOS WISTAR MACHOS ADULTOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de Concentração: Neurociências  
Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima  
Co-orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Freitas Da Silva

BELÉM-PA  
2015

RAFAEL MONTEIRO FERNANDES

**AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO  
MERCÚRIO INORGÂNICO NA MEMÓRIA SOCIAL E MEMÓRIA  
EMOCIONAL DE RATOS WISTAR MACHOS ADULTOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima – Orientador  
Instituto de Ciências da Biológicas – ICB-UFPA

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Freitas Da Silva – Co-orientador  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFPA

---

Prof. Dr. Ademir Ferreira da Silva Júnior – Avaliador  
Centro de Ciências Biológicas da Saúde – CCBS – UEPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa do Socorro Campos de Araújo Sousa - Avaliador  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFPA

BELÉM – PA  
2015

## AGRADECIMENTOS

Eu agradeço a Deus em primeiro lugar, pois dia a dia, em cada adversidade, Ele colocou pessoas em minha frente que cada um de sua maneira pode me amparar quando caí, que me deram forças e que acreditaram quando nem eu mais acreditava, sou abençoado por ter tido em meu caminho essas pessoas que irei citar abaixo:

Tudo isso começou há quase 26 anos... O que seria de mim sem esses dois que sempre, sempre confiaram em mim, em cada dia, em cada passo... sim, meus pais Jane Monteiro e Oswaldo Fernandes. Sem eles me apoiando, me dando força, e também brigando (né, mãe?!) eu não seria o que sou hoje! Mas nem só de lamúrias foram esses tempos mas de muitas alegrias, risos e orações (Nossa Senhora de Nazaré com certeza pode testemunhar isso)

Essa pessoa tem menos tempo de estrada mas também não fica atrás, um relacionamento que nasceu nas adversidades da pós graduação e de lá pra cá um sustentando o outro, a cada dia e semana e.... já faz quanto tempo? 3 anos! Te agradeço Ana Carolina Alves, por estar a cada dia em meu lado na vida e na pós-graduação.

Ao meu orientador Rafael Rodrigues Lima, que há mais de 4 anos me deixa louco - acho que pro louco que sou, não podia pedir um orientador clássico, prefiro o meu que a cada dia de trabalho vem com uma história nova para contar, que além de ser quem me ensinou desde as técnicas de imunohistoquímica, a como me virar em uma universidade, mas me ensinou sobre a vida e a importância da amizade.

À minha co-orientadora Márcia Freitas que sempre foi compreensiva e parceira sempre me ajudando em todas as minhas dúvidas.

Ao meu amigo Enio Mauricio Santos, esse cara foi um dos anjos que Deus me enviou nesse árduo caminho, me deu forças (não apenas emocional, mas não consigo contar quantas vezes foi esticar cortes em lâmina comigo), me ensinou que na vida não tem que se “ensebar” com um problema: é resolver e pronto! E agora meu compadre, meu afilhado ainda nem sabe ler mas já está sendo citado.

Ao Paulo Mecnas, para quem não tem hora ruim, parceria de laboratório que deu certo, amigo pra um bom papo, mas companheiro quando estou até os olhos de problemas.

Agradeço também ao Bruno Teixeira, parceiro de laboratório, por compreender as diversas situações do dia-a-dia e por sua solicitude e partilhas.

Nesse caminho existiram 3 pessoas que sem elas eu não estaria na pós-graduação: Prof. Dr. Antônio Pereira, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal (pelo qual, por muito tempo, fui orientando e sempre estive de portas abertas pra mim) e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cristiane Maia (Nunca obtive um não como resposta, posso dizer que durante esse tempo foi como uma mãe). Muito Obrigado!

À equipe incansável da secretaria da Pós-graduação: Socorro, Jean e Daniel, que sempre estiveram do meu lado para resolver da maneira mais fácil todos os problemas que surgiram (e não foram poucos).

À Coordenação do PNBC, Prof. Dr. Anderson Herculano, e ao Prof. Dr. Rommel Burbano, que me aguentou em várias ligações e whatsapp para resolver minha vida na pós-graduação.

Ao Reginaldo, Amarildo, Marcelinho e Irmão, incansáveis na gerência do Biotério Central, sem eles não teria nem os animais para pesquisa e nem as risadas, muitos momentos de risadas pelos corredores.

Meus amigos Ijair e Diego, que, por ocasião da minha entrada na UFPA, foram companheiros incansáveis, e sem contar o aprendizado das técnicas Jedi de cortes no criostato.

Ao Prof, Walther Carvalho, que um dia acreditou em mim e me deu a oportunidade de conhecer a beleza da pesquisa.

À Prof<sup>a</sup>. Maria Lucia, que em suas aulas no meu primeiro ano de graduação, já me deixou o gosto saboroso da pesquisa e do trabalho em laboratório.

Aos meus professores da graduação, Flávio, Cibele, Valéria, Paulo, Erielson, Eduardo Lama, Alan Lameira, Reinaldo e tantos outros, que me deram o conhecimento e o estímulo a seguir esse caminho e à docência.

Aos meus irmãos posições, gêmeos Conduru, mesmo sem sangue, esses dois sabem o quanto são importantes pra mim e souberam entender minha ausência durante essa etapa da vida.

Ao Taylon, Marcos, Alene, Rafa Souza, Dani Souza e Gabi Souza: obrigado pelos momentos de felicidade e risos e a amizade de cada dia.

Aos meus amigos Ingrid, Julius, Arthur, Sadala, Eduardo Japa, Tameirão, Luene, Miguel e tantos outros que fizeram parte de minha vida e sempre estiveram no meu lado

Aos meus companheiros do LABEF, que a cada dia compartilham risos e dores de cabeça.

“Faça ou não faça. Tentativa não há.”

(Mestre Yoda)

## RESUMO

O mercúrio inorgânico é facilmente absorvido por ingestão ou via cutânea. Entretanto, uma quantidade relativamente pequena de  $\text{Hg}^{2+}$  atravessa a barreira hematoencefálica ou as membranas biológicas, sendo em ratos adultos, o transporte axonal retrógrado a única via para a absorção de  $\text{Hg}^{2+}$  por neurônios, apresentando um forte potencial neurotóxico. Desta forma, o presente estudo objetivou investigar os efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio em memória social e emocional de ratos adultos. Para isso utilizou-se ratos Wistar, machos ( $n=40$ ), com 5 meses de idade, distribuídos em dois grupos, um dos quais foi exposto ao Cloreto de Mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) via oral, por gavagem intra-gástrica ( $0,375\text{mg/Kg}$ ), durante 45 dias. O outro grupo, denominado grupo controle ( $n=20$ ) recebeu água destilada por gavagem. Foram utilizados os seguintes testes comportamentais: teste do campo aberto, teste de reconhecimento social para avaliação de memória social; o Teste do Labirinto em T Elevado (LTE) foi usado para avaliar o aprendizado do estado de esquiva e as memórias de curta e longa-duração. Após a finalização dos testes, os animais foram sacrificados para a dosagem do mercúrio total no hipocampo e através de um Espectrofotômetro de Absorção Atômica. Os resultados revelaram que os animais submetidos à exposição ao cloreto de mercúrio não manifestaram déficits em atividade exploratória. Nos dados do Teste de Reconhecimento Social, observamos que não houve alteração em memória social. No teste do LTE, o grupo exposto ao  $\text{HgCl}_2$  necessitou de um número maior de exposições para aquisição do critério de esquiva ( $p<0,05$ ) e apresentaram latência maior no braço aberto do aparato ( $p<0,05$ ). Após 24 horas, verificou-se que os animais expostos passaram menos tempo no braço fechado em relação ao grupo controle, sugerindo déficits de memória de longa duração. Ao observar apenas o grupo  $\text{HgCl}_2$ , percebeu-se uma melhora no reteste, indicando preservação na memória de curta duração. Os dados de espectrometria de absorção atômica mostraram uma maior deposição de mercúrio no hipocampo de animais intoxicados, em relação aos animais do grupo controle.

**Palavras-chave:** Mercúrio Inorgânico, Cloreto de Mercúrio, Memória, Intoxicação, Aprendizagem.



**ABSTRACT**

Inorganic mercury is easily absorbed by ingestion or cutaneous. However, a relatively small amount of  $Hg^{2+}$  crosses the blood brain barrier or biological membranes, and in adult rats, the retrograde axonal transport only way to  $Hg^{2+}$  uptake by neurons, presenting great potential neurotoxic. The aim of this study was to determine the effects of chronic exposure to mercury chloride in social and emotional memory in adult rats. For this we used male Wistar rats (n= 40) with 5 months of age , divided into two groups , one of which was exposed to mercury chloride ( $HgCl_2$ ) by intragastric gavage (0,375mg / kg) for 45 days. The other group, called the control group (n=20) received distilled water by gavage. The following behavioral tests were used: the open field test, social recognition test for the evaluation of social memory; the elevate T maze test (LTE) was used to assess learning in the state of avoidance and short and long - term memories. After completion of the tests, the animals were sacrificed to evaluate the level of total mercury in the hippocampus by an Atomic Absorption Spectrophotometer. The results showed that animals subjected to exposure to mercury chloride did not show deficits in exploration activity. The data from social recognition test, showed that there was no change in social memory. In LTE test, the group exposed to  $HgCl_2$  required a greater number of exposures for the acquisition of avoidance criteria ( $p<0.05$ ) and a higher latency in the open apparatus arm ( $p<0.05$ ). After 24 hours, it was found that treated animals spent less time in the closed arms than in the control group, suggesting the long-term memory deficits. By just watching the  $HgCl_2$  group, noticed an improvement in the retest, indicating preservation in the short-term memory. The data of atomic absorption spectrometry showed greater deposition of mercury in the hippocampus of affected animals, as compared to control animals.

**Keywords:** Inorganic Mercury, Mercury Chloride, Memory, Intoxication

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Quadro 1:</b> Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo	30
<b>Figura 1:</b> Desenho Esquemático dos Experimentos	31
<b>Figura 2:</b> Efeitos da administração de HgCl <sub>2</sub> (0,375 mg/kg/dia) sobre a atividade exploratória espontânea de ratos Wistar machos avaliados no campo aberto	40
<b>Figura 3:</b> Efeitos da administração de HgCl <sub>2</sub> (0,375 mg/kg/dia) na memória de reconhecimento social em ratos Wistar machos	41
<b>Figura 4:</b> Efeitos da administração de HgCl <sub>2</sub> (0,375 mg/kg/dia) no aprendizado e memória de curta e longa duração de ratos Wistar machos avaliados pelo teste do Labirinto em T Elevado	44
<b>Figura 5:</b> Efeitos da administração de HgCl <sub>2</sub> (0,375 mg/kg/dia) sobre a deposição de mercúrio (µg/g) no hipocampo de ratos Wistar machos	45

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

**Hg** – Mercúrio

**MeHg** – Metil Mercúrio

**Hg<sup>0</sup>** – Mercúrio Elementar

**Hg<sub>2</sub><sup>+2</sup> / Hg<sup>+1</sup>** - Íon Mercuroso

**Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** – Cloreto Mercuroso

**Hg<sup>+2</sup>** - Íon Mercúrico

**HgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de Mercúrio

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**NOS** – Óxido Nítrico Sintase

**O<sup>3</sup>** – Ozônio

**H<sub>2</sub>O** – Água

**OH<sup>-</sup>** - Hidroxila

**O<sup>2</sup>** – Oxigênio

**Na/K ATPase** – Bomba de Sódio e Potássio

**-SH** - grupamentos sulfidrílicos

**EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**CA1** – Corno de Amon

**LTE** - Labirinto em T Elevado

**CEPAE/UFPA** – Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação – Universidade Federal do Pará

**DZP** – Diazepan

**CAF** – Cafeína

**NaCl** – Cloreto de Sódio

**i.p** – Intraperitoneal

**KMnO<sub>2</sub>** – Permanganato de Potássio

**NH<sub>2</sub>OH** – Hidroxilamina

**HNO<sub>3</sub>** - Ácido Nítrico

**HClO<sub>4</sub>** – Ácido Perclórico

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** - Ácido Sulfúrico

**Sn<sup>2+</sup> e Sn<sup>4+</sup>** - Estanho

**RID** - Ratio of Investigation Duration / Taxa de duração de Investigação

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1. MERCÚRIO	14
1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MERCÚRIO	14
1.3. CARACTERÍSTICAS E BIODISPONIBILIDADE DO MERCÚRIO	15
1.4. MERCÚRIO ORGÂNICO	16
1.5. MERCÚRIO INORGÂNICO	17
1.6. CICLO AMBIENTAL DO MERCÚRIO	18
1.7. VIAS DE EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO	19
1.8. EFEITOS DO MERCÚRIO NO ORGANISMO	20
1.9. EFEITOS DO MERCÚRIO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	21
1.9.1 Exposição das células ao HgCl <sub>2</sub>	22
1.10. MEMÓRIA	23
1.11 ANSIEDADE	25
1.12 HIPÓTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL	27
1.13 OBJETIVO	28
1.13.1. Objetivo Geral	28
1.5.2. Objetivos Específicos	28
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
2.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	29
2.2. PROCEDIMENTOS DE EXPOSIÇÃO E FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	29
2.3. DESENHO EXPERIMENTAL	30
2.4. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS	31
2.4.1. Campo Aberto	32
2.4.2. Reconhecimento Social	33
2.4.3. Teste do Labirinto em T Elevado	35
2.5. DOSAGEM DO MERCÚRIO TOTAL	36
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
3.1. EXPOSIÇÃO CRÔNICA A HgCl <sub>2</sub> INDUZ DÉFICITS NA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA ESPONTÂNEA EM RATOS	39
3.2. PREJUÍZO DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA SOCIAL INDUZIDAS POR EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO HgCl <sub>2</sub> EM RATOS	40

<b>3.2. PREJUÍZO DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA DE CURTO E LONGO PRAZO INDUZIDAS POR EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO HgCl<sub>2</sub> EM RATOS</b>	<b>41</b>
<b>3.4. DEPOSIÇÃO DE MERCÚRIO NO HIPOCAMPO APÓS A INTOXICAÇÃO CRÔNICA</b>	<b>45</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>50</b>
<b>6. Referencias</b>	<b>51</b>
<b>Anexo - 1</b>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. MERCÚRIO

O uso do mercúrio em atividades humanas pode ser encontrado em descrições datadas de 2000 anos antes de Cristo, por chineses e egípcios que utilizavam cinábrio (sulfeto de mercúrio) na fabricação de corante vermelho, bem como de amálgamas. Também foi utilizado no tratamento de sífilis, como anti-séptico e por alquimistas para o refino de ouro (YAMADA et al., 1997).

Intoxicação por metilmercúrio foi amplamente descrita após acidente em Minamata, no Japão, um dos casos mais conhecidos, ocorrido em 1956, após a descarga de grande quantidade do metal na baía de Yatsushiro por uma indústria de polímeros, que usava compostos mercuriais como catalisadores de reação, resultando em um acúmulo de metilmercúrio (MeHg) na fauna da baía. Após alguns anos, vários efeitos adversos relacionados à exposição ao MeHg começaram a ser observados na população local, que se alimentava dos peixes desta região (EKINO et al., 2007). O conjunto de sintomas decorrentes, como parestesia, ataxia e perda de visão, compõem a doença de Minamata, que pode evoluir a óbito (EKINO et al., 2007).

### 1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MERCÚRIO

O mercúrio, identificado pelo símbolo Hg (do latim “hydrargyrum”, que significa prata líquida) é o único metal líquido à temperatura ambiente, com propriedades físicas que incluem baixa viscosidade, alta densidade, excelente condutância elétrica e superfície refletora, não apresentando função biológica conhecida (CLARKSON e MAGOS, 2006).

O mercúrio, elemento químico de número atômico 80, encontra-se no grupo II B da tabela periódica de classificação dos elementos, junto com o cádmio e o zinco. O Hg é um metal pesado bem estudado (AZEVEDO, 2003; CLARKSON, 2003) com alto poder de toxicidade em todas as formas em que se apresenta, sobre várias células, órgãos e sistemas (GUO et al., 1998; SILBERGELD et al., 2000).

O mercúrio pode se combinar com outros íons formando compostos inorgânicos e orgânicos, aumentando sua toxicidade e deixando mais volátil e solúvel em água. Sua Lipofilicidade facilita a transposição de barreiras ou membranas, podendo depositar-se em diversos sistemas no organismo, como o sistema renal e digestório (BANDO et al., 2005; FARIA, 2003; HODGSON et al., 2007; WORLD HEALTH e INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF, 2014).

### 1.3. CARACTERÍSTICAS E BIODISPONIBILIDADE DO MERCÚRIO

O mercúrio apresenta-se em diversas formas (Hg metálico, orgânico, inorgânico) e pode encontrar-se em três estados de oxidação (0, +1, +2), em geral facilmente interconversíveis na natureza. O Hg elementar ( $\text{Hg}^0$ , líquido ou gasoso, praticamente insolúvel em água) e as formas oxidadas: íon mercuroso,  $\text{Hg}^{+1}$ , quando o átomo de mercúrio perde um elétron e o mercúrico,  $\text{Hg}^{+2}$ , quando este perde dois elétrons, pouco estável e bastante rara em sistemas naturais.

De acordo com Lindqvist e colaboradores (LINDQVIST et al., 1991), o mercúrio elementar e o dimetilmercúrio são voláteis à temperatura ambiente e os vapores podem representar um perigo para os seres humanos. Na presença de cálcio, forma amálgama em temperatura de  $390^\circ$ , podendo reagir com metais alcalinos e produzir reações exotérmicas com riscos de explosões e chamas (AZEVEDO, 2003).

A exposição pode ocorrer em muitos tipos de indústrias, onde grande quantidade de mercúrio elementar é utilizada, inclusive na fabricação de cloro e álcali, amálgamas dentários, interruptores eletrônicos e lâmpadas fluorescentes (SYVERSEN e KAUR, 2012).

As formas de exposição ao mercúrio variam de acordo com o tipo de composto. O vapor de mercúrio, por exemplo, encontrado em restaurações de amálgama, termômetros e lâmpadas, são absorvidos pelos pulmões, especialmente decorrente de atividades ocupacionais (CLARKSON et al., 2007; HOUSTON, 2007). A exposição ao mercúrio elementar que ocorre a



partir do ar, acarreta uma rápida absorção através dos pulmões e cerca de 74% do metal é mantido no corpo humano.

#### 1.4. MERCÚRIO ORGÂNICO

A forma orgânica é altamente tóxica tanto para o ser humano quanto para toda a biota. Caso esteja associado a um radical orgânico, pode entrar rapidamente na corrente sanguínea, acarretando danos irreparáveis ao sistema nervoso central (MELA et al., 2007).

Os compostos organomercuriais são a associação do cátion  $\text{Hg}^{2+}$  com radicais de carbono através de uma ligação covalente (AZEVEDO, 2003). Este é um grupo heterogêneo e seus elementos apresentam possibilidades variadas de produzir efeitos tóxicos tendo, em geral, baixa absorção cutânea e elevada taxa de absorção por exposições orais ou por inalação (BRUNTON et al., 2011; LONGO et al., 2011).

O metilmercúrio (MeHg) é a principal forma orgânica encontrada na natureza, pois é formada principalmente por metilação ou biometilação do metal, realizada por bactérias metalogênicas, a partir dos compostos metálicos liberados pelas indústrias em rios e córregos. Este processo ocorre devido ao fato de que o mercúrio iônico é prejudicial a essas bactérias, que tentam eliminá-lo através da metilação, transformando-o em MeHg que, por ser lipossolúvel é mais facilmente eliminado por organismos unicelulares (WASSERMAN, 2001).

Outra forma de mercúrio orgânico, muito conhecida e utilizada é o etilmercúrio ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$ ) encontrado no medicamento timerosal, utilizado como conservante de vacinas e, por muito tempo, como anti-séptico, neste último sendo substituído pela clorexidina. Em contraposto, temos o dimetilmercúrio ( $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ), de uso quase exclusivamente laboratorial e de altíssima toxicidade, devido a sua alta absorção por via dérmica (LONGO et al., 2011).

Os efeitos tóxicos do mercúrio dependem de sua forma química, dose utilizada, duração da exposição e via de administração. As formas orgânicas, especialmente o metilmercúrio, são mais tóxicas ao organismo

do que as formas inorgânicas, provavelmente por conta de sua alta lipossolubilidade (GOCHFELD, 2003).

### 1.5. MERCÚRIO INORGÂNICO

O mercúrio inorgânico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) e seus derivados podem ser formados a partir do mercúrio metálico ou pela conversão de formas orgânicas de mercúrio a formas inorgânicas ( $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Hg}^+$ ), apresentando-se em diferentes formas, como: cloreto mercurioso ou  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  – muito utilizado na agricultura como fungicida; o cloreto de mercúrio ou  $\text{HgCl}_2$  – atualmente empregado como catalisador na indústria química sendo, então, possivelmente eliminado nos efluentes líquidos industriais, podendo ser encontrado dentre outras formas, também, em cosméticos, produtos de limpeza e outros produtos domésticos (AZEVEDO, 2003; OZUAH, 2000; WOOD et al., 1968).

O  $\text{HgCl}_2$  foi usado como conservante de películas fotográficas, sendo também um componente de alguns cremes de clareamento da pele.

Somente cerca de 2% desta forma de mercúrio é absorvido inicialmente (NORSETH e CLARKSON, 1971), mas propõe-se que seu efeito corrosivo sobre o intestino aumenta sua permeabilidade e, conseqüentemente, a absorção após exposição prolongada (KOSTIAL et al., 1979).

Rahola e colaboradores (RAHOLA et al., 1973) e Hattula e Rahola (HATTULA e RAHOLA, 1975) demonstraram que cerca de 1-16% da dose inicial foi absorvida com meia vida de cerca de 41 dias. O mercúrio inorgânico acumula principalmente no rim, seguido por sua acumulação no fígado.

A absorção de mercúrio inorgânico nos alimentos tem sido relatada em valores inferiores a 15% em animais experimentais (PIOTROWSKI et al., 1992). Em humanos voluntários que ingeriram uma dose de marcador oral de nitrato de mercúrio em solução aquosa, a taxa de absorção foi de 5-10% (RAHOLA et al., 1973).

As propriedades físico-químicas dos compostos mercuriais inorgânicos estão intimamente relacionadas ao ânion ao qual o metal se liga como, por exemplo, o nitrato e o sulfato de Hg, os quais possuem elevada hidrossolubilidade. Em contrapartida, o cloreto de Hg é bastante solúvel em

solventes orgânicos sendo absorvido por via dérmica e via gastrointestinal (AZEVEDO, 2003).

#### 1.6. CICLO AMBIENTAL DO MERCÚRIO

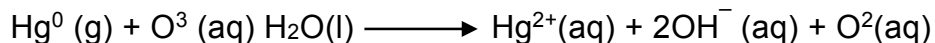
Ao entrar em contato com o solo ou sedimento, pode ocorrer absorção do mercúrio na forma insolúvel seguida de metilação/desmetilação. O ciclo se completa pelas rotas de precipitação, conversão em formas voláteis ou solúveis, reiteração deste metal na atmosfera ou bioacumulação na cadeia alimentar aquática ou terrestre (BISINOTI e JARDIM, 2004).

As áreas geológicas conhecidas como cinturões de mercúrio, localizadas nas Américas, destacam-se pela maior forma de ocorrência natural (SAHA e LEE, 1972; SWAIN et al., 2007). O ciclo de transporte e distribuição do mercúrio no ambiente pode ser classificado em dois tipos: um local e um global. O ciclo global compreende a evaporação do mercúrio, circulação atmosférica de seus vapores e a posterior precipitação através das chuvas, quando o mercúrio retorna para a terra e para a água (LIN e PEHKONEN, 1999; PIRRONE e MASON, 2009).

Apesar de carregado na natureza por meio da lixiviação das rochas (processo de “arraste” ou “lavagem” dos sais minerais presentes no solo, caracterizando uma forma inicial de erosão, ou erosão leve) ou da emissão de gases em áreas vulcânicas, as concentrações deste metal têm aumentado consideravelmente devido a atividades humanas, como a volatilização do mercúrio decorrente da incineração de lixo urbano ou industrial, descarte de lâmpadas em aterros e o mercúrio decorrente da atividade mineradora. (AZEVEDO, 2003; LACERDA, 1997).

Cerca de dois anos após a liberação do vapor de mercúrio na atmosfera, ele é convertido na forma solúvel ( $\text{Hg}^{2+}$ ) reação feita pela oxidação do metal elementar e na presença de gás ozônio, água e luz solar. Como  $\text{Hg}^{2+}$ , retorna ao solo através das chuvas, podendo ser convertido novamente em vapor no solo ou por ação de microorganismos existentes nas águas, voltando para a atmosfera. Desta forma, o mercúrio pode

recircular por longos períodos, caracterizando o ciclo global deste metal (CLARKSON e STRAIN, 2003).



Ao retornar ao solo, podem se formar sais, se combinando com uma infinidade de elementos como o carbeto de sódio, alumínio, chumbo, ferro e cloro, neste caso, originando o  $\text{HgCl}_2$ . Chegando a ecossistemas aquáticos, ficam dissociados deixando livre a forma inorgânica  $\text{Hg}^{2+}$  (GUENTZEL et al., 1996). Como um dos metais com maior potencial tóxico, é capaz de bioacumular-se nos organismos e biomagnificar através da cadeia alimentar (MOREL et al., 1998).

### 1.7. FONTES DE EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO

No corpo humano, o  $\text{Hg}^{2+}$  conta com três fontes principais. A primeira é a absorção gastrintestinal, sendo cerca de 7% do  $\text{Hg}^{2+}$  contido nos alimentos absorvido por esta via (RAHOLA et al., 1973). A segunda fonte é a oxidação de  $\text{Hg}^0$ , liberado de amálgamas dentários ou disponível na atmosfera, absorvido pelo corpo e oxidado até a forma de  $\text{Hg}^{2+}$  (CLARKSON e MAGOS, 2006). Cerca de 75% do vapor de mercúrio inalado permanece no corpo.

A terceira fonte de  $\text{Hg}^{2+}$  é a desmetilação de  $\text{MeHg}$ , que mesmo em pequena proporção no organismo pode ser convertido em  $\text{Hg}^{2+}$  pela microflora intestinal, células fagocíticas e microsomas do fígado (SUDA e HIRAYAMA, 1992; SUDA et al., 1993; SUDA et al., 1992).

Outra forma de exposição ao mercúrio inorgânico ocorre a partir do consumo de alimentos contaminados, como peixes e moluscos de água doce ou salgada, uso de cosméticos contendo mercúrio em sua composição e timerosal.

Sobre o timerosal, trata-se de um composto inorgânico de mercúrio, usado como conservante em vacinas (CLARKSON et al., 2003), metabolizado no corpo humano e degradado em etilmercúrio e tiosalicilato (GEIER e GEIER, 2003). Sua utilização iniciou-se em 1930 e perdura até os tempos atuais, mantendo a linha de produção estéril, impedindo o crescimento microbiano durante o armazenamento e utilização (WORLD

HEALTH e INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF, 2014).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), através da Resolução 528 de 17 de abril de 2001, proibiu o uso deste composto nos medicamentos, por seu risco de causar intoxicação aos usuários. Não há, entretanto, um substituto eficaz para o timerosal, motivo pelo qual ele continua sendo utilizado em vacinas por recomendação da OMS (WORLD HEALTH e INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF, 2014).

Intoxicação em doses 7,5 mg/Kg de cloreto de mercúrio pode levar à falência renal, mediada por redução da NOS (óxido nítrico sintase) cerebral presente em células renais, com consequente redução do óxido nítrico (YANAGISAWA et al., 2002).

#### 1.8. EFEITOS DO MERCÚRIO NO ORGANISMO

O cloreto de mercúrio é facilmente absorvido por ingestão ou via cutânea. Entretanto, uma quantidade relativamente pequena de  $Hg^{2+}$  atravessa a barreira hematoencefálica ou as membranas biológicas, sendo, dessa forma, excretado através da urina ou das fezes (CLARKSON, 2002; TAKEUCHI et al., 1989). Justamente por essa dificuldade em atravessar as membranas biológicas, o mercúrio inorgânico tem como principal sítio de toxicidade as próprias membranas e o meio extracelular (FRIBERG e MOTTET, 1989).

O sistema renal sofre influência da exposição aguda e crônica ao mercúrio, sendo a perda da função glomerular considerada uma das principais alterações observadas. Considerando a sua função de extrair substâncias do organismo, os rins são o melhor indicador da toxicidade deste metal (CARMIGNANI et al., 1992). A glomerulonefrite auto-imune decorrente desta intoxicação causa proteinúria, oligúria e hematúria, alterações observadas em indivíduos que ingeriram de 3.5 a 37 mgHg/kg (BERNHOF, 2012).

Pode-se observar, também, acúmulo de mercúrio no córtex renal (após exposição à forma elementar e inorgânica) (HAHN et al., 1990), bem como nos túbulos proximais (DANSCHER et al., 1990).

O sistema respiratório também pode ser afetado pelo mercúrio, com consequente edema pulmonar, congestão, tosse e pneumonia (BLUHM et al., 1992; TAUEG et al., 1992). Exposição aguda provoca degeneração e necrose pulmonar, de acordo com pesquisa realizada por Ashe e colaboradores (ASHE et al., 1953).

Alterações gastrintestinais como irritação da mucosa, com diarreia, náuseas e vômitos também são referidos como efeitos tóxicos do HgCl<sub>2</sub>. Baixas doses de mercúrio administradas por gavagem (0,1mg/kg) são suficientes para promover dano e aumento do estresse oxidativo no fígado (BANDO et al., 2005).

#### 1.9. EFEITOS DO MERCÚRIO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Azevedo (AZEVEDO, 2003) aponta o sistema nervoso central (SNC) como um importante órgão-alvo da ação do mercúrio em todas as espécies. A intoxicação por este metal pode causar ou agravar doenças neurodegenerativas (MUTTER et al., 2007). O quadro neurológico de intoxicação aguda inclui ataxia, disartrias, parestesia e perda de audição (AZEVEDO, 2003). Este composto pode ser transportado através de um ou mais transportadores de aminoácidos, especialmente pelo complexo cisteína, para o interior das células endoteliais dos vasos localizados no cérebro, configurando uma possível razão para o acúmulo desta substância nesta região (BERLIN et al., 2007; SIMMONS-WILLIS et al., 2002).

Embora seja pouco lipossolúvel, o mercúrio inorgânico pode ser detectado no cérebro, rompendo a homeostase neuronal, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Szumanska e colaboradores (SZUMANSKA et al., 1993) relatam alteração na atividade da Na/K ATPase no córtex cerebral como uma possível via para a absorção do mercúrio inorgânico pelo sistema nervoso central.

Estudos anteriores apontam que a absorção de mercúrio em neurônios está relacionada à idade. Em ratos adultos, o transporte axonal retrógrado

(da junção neuromuscular para motoneurônios da medula espinhal e tronco cerebral) é a única via para a absorção de  $\text{Hg}^{2+}$  por neurônios, já que a eletricidade desta substância impede sua passagem através da barreira hemato-encefálica (ARVIDSON, 1990; 1992).

Há evidências de que, em ratos jovens, o  $\text{Hg}^{2+}$  passa direto pela barreira hemato-encefálica e, subseqüentemente, é absorvido por neurônios cerebrais, não sendo, porém, detectado em neurônios espinhais em experimentos com injeções intraperitoneais por 4 dias consecutivos em dose de 0,6  $\mu\text{g/g}$ . Danos em neurônios cerebrais, porém, foram observados após exposição a dose cerca de oito vezes menor (FENG et al., 2004).

Este fato pode encontrar precedentes nas características da barreira hemato-encefálica durante o desenvolvimento. Nesta fase, a barreira necessita ser mais permeável para acomodar a alta demanda de nutrientes transportados pelo sangue para o crescimento encefálico, e nesse contexto, o  $\text{Hg}^{2+}$  pode adentrar o sistema nervoso central (ALLEN et al., 2001). O  $\text{HgCl}_2$  é proposto como um tóxico direto à barreira, facilitando seu rompimento (ALBRECHT et al., 1993; PETERSON e CARDOSO, 1983).

O mercúrio influencia a atividade da colinesterase e monoamino oxidase, enzimas importantes na síntese e degradação de neurotransmissores (BASU et al., 2007). Alguns estudos correlacionam a neurotoxicidade do mercúrio com o estresse oxidativo (HUANG, Y. et al., 2008; SHANKER et al., 2004). Um dos determinantes da toxicidade do mercúrio é a elevada afinidade com os grupamentos sulfidrílicos (-SH), fundamentais para a função normal de várias proteínas que formam as enzimas, canais iônicos ou receptores (BORASO e WILLIAMS, 1994; CHIAMVIMONVAT et al., 1995).

### **1.9.1 Exposição das células ao $\text{HgCl}_2$**

Quanto ao estresse oxidativo, observa-se uma forte associação com o cloreto de mercúrio. Animais expostos a esse composto apresentaram aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) (KONIGSBERG et al., 2001). O SNC é sensível a este aumento por possuir menor capacidade antioxidante do que outros tipos celulares (HALLIWELL, 1992). Neste tecido, as EROs agem sobre

enzimas, proteínas, membranas lipídicas e DNA, modificando vias de sinalização intracelular necessárias para a sobrevivência dos neurônios (DROGE, 2002; MAHER e SCHUBERT, 2000).

A exposição aos vapores de mercúrio, que após ser oxidado se transforma em  $Hg^{2+}$  (COUNTER, 2003) resulta em tremores, déficit em velocidade de processamento de informação, destreza manual, velocidade psicomotora, distúrbios psicológicos e pode estar também associado a doença de Alzheimer (CLARKSON et al., 2003; ZACHI et al., 2007).

Estudos em macacos têm verificado a presença de mercúrio inorgânico no cérebro, associado com aumento da contagem de células inflamatórias (microglías) e diminuição na contagem de astrócitos (BURBACHER et al., 2005; CHARLESTON et al., 1995).

Como uma toxina eletrofílica, o  $Hg^{2+}$  apresenta forte potencial neurotóxico, sendo provável que os neurônios não tenham mecanismos de defesa adequado contra esta substância (SARAFIAN et al., 1994).

O cloreto de mercúrio exerce um efeito inibitório no transporte de membrana que pode causar, por exemplo, inibição seletiva da captação de glutamato pelos astrócitos de camundongos e pelo córtex cerebral de ratos (GASSO et al., 2000; JUAREZ et al., 2002; MORETTO et al., 2005).

## 1.10. MEMÓRIA

A memória é a capacidade de reter e recuperar informações, produzindo alterações comportamentais e permitindo que o indivíduo se situe no presente, considerando passado e futuro. Engloba o conjunto de informações sobre fatos da vida de um indivíduo, sendo um processo dinâmico que envolve a maneira pela qual o cérebro apreende a informação (aquisição), armazena-a (consolidação) e recupera-a posteriormente (evocação). Pode-se citar, também, os fenômenos de extinção e reconsolidação da memória (ABEL e LATTAL, 2001; IZQUIERDO et al., 2006).

A formação da memória inicia-se com a aquisição de informações recebidas a partir de estímulos, detectados pelos sistemas sensoriais, sendo



devidamente processadas. O aprendizado e a memória estão intimamente relacionados, pois não há memória sem que ocorra o aprendizado, embora o contrário não seja válido, considerando que nem todo aprendizado gera uma memória (STARK e SQUIRE, 2003).

A memória pode ser classificada de acordo com o tempo de duração ou quanto à natureza de seu conteúdo. Conforme o tempo de duração e função, as memórias podem ser classificadas em (1) memória de trabalho, processada por atividades neurais do córtex pré-frontal (IZQUIERDO, 2002). Ao escutarmos uma frase, mesmo não lembrando das palavras exatas, a memória de trabalho nos permite lembrar a essência da informação proveniente da frase; (2) a memória de curta duração, que dura minutos ou horas, armazena poucas informações. A todo instante formamos memória de curta duração, usadas para lembrarmos de eventos recentes. Está envolvida com a leitura, a continuidade de conversas e episódios enquanto a memória de longa duração não está formada, atuando como um armazenamento temporário da memória (IZQUIERDO, 2011).

A memória de longa duração estabelece engramas duradouros, de dias, meses ou anos, requerendo cerca de seis horas até sua consolidação (IZQUIERDO, 2011; MCGAUGH et al., 1996). Sua formação envolve a ocorrência de eventos bioquímicos na região CA1 do hipocampo e em suas projeções (IZQUIERDO et al., 1999).

Dentre as estruturas cerebrais, destacam-se as do lobo temporal como sendo essenciais para a formação e processamento da memória, especialmente das memórias de curta e longa duração (SQUIRE, L. R., 2009; SQUIRE, L. R. e WIXTED, 2011; WIXTED e SQUIRE, 2011).

No lobo temporal encontra-se o hipocampo, responsável pela criação de memórias declarativas, diferenciando-se das demais estruturas do lobo temporal por ser capaz de combinar uma grande variedade de atributos para formar uma memória. (IZQUIERDO, 2011; WIXTED e SQUIRE, 2011).

O núcleo caudado, juntamente com o lenticular, forma o corpo estriado, que faz parte dos núcleos da base. Estes núcleos atuam principalmente sobre o sistema motor, mas há evidências de que estejam envolvidos também no

aprendizado de tarefas de condicionamento instrumental. O núcleo caudado é um dos responsáveis pelas memórias procedurais, mas utilizam-se do hipocampo e córtex entorrinal para a sua aquisição (CARLSON et al., 1993; IZQUIERDO, 2011). Além dessas estruturas, ressalta-se o estriado ventral, parte dos núcleos da base, relacionado ao armazenamento de memória espacial (FERRETTI et al., 2010).

Quanto à natureza de seu conteúdo, a memória pode ser dividida em explícita ou declarativa e memória implícita ou não declarativa (CONNORS et al., 2002; SQUIRE, L.R. e KANDEL, 2003).

As memórias explícitas dependem da atividade de neurônios hipocampais e estruturas relacionadas ao lobo temporal, podendo ser divididas em episódica e semântica. As memórias episódicas referem-se à capacidade de evocar detalhes de eventos passados, respondendo perguntas como “o que”, “onde” e “quando”. Nesta pesquisa, enfoca-se a memória espacial, uma forma de memória declarativa episódica, aquela que depende da habilidade de codificar, armazenar e resgatar informações sobre o esquema espacial ou temporal no ambiente, permitindo ao indivíduo orientar-se espacialmente em qualquer lugar, familiar ou não (SARKISYAN e HEDLUND, 2009).

A memória semântica relaciona-se a conhecimentos gerais, contanto que não tenham referências espaciais ou temporais, como o conhecimento de idiomas e conceitos de palavras (DICKERSON e EICHENBAUM, 2010; RENOULT et al., 2012).

### 1.11 ANSIEDADE

Estímulos nocivos ou ameaças à integridade, saúde e segurança do animal desencadeiam um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas características da reação de medo. Quando, entretanto, o perigo é apenas potencial, ou seja, uma ameaça incerta, o comportamento apresentado refere-se à ansiedade (GRAEFF, F. G. et al., 1993). Pode ocorrer também em situações de conflito, em que um mesmo comportamento é

simultaneamente recompensado e punido, ou em situações novas, inibindo o comportamento exploratório motivado pela curiosidade.

McNaughton e Corr (MCNAUGHTON e CORR, 2004) apontam a diferença entre medo e ansiedade, sendo o medo responsável pela função de mover o animal para longe do perigo, podendo envolver fuga, luta ou congelamento, enquanto a ansiedade faz com que o animal mova-se em direção à fonte do perigo. Ambas possuem raízes nas reações de defesa dos animais, ante aos perigos encontrados no ambiente em que vivem.

A ansiedade é caracterizada como uma antecipação emocional de situação aversiva, de difícil controle e provável ocorrência. Trata-se de um fenômeno fundamental para a adaptação biológica normal, sofrendo influências de fatores ambientais e constitucionais e apresentando características diferentes (EDWARDS, 1991; GRAEFF, R. M. et al., 1998). Apresenta sinais e sintomas semelhantes aos do medo, mas não está nitidamente associada a um único estímulo provocador.

Diversos autores fazem distinção entre estado de ansiedade e traço de ansiedade (BELZUNG et al., 2001; FILE, 1993; RODGERS, 1992). O estado de ansiedade é o estado relativo a experiências subjetivas num determinado momento e é aumentado pela presença de um estímulo ansiogênico. O traço de ansiedade, por sua vez, não varia de momento a momento, sendo um quadro persistente e durável, refletindo a maneira como o indivíduo interage com o ambiente.

## 1.12 HIPÓTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL

O mercúrio é um agente de contaminação ambiental que existe na forma orgânica ou inorgânica e que sofre um ciclo complexo no ambiente ou in vivo (MCELWEE et al., 2013). Seres humanos foram amplamente expostos a este metal em suas diversas formas.

Por sua baixa absorção através do epitélio gastrointestinal (KOSTIAL et al., 1979; KOSTIAL et al., 1983; PIOTROWSKI et al., 1992; RAHOLA et al., 1973) e pela dificuldade de atravessar a barreira hematoencefálica (CLARKSON, 2002; TAKEUCHI et al., 1989), o mercúrio inorgânico esteve por muito tempo negligenciado, tendo seu efeito no sistema nervoso desconsiderado.

Estudos relatam a possível via de entrada do mercúrio inorgânico como um transporte retrógrado via neurônios motores (ARVIDSON, 1992), chegando dentre outras regiões, ao hipocampo, segundo local de maior concentração deste metal no SNC (BOURDINEAUD et al., 2012).

Mesmo sendo uma área de alta afinidade pelo mercúrio, inexistem estudos verificando se esta mínima quantidade que atravessa as diversas barreiras do organismo poderia gerar alguma alteração no funcionamento dessa região.

Desta forma, este estudo se propõe a determinar com testes comportamentais específicos se a exposição crônica ao mercúrio inorgânico induz déficits na memória de ratos adultos, verificando também o nível de acumulação deste metal no hipocampo.

## 1.13 OBJETIVO

### 1.13.1. Objetivo Geral

Investigar efeitos neurocomportamentais da exposição crônica ao Cloreto de Mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) sobre os processos mnemônicos de ratos adultos.

### 1.5.2. Objetivos Específicos

A) Avaliar os efeitos da exposição crônica ao  $\text{HgCl}_2$  sobre a atividade exploratória de ratos adultos submetidos ao teste de campo aberto;

B) Verificar os efeitos da administração crônica de  $\text{HgCl}_2$  sobre os processos de aprendizagem e memória de ratos adultos submetidos aos testes de reconhecimento social e Labirinto em T elevado (LTE);

c) Determinar a concentração de mercúrio total em amostras de hipocampo de ratos adultos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados 40 ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos, com massa corpórea entre 250 e 300 g e aproximadamente 5 meses de vida, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Pará.

Os animais foram alojados em gaiolas-viveiros de plástico, com dimensões de 30 cm x 20 cm x 12 cm, divididos em 4 grupos de 5 animais por caixa. Durante o período de alojamento, os animais foram alimentados com ração balanceada e água e permaneceram em uma temperatura de 25°C em ciclo escuro/claro de 12 horas.

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE-UFPA) sob o número CEPAE-UFPA: 139-13.

### 2.2. PROCEDIMENTOS DE EXPOSIÇÃO E FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Neste estudo, utilizou-se a concentração única de 0,375mg/Kg/dia de  $\text{HgCl}_2$ , (SZASZ et al., 2002), durante 45 dias, para o grupo intoxicado. O grupo controle recebeu apenas água destilada pelo mesmo tempo em volumes semelhantes de solução. A administração destas soluções foi realizada por via oral (gavagem intragástrica).

Por outro lado, os animais dos grupos controles positivos usados nos testes comportamentais, receberam os fármacos diazepam (DZP) (para o teste do campo aberto) na dose de 1 mg/kg, e cafeína (CAF) (para os testes de memória) na dose de 10 mg/kg, os quais foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%). As substâncias foram administradas pela via i.p., em um volume

de 0,1 mL/100 g de peso corpóreo, 30 minutos antes dos experimentos de acordo com estudos prévios (PREDIGER et al., 2005; PREDIGER et al., 2008).

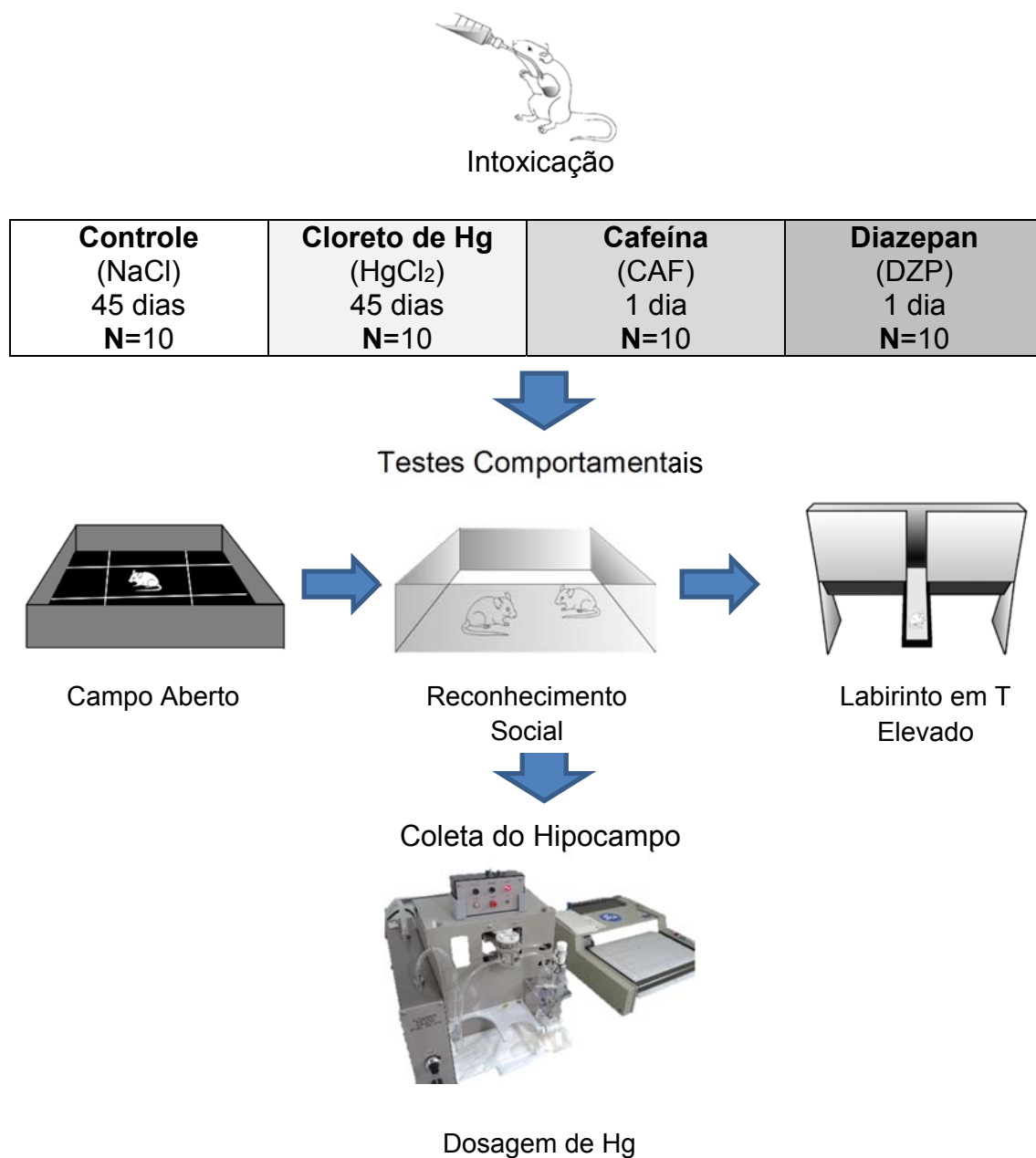
A distribuição dos grupos foi feita de acordo com dados mostrados na tabela abaixo:

**Quadro 1:** Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo

<b>Grupo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Dose</b>	<b>N° de Animais</b>
<i>Controle</i>	Animais tratados com solução salina por (NaCl 0,9%)	0,375mg/Kg/dia	10
<i>Cloreto de Hg</i>	Animais tratados com solução de cloreto de mercúrio(HgCl <sub>2</sub> )	0,375mg/Kg/dia	10
<i>CAF</i>	Controle positivo - animais tratados com Cafeína por via i.p.	10 mg/kg	10
<i>DZP</i>	Controle positivo - são animais tratados com Diazepam por via i.p.	1 mg/kg	10
		TOTAL	40

### 2.3. DESENHO EXPERIMENTAL

Para a realização desse experimento foram realizadas várias etapas (Figura 1). Teve início com a intoxicação dos animais com cloreto de mercúrio durante 45 dias. Em seguida, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais com 2 dias de duração. Após o término dos testes, os animais foram sacrificados para a retirada do encéfalo de sua caixa craniana e a coleta do hipocampo, no qual foi realizada a quantificação do mercúrio total.



**Figura 1:** Desenho Esquemático dos Experimentos. Imagens do autor, 2014.

#### 2.4. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Após 24 horas da última administração, os ensaios comportamentais foram realizados. Todos os testes foram realizados em sala própria, com atenuação dos níveis de ruído e baixa intensidade de iluminação (12 lux).



### 2.4.1. Campo Aberto

Para este teste, utilizou-se uma arena que faz referência à desenvolvida por Calvin Hall em 1934, o qual avaliava a quantidade de defecação e urina do animal como índice de emocionalidade. De forma geral, a metodologia do campo aberto consiste em mensurar os comportamentos apresentados por um animal colocado em espaço aberto, o qual represente um ambiente novo e do qual não seja capaz de fugir. Trata-se de um modelo que permite avaliar medidas de exploração (locomoção, levantamento e farejamento) e medidas aversivas (defecação, micção e congelamento) relacionados a atividades motoras e características referentes à exploração e medo (WALSH e CUMMINS, 1976).

Utilizou-se o aparato de campo aberto, *webcam*, computador e cronômetro. O aparelho de campo aberto foi feito de madeira coberto com fórmica impermeável, com uma área de 100cm<sup>2</sup>, com assoalho negro dividido em 25 quadrados e cercado por paredes de madeira de 30 cm de altura, conforme figura X. A iluminação do ambiente consistiu em lâmpada fluorescente branca de 80 watts, à altura de 2,6 m do centro da arena.

O animal foi colocado no centro do aparato e exposto, individualmente, ao campo aberto por um período de 5 minutos, durante os quais os comportamentos foram capturados por *webcam* localizada a 1m de distância para posterior análise. Antes do início dos experimentos, os animais foram levados ao laboratório por um período de, no mínimo, uma hora, para aclimação e habituação ao ambiente do teste.

Os vídeos foram analisados e contabilizou-se o número de quadrantes cruzados (“crossing”) durante 5 minutos. Considerou-se a mudança de quadrante quando o animal ultrapassou com as 4 patas para o interior do quadrante adjacente, segundo Pandolfo e colaboradores (PANDOLFO et al., 2007). Além disso, contabilizou-se o tempo central, ou seja, a permanência dos animais da região central do aparato bem como a taxa de rearing (levantamentos).

O objetivo da utilização desse modelo no trabalho foi verificar se a exposição ao  $HgCl_2$  afeta as atividades exploratórias dos animais experimentais, cujo prejuízo poderia mascarar ou impedir a avaliação de possíveis efeitos neurotóxicos nos processos cognitivos que estão sendo investigados e favorecer a exploração dos animais nos testes de Memória do Reconhecimento social e do Labirinto em T Elevado (LTE).

#### **2.4.2. Reconhecimento Social**

A necessidade de entendimento de comportamentos complexos, como relação de agressão, dominância e subordinação tem recebido valorosas contribuições a partir de estudos sobre os processos fisiológicos, celulares e moleculares. Esses comportamentos têm por base encontros sociais passados, ou memórias de reconhecimento social (MOURA e XAVIER, 2010).

Esse tipo de memória possui maior duração do que a memória operacional, mas duração menor do que uma memória espacial ou aversiva, enquadrando-a em um tipo específico de memória, diferente de outras previamente descritos (FERGUSON et al., 2002).

Em 1933 foram publicados os primeiros estudos sobre os comportamentos sociais em roedores, realizados por Davis, que categorizou as interações sociais dos animais como comportamento de “luta”. Anos depois, este mesmo autor avaliou o comportamento de roedores e verificou que eles podem apresentar uma postura “agressiva” (DAVIS, 1933). Neste mesmo ano, Davis realizou uma análise detalhada dos comportamentos de ratos em encontros sociais em sessões de 15 minutos, verificando 60 tipos diferentes de posturas, incluindo as categorias previamente avaliadas de “agressão” e “luta”. O autor ressaltou também a ocorrência de posturas como beber, comer, auto catação e “postura de lado” em relação ao outro animal.

Descrito por Dantzer e colaboradores (DANTZER et al., 1987), este teste é empregado para avaliar a memória social em um curto período. Consiste em duas exposições sucessivas, de 5 minutos cada, intercaladas por um espaço

temporal de 30 minutos. O parâmetro para análise é a aproximação do rato adulto com o juvenil.

O rato adulto foi colocado na caixa-teste por 3 minutos e retirado em seguida. Após este procedimento o animal adulto foi recolocado na caixa e foi introduzido o animal juvenil por 5 minutos. Após 30 minutos da primeira exposição, os animais adulto e juvenil foram reintroduzidos na caixa-teste por mais 5 minutos, adotando-se os mesmos procedimentos da primeira exposição.

Em cada exposição, o parâmetro avaliado foi a somatória de tempo usado pelo rato adulto para explorar/investigar (cheirar, lambe ou comportamento decorrente de qualquer tipo de aproximação) o rato jovem.

De acordo com Dantzer e colaboradores (DANTZER et al., 1987), se o período do intervalo é menor que 40 minutos, os ratos adultos exibem reconhecimento deste animal juvenil, indicado por uma redução significativa no tempo de investigação social durante a segunda apresentação.

Em cada exposição, o parâmetro avaliado foi o tempo em que o rato adulto levava para explorar/investigar (cheirar, lambe ou comportamento decorrente de qualquer tipo de aproximação) o rato jovem, sendo que no final da primeira exposição, o rato jovem retornava à sua caixa específica e era reexposto ao mesmo animal após 30 minutos. Este intervalo foi usado como uma janela temporal para testar a memória do animal.

O tempo gasto na investigação social do rato adulto foi medido e, em seguida, expresso para cada animal como a relação da segunda exposição à primeira exposição (Ratio of Investigation Duration - RID).

$$RID = \frac{\text{Tempo da segunda exposição}}{\text{Tempo da primeira exposição}}$$

Uma redução dessa relação reflete um aumento no comportamento de investigação durante a segunda exposição demonstrando uma redução na capacidade de reconhecimento por parte do rato adulto. Essa técnica foi escolhida a fim de minimizar o dia-a-dia, as variações na base de desempenho e para igualar as variações entre os diferentes grupos (DANTZER et al., 1987; PREDIGER et al., 2005).

### **2.4.3. Teste do Labirinto em T Elevado**

O Labirinto em T Elevado é uma modificação do labirinto em cruz elevado, desenvolvido por Handley e Mithani (HANDLEY e MITHANI, 1984), com o intuito de detectar os efeitos de drogas ansiolíticas, consolidando-se como um modelo comportamental largamente utilizado para o estudo da ansiedade (VIANA et al., 1994).

O labirinto em cruz foi a base de Handley e Mithani para confirmar dados publicados por Montgomery (MONTGOMERY, 1955), o primeiro a utilizar um modelo de labirinto elevado, demonstrando que a exposição a um braço aberto do aparato seria capaz de provocar nos ratos um conflito entre motivação para explorar um novo ambiente e o medo gerado pelo espaço aberto e altura. Esta relação conflituosa não era observada quando o animal explorava um braço fechado desse labirinto (SCHUTZ et al., 1985).

Os modelos de avaliação de ansiedade sofrem interferências de processos psicobiológicos, como habilidades motoras, motivação, aprendizado e memória. Observa-se, entretanto, que a maioria desses modelos não costumava considerar os processos de aprendizado e memória, sabidamente envolvidos em situações de ansiedade. Além disso, há fortes evidências de relação entre estruturas cerebrais envolvidas na ansiedade e modulação da memória (GRAEFF, F. G. et al., 1993; VIANA et al., 1994). O Labirinto em T Elevado foi padronizado por Graeff et al (1993) e Viana et al (1994) com o intuito de analisar em animais os diferentes tipos de ansiedade e, ao mesmo tempo, avaliar a memória.

O LTE foi desenvolvido para medir respostas relacionadas tanto ao medo aprendido como ao medo inato (medo incondicionado) no mesmo indivíduo, e simultaneamente a avaliação de memória para estes comportamentos. É construído por pelo menos dois ambientes e com diferentes níveis de aversão: frequentemente provoca medo e favorece o comportamento exploratório, levando a um adequado conflito de esquiva (HANDLEY e MCBLANE, 1993).

Este aparato consiste em três braços de madeira, cada um medindo 50 cm de comprimento por 12 cm de largura, sendo um dos braços circundado lateralmente por paredes opacas de 40 cm e disposto perpendicularmente aos outros dois braços, que permanecem abertos. Todo o conjunto está 50 cm do solo. Os braços abertos são cercados por uma faixa de madeira de 1cm de altura (GRAEFF, F. G. et al., 1993; ZANGROSSI e GRAEFF, 1997).

O procedimento adotado neste estudo foi adaptado de Silva-Júnior e colaboradores (SILVA et al., 2013), em que cada animal foi colocado pelo experimentador no fim do braço fechado com a cabeça voltada para dentro do labirinto com o intuito de alcançar o critério de permanecer 300 segundos no braço fechado (critério de esquivia). Em caso de saída do animal com as quatro patas para o braço aberto nesse intervalo de tempo, ele era levado até o campo aberto por 30 segundos e reapresentado quantas vezes necessário para a aquisição do critério de esquivia.

Logo após o rato adquirir o critério de esquivia, era realizado o teste de fuga, em que o animal foi colocado no fim do braço aberto direito do labirinto para registrar a latência (tempo) que ele levava para sair com as quatro patas do braço aberto até sua entrada no braço fechado. Depois destes procedimentos, os animais retornavam às suas gaiolas.

Após 24 horas do treinamento, foi realizado o teste de memória de longa duração, em que os animais foram posicionados no final do braço fechado e cronometrado o tempo de saída com as quatro patas para um dos braços abertos.

Depois de 30 segundos, foi realizado um re-teste para verificar a memória de curta duração, com cada rato sendo recolocado no braço fechado do LTE, adotando-se o mesmo procedimento anterior.

## 2.5. DOSAGEM DO MERCÚRIO TOTAL

Ao final dos testes, os animais foram profundamente anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (9 mg/Kg). Após abolição dos reflexos, o animal foi sacrificado com a técnica de

deslocamento cervical. Seguiu-se, então, a exposição do cérebro e remoção do hipocampo para o processamento de dosagem.

Antes dos procedimentos analíticos, todas as vidrarias e frascos utilizados foram submersos em solução detergente de Extran 1% (VETEC) por um período de 24 horas e retirada com água corrente, em seguida um leve enxague com solução de permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ), para eliminação de qualquer resíduo de Hg presente nas vidrarias. Após a retirada do  $\text{KMnO}_4$  com água corrente, as vidrarias foram, então, lavadas com solução de hidroxilamina a 1% ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) para retirada total do  $\text{KMnO}_4$  e finalmente lavadas com água destilada (AKAGI et al., 2000).

As amostras foram pesadas (máximo de 0,5 g em peso úmido, por amostra) em um frasco de digestão de amostra. Em cada balão foi acrescentado 1 ml de água destilada, 2 ml de ácido nítrico e perclórico ( $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ ) na proporção de 1:1 (um para um) e 5 ml de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processo de digestão ácida, que tem como intuito eliminar elementos interferentes presentes na amostra, como a presença de outros metais.

A digestão ácida é realizada em uma chapa aquecedora a uma temperatura de  $210^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Quando as amostras digeridas chegaram à temperatura ambiente estas foram aferidas com água destilada até o volume final de 50 ml.

São utilizados quatro pontos para a curva de calibração, 0, 20, 50 e 100. A curva de calibração é utilizada para avaliar os resultados das amostras assim como a estabilidade do equipamento.

Para o preparo das soluções padrões referentes à curva de calibração da análise de mercúrio total é necessário o preparo de uma solução padrão de metilmercúrio (MeHg) de 100 ppm (parte por milhão), uma solução padrão de MetilHg 1 ppm (1 ml da solução de 100 ppm), uma Solução de L-Cysteina 0,01%.

A análise de Hg total foi realizada com um Espectrofotômetro de Absorção Atômica disponível comercialmente como Analisador Semi-

Automático de Mercury Modelo Hg 201 (Sanso Seisakusho Co. Ltd. Tokyo, Japan).

Este método é aplicado em amostras biológicas como peixe, molusco, sangue humano, urina e tecidos como cordão umbilical (AKAGI et al., 2000; SAKAMOTO et al., 2008). É um equipamento que utiliza espectrometria de absorção atômica por vapor frio, no qual o mercúrio bivalente ( $\text{Hg}^{2+}$ ) é convertido em vapor de mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ) no evento de óxido – redução ocasionado pelo Estanho ( $\text{Sn}^{2+}$  e  $\text{Sn}^{4+}$ ), sendo um sistema aberto de circulação de ar. Neste equipamento, o vapor de mercúrio gerado é circulado em uma bomba de diafragma a uma taxa de 1-1,5 l/min por 30 segundos para homogeneizar. Então, a válvula é acionada e gira 90° para entrar na célula de foto absorção para a medida de absorbância a 253,7 nm.

## 2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados e submetidos ao teste de D'agostino e Pearson para verificar a normalidade. O teste *t-student* foi utilizado para a comparação entre os grupos exposto e controle na dosagem do Hg. Para os testes comportamentais foi utilizado a análise de variância (ANOVA) com critério de correção posteriore de Tukey. O nível de significância adotado no presente estudo foi de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos textualmente e em gráficos com média e erro padrão (média  $\pm$  erro padrão).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. EXPOSIÇÃO CRÔNICA A HgCl<sub>2</sub> INDUZ DÉFICITS NA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA ESPONTÂNEA EM RATOS

No teste do campo aberto foram avaliados o número de quadrantes percorridos, a somatória do número de levantamentos verticais dos animais e o tempo que estes permaneceram na área central do aparato.

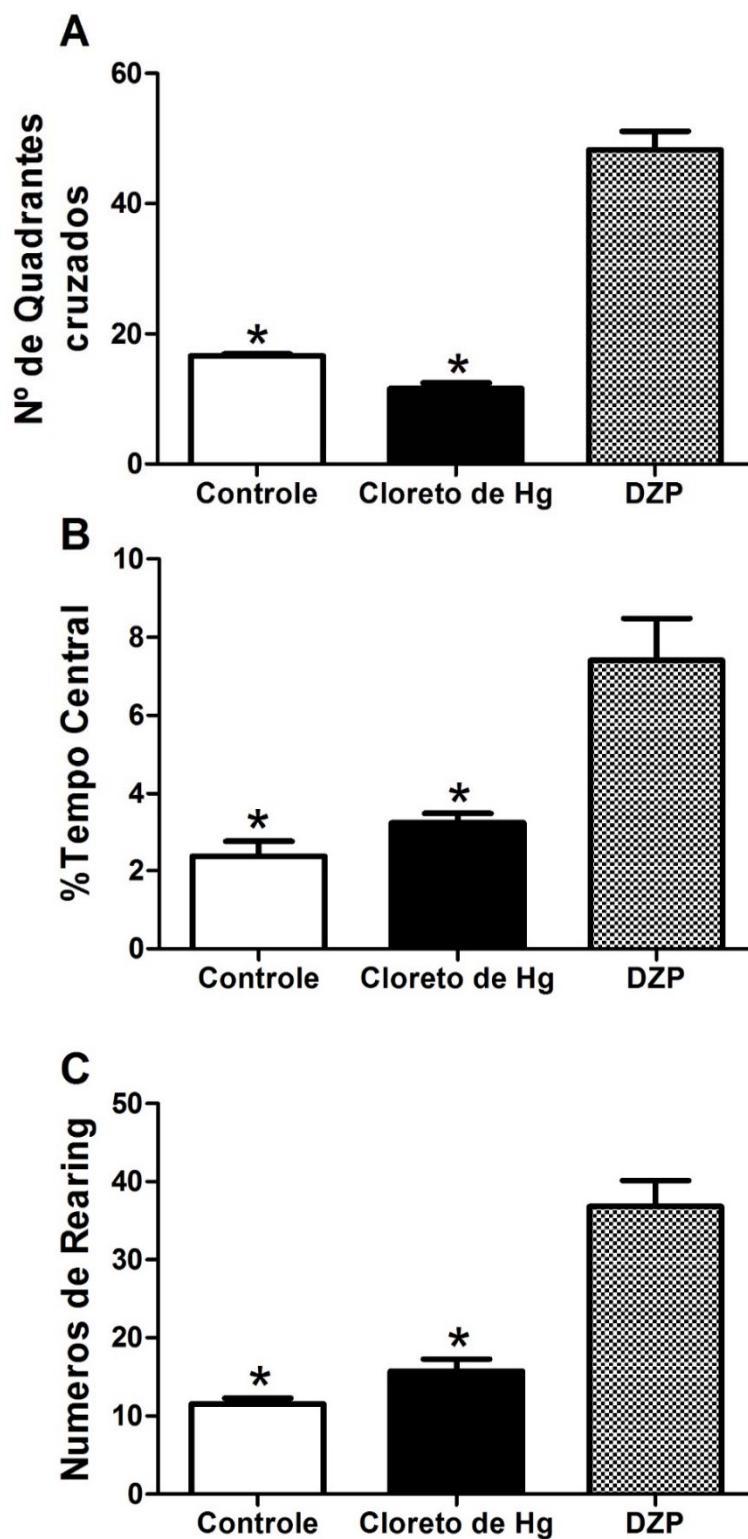
Os resultados revelam que a exposição dos animais ao HgCl<sub>2</sub> ( $11,6 \pm 0,8969$ ) não resultou em diminuição na atividade locomotora em relação ao grupo controle ( $16,6 \pm 0,3399$ ).

O teste ANOVA, seguida do teste de Tukey para múltiplas comparações, revelou uma diferença significativa no número de quadrantes percorridos pelos animais do grupo Diazepam (DZP) ( $48,25 \pm 2,858$ ) em relação aos grupos Controle ( $p < 0,05$ ), e ao grupo HgCl<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ) (Figura 2 A).

Quanto ao tempo de permanência dos animais no centro do campo aberto, o teste ANOVA seguida do teste de Tukey de comparações múltiplas, revelou que o grupo DZP ( $7,407 \pm 1,070$ ) apresentou diferenças significativas entre os grupos Controle ( $2,367 \pm 0,3891$ ;  $p < 0,05$ ), e HgCl<sub>2</sub> ( $3,218 \pm 0,2436$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 2 B). O grupo DZP permaneceu mais tempo na área central do aparato, supostamente pelo efeito ansiolítico deste fármaco

Em relação ao número de levantamentos, o teste ANOVA revelou novamente diferenças significativas entre o grupo DZP ( $36,80 \pm 3,338$ ), em relação ao grupo Controle ( $11,50 \pm 0,7923$ ;  $p < 0,005$ ), e em comparação ao grupo que recebeu o HgCl<sub>2</sub> ( $15,71 \pm 1,539$ ;  $p < 0,005$ ) (Figura 2 C).





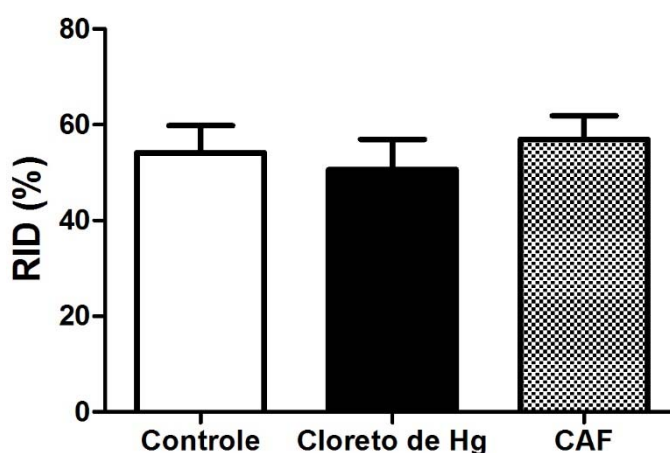
**Figura 2:** Efeitos da administração de HgCl<sub>2</sub> (0,375 mg/kg/dia) sobre a atividade exploratória espontânea de ratos Wistar machos avaliados no campo aberto (5 minutos). Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM de: (A) total de quadrantes cruzados. (B) % de tempo no centro do aparato. (C) Números de Rearing \* $p < 0,05$  comparado ao grupo DZP (teste ANOVA).

### 3.2. PREJUÍZO DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA SOCIAL INDUZIDAS POR EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO HgCl<sub>2</sub> EM RATOS

A Figura 3 mostra os resultados da exposição crônica de ratos ao HgCl<sub>2</sub> após 45 dias de intoxicação, na memória de reconhecimento social de ratos quando o mesmo rato jovem foi reexposto após um período de 30 minutos da primeira exposição.

Os resultados da razão das exposições do rato jovem aos animais adultos, revelaram que os animais dos grupos Controle ( $54,15 \pm 5,702$ ), HgCl<sub>2</sub> ( $50,63 \pm 6,324$ ) e Cafeína (CAF) ( $56,95 \pm 4,929$ ) não apresentaram diferenças significativas.

O teste ANOVA mostra que os animais não apresentaram déficit cognitivo na memória social, sendo capazes de reconhecer o animal jovem durante a segunda exposição, gastando menos tempo explorando o mesmo animal.



**Figura 3:** Efeitos da administração de HgCl<sub>2</sub> (0,375 mg/kg/dia) na memória de reconhecimento social em ratos Wistar machos. Os resultados são expressos como média ± SEM de RID em porcentagem. \*p<0,05 comparado ao grupo CAF (teste ANOVA)

### 3.2. PREJUÍZO DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA DE CURTO E LONGO PRAZO INDUZIDAS POR EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO HgCl<sub>2</sub> EM RATOS

Os efeitos da administração crônica durante a fase adulta tardia em aprendizagem e memória de curto e longo prazo, avaliados na tarefa do labirinto em T elevado estão ilustradas na figura 4.

No teste do LTE, os parâmetros avaliados foram o número de reexposições dos animais ao aparato para a aquisição do critério de esquiva inibitória no braço fechado e o tempo de fuga do braço aberto. Além destes, avaliou-se teste e reteste, (realizado 24 horas após a primeira exposição ao LTE), para a verificação da retenção da memória para as respostas de esquiva, com um intervalo de 30 segundos.

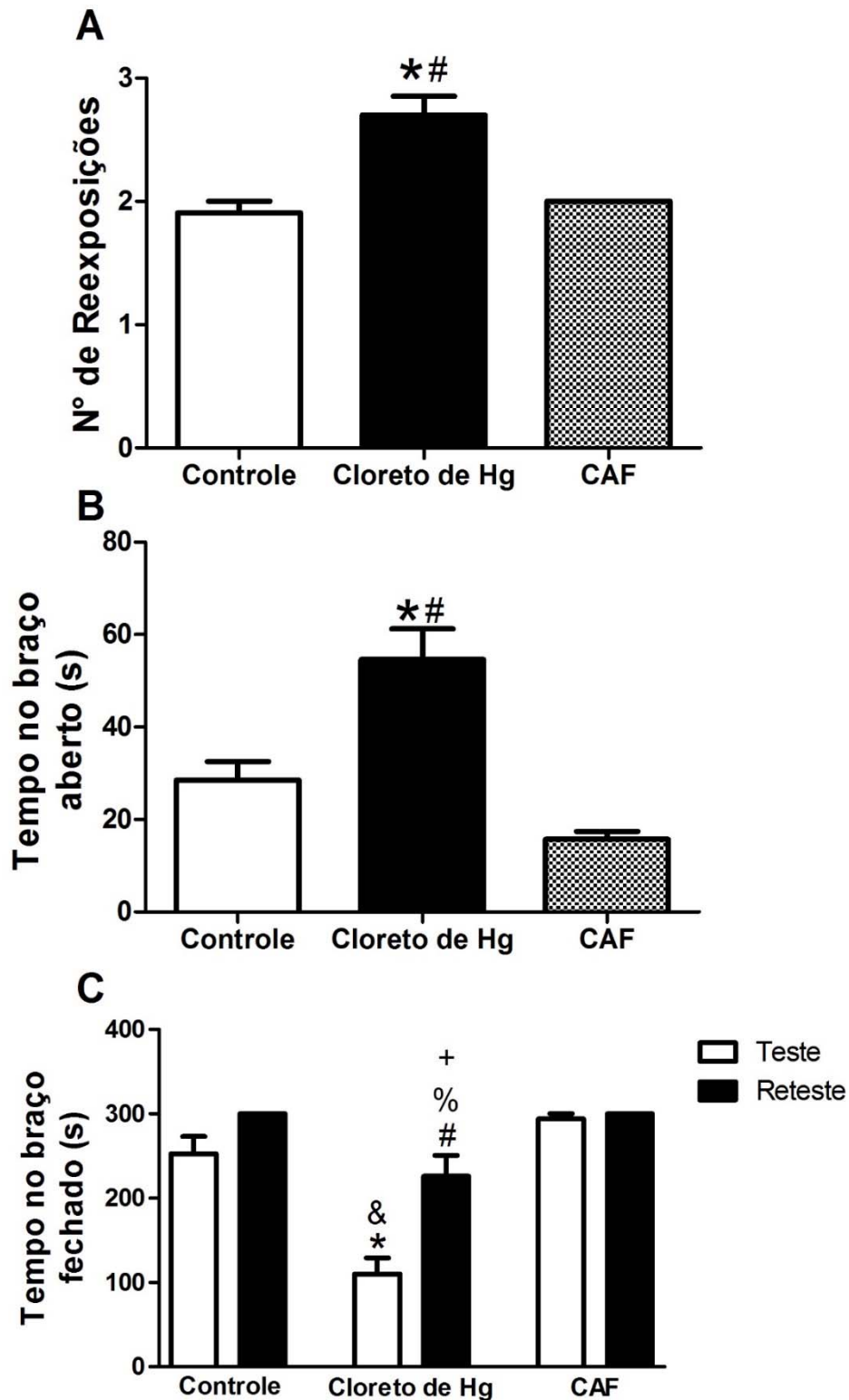
Na Figura 4A, observou-se que os animais do grupo HgCl<sub>2</sub> ( $2,7 \pm 0,1528$ ) necessitaram de mais reexposições ao LTE para adquirir o critério de esquiva que os animais do grupo Controle ( $2,273 \pm 0,1408$ ;  $P < 0,05$ ) e grupo Cafeína ( $2,0$ ;  $P < 0,05$ ), sendo evidência de um possível déficit de aprendizado.

A latência de fuga do braço aberto do LTE, com o teste ANOVA, apresentou uma diferença significativa entre o grupo HgCl<sub>2</sub>, ( $58 \pm 6,645$ ) e os grupos Controle ( $28,5 \pm 4,0$ ;  $p < 0,05$ ) e Cafeína ( $15,70 \pm 1,719$ ;  $p < 0,05$ ) conforme mostra a Figura 4B. Isso leva a crer que a intoxicação com cloreto de mercúrio pode gerar déficit na resposta de fuga que representa o medo inato do animal.

A Figura 4C representa o teste e o reteste, realizados após 24 horas, com o objetivo de avaliar a memória de curta e longa duração dos animais. Ao observarmos o teste, o grupo HgCl<sub>2</sub> ( $99,43 \pm 31,96$ ) obteve um tempo menor dentro do braço fechado em relação ao grupo controle ( $230,6 \pm 31,28$ ;  $p < 0,05$ ) e ao grupo Cafeína ( $293,9 \pm 6,11$ ;  $p < 0,05$ ).

Após 30 segundos, os animais foram novamente posicionados no braço fechado do LTE para a realização do reteste, com os mesmos procedimentos usados no teste. Observamos, nesta fase de reteste, que o grupo HgCl<sub>2</sub> (220,9 ± 26,02) mais uma vez teve um rendimento inferior no teste, mantendo-se menos tempo dentro do braço fechado em relação ao grupo controle (300; p<0,05) e ao grupo Cafeína (300; p<0,05).

Fazendo uma análise intragrupo de teste e reteste, ANOVA revelou uma diferença significativa apenas para o teste e reteste realizado pelos animais do grupo HgCl<sub>2</sub> (p<0,05), evidenciando melhora na latência do animal dentro do braço fechado.

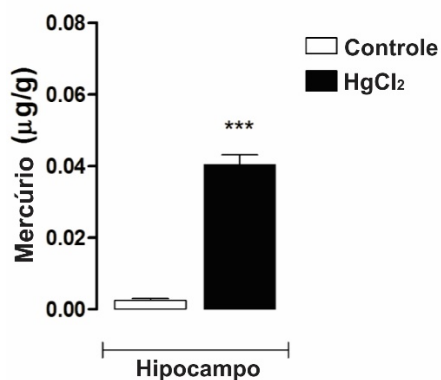


**Figura 4:** Efeitos da administração de  $\text{HgCl}_2$  (0,375 mg/kg/dia) no aprendizado e memória de curta e longa duração de ratos Wistar machos avaliados pelo teste do Labirinto em T Elevado. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM de: (A) número de re-exposições para obtenção do critério de esquia.  $^*p < 0,05$  comparado ao grupo controle;  $\#p < 0,05$  comparado ao grupo CAF. (B) Tempo, em segundos, no braço aberto.  $^*p < 0,05$  comparado ao grupo controle;  $\#p < 0,05$  comparado ao grupo CAF. (C) Tempo, em segundos, nos braços

fechados para teste de memória de longa duração e curta duração. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle Teste (T); # $p < 0,05$  comparado ao grupo  $\text{HgCl}_2$  R (Reteste); & $p < 0,05$  comparado ao grupo CAF T; % $p < 0,05$  comparado ao  $\text{HgCl}_2$  R; + $p < 0,05$  comparado ao grupo CAF R (teste ANOVA).

### 3.4. DEPOSIÇÃO DE MERCÚRIO NO HIPOCAMPO APÓS A INTOXICAÇÃO CRÔNICA

A figura 5 mostra as concentrações de mercúrio no hipocampo de ratos (após 45 dias de intoxicação). Note-se que a concentração de mercúrio no hipocampo é maior do que no grupo controle ( $p < 0,001$ ).



**Figura 5:** Efeitos da administração de  $\text{HgCl}_2$  (0,375 mg/kg/dia) sobre a deposição de mercúrio ( $\mu\text{g/g}$ ) no hipocampo de ratos Wistar machos. Os resultados são expressos em média  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4. DISCUSSÃO

É bastante conhecido o fato de que mercúrio, tanto em sua forma orgânica quanto na inorgânica, pode provocar mudanças neurocomportamentais em animais e seres humanos, especialmente se a exposição ocorrer nas fases iniciais do desenvolvimento, acarretando déficits de funções motoras e cognitivas (GRANDJEAN et al., 1997; SZASZ et al., 2002).

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que intoxicação crônica em ratos Wistar durante a senescência acarreta danos funcionais. Esta exposição crônica ao  $\text{HgCl}_2$  induziu respostas relacionadas à ansiedade e perda de memória de curto e longo prazo, avaliadas através de diferentes testes comportamentais (campo aberto, reconhecimento social e labirinto em T elevado).

O sistema nervoso central é um dos sistemas mais vulneráveis aos efeitos tóxicos do mercúrio, destacando, nesta área, o córtex cerebral, o cerebelo e o hipocampo. O mercúrio é capaz de induzir diversos efeitos neurotóxicos que dependem de sua forma química (compostos orgânicos, mercúrio elementar ou sais inorgânicos) (GALLAGHER et al., 1982; MAIA et al., 2009).

Encontramos na literatura atual, inúmeros relatos de que o  $\text{Hg}^{+2}$  é capaz de induzir alterações estruturais e funcionais no cérebro (ALBRECHT et al., 1993; GAJKOWSKA e MOSSAKOWSKI, 1992; HUANG, C. S. e NARAHASHI, 1996) embora a barreira hematoencefálica seja praticamente impermeável (ALBRECHT et al., 1993; CLARKSON e MAGOS, 2006; SZUMANSKA et al., 1993).

O mercúrio orgânico, entretanto, atravessa facilmente esta barreira e mesmo os sais inorgânicos (como o  $\text{HgCl}_2$ ), insolúveis em lipídeos e que, portanto, poderiam ter sua penetração impedida, são detectados no SNC após uma única dose ou administrações consecutivas via intraperitoneal. Estes estudos corroboram nossos resultados, nos quais detectou-se mercúrio no hipocampo (média de 0,04  $\mu\text{g/g}$ ) em cérebros de ratos Wistar machos.

O transporte de  $\text{HgCl}_2$  através da barreira hemato-encefálica pode ser resultante de um efeito direto da interferência de atividades de enzimas cerebrovasculares.

Outros estudos sugerem que o mercúrio atravesse a barreira na forma orgânica ou de mercúrio elementar e no cérebro ocorra a conversão para a forma iônica inorgânica (GUZZI e LA PORTA, 2008; HUANG, C. S. e NARAHASHI, 1996; PEDERSEN et al., 1999). Moller-Madsen (MOLLER-MADSEN, 1990) demonstraram que, após injeção intra-peritoneal de  $\text{HgCl}_2$ , esta substância foi detectada no córtex, não sendo observada após administração oral (MOLLER-MADSEN e DANSCHER, 1986). Pamphlett e Hum (PAMPHLETT e KUM JEW, 2013), entretanto, detectaram depósitos de mercúrio em neurônios motores inferiores, mas não em neurônios corticomotores após exposição ao mercúrio inorgânico em roedores.

Outra hipótese é que a absorção do mercúrio inorgânico parece ocorrer através das junções neuromusculares e, finalmente, retrogradamente transportada para os corpos de neurônios motores inferiores pelos seus axônios (ARVIDSON, 1994).

Para avaliar a atividade exploratória dos animais foi utilizado o teste do campo aberto, tendo como resultado esperado a exploração do ambiente, apesar do estresse e do conflito provocado por este ambiente aberto que remete ao medo inato do animal (MONTGOMERY, 1955). Desta forma, a locomoção, exploração vertical e o tempo passado no centro do aparato pelos animais, observados no campo aberto, são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências dos eventos da vida ou da administração de drogas (ARAKAWA e IKEDA, 1991; MONTGOMERY, 1955; REX et al., 1996). O modelo de campo aberto possibilita discutir a especificidade do efeito de uma droga, seja estimulante, sedativa, ansiolítica ou ansiogênica (LISTER, 1987). Para esta pesquisa, avaliamos somente a locomoção do rato pelo campo, descartando os dados sobre exploração vertical e auto-limpeza.

Este teste permitiu verificar que o  $\text{HgCl}_2$  não gerou alterações nos comportamentos relacionados à ansiedade, com os animais deste grupo



apresentando resultados semelhantes aos do grupo controle. Houve diferença estatística apenas quando comparado ao grupo controle positivo que recebeu Diazepam, droga de caráter ansiolítico, servindo de parâmetro de comparação para a relação entre os grupos.

O teste de reconhecimento social caracteriza-se como um modelo de memória olfatória de curta duração que pode sofrer prejuízo por processos patológicos que interferem nesses processos de aprendizado e de memória (PREDIGER et al., 2005).

Em nosso estudo, não houve diferença estatística entre os grupos, indicando que a exposição a esta dose de HgCl<sub>2</sub> não gera danos neurocomportamentais referentes à memória de curta duração.

De acordo com Moura e Xavier (MOURA e XAVIER, 2010), uma das principais vantagens do uso deste tipo de teste comportamental para averiguar a memória relaciona-se ao fato de que a resposta dos animais independe de reforçadores ou punição imediatos do comportamento, dependendo apenas da tendência natural de ratos investigarem seus co-específicos.

O labirinto em T elevado (LTE) é um interessante instrumento de pesquisa, pois permite a avaliação dos processos de ansiedade mas também os de memória (GRAEFF, F. G. et al., 1993; VIANA et al., 1994). O teste com a configuração apresentada nesta pesquisa baseia-se no protocolo de Conde e colaboradores (CONDE et al., 1999). As latências de saída do braço fechado do LTE, avaliadas na sessão teste são utilizadas para verificar o processo de evocação de memória.

Trata-se de um teste que possibilita a verificação de uma experiência aversiva, considerando que os ratos têm medo inato de locais abertos (MONTGOMERY, 1955), permitindo ao animal aprender a esquivar-se do braço aberto se for colocado repetidas vezes para explorar o labirinto (ZANGROSSI e GRAEFF, 1997), um comportamento conhecido como resposta condicionada de medo (GRAEFF, F. G. et al., 1993; VIANA et al., 1994). Este condicionamento é uma forma de aprendizado, por isso o LTE pode ser usado como medida tanto de ansiedade como de memória.

Em nosso estudo, os animais do grupo HgCl<sub>2</sub> apresentaram diferenças em relação aos grupos controle e cafeína, necessitando de um número maior de exposições para adquirir o critério de esquia, sugerindo que este metal provoca déficit de aprendizado e aquisição de memória, dados semelhantes aos encontrados por Sanson e Carobrez (SANSON e CAROBREZ 1999) e Takahashi e colaboradores (TAKAHASHI et al., 2005), os quais relacionaram o número de reexposições com déficits de memória.

Na fuga do braço aberto os animais do grupo HgCl<sub>2</sub>, apresentaram uma latência de tempo maior para sair do braço, estudos relatam que esse comportamento é característico do uso de drogas ansiolíticas (Carobrez e Bertoglio, 2005; Kalueff e cols., 2007; Nascimento Häckl e Carobrez, 2007, Stern e cols., 2008), não apresentando este resultado quando analisado no Campo aberto.

Com exceção do grupo HgCl<sub>2</sub>, todos os animais permaneceram no braço fechado do LTE, sugerindo a retenção de memória para a tarefa realizada. O grupo HgCl<sub>2</sub> apresentou uma redução significativa no tempo de permanência no braço fechado do labirinto. De Mello e Carobrez (2002), levantam que esse comportamento é sugestivo de um déficit na memória de longa duração.

Ao observar o grupo HgCl<sub>2</sub>, percebemos também uma elevação na latência no reteste. Estes resultados sugerem uma preservação da memória de curta duração, evidenciando que a informação adquirida durante o treino esteja parcial ou totalmente consolidada, necessitando de uma espécie de gatilho para evoca-la, fenômeno denominado reativação, envolvendo um contato prévio para evocar e relembrar algo previamente aprendido (ABEL e LATTAL, 2001; NADER et al., 2000). Sugere-se, também, que a reexposição funcionaria como um novo aprendizado, possibilitando a reconstrução de conexões incompletas, ou seja, a reconsolidação (SCHAFE et al., 2001).

## **5. CONCLUSÃO**

A exposição crônica ao cloreto de mercúrio demonstrou depósito deste metal no hipocampo de ratos sem prejuízos à atividade exploratória, à memória olfatória de curta duração e reconsolidação, avaliada no teste do Labirinto em T Elevado. Houve, porém, déficit na aquisição e retenção de memórias de longa duração.

## 6. Referencias

- ABEL, T. e LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Curr Opin Neurobiol**, v. 11, n. 2, p. 180-187, 2001.
- AKAGI, H.; CASTILLO, E. S.; CORTES-MARAMBA, N.; FRANCISCO-RIVERA, A. T. e TIMBANG, T. D. Health assessment for mercury exposure among schoolchildren residing near a gold processing and refining plant in Apokon, Tagum, Davao del Norte, Philippines. **Sci Total Environ**, v. 259, n. 1-3, p. 31-43, 2000.
- ALBRECHT, J.; TALBOT, M.; KIMELBERG, H. K. e ASCHNER, M. The role of sulfhydryl groups and calcium in the mercuric chloride-induced inhibition of glutamate uptake in rat primary astrocyte cultures. **Brain Res**, v. 607, n. 1-2, p. 249-254, 1993.
- ALLEN, J. W.; MUTKUS, L. A. e ASCHNER, M. Mercuric chloride, but not methylmercury, inhibits glutamine synthetase activity in primary cultures of cortical astrocytes. **Brain Research**, v. 891, n. 1-2, p. 148-157, 2001.
- ARAKAWA, O. e IKEDA, T. Apomorphine effect on single and paired rat open-field behavior. **Physiol Behav**, v. 50, n. 1, p. 189-194, 1991.
- ARVIDSON, B. Accumulation of mercury in brainstem nuclei of mice after retrograde axonal transport. **Acta Neurol Scand**, v. 82, n. 4, p. 234-237, 1990.
- . Accumulation of inorganic mercury in lower motoneurons of mice. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 1, p. 277-280, 1992.
- . A review of axonal transport of metals. **Toxicology**, v. 88, n. 1-3, p. 1-14, 1994.
- ASHE, W. F.; LARGENT, E. J.; DUTRA, F. R.; HUBBARD, D. M. e BLACKSTONE, M. Behavior of mercury in the animal organism following inhalation. **AMA Arch Ind Hyg Occup Med**, v. 7, n. 1, p. 19-43, 1953.
- AZEVEDO, F. A. TOXICOLOGIA DO MERCURIO. 1º ed., São Carlos, SP: RIMA, 2003.
- BANDO, I.; REUS, M. I.; ANDRES, D. e CASCALES, M. Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercury chloride oral intoxication. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 19, n. 3, p. 154-161, 2005.
- BASU, N.; SCHEUHAMMER, A. M.; EVANS, R. D.; O'BRIEN, M. e CHAN, H. M. Cholinesterase and monoamine oxidase activity in relation to mercury levels in the cerebral cortex of wild river otters. **Hum Exp Toxicol**, v. 26, n. 3, p. 213-220, 2007.
- BELZUNG, C.; EL HAGE, W.; MOINDROT, N. e GRIEBEL, G. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 3, p. 400-408, 2001.
- BERLIN, M.; ZALUPS, R. K. e FOWLER, B. A. Chapter 33 - Mercury. em NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M. e FRIBERG, L. T., eds. Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition). Burlington: Academic Pressp. Pages 675-7292007.
- BERNHOF, R. A. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2012, n. p. 460508, 2012.
- BISINOTI, M. C. e JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Química Nova**, v. 27, n. p. 593-600, 2004.
- BLUHM, R. E.; BOBBITT, R. G.; WELCH, L. W.; WOOD, A. J.; BONFIGLIO, J. F.; SARZEN, C.; HEATH, A. J. e BRANCH, R. A. Elemental mercury vapour toxicity, treatment, and prognosis after acute, intensive exposure in chloralkali plant workers. Part I: History, neuropsychological findings and chelator effects. **Hum Exp Toxicol**, v. 11, n. 3, p. 201-210, 1992.
- BORASO, A. e WILLIAMS, A. J. Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and dithiothreitol. **Am J Physiol**, v. 267, n. 3 Pt 2, p. H1010-1016, 1994.
- BOURDINEAUD, J.-P.; MARUMOTO, M.; YASUTAKE, A. e FUJIMURA, M. Dietary Mercury Exposure Resulted in Behavioral Differences in Mice Contaminated with Fish-Associated Methylmercury Compared to Methylmercury Chloride Added to Diet. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. p. 9, 2012.

- BRUNTON, L.; CHABNER, B. e KNOLLMAN, B. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition. ed., McGraw-Hill Education, 2011.
- BURBACHER, T. M.; SHEN, D. D.; LIBERATO, N.; GRANT, K. S.; CERNICHIARI, E. e CLARKSON, T. Comparison of blood and brain mercury levels in infant monkeys exposed to methylmercury or vaccines containing thimerosal. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 8, p. 1015-1021, 2005.
- CARLSON, R. A.; WENGER, J. L. e SULLIVAN, M. A. Coordinating information from perception and working memory. **J Exp Psychol Hum Percept Perform**, v. 19, n. 3, p. 531-548, 1993.
- CARMIGNANI, M.; BOSCOLO, P.; ARTESE, L.; DEL ROSSO, G.; PORCELLI, G.; FELACO, M.; VOLPE, A. R. e GIULIANO, G. Renal mechanisms in the cardiovascular effects of chronic exposure to inorganic mercury in rats. **Br J Ind Med**, v. 49, n. 4, p. 226-232, 1992.
- CHARLESTON, J. S.; BODY, R. L.; MOTTET, N. K.; VAHTER, M. E. e BURBACHER, T. M. Autometallographic determination of inorganic mercury distribution in the cortex of the calcarine sulcus of the monkey *Macaca fascicularis* following long-term subclinical exposure to methylmercury and mercuric chloride. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 132, n. 2, p. 325-333, 1995.
- CHIAMVIMONVAT, N.; O'ROURKE, B.; KAMP, T. J.; KALLEN, R. G.; HOFMANN, F.; FLOCKERZI, V. e MARBAN, E. Functional consequences of sulfhydryl modification in the pore-forming subunits of cardiovascular Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> channels. **Circ Res**, v. 76, n. 3, p. 325-334, 1995.
- CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environ Health Perspect**, v. 110 Suppl 1, n. p. 11-23, 2002.
- CLARKSON, T. W. e STRAIN, J. J. Nutritional factors may modify the toxic action of methyl mercury in fish-eating populations. **J Nutr**, v. 133, n. 5 Suppl 1, p. 1539S-1543S, 2003.
- CLARKSON, T. W. e MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Crit Rev Toxicol**, v. 36, n. 8, p. 609-662, 2006.
- CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. e MYERS, G. J. The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. **N Engl J Med**, v. 349, n. 18, p. 1731-1737, 2003.
- CLARKSON, T. W.; VYAS, J. B. e BALLATORI, N. Mechanisms of mercury disposition in the body. **Am J Ind Med**, v. 50, n. 10, p. 757-764, 2007.
- CONDE, C. A.; COSTA, V. e TOMAZ, C. Measuring emotional memory in the elevated T-maze using a training-to-criterion procedure. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 63, n. 1, p. 63-69, 1999.
- CONNORS, B. W.; BEAR, M. F. e PARADISO, M. A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. ed., Artmed, 2002.
- COUNTER, S. A. Neurophysiological anomalies in brainstem responses of mercury-exposed children of Andean gold miners. **J Occup Environ Med**, v. 45, n. 1, p. 87-95, 2003.
- DANSCHER, G.; HORSTED-BINDSLEV, P. e RUNGBY, J. Traces of mercury in organs from primates with amalgam fillings. **Exp Mol Pathol**, v. 52, n. 3, p. 291-299, 1990.
- DANTZER, R.; BLUTHE, R. M.; KOOB, G. F. e LE MOAL, M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 91, n. 3, p. 363-368, 1987.
- DAVIS, F. C. The Measurement of Aggressive Behavior in Laboratory Rats. **The Pedagogical Seminary and Journal of Genetic Psychology**, v. 43, n. 1, p. 213-217, 1933.
- DICKERSON, B. C. e EICHENBAUM, H. The episodic memory system: neurocircuitry and disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 86-104, 2010.
- DROGE, W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. **Exp Gerontol**, v. 37, n. 12, p. 1333-1345, 2002.
- EDWARDS, J. G. Clinical anxiety and its treatment. **Neuropeptides**, v. 19 Suppl, n. p. 1-10, 1991.
- EKINO, S.; SUSA, M.; NINOMIYA, T.; IMAMURA, K. e KITAMURA, T. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. **J Neurol Sci**, v. 262, n. 1-2, p. 131-144, 2007.
- FARIA, M. D. A. M. Mercúrio metálico crônico ocupacional. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. p. 116-127, 2003.
- FENG, X.; LU, J. Y.; GREGOIRE, D. C.; HAO, Y.; BANIC, C. M. e SCHROEDER, W. H. Analysis of inorganic mercury species associated with airborne particulate matter/aerosols: method development. **Anal Bioanal Chem**, v. 380, n. 4, p. 683-689, 2004.

- FERGUSON, J. N.; YOUNG, L. J. e INSEL, T. R. The neuroendocrine basis of social recognition. **Front Neuroendocrinol**, v. 23, n. 2, p. 200-224, 2002.
- FERRETTI, V.; ROULLET, P.; SARGOLINI, F.; RINALDI, A.; PERRI, V.; DEL FABBRO, M.; COSTANTINI, V. J.; ANNESE, V.; SCESA, G.; DE STEFANO, M. E.; OLIVERIO, A. e MELE, A. Ventral striatal plasticity and spatial memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 17, p. 7945-7950, 2010.
- FILE, S. E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 199-202, 1993.
- FRIBERG, L. e MOTTET, N. K. Accumulation of methylmercury and inorganic mercury in the brain. **Biol Trace Elem Res**, v. 21, n. p. 201-206, 1989.
- GAJKOWSKA, B. e MOSSAKOWSKI, M. J. Calcium accumulation in synapses of the rat hippocampus after cerebral ischemia. **Neuropatol Pol**, v. 30, n. 2, p. 111-125, 1992.
- GALLAGHER, P. J.; MITCHELL, J. e WHEAL, H. V. Identity of ultrastructural effects of mercuric chloride and methyl mercury after intracerebral injection. **Toxicology**, v. 23, n. 2-3, p. 261-266, 1982.
- GASSO, S.; SUNOL, C.; SANFELIU, C.; RODRIGUEZ-FARRE, E. e CRISTOFOL, R. M. Pharmacological characterization of the effects of methylmercury and mercuric chloride on spontaneous noradrenaline release from rat hippocampal slices. **Life Sci**, v. 67, n. 10, p. 1219-1231, 2000.
- GEIER, M. R. e GEIER, D. A. Neurodevelopmental disorders after thimerosal-containing vaccines: a brief communication. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 228, n. 6, p. 660-664, 2003.
- GOCHFELD, M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 56, n. 1, p. 174-179, 2003.
- GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B. e TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, n. 1, p. 67-70, 1993.
- GRAEFF, R. M.; FRANCO, L.; DE FLORA, A. e LEE, H. C. Cyclic GMP-dependent and -independent Effects on the Synthesis of the Calcium Messengers Cyclic ADP-ribose and Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 1, p. 118-125, 1998.
- GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R. F.; DEBES, F.; ARAKI, S.; YOKOYAMA, K.; MURATA, K.; SORENSEN, N.; DAHL, R. e JORGENSEN, P. J. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicol Teratol**, v. 19, n. 6, p. 417-428, 1997.
- GUENTZEL, J. L.; POWELL, R. T.; LANDING, W. M. e MASON, R. P. Mercury associated with colloidal material in an estuarine and an open-ocean environment. **Marine Chemistry**, v. 55, n. 1-2, p. 177-188, 1996.
- GUO, T. L.; MILLER, M. A.; SHAPIRO, I. M. e SHENKER, B. J. Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: evidence of mitochondrial dysfunction. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 153, n. 2, p. 250-257, 1998.
- GUZZI, G. e LA PORTA, C. A. Molecular mechanisms triggered by mercury. **Toxicology**, v. 244, n. 1, p. 1-12, 2008.
- HAHN, L. J.; KLOIBER, R.; LEININGER, R. W.; VIMY, M. J. e LORSCHIEDER, F. L. Whole-body imaging of the distribution of mercury released from dental fillings into monkey tissues. **FASEB J**, v. 4, n. 14, p. 3256-3260, 1990.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem**, v. 59, n. 5, p. 1609-1623, 1992.
- HANDLEY, S. L. e MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.
- HANDLEY, S. L. e MCBLANE, J. W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 29, n. 3, p. 129-138, 1993.

- HATTULA, T. e RAHOLA, T. The distribution and biological half-time of  $^{203}\text{Hg}$  in the human body according to a modified whole-body counting technique. **Environ Physiol Biochem**, v. 5, n. 4, p. 252-257, 1975.
- HODGSON, S.; NIEUWENHUIJSEN, M. J.; ELLIOTT, P. e JARUP, L. Kidney disease mortality and environmental exposure to mercury. **Am J Epidemiol**, v. 165, n. 1, p. 72-77, 2007.
- HOUSTON, M. C. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. **Altern Ther Health Med**, v. 13, n. 2, p. S128-133, 2007.
- HUANG, C. S. e NARAHASHI, T. Mercury chloride modulation of the GABAA receptor-channel complex in rat dorsal root ganglion neurons. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 140, n. 2, p. 508-520, 1996.
- HUANG, Y.; JIN, B.; ZHONG, Z.; ZHONG, W. e XIAO, R. Characteristic and mercury adsorption of activated carbon produced by CO<sub>2</sub> of chicken waste. **J Environ Sci (China)**, v. 20, n. 3, p. 291-296, 2008.
- IZQUIERDO, I. *Memória: Iván Izquierdo*. ed., ARTMED, 2002.
- . *Memória*. ed., Artmed Editora, 2011.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R.; IZQUIERDO, L. A. e BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behav Brain Res**, v. 103, n. 1, p. 1-11, 1999.
- IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R.; ROSSATO, J. I.; BONINI, J. S.; MEDINA, J. H. e CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci**, v. 29, n. 9, p. 496-505, 2006.
- JUAREZ, B. I.; MARTINEZ, M. L.; MONTANTE, M.; DUFOUR, L.; GARCIA, E. e JIMENEZ-CAPDEVILLE, M. E. Methylmercury increases glutamate extracellular levels in frontal cortex of awake rats. **Neurotoxicol Teratol**, v. 24, n. 6, p. 767-771, 2002.
- KONIGSBERG, M.; LOPEZ-DIAZGUERRERO, N. E.; BUCIO, L. e GUTIERREZ-RUIZ, M. C. Uncoupling effect of mercuric chloride on mitochondria isolated from an hepatic cell line. **J Appl Toxicol**, v. 21, n. 4, p. 323-329, 2001.
- KOSTIAL, K.; RABAR, I.; CIGANOVIC, M. e SIMONOVIC, I. Effect of milk on mercury absorption and gut retention in rats. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 23, n. 4-5, p. 566-571, 1979.
- KOSTIAL, K.; SIMONOVIC, I.; RABAR, I.; BLANUSA, M. e LANDEKA, M. Age and intestinal retention of mercury and cadmium in rats. **Environ Res**, v. 31, n. 1, p. 111-115, 1983.
- LACERDA, L. D. Contaminação por mercúrio no Brasil: fontes industriais vs garimpo de ouro. **Química Nova**, v. 20, n. p. 196-199, 1997.
- LIN, C.-J. e PEHKONEN, S. O. The chemistry of atmospheric mercury: a review. **Atmospheric Environment**, v. 33, n. 13, p. 2067-2079, 1999.
- LINDQVIST, O.; JOHANSSON, K.; BRINGMARK, L.; TIMM, B.; AASTRUP, M.; ANDERSSON, A.; HOVSENIUS, G.; HÅKANSON, L.; IVERFELDT, Å. e MEILI, M. Mercury in the Swedish environment — Recent research on causes, consequences and corrective methods. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 55, n. 1-2, p. xi-261, 1991.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.
- LONGO, D.; FAUCI, A.; KASPER, D.; HAUSER, S.; JAMESON, J. e LOSCALZO, J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18th Edition. ed., McGraw-Hill Education, 2011.
- MAHER, P. e SCHUBERT, D. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, n. 8-9, p. 1287-1305, 2000.
- MAIA, C. S.; LUCENA, G. M.; CORREA, P. B.; SERRA, R. B.; MATOS, R. W.; MENEZES, F. C.; SANTOS, S. N.; SOUSA, J. B.; COSTA, E. T. e FERREIRA, V. M. Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 1, p. 23-30, 2009.
- MCELWEE, M. K.; HO, L. A.; CHOU, J. W.; SMITH, M. V. e FREEDMAN, J. H. Comparative toxicogenomic responses of mercuric and methyl-mercury. **BMC Genomics**, v. 14, n. p. 698, 2013.

- MCGAUGH, J. L.; CAHILL, L. e ROOZENDAAL, B. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 24, p. 13508-13514, 1996.
- MCNAUGHTON, N. e CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 3, p. 285-305, 2004.
- MELA, M.; RANDI, M. A.; VENTURA, D. F.; CARVALHO, C. E.; PELLETIER, E. e OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 68, n. 3, p. 426-435, 2007.
- MOLLER-MADSEN, B. Localization of mercury in CNS of the rat. II. Intraperitoneal injection of methylmercuric chloride (CH<sub>3</sub>HgCl) and mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>). **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 103, n. 2, p. 303-323, 1990.
- MOLLER-MADSEN, B. e DANSCHER, G. Localization of mercury in CNS of the rat. I. Mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) per os. **Environ Res**, v. 41, n. 1, p. 29-43, 1986.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol**, v. 48, n. 4, p. 254-260, 1955.
- MOREL, F. M. M.; KRAEPIEL, A. M. L. e AMYOT, M. THE CHEMICAL CYCLE AND BIOACCUMULATION OF MERCURY. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 543-566, 1998.
- MORETTO, M. B.; FUNCHAL, C.; SANTOS, A. Q.; GOTTFRIED, C.; BOFF, B.; ZENI, G.; PUREUR, R. P.; SOUZA, D. O.; WOFCHUK, S. e ROCHA, J. B. Ebselen protects glutamate uptake inhibition caused by methyl mercury but does not by Hg<sup>2+</sup>. **Toxicology**, v. 214, n. 1-2, p. 57-66, 2005.
- MOURA, P. J. e XAVIER, G. F. Memória de reconhecimento social em ratos. **Psicologia USP**, v. 21, n. p. 355-389, 2010.
- MUTTER, J.; NAUMANN, J. e GUETHLIN, C. Comments on the article "the toxicology of mercury and its chemical compounds" by Clarkson and Magos (2006). **Crit Rev Toxicol**, v. 37, n. 6, p. 537-549; discussion 551-532, 2007.
- NADER, K.; SCHAFF, G. E. e LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 722-726, 2000.
- NORSETH, T. e CLARKSON, T. W. Intestinal transport of <sup>203</sup>Hg-labeled methyl mercury chloride. Role of biotransformation in rats. **Arch Environ Health**, v. 22, n. 5, p. 568-577, 1971.
- OZUAH, P. O. Mercury poisoning. **Curr Probl Pediatr**, v. 30, n. 3, p. 91-99, 2000.
- PAMPHLETT, R. e KUM JEW, S. Uptake of inorganic mercury by human locus ceruleus and corticomotor neurons: implications for amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 1, n. 1, p. 13, 2013.
- PANDOLFO, P.; PAMPLONA, F. A.; PREDIGER, R. D. e TAKAHASHI, R. N. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. **Eur J Pharmacol**, v. 563, n. 1-3, p. 141-148, 2007.
- PEDERSEN, M. B.; HANSEN, J. C.; MULVAD, G.; PEDERSEN, H. S.; GREGERSEN, M. e DANSCHER, G. Mercury accumulations in brains from populations exposed to high and low dietary levels of methyl mercury. Concentration, chemical form and distribution of mercury in brain samples from autopsies. **Int J Circumpolar Health**, v. 58, n. 2, p. 96-107, 1999.
- PETERSON, E. W. e CARDOSO, E. R. The blood-brain barrier following experimental subarachnoid hemorrhage. Part 1: Response to insult caused by arterial hypertension. **J Neurosurg**, v. 58, n. 3, p. 338-344, 1983.
- PIOTROWSKI, J. K.; SZYMANSKA, J. A.; SKRZYPINSKA-GAWRYSIAK, M.; KOTELO, J. e SPORNY, S. Intestinal absorption of inorganic mercury in rat. **Pharmacol Toxicol**, v. 70, n. 1, p. 53-55, 1992.
- PIRRONE, N. e MASON, R. Mercury Fate and Transport in the Global Atmosphere: Emissions, Measurements and Models. ed., Springer, 2009.
- PREDIGER, R. D.; BATISTA, L. C. e TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol Aging**, v. 26, n. 6, p. 957-964, 2005.



- PREDIGER, R. D.; FERNANDES, M. S.; RIAL, D.; WOPEREIS, S.; PEREIRA, V. S.; BOSSE, T. S.; DA SILVA, C. B.; CARRADORE, R. S.; MACHADO, M. S.; CECHINEL-FILHO, V. e COSTA-CAMPOS, L. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **J Ethnopharmacol**, v. 120, n. 3, p. 465-473, 2008.
- RAHOLA, T.; HATTULA, T.; KOROLAINEN, A. e MIETTINEN, J. K. Elimination of free and protein-bound ionic mercury ( $20\text{Hg}^{2+}$ ) in man. **Ann Clin Res**, v. 5, n. 4, p. 214-219, 1973.
- RENOULT, L.; DAVIDSON, P. S.; PALOMBO, D. J.; MOSCOVITCH, M. e LEVINE, B. Personal semantics: at the crossroads of semantic and episodic memory. **Trends Cogn Sci**, v. 16, n. 11, p. 550-558, 2012.
- REX, A.; STEPHENS, D. N. e FINK, H. "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 53, n. 4, p. 1005-1011, 1996.
- RODGERS, C. Extrapyrmidal side effects of antiemetics presenting as psychiatric illness. **Gen Hosp Psychiatry**, v. 14, n. 3, p. 192-195, 1992.
- SAHA, J. G. e LEE, Y. W. Interference of fats in the determination of mercury residues in fish by atomic absorption spectrometry. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 7, n. 5, p. 301-304, 1972.
- SAKAMOTO, M.; KUBOTA, M.; MURATA, K.; NAKAI, K.; SONODA, I. e SATOH, H. Changes in mercury concentrations of segmental maternal hair during gestation and their correlations with other biomarkers of fetal exposure to methylmercury in the Japanese population. **Environ Res**, v. 106, n. 2, p. 270-276, 2008.
- SANSON, L. T. e CAROBREZ, A. P. Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T-maze model of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 101, n. 1, p. 59-64, 1999.
- SARAFIAN, T. A.; VARTAVARIAN, L.; KANE, D. J.; BREDESEN, D. E. e VERITY, M. A. bcl-2 expression decreases methyl mercury-induced free-radical generation and cell killing in a neural cell line. **Toxicol Lett**, v. 74, n. 2, p. 149-155, 1994.
- SARKISYAN, G. e HEDLUND, P. B. The 5-HT<sub>7</sub> receptor is involved in allocentric spatial memory information processing. **Behav Brain Res**, v. 202, n. 1, p. 26-31, 2009.
- SCHAFE, G. E.; NADER, K.; BLAIR, H. T. e LEDOUX, J. E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 9, p. 540-546, 2001.
- SCHUTZ, M. T.; DE AGUIAR, J. C. e GRAEFF, F. G. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 340-345, 1985.
- SHANKER, G.; ASCHNER, J. L.; SYVERSEN, T. e ASCHNER, M. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 128, n. 1, p. 48-57, 2004.
- SILBERGELD, E. K.; SACCI, J. B., JR. e AZAD, A. F. Mercury exposure and murine response to *Plasmodium yoelii* infection and immunization. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 22, n. 4, p. 685-695, 2000.
- SILVA, A. F.; AGUIAR, M. S.; CARVALHO, O. S.; SANTANA LDE, N.; FRANCO, E. C.; LIMA, R. R.; SIQUEIRA, N. V.; FEIO, R. A.; FARO, L. R. e GOMES-LEAL, W. Hippocampal neuronal loss, decreased GFAP immunoreactivity and cognitive impairment following experimental intoxication of rats with aluminum citrate. **Brain Res**, v. 1491, n. p. 23-33, 2013.
- SIMMONS-WILLIS, T. A.; KOH, A. S.; CLARKSON, T. W. e BALLATORI, N. Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. **Biochem J**, v. 367, n. Pt 1, p. 239-246, 2002.
- SQUIRE, L. R. Memory and brain systems: 1969-2009. **J Neurosci**, v. 29, n. 41, p. 12711-12716, 2009.
- SQUIRE, L. R. e KANDEL, E. R. *Memória*. ed., Artmed, 2003.
- SQUIRE, L. R. e WIXTED, J. T. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. **Annu Rev Neurosci**, v. 34, n. p. 259-288, 2011.

- STARK, C. E. e SQUIRE, L. R. Hippocampal damage equally impairs memory for single items and memory for conjunctions. **Hippocampus**, v. 13, n. 2, p. 281-292, 2003.
- SUDA, I. e HIRAYAMA, K. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by hydroxyl radical produced from rat liver microsomes. **Arch Toxicol**, v. 66, n. 6, p. 398-402, 1992.
- SUDA, I.; SUDA, M. e HIRAYAMA, K. Phagocytic cells as a contributor to in vivo degradation of alkyl mercury. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 51, n. 3, p. 394-400, 1993.
- SUDA, I.; TOTOKI, S.; UCHIDA, T. e TAKAHASHI, H. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by various phagocytic cells. **Arch Toxicol**, v. 66, n. 1, p. 40-44, 1992.
- SWAIN, E. B.; JAKUS, P. M.; RICE, G.; LUPI, F.; MAXSON, P. A.; PACYNA, J. M.; PENN, A.; SPIEGEL, S. J. e VEIGA, M. M. Socioeconomic consequences of mercury use and pollution. **Ambio**, v. 36, n. 1, p. 45-61, 2007.
- SYVERSEN, T. e KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. **J Trace Elem Med Biol**, v. 26, n. 4, p. 215-226, 2012.
- SZASZ, A.; BARNA, B.; GAJDA, Z.; GALBACS, G.; KIRSCH-VOLDERS, M. e SZENTE, M. Effects of continuous low-dose exposure to organic and inorganic mercury during development on epileptogenicity in rats. **Neurotoxicology**, v. 23, n. 2, p. 197-206, 2002.
- SZUMANSKA, G.; GADAMSKI, R. e ALBRECHT, J. Changes of the Na/K ATPase activity in the cerebral cortical microvessels of rat after single intraperitoneal administration of mercuric chloride: histochemical demonstration with light and electron microscopy. **Acta Neuropathol**, v. 86, n. 1, p. 65-70, 1993.
- TAKAHASHI, R. N.; PAMPLONA, F. A. e FERNANDES, M. S. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. **Neurosci Lett**, v. 380, n. 3, p. 270-275, 2005.
- TAKEUCHI, T.; ETO, K. e TOKUNAGA, H. Mercury level and histochemical distribution in a human brain with Minamata disease following a long-term clinical course of twenty-six years. **Neurotoxicology**, v. 10, n. 4, p. 651-657, 1989.
- TAUEG, C.; SANFILIPPO, D. J.; ROWENS, B.; SZEJDA, J. e HESSE, J. L. Acute and chronic poisoning from residential exposures to elemental mercury--Michigan, 1989-1990. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 30, n. 1, p. 63-67, 1992.
- VIANA, M. B.; TOMAZ, C. e GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 3, p. 549-554, 1994.
- WALSH, R. N. e CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.
- WASSERMAN, J. C. H., S. S.; WASSERMAN, M. A. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. **Mundo e Vida**, v. 2, n. p. 49-53, 2001.
- WIXTED, J. T. e SQUIRE, L. R. The medial temporal lobe and the attributes of memory. **Trends Cogn Sci**, v. 15, n. 5, p. 210-217, 2011.
- WOOD, J. M.; KENNEDY, F. S. e ROSEN, C. G. Synthesis of methyl-mercury compounds by extracts of a methanogenic bacterium. **Nature**, v. 220, n. 5163, p. 173-174, 1968.
- WORLD HEALTH, O. e INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF, C. Inorganic chromium (VI) compounds. ed., Geneva: World Health Organization, 2014.
- YAMADA, M.; MINAMI, T.; YAMADA, G.; TOHNO, Y.; TOHNO, S.; IKEDA, Y.; TASHIRO, T.; KOHNO, Y. e KAWAKAMI, K. Different element ratios of red cosmetics excavated from ancient burials of Japan. **Sci Total Environ**, v. 199, n. 3, p. 293-298, 1997.
- YANAGISAWA, H.; NODERA, M.; SATO, M.; MORIDAIRA, K.; SATO, G. e WADA, O. Decreased expression of brain nitric oxide synthase in macula densa cells and glomerular epithelial cells of rats with mercury chloride-induced acute renal failure. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 184, n. 3, p. 165-171, 2002.
- ZACHI, E. C.; D, F. V.; FARIA, M. A. e TAUB, A. Neuropsychological dysfunction related to earlier occupational exposure to mercury vapor. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 3, p. 425-433, 2007.

ZANGROSSI, H., JR. e GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Res Bull**, v. 44, n. 1, p. 1-5, 1997.