



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS NO COMPORTAMENTO MOTOR APÓS
INTOXICAÇÃO SUBCRÔNICA DE METILMERCÚRIO NA
PRESENÇA DE ETANOL (PADRÃO BINGE) EM RATAS
ADOLESCENTES À FASE ADULTA.**

ALINE DO NASCIMENTO DE OLIVEIRA

BELÉM – PA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS NO COMPORTAMENTO MOTOR APÓS
INTOXICAÇÃO SUBCRÔNICA DE METILMERCÚRIO NA
PRESENÇA DE ETANOL (PADRÃO BINGE) EM RATAS
ADOLESCENTES À FASE ADULTA.**

Autor: Aline do Nascimento de Oliveira
Orientadora: Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêutica.

BELÉM – PA

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Oliveira, Aline do Nascimento, 1981-

Efeitos no comportamento motor após intoxicação
subcrônica de metilmercúrio na presença de etanol
(padrão binge) em ratas adolescentes à fase adulta /
Aline do Nascimento Oliveira. - 2015.

Orientadora: Cristiane do Socorro Ferraz
Maia.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Belém, 2015.

1. Metilmercúrio. 2. Etanol. 3. Adolescente.
4. Atividade motora. I. Título.

CDD 22. ed. 615.925663

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline do Nascimento de Oliveira

Efeitos no comportamento motor após intoxicação subcrônica de metilmercúrio na presença de etanol (padrão binge) em ratas adolescentes à fase adulta.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará para a obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em: 06/11/2015

Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia
Orientadora

Prof. Dr. Enéas de Andrade Fontes Júnior- UFPA

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Lima- IEC

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, Júlio, ao meu marido Paulo e às minhas filhas Bárbara e Ana Laura.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, pelo grande exemplo de vida e incentivo para fazer o correto.

Ao meu marido, pelo total apoio para fazer o que gosto e pela compreensão pelos momentos de ausência.

Às minhas filhas, que várias vezes tiveram que conviver com minha ausência.

À orientadora, Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia, pelo aceite, orientação e respeito.

À Luanna Fernandes, que me ajudou em todas as etapas deste trabalho.

À Sabrina Carvalho, pela cumplicidade e apoio.

À toda família LAFICO, pois todos foram fundamentais para execução deste trabalho, meu muito obrigada pela dedicação.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro dado a esta pesquisa.

“Não duvide do valor da vida, da paz, do amor, do prazer de viver, em fim, de tudo que faz a vida florescer. Mas duvide de tudo que a compromete.”

Augusto Cury

RESUMO

EFEITOS NO COMPORTAMENTO MOTOR APÓS INTOXICAÇÃO SUBCRÔNICA DE METILMERCÚRIO NA PRESENÇA DE ETANOL (PADRÃO BINGE) EM RATAS ADOLESCENTES À FASE ADULTA.

A exposição ao metilmercúrio, através da ingestão de peixes contaminados, concomitante a ingestão abusiva de álcool, no padrão binge, é bastante comum nas comunidades garimpeiras de extração de ouro, principalmente na Amazônia. A associação entre esses dois neurotóxicos é evidenciada também entre as mulheres adolescentes e gera a necessidade de se compreender seus efeitos sobre o Sistema Nervoso Central, principalmente na coordenação motora, equilíbrio e locomoção espontânea, uma vez que os estudos estão avançados somente nos efeitos das exposições de forma isolada. Portanto este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos no comportamento motor resultante da exposição subcrônica de metilmercúrio na presença de álcool, no padrão *binge*, em ratas no período da adolescência até início da fase adulta (37 a 72 dia pós-natal), através dos testes comportamentais motores do Campo Aberto, Pole Teste, Rotarod e Beam Walking Teste. Os testes ocorreram 24h após a última intoxicação das ratas que receberam metilmercúrio (0,04mg/kg/dia) durante 35 dias, concomitante com álcool (3g/kg/dia), sendo 3 dias consecutivos, 1 vez por semana (padrão *binge*) totalizando 5 *binges*. Os resultados demonstraram uma diminuição da locomoção espontânea no teste do Campo Aberto através dos parâmetros da distância total percorrida e número de levantamentos. No Pole Teste houve aumento do tempo de descida, ficando evidente a bradicinesia. No Rotarod houve diminuição na latência nas três primeiras exposições, assim como no Beam Walking Teste houve aumento na latência e número de escorregadas, principalmente nas vigas mais finas, demonstrando que a exposição subcrônica ao metilmercúrio na presença de álcool, no padrão *binge*, em ratas adolescentes foi capaz de produzir alterações comportamentais referentes à coordenação motora, equilíbrio, bem como na atividade locomotora espontânea.

Palavras-chave: metilmercúrio, álcool, adolescente, comportamento motor.

ABSTRACT

EFFECT ON MOTOR BEHAVIOR AFTER SUBCHRONIC METHYLMERCURY POISONING IN THE PRESENCE OF ALCOHOL (BINGE PATTERN) IN ADOLESCENTS FEMALE RATS UNTIL EARLY ADULTHOOD

Exposure to methylmercury through the contaminated seafood diet, concomitant abusive alcohol intake, in binge pattern, is quite common in gold mining communities of gold extraction, especially in the Amazon. The association between these two neurotoxicantes is also evident among adolescent women and creates the need to understand its effects on the central nervous system, especially in motor coordination, balance and spontaneous locomotion, because the studies are advanced only for the effects of exposure in isolation. Therefore this study aims to evaluate the effects on motor behavior resulting of subchronic exposure to methylmercury in the presence of alcohol, in binge pattern, in adolescents female rats until early adulthood (37-72 postnatal day), through behavioral motors tests, like Open Field, Pole Test, Rotarod and Beam Walking Test. The testing occurred 24 hours after the last intoxication of rats, which received methylmercury (0.04 mg / kg / day) for 35 days, concomitant with alcohol (3g / kg / day), 3 intermittent days, 1 time per week (binge), totaling 5 binges. The results showed a decrease in spontaneous locomotion in Open Field test through the parameters of the total distance traveled and number of rearing. In the Pole test was increased fall time, evidencing the bradykinesia. In the Rotarod there was a decrease in latency in the first three exhibitions, as well as Beam Walking Test was increased latency and number of slips, especially in thinner beams, showing that subchronic exposure to methylmercury in the presence of alcohol, in the binge, in adolescent female rats was able to produce behavioral damages related to coordinating motor, balance and spontaneous locomotor activity.

Keyword: methylmercury, alcohol, adolescent, motor behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo mercurial.....	19
Figura 2: Distribuição demográfica de mulheres nas 3 regiões Amazônica expostas ao mercúrio	21
Figura 3: Modelo conceitual causal e consequências do consumo de álcool.	28
Figura 4: Diagrama simplificado das conexões dos gânglios da base.....	39
Figura 5: Divisão do córtex motor.....	40
Figura 6: Cerebelo: localização, divisão anatômica e suas comunicações.....	42
Figura 7: Camadas do córtex cerebelar e suas composições.....	43
Figura 8: Grupos experimentais.	50
Figura 09: Tratamento do grupo MeHg.....	51
Figura 10: Tratamento do grupo EtOH.....	52
Figura 11: Tratamento do grupo MeHg+EtOH.....	53
Figura 12: Tratamento do grupo Controle.....	54
Figura 13: Aparato do campo aberto.....	56
Figura 14: Tarefa do pole teste	57

Figura 15: Tarefa do beam walking teste.....	59
Figura 16: Aparelho do rotarod.....	60
Figura 17: Delineamento experimental.....	62
Figura 18: Peso médio dos grupos experimentais/semana	65
Figura 19: Efeito da intoxicação da associação de etanol e metilmercúrio para o parâmetro da distância total percorrida (m) na atividade locomotora espontânea do campo aberto	66
Figura 20: Efeito da intoxicação da associação de etanol e metilmercúrio para o parâmetro número de levantamentos na atividade locomotora espontânea do campo aberto.....	67
Figura 21: Efeito da intoxicação da associação de etanol e metilmercúrio para o parâmetro de tempo de descida (s) no pole teste	68
Figura 22: Efeito da intoxicação da associação de etanol e metilmercúrio para os parâmetros tempo de latência (s) e número de escorregadas nas varas quadradas do beam walking teste	69
Figura 23: Efeito da intoxicação de da associação de etanol e metilmercúrio para os parâmetros tempo de latência (s) e número de escorregadas nas varas circulares do beam walking teste	71
Figura 24: Efeito da intoxicação da associação de etanol e metilmercúrio para o parâmetro tempo de latência (s) do teste rotarod.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Resumo dos resultados encontrados.....	87
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMAP	Acompanhamento Ártico e Programa de Avaliação
AMS	Área motora suplementar
ANOVA	Análise de variância
APM	Área pré-motora
Au	Ouro
BWT	Beam Walking Teste
CEPAE	Comitê ética em pesquisa envolvendo animais
CM	Córtex motor
CP	Célula Purkinje
DPN	Dia pós natal
e.p.m	erro padrão médio
EtOH	Etanol/álcool
G	Gramas
GISAH	Sistema Global de informação sobre álcool e saúde
Hg	Mercúrio
Hg ⁰	Mercúrio elementar
Hg ²⁺	Sal inorgânico de mercúrio
HIV/SIDA	Vírus da imunodeficiência humana
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
Kg	Kilograma
LAFICO	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento
LENAD	Levantamento Nacional de álcool e drogas

M1	Córtex motor primário
MeHg	Metilmercúrio
Mg	Miligrama
MS	Ministério da Saúde
NMDA	N-metil D-Aspartato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEAD	Plano emergencial de ampliação do acesso ao tratamento e prevenção em álcool e outras drogas.
Ppm	Parte por milhão
R	Raio
RPM	Rotação por minute
SNC	Sistema Nervoso Central
Tukey	Pós-teste estatístico para multipla comparação
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas
µg	Micrograma

SUMÁRIO

i.

I INTRODUÇÃO	16
1.1 Mercúrio e metilmercúrio - epidemiologia	17
1.1.1 MeHg E MULHERES	20
1.1.2 EFEITOS DA INTOXICAÇÃO POR MeHg	22
1.2 Exposição ao MeHg na presença de álcool – epidemiologia	24
1.2.1 EtOH - EPIDEMIOLOGIA	25
1.2.2 EtOH E ADOLESCÊNCIA	30
1.2.3 EtOH E MULHERES	32
1.2.4 EFEITOS DA INTOXICAÇÃO POR EtOH	33
1.2.5 EFEITOS DA INTOXICAÇÃO POR MeHg NA PRESENÇA DE EtOH.....	36
1.3 Sistema motor	38
1.3.1 DANOS ÀS ESTRUTURAS MOTORAS.....	44
II OBJETIVOS	46
2.1 Objetivo geral.	47
2.2 Objetivos específicos	47
III MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 Animais.	49
3.2 Grupos experimentais.	49
3.3 Tratamento do grupo MeHg	50
3.4 Tratamento do grupo EtOH.	51
3.5 Tratamento do grupo MeHg+EtOH	53
3.6 Tratamento do grupo Controle	53
3.7 Testes comportamentais	54
3.7.1 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	55
3.7.2 POLE TESTE	56
3.7.3 BEAM WALKING TESTE	58
3.7.4 TESTE DO ROTAROD.	60
3.8 Delineamento experimental	61
3.9 Análise estatística	63
IV RESULTADOS	64
4.1 Peso médio dos grupos experimentais	65
4.2 Teste do campo aberto	65

4.3 Pole teste.....	67
4.4 Beam walking teste.....	68
4.5 Teste do rotarod.....	72
V DISCUSSÃO.....	75
VI CONCLUSÃO.....	88
VII REFERÊNCIAS.....	90
VIII ANEXOS.....	113

I INTRODUÇÃO

1.1 Mercúrio e Metilmercúrio - Epidemiologia

O mercúrio (Hg) é um elemento natural encontrado no ar, água e solo. A exposição a este metal pesado, mesmo em pequenas quantidades, pode causar sérios problemas de saúde, por isso é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos dez produtos ou grupos de produtos químicos de grande preocupação de saúde pública (OMS, 2014).

O Hg é encontrado na natureza sob a forma inorgânica e orgânica, ambos com um elevado potencial para contaminar o meio ambiente e desencadear alterações da homeostase em mamíferos (GROTTO et al. 2010 e 2011; VIEIRA et al. 2015).

A exposição da população a forma elementar/metálico (Hg^0) e sal inorgânico (Hg^{2+}) ocorrem através de eventos naturais e de sua ocupação (atividades antropogênicas), enquanto que a exposição à forma orgânica, denominada metilmercúrio (MeHg), se dá através da dieta (DIAZ, 2000; PINHEIRO et al. 2008).

A atividade humana é a principal causa de emissões de Hg, em particular as estações de energia movidas a carvão, queima de carvão residencial para aquecer e cozinhar, processos industriais, incineradores de resíduos e principalmente como resultado da mineração para o Hg, ouro (Au) e outros metais (DIAZ, 2000; PINHEIRO et al. 2008, OMS, 2014 e VIEIRA et al. 2015).

Um exemplo, significativo, da exposição ao Hg que afetou a saúde pública, ocorreu em Minamata e Niigata, no Japão, entre 1932 e 1968, pois uma fábrica de produção de ácido acético líquido descarregou resíduos contendo altas concentrações de Hg nas baías destas regiões, onde o Hg sofreu o processo de metilação e originou MeHg, que é a forma orgânica de Hg com alta toxicidade para humanos e animais, devido à sua solubilidade lipídica e conseqüente tem elevado poder de penetração (WEISS, 2007; GROTTO et al. 2010 e 2011; YORIFUJI et al. 2011; MARUYAMA et al. 2012).

Estas baías, rica em peixe e marisco, proporcionavam o principal meio de subsistência para os residentes e pescadores destas e outras áreas locais, assim houve a intoxicação de grande parte desta população através do consumo de peixes e mariscos contaminados com alta concentrações de MeHg (média de $11\mu\text{g/g}$)

(WEISS, 2007; GROTTTO et al. 2010 e 2011; YORIFUJI et al. 2011; MARUYAMA et al. 2012).

Por muitos anos, não foi percebido que os peixes estavam contaminados por MeHg e que estava causando uma estranha doença na comunidade local e em outros distritos. Pelo menos 50.000 pessoas foram afetadas de alguma forma, sendo confirmados mais de 2000 casos de doença de Minamata e atingiu o pico na década de 1950, com casos graves que sofrem danos cerebrais, paralisia, discurso incoerente e delírio em consequências da intoxicação por MeHg (OMS, 2014).

No Brasil, o Hg foi bastante usado no período do "ciclo do ouro", que ocorreu de forma precoce, iniciando por volta de 1690 e durou até 1850. Nesse período, o Hg era utilizado apenas para extrair grandes partículas de Au nas minas, onde desde então, a tecnologia amálgama vem sendo usada para quase toda a extração de Au. Nos últimos 20 anos esta forma de extração tem sido substituída por mineiros informais, também chamados de garimpeiros (DIAZ, 2000).

Atualmente, as situações de exposição ao MeHg ocorrem principalmente nestas regiões de garimpo, em virtude da prática da mineração de Au artesanal e em pequena escala, no qual o Hg é usado na mineração para extrair Au através da formação de "amálgama", uma mistura composta por partes aproximadamente iguais Hg e Au (fusão Hg-Au) e após o seu aquecimento, o Hg evapora da mistura, deixando o Au (AMAP/ UNEP, 2013). Este método de extração de Au é bastante usado nas comunidades garimpeiras, porque é mais barato do que a maioria dos métodos alternativos, pois pode ser utilizado por uma pessoa de forma independente, é rápido e de fácil utilização (UNEP, 2012).

Em decorrência desta prática, os vapores de Hg (Hg^0) em torno da amálgama queimada podem ser alarmantes, uma vez que quase sempre excedem o limite da exposição pública preconizado pela OMS que é de $1,0 \text{ mg/m}^3$ (UNEP, 2012).

O Hg^0 disponível no ambiente realiza o ciclo mercurial, pois pode sofrer oxidação e se transforma em sal inorgânico (Hg^{2+}), os quais se instalam no solo e sedimentos de lagos, rios, baías e oceanos, onde são transformados por organismos anaeróbicos (microbiota) para a forma orgânica (MeHg). No meio aquático, o MeHg é absorvido pelo fitoplâncton, que é ingerido pelo zooplâncton e peixes, contaminando toda a cadeia alimentar e devido uma de suas características que é de sofrer bioacumulação, altas concentrações de MeHg pode acumular-se em

peixes, principalmente os grandes (DIAZ, 2000; CLARKSON, 2002; GOLDMAN e SHANNON, 2001 e CLARKSON e MAGOS, 2006) (Figura 1).

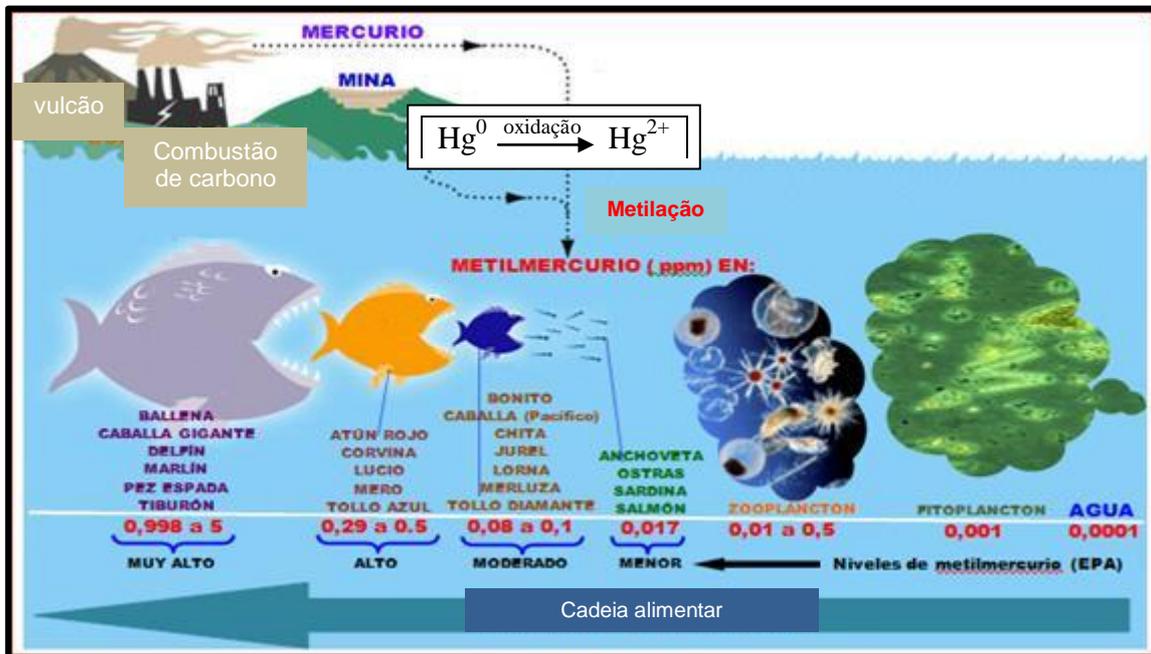


Figura 1: Ciclo mercurial. As emissões de mercúrio elementar (Hg^0) ocorrem através de eventos naturais (ex.: vulcão) ou através de atividade antropogênica (ex.: mina/garimpo, que corresponde a principal fonte para contaminação da atmosfera). Os vapores de Hg^0 podem sofrer oxidação, transformando-se em sal inorgânico (Hg^{2+}), que é depositado no solo, rios e lagos. Nos sistemas aquáticos, o Hg^{2+} pode sofrer metilação, transformando-se na forma orgânica (MeHg) e depositar-se nos plânctons, que são fonte alimentar para os animais marinhos. Desta forma, o consumo de peixes contaminados por MeHg correspondem a principal fonte de contaminação para seres humanos (VIEIRA et al. 2015). Fonte: Adaptado de http://agendaquimica.blogspot.com.br/2013_02_01_archive.html

Nas últimas décadas, tem alimentado uma corrida da prática de mineração de Au artesanal e em pequena escala por garimpeiros, devido ao aumento nos custos para se extrair grandes partículas de Au, impulsionada pela pobreza em muitos países (UNEP, 2008). Essa prática ocorre principalmente na América do Sul, África e Ásia, mas também pode ser encontrado na América do Norte e Austrália (UNEP, 2013c).

Estima-se que aproximadamente 15 milhões de pessoas participam desta prática em 70 países (UNEP, 2012), além de representar a maior fonte das emissões globais de Hg, ou seja, cerca de 37% e entre os anos de 2005 e 2010 as emissões duplicaram (UNEP, 2013a).

Embora, a maioria do uso de Hg esteja em declínio em todo o mundo, para a prática de mineração de ouro artesanal e em pequena escala é esperado um aumento, representando a maior porcentagem de demanda de Hg global (UNEP, 2013c).

Na Amazônia, esta prática é bastante comum, pois estudos demonstram que peixes piscívoros e carnívoros coletados nos rios amazônicos Madeira e Tapajós apresentaram concentração de MeHg acima do valor máximo recomendado pela OMS, bem como altas concentrações nas amostras de cabelos e sangues dessas comunidades ribeirinhas (DIAZ, 2000).

Isto ocorre devido aos hábitos alimentares dessa população, no qual as comunidades costeiras cuja base da dieta é a pesca, estão expostos pelo processo de intoxicação crônica causada pela ingestão de peixes contaminados por MeHg nas áreas próximas às atividades garimpeiras (DIAZ, 2000; MALM, 1998).

Segundo Vieira et al. (2015) a ingestão de peixes contaminados constitui a principal via de exposição ao MeHg e quanto maior o consumo, maior a concentração de MeHg encontrados nos cabelos desta população. O limite aceitável para peixes comestíveis é de 0,5mg/kg de Hg total, com consumo semanal de 400g. Cerca de 85% deste Hg total esta na forma de MeHg (BISINOTI e JARDINS, 2004).

1.1.1 MeHg E MULHERES

Segundo UNEP (2013a), das 15 milhões de pessoas que participam da prática de mineração artesanal de Au em pequena escala em todos os países, cerca de 3 milhões são mulheres e crianças.

No Brasil, em especial, na região Amazônica, as mulheres, principalmente a predominância das jovens, que moram próximas às áreas de mineração de ouro, estão expostas ao Hg (PINHEIRO et al. 2008) (Figura 2).

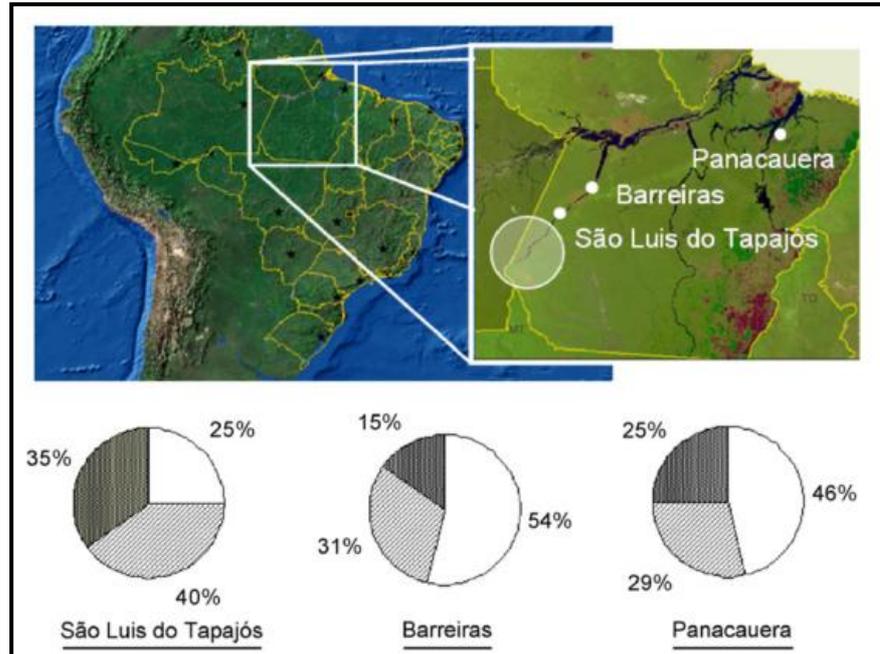


Figura 2: Mapa do Brasil, ênfase em 3 regiões Amazônicas demonstrando a distribuição de mulheres por idade expostas ao Hg. O painel superior direito, representa 3 populações Amazônicas, São Luis do Tapajós, Barreiras e Panacauera representadas pelos círculos brancos pequenos, bem como a proximidade do rio Tapajós com a principal área de mina de ouro, representada pelo círculo branco maior. O painel abaixo mostra a distribuição de mulheres por idade nas 3 comunidades acima citadas: de 13-29 (branco), 30-45 (cinza) e 46-65 anos (preto). Fonte: Instituto Brasileiro de Geologia e Estatística (IBGE).

Cerca de, 15% das mulheres jovens e adolescentes (idade 13- 29 anos) que vivem em Barreiras e São Luiz do Tapajós apresentaram taxas de concentração superior a 20 ppm MeHg nos cabelos, acima do recomendado pela OMS (PINHEIRO et al. 2008).

Desta forma, como resultado da cadeia produtiva do Au, todas as pessoas envolvidas nas operações de mineração de ouro, suas famílias, e aqueles nas comunidades de mineração de Au estão expostos a níveis perigosos de vapor de Hg elementar, assim como contaminação de outras formas mercuriais (GIBB e O'LEARY, 2014). Isto inclui aqueles que manuseiam diretamente a amálgama como o mineiro responsável pela extração, o lojista, que é responsável pela purificação do Au, quanto as populações que frequentam os ambientes próximos aos locais de produção (NOVAIS e CÂMARA, 2009).

Outro grande grupo de exposição é composto por todos os residentes das comunidades de mineração de Au, que consomem peixes, os quais podem estar

altamente contaminado pelo MeHg (GIBB e O`LEARY, 2014).

De acordo com dados da OMS (2014), há duas subpopulações mais suscetíveis quando intoxicadas por Hg. A primeira é composta pelo feto, o recém-nascido e a criança devido a sensibilidade do sistema nervoso em desenvolvimento, tanto por exposição ainda no útero quanto pelo consumo de leite materno contaminado. A segunda subpopulação é composta pelas mulheres, mães, grávidas e mulheres que possam vir a engravidar, que devem estar cientes quanto ao risco da intoxicação por MeHg.

Diante do exposto, é necessário reconhecer a importância dos aspectos e desafios de saúde inerentes aos produtos e atividades que incluem o Hg, implementar estratégias mundiais e nacionais de saúde pública, conforme exigido pela Convenção de Minamata, priorizando as populações vulneráveis, em especial as mulheres, as crianças e através delas, as gerações futuras (BOARD et al. 2013). Porém, apesar da vulnerabilidade aos efeitos tóxicos mercuriais, há de se reconhecer que todos os grupos expostos podem sofrer os seus efeitos, constituindo um perigo generalizado em todo o mundo (BOARD et al. 2013).

1.1.2 EFEITOS DA INTOXICAÇÃO POR MeHg

As diferentes formas de Hg (elementar ou orgânico) são tóxicas para o Sistema Nervoso Central (SNC) e periférico, mas diferem no seu grau de toxicidade e nos seus efeitos sobre os sistemas nervoso, digestivo, imune, nos pulmões, rins, pele e olhos (OMS, 2014). Distúrbios neurológicos e comportamentais podem ser observados após a inalação e/ou ingestão das diferentes formas mercuriais, no qual os sintomas incluem, insônia, perda de memória, dores de cabeça, efeitos neuromusculares, tremores, e disfunção cognitiva e motora (ASCHER e SYVERSEN, 2005; CLARKSON e MAGOS, 2006; GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2006; AUGER et al. 2005).

Os efeitos decorrentes do consumo de peixes contaminados e bioacumulados por MeHg favorecem o desenvolvimento da "doença de Minamata", cujo nome se dá pelo conjunto de sintomas característicos dos efeitos tóxicos do contato com MeHg.

Estes efeitos são ocasionados pelas características inerentes a este neurotóxico, tais como: alta estabilidade química, após ingestão, ocorre absorção intestinal quase em sua totalidade, cerca de 95% (Diaz, 2000).

Além disso, o MeHg é capaz de penetrar nas barreiras placentária e hematoencefálica, podendo afetar negativamente a reprodução e o neurodesenvolvimento (CLARKSON e MAGOS, 2006 e FARINA et al. 2011). Nos jovens, podem produzir defeitos no desenvolvimento neurológico (CRICHTON et al. 2008 e FERRARO et al. 2009), visto que o MeHg parece ter preferência de se acumular nas células nervosas (DAVE et al. 1994). A exposição em longo prazo induz neurotoxicidade severa (GLASER et al. 2010), depois estende-se aos outros tecidos em apenas quatro dias e exerce mecanismos de neurotoxicidade ainda não totalmente conhecidos (DIAZ, 2000; COUNTER e BUCHANAN, 2004; GRANDJEAN, 2007; OMS, 2014).

Os sintomas neurológicos decorrentes da intoxicação por MeHg incluem prejuízo cognitivo, ataxia, paralisia cerebral, restrição do campo visual, deficiência auditiva e de fala, bem como efeitos teratogênicos em fetos de mulheres grávidas expostas (TO et al. 2002; CRESPO LOPEZ et al. 2011; BERNHOFT, 2012; GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2014).

Outros efeitos tóxicos decorrentes da intoxicação por MeHg incluem, efeitos mais sutis sobre a linguagem, a atenção e a cognição (CLARKSON e MAGOS, 2006; GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2006), deficiências sensoriais (CARTA et al. 2003; SILVEIRA et al. 2003; HERCULANO et al. 2006), genotoxicidade (CRESPO-LÓPEZ et al. 2007), disfunção motora (AUGER et al. 2005) e deficiências no desenvolvimento psicomotor (ASCHER e SYVERSEN, 2005) e outros.

Estudos em animais demonstraram que a intoxicação por MeHg em ratos adultos promove diversas alterações mitocondriais do córtex cerebral, bem como alargamento na morfologia e diminuição em até 60% destas organelas (GLASER et al. 2014), ocasionando uma diminuição da neuroproteção devido comprometimento na atividade mitocondrial (KUMARI et al. 2012 e MENDELEV et al. 2012).

Anomalias mitocondriais também foram encontradas em ratos após intoxicação por MeHg na dose 6ppm no período pré-natal e logo após nascimento, que apareceria ter sido ocasionadas pela liberação do citocromo C destas

organelas presentes nas células de Purkinje, bem como uma redução dramática destas células (BIAMONTE et al. 2014).

No córtex cerebral, a intoxicação causada pela exposição ao MeHg é dose-dependente, visto que ratos Wistar adultos, expostos durante 4 semanas, às concentrações de 4 μ mol/kg e 12 μ mol/kg, apresentaram aumento nos níveis Hg no córtex cerebral, sendo encontrado maiores concentrações nos animais que foram intoxicados com a maior dose (YANG et al. 2015).

O efeito neurotóxico de MeHg envolve também o cerebelo, como já foi demonstrado em ratos (CASTOLDI et al. 2001). Nesta estrutura, a intoxicação mercurial promove dano nas células desta estrutura em embriões (BERTOSSO et al. 2004) devido à morte de células granulares cerebelares por apoptose, após exposição às baixas doses de MeHg (menor ou igual a 1 μ M) (CASTOLDI et al. 2000 e KUNIMOTO, 1994).

A fim de investigar os efeitos em longo prazo da exposição ao MeHg, ratas grávidas foram expostas (0,5 mg/kg/dia) no período pré-natal. A prole foi submetida a testes comportamentais motores (5-15 e 26-36 semanas de idade), que embora demonstrou função motora normal, houve uma diminuição da atividade exploratória. (ONISHCHENKO et al. 2007).

As deficiências motoras resultantes desta intoxicação estão associadas à exposição a altos níveis de MeHg, tais como: coordenação e equilíbrio, incluindo alterações nas funções do cerebelo e áreas corticais (ROEGGE e SCHANTZ, 2006).

Em ratos adultos jovens, a exposição em curto prazo de baixas doses à moderada (1 a 5mg/kg) de MeHg, induziu prejuízo na coordenação motora e equilíbrio, através do aumento da latência no teste Rotarod (com aceleração), diminuição da distância total percorrida (exploração horizontal) no teste do Campo Aberto e aumento do tempo de descida no Pole Teste (BELLUM et al. 2007).

Testes comportamentais, realizados em animais recém-desmamados (8 semanas de vida), para avaliação dos efeitos da exposição crônica de MeHg (1,4 μ g/g/dia) durante o período pré-natal, demonstraram uma tendência de menor desempenho no teste do campo aberto, bem como aumento no comportamento de ansiedade (LIANG et al. 2009).

1.2 Exposição ao MeHg na presença de Álcool - Epidemiologia

A exposição ao MeHg na presença de álcool etílico (EtOH) ganha importância em virtude de haver regiões no Brasil, principalmente nos garimpos da Amazônia, onde há exposição do Hg, decorrente do consumo de peixes provenientes de rios contaminados com MeHg, associado ao consumo abusivo de bebidas alcoólicas (CORBETT et al. 2007 e PINHEIRO et al. 2008).

Aliado ao consumo de peixes contaminados por MeHg, evidenciando a exposição aguda ou crônica (OMS, 2014), o consumo de bebidas alcoólicas nas áreas de garimpos é considerado alto (CORBETT et al. 2007).

Nestas áreas, o consumo de EtOH ocorre para suportar o frio de começar o trabalho extrativista em meio aquático, atividade que se inicia ainda de madrugada e se estende até o entardecer, ou ainda objetivando o lazer, o qual ocorre nos bares e zonas das vilas de garimpo, principalmente aos finais de semana (SANTOS e CATRAVECHI, 2014).

Devido a exposição ao MeHg, 15% das mulheres jovens e adolescentes (idade 13- 29 anos) que vivem em regiões de garimpo da Amazônia apresentaram taxas de concentração superior a 20 ppm MeHg, acima do recomendado pela OMS (PINHEIRO et al. 2008).

Aliado a isto, as mulheres, principalmente as adolescentes, apresentam um padrão mais nocivo no consumo de EtOH, devido às altas doses e frequência, podendo ser consideradas como um grupo de risco para esta droga (LARANJEIRA, 2013).

Embora os efeitos tóxicos desses dois compostos sejam, relativamente, bem estudados isoladamente, os efeitos provocados pela exposição concomitante aos dois neurotóxicos, ainda não são bem entendidos, principalmente sobre as funções do SNC (CORBETT et al. 2007 e PINHEIRO et al. 2008), demonstrando a necessidade de compreendê-los.

1.2.1 EtOH - EPIDEMIOLOGIA

O EtOH é uma das substâncias psicoativas mais antigas utilizadas na sociedade (MUKHERJEE et al. 2007). Seu uso e efeitos vem sendo descritos desde tempos ancestrais, e em seu histórico cultural é aceito em quase todas as sociedades organizadas (SHER, 2006; ELLIOT e BOWER, 2008; UHART e WAND, 2009). O consumo é favorecido por ser uma droga lícita, de baixo custo, amplamente disponível, de fácil acesso (JERNIGAN et al. 2002) e que vem sendo estimulada pelas propagandas (FARIA et al. 2011).

O uso de EtOH é incentivado pelo consumo em celebrações, situações sociais e de negócios, cerimônias religiosas, eventos culturais (MELONI e LARANJEIRA, 2004), para fins recreativos e pela redução da idade de iniciação (ADRIELLE, 2013). A frequência de consumo é favorecido, por provocar desinibição, ter a capacidade de aliviar tensão/estresse e ansiedade, que são fatores reforçadores para a continuidade da ingestão (KOOB e KREEK, 2007), demonstrando que o padrão de consumo de bebidas alcoólicas tem sido apoiado por aspectos sociais e culturais (PINSKY et al. 2010).

Atualmente, um dos principais fatores que estimulam o consumo de EtOH é o estresse da vida moderna, que implica na falta de qualidade de vida (LEITE et al. 2015) e é fortalecido por um amplo espaço de divulgação na mídia. Como exemplo disso, temos a cerveja, que é uma bebida alcólica popular, e por ser uma droga lícita, conta cada vez mais com a permissividade social, no qual sua propaganda é, em grande maioria, voltada a um público cada vez mais jovem e que contém diversas mensagens subliminares e com cenas instigantes (OLIVEIRA et al. 2011).

Segundo Schuckit (2009) o consumo do álcool continuará a subir nas próximas décadas, e as mulheres e os adultos jovens constituem os grupos de maior incremento na elevação dos índices de consumo, tornando o álcool um problema de saúde pública emergencial.

Em relação as drogas ilícitas, que matam 4 a cada 100.000 pessoas por ano, o álcool matam 35 mortes (ATLAS, HEALTH, & ABUSE, 2010). Segundo o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2012, há, em todo o mundo, 3,3 milhões de mortes por ano, resultante do uso nocivo do álcool, que representa 5,9% de todas as mortes. O abuso alcoólico é um fator causal em mais de 200 doenças, sendo responsável por 5,1% da carga global de doenças e lesões.

Existe uma relação causal entre o uso nocivo do álcool e uma série de distúrbios mentais e comportamentais, incluindo dependência; outras doenças não transmissíveis, como cirrose hepática; alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares; bem como lesões resultantes de violência e de confrontos em estradas e colisões. Há incidência também de doenças infecciosas, tais como tuberculose e o vírus da imunodeficiência humana (HIV/SIDA) (OMS, 2013) e quanto menores os níveis sócio-econômicos, maior a incidência de doenças atribuíveis ao álcool (HERTTUA et al. 2008 e MACKENBACH et al. 2008).

Além das consequências para a saúde, o EtOH traz prejuízos sociais, econômicos significativos para os indivíduos e a sociedade em geral, podendo resultar em danos a outras pessoas, como familiares, amigos, colegas de trabalho e estranhos, assim resultando em uma carga sanitária, social e econômico (OMS, 2013).

Segundo o Sistema Global de Informações de álcool e saúde (GISAH)-desenvolvido pela OMS para dinamizar dados atuais sobre níveis e padrões de consumo do EtOH, das consequências de saúde e sociais, bem como as respostas políticas a todos os níveis- a estimativa média de consumo (em litros) de EtOH por pessoa, de 15 ou mais anos no Brasil em 2012 era de 8,9 (6,6 – 11,3), em 2015 é de 9,1 (8,0 – 10,2), e a projeção para 2020 é de 9,6 (8,6 – 10,7) e em 2025 de 10,1 (9,1 – 11,3) (GISAH, 2014).

Segundo dados estatísticos do II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD), apontam para um aumento significativo do consumo nocivo de EtOH nos últimos anos, pois revelaram o discreto aumento da proporção de pessoas não abstinentes (ou consumidores) entre os anos de 2006 e 2012, que era de 48% e atingiu 50% da população. Entretanto, este estudo aponta que houve aumento significativo do número de doses e frequência de consumo (consumo de 5 ou mais doses), que em 2006 era de 29% e em 2012 aumentou para 39%. O levantamento ainda mostrou que houve um aumento do número de pessoas que consomem álcool pelo menos uma vez por semana, de 42% em 2006 para 53% em 2012 e que o consumo tem sido cada vez mais precoce (LARANJEIRA, 2014).

O impacto do consumo crônico e agudo de álcool é amplamente determinada por duas dimensões distintas mas conexas, tais como o volume total de álcool consumido e o padrão de consumo (MONT- GOMERY et al. 2012) (Figura 3).

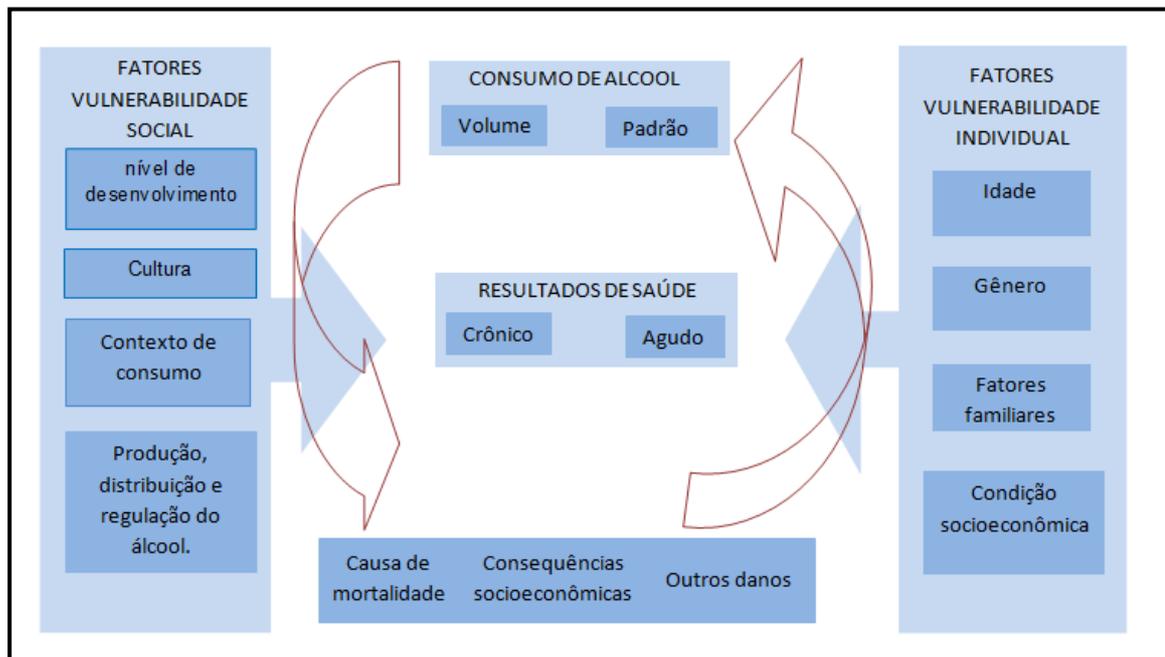


Figura 3: Modelo conceitual causal do consumo de álcool e os resultados para a saúde, demonstrando os vários fatores, tanto a nível social quanto individual, que afetam os níveis e padrão de consumo, bem como a amplitude dos problemas relacionados ao álcool para a população em geral. Fonte: Adaptado de <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs349/en/#>.

Nos últimos anos, o padrão de consumo e os hábitos começaram a mudar drasticamente, especialmente entre os mais jovens nas culturas ocidentais (MONT-GOMERY et al. 2012), sendo observado a ingestão em altas doses de EtOH, em um curto período de tempo, seguido por um período de abstinência. Este padrão de consumo, constitui uma forma de beber episódica e intensa, chamada de *binge* (CREGO et al. 2010; PETIT et al. 2013; JACOBUS e TAPERT, 2013).

O *binge* descreve um padrão de consumo que é caracterizado pela ingestão de bebidas alcoólicas com a intenção principal de alcançar uma intoxicação marcada, que é caracterizada por uma concentração de EtOH no sangue mínima de 0,8%. Para homens adultos, este padrão equivale a pelo menos cinco drinques

padrão, e para mulheres adultas, são necessários pelo menos quatro doses (CRABBE et al. 2011). As diferenças mais marcantes entre os padrões “binge” e “tradicional” são a irregularidade da ingestão de EtOH e que os jovens são os principais consumidores (HERMENS et al. 2013).

As consequências decorrentes do consumo em excesso e constante do EtOH caracteriza-o como droga de abuso e é um problema de saúde e economia ao Estado, pois os impactos sociais do uso dessa substância são temas de grande preocupação social, principalmente a partir no início do século XX, onde o crescimento da circulação e uso de substâncias psicoativas ganham destaque (LORENZO, 2006).

Assim, estes fatos configuram-o como um problema de saúde pública global, devido à dependência decorrente de seu uso, à gravidade de seus efeitos, que ultrapassa o limite do biológico, à severidade dos efeitos produzidos pelo seu uso crônico, e o aumento vertiginoso da prevalência do uso na população mundial (ADRIELLE e SANTOS, 2013).

O impacto gerado pelo consumo crescente de álcool ao longo dos anos é mundial (GALLASSI et al. 2008). No Brasil, também é notório o impacto do custo social gerado pelo abuso de álcool, e os investimentos realizados não conseguem reduzir, de modo significativo, os problemas decorrentes desta prática, tais como: criminalidade, acidentes, violência doméstica, absenteísmo, desemprego e outros (MORAES et al. 2006).

E neste contexto, surgiram algumas políticas nacionais, tais como a Política para a Atenção Integral ao Uso de Álcool e Outras Drogas, que foi apresentada pelo Ministério da Saúde (MS) em 2003. Ela reforça que, a abstinência não pode ser o único objetivo a ser alcançado e considera a redução de danos um caminho promissor.

Em 2007 foi publicada a Política Nacional sobre o Álcool, que tem como fim, a sustentação de estratégias para o enfrentamento coletivo dos problemas relacionados ao consumo de EtOH e em 2009 emergiu o Plano Emergencial de Ampliação do Acesso ao Tratamento e Prevenção em Álcool e outras Drogas (PEAD, 2009-2011), que tem como objetivos intensificar, ampliar e diversificar as

ações direcionadas para a promoção da saúde, prevenção, tratamento e redução dos riscos e danos associados ao consumo de substâncias psicoativas, neste âmbito inserido o EtOH (MANGUEIRA, 2015).

Estas políticas têm como objetivo à promoção da saúde, que no contexto do consumo nocivo do EtOH, há grande necessidade de políticas públicas direcionadas às populações vulneráveis, tais como mulheres e adolescentes (MANGUEIRA, 2015).

Segundo o PEAD, crianças, adolescentes e jovens são considerados segmentos vulneráveis e priorizados, uma vez que estes grupos se apresentam em situação mais grave quando se considera o impacto das consequências danosas do EtOH na vida afetiva, familiar e social, além dos prejuízos à saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

1.2.2 EtOH E ADOLESCÊNCIA

Os adolescentes são considerados uma população vulnerável ao consumo de EtOH, por isso é um seguimento prioritário nas políticas públicas voltadas para o tema. Devido à adolescência, que segundo o Estatuto da Criança e do Adolescente (2010), compreende entre os 12 e 18 anos de idade, ser um importante período de transição entre a infância e a idade adulta, é marcado por transformações biológicas, físicas, comportamentais e sociais complexas.

Geralmente, os comportamentos de alcoolização, nessa etapa da vida, ocorrem em contexto situacional incentivador e promotor do consumo (BARROSO et al. 2009), pois é nesta fase que, comumente, ocorre o início do uso de drogas lícitas e/ou ilícitas, devido ser um período de curiosidade, de especial valorização do grupo de amigos e do conhecido “comportamento rebelde”, que marca o começo do processo de sua autonomia em relação à família (SOUZA et al. 2010).

O consumo de EtOH, por adolescentes, tem entre os fatores associados, destaque para os inerentes às estruturas familiares e sociais: separação

dos pais, conflitos com a mãe, presença de pai permissivo, ter sofrido maus tratos, não possuir prática religiosa e residir com usuário de álcool e/ou drogas. Além de ser motivado pela sensação de atingir o prazer, a intenção de “ficar animado” e diminuir a ansiedade (MATOS et al. 2010).

Segundo uma pesquisa, realizada no período entre 1998 e 2008 com universitários brasileiros, havia grandes proporções no uso de substâncias psicoativas (WAGNER e ANDRADE, 2008) e o padrão de consumo, incluindo o EtOH, ocorre de forma intermitente e é conhecido por ser o tipo dominante entre os adolescentes e adultos jovens (CREGO et al. 2009). Além disso, a frequência de consumo nessa população, principalmente de estudantes universitários, ocorre três vezes na semana, particularmente às quintas-feiras e fins de semana (PARADA et al. 2011; BEETS et al. 2009).

Segundo os dados do II LENAD, que avaliou o consumo entre os adolescentes, no período entre 2006 e 2012, houve um aumento dos abstinentes (pessoas que não beberam álcool nos últimos 12 meses), de 66% para 74%, na faixa etária de 14 a 17 anos. Estes dados também revelaram uma queda do consumo, além de algumas mudanças comportamentais importantes e que mereceram atenção, pois apesar da idade daqueles que bebiam 5 ou mais doses na mesma ocasião ter se mantido estável em 22%, esta aparente estabilidade encobriu a diferença significativa de gênero, pois se observou uma queda de 31% para 24% entre os meninos e um crescimento expressivo entre as meninas, passando de 11% para 20% (crescimento de 9 pontos percentuais) (LARANJEIRA, 2014).

Estes achados são preocupantes, bem como evidenciam e sugerem que, os indivíduos que iniciam o consumo aos 12 ou menos de idade são mais suscetíveis à dependência de álcool do que aqueles que iniciam mais tardiamente (COMISSÃO DE ABUSO DE SUBSTÂNCIAS, 2010).

Os danos relacionados ao consumo de EtOH tendem a ocorrer em faixas etárias relativamente mais jovens, como uma proporção significativa da carga de doenças que surgem de lesões não intencionais e intencionais, incluindo as ocasionadas pelos acidentes de trânsito, violência, suicídios e lesões fatais (OMS, 2013), além de aumentar ainda mais os riscos de morbidade e gravidade de transtornos associados ao álcool (BEENSTOCK et al. 2010).

Para enfrentar os problemas relacionados ao consumo excessivo de bebidas alcoólicas por adolescentes, devem-se intensificar tanto as políticas e programas que promovem a sensibilização e controle social da oferta e acesso às bebidas, quanto à sensibilização do ambiente familiar (MATOS et al. 2010).

1.2.3 EtOH E MULHERES

As mulheres, assim como os adolescentes, são consideradas uma população vulnerável ao consumo de EtOH, por isso também são um seguimento prioritário nas políticas públicas voltadas para o tema, pois as mulheres têm se destacado em meio ao perfil dos consumidores (MANGUEIRA, 2015). Este gênero, principalmente as adolescentes, apresenta um padrão mais nocivo no consumo de EtOH, devido às altas doses e frequência, podendo ser consideradas como um grupo de risco para esta droga (LARANJEIRA, 2013).

Ao longo dos anos, a literatura aponta para o aumento do consumo de EtOH entre mulheres e tem ocorrido de modo cada vez mais precoce, pois segundo os dados divulgados em 2007, do I LENAD, mostrou que 41% das mulheres consumiam algum tipo de bebida alcoólica (LARANJEIRA et al. 2007), enquanto que os dados do II LENAD, analisados entre os anos de 2006 e 2012, revelaram que a idade de experimentação do EtOH, em mulheres, na faixa etária de até 11 anos, aumentou de 1% para 4%; dos 12 aos 14 anos, de 7% para 13%; e dos 15 aos 17 anos, de 28% para 32%.

Além disso, este mesmo levantamento também demonstrou que em 2012, as mulheres representaram 38% das pessoas que consumiram EtOH nos últimos 12 meses, com o padrão de ingestão de cinco ou mais doses, que aumentou de 17% para 27%; e a frequência de beber, pelo menos uma vez por semana, aumentou de 27% para 38% (LARANJEIRA, 2014).

Como relatado anteriormente, o consumo de EtOH está aumentando para o público feminino, por isso se deve dar especial atenção a este grupo. Deve-se atentar para as diferenças entre os gêneros, tais como a metabolização do EtOH, que ocorre de forma mais lenta nas mulheres que nos homens, fato este que as torna mais susceptíveis aos prejuízos relacionados ao seu consumo, mesmo quando ingerido níveis mais baixos e por período mais curto (ELBREDER et al. 2008).

Outras diferenças fisiológicas entre os gêneros reforçam a preocupação com as mulheres, seja pela menor quantidade da enzima álcool-desidrogenase e/ou pelo baixo volume de água no organismo, contribuindo para altas concentrações sanguíneas desta droga (OSHIMA et al. 2013; WOLLE et al. 2011). Além disso, a presença de hormônios femininos que, embora os estudos sejam pouco conclusivos, parece acentuar o consumo de EtOH na fase adulta, quando iniciado na adolescência (STRONG et al. 2010 e MELÓN et al. 2013).

Diante da necessidade de se dar especial atenção aos grupos mais vulneráveis ao consumo de EtOH, tais como, adolescentes e mulheres, é de extrema importância saber seus efeitos e de que forma esta substância exerce seus prejuízos, seja para auxiliar o entendimento científico ou para orientar intervenções nos transtornos causados pelo EtOH (ALLEN e BAYRAKTUTAN, 2008).

1.2.4 EFEITOS DA INTOXICAÇÃO POR EtOH

Os efeitos do EtOH nos vários órgãos e tecidos são causados pela sua concentração sanguínea ao longo do tempo (MANZO-AVALOSS e SAAVEDRA-MOLINA, 2010). Os sintomas característicos desta intoxicação no SNC são decorrentes do consumo excessivo e, conseqüentemente, sua elevada concentração plasmática (GOHLKE et al. 2008).

O EtOH é uma molécula de carga fraca, que após se mover através das membranas, facilmente atinge o equilíbrio de concentração sangue/tecidos

rapidamente (SCHUKIT, 2004). É absorvido pelo trato gastrointestinal (TGI) após a administração oral (cerca de 95-98%) e sofre metabolização pré-sistêmica ou de 1ª passagem (HOLFORD, 1987; NORBERG et al. 2003). Em ratos, a concentração sanguínea de EtOH, administrado via intragástrica (gavagem), possui um declínio gradual e dura em torno de 450 minutos para ser eliminado do organismo (LIVY et al. 2003).

Os adolescentes, que tem um padrão de consumo de EtOH intermitente e em altas concentrações, apresentam maiores alterações no SNC, pois o cérebro desta população é mais sensível aos seus efeitos neurotóxicos, em *binge*, que o cérebro adulto (PETIT et al. 2013). Além disso, o cérebro nesta fase ainda encontra-se em neuromaturação, sendo possível que o consumo intermitente (em *binge*) pode alterar o seu funcionamento em comparação com adolescentes que não participam de *binge drinking*, ou abstem-se de fazê-lo até a idade adulta (GUERRI e PASCUAL, 2010).

Em virtude disso, os efeitos neurotóxicos dessa forma de consumo são especialmente perigosos, devido às altas doses ingeridas seguidas de abstinência, provocando danos mais rápidos e mais severos que o consumo crônico em baixas doses (SKALA e WALTER, 2013). Aliado a isso, a retirada abrupta no consumo excessivo altera a integridade neuronal de regiões cerebrais vulneráveis como cerebelo, hipocampo e córtex (JUNG e METZGER, 2010).

É neste contexto, de alta prevalência do consumo abusivo de EtOH, na população adolescente, que tem havido grande preocupação acerca dos seus efeitos (CREGO et al. 2010).

O consumo crônico de EtOH afeta diversas populações celulares do SNC, em especial neurônios, expressando seus efeitos deletéricos (CEDERBAUM et al. 2009; GEORGE e FIGUEREDO, 2010), pois sofrem um processo de neurodegeneração e morte celular (ZOU e CREWS, 2005; CREWS e NIXON, 2008). Além disso, altera interações existentes entre as células da glia e os neurônios, influenciando no desenvolvimento do SNC (CREWS e BAUN, 2003; HAO et al. 2003; TATENO et al. 2005).

A sensibilidade ao EtOH é diferente entre as regiões cerebrais e se expressam através dos efeitos comportamentais, tais como: desinibição,

sedativo-hipnótico, prejuízos cognitivos e na função motora (FEHR et al. 2006; KUMAR et al., 2009; HEILIG, 2011).

Um estudo clínico indicou que os homens que apresentam o alcoolismo no início na adolescência têm volumes cerebelar menores comparados aos controles, demonstrando que, embora o cerebelo de jovens pode ser menos sensível ao EtOH do que os adultos, o consumo excessivo de EtOH em uma idade precoce, pode levar a efeitos adversos em longo prazo desta parte do cérebro (DE BELLIS et al. 2005).

A exposição ao EtOH, durante o período da adolescência, pode resultar em alterações motoras na idade adulta, pois um estudo realizado em ratos Wistar jovens, expostos a um protocolo de EtOH (3g/Kg) em *binge* intermitente, tiveram alguns déficits de longo prazo na função motora (PASCUAL et al. 2007).

Apesar de saber que o EtOH produz danos no equilíbrio e coordenação motora, uma pesquisa demonstrou que os adolescentes e adultos não diferem na sua sensibilidade para os seus efeitos em doses relativamente baixas (1,0g/kg) sobre a coordenação motora, mas em doses mais elevadas (2,0 e 3,0g/kg) houve comprometimento motor, tanto para animais adolescentes quanto para os adultos, sendo neste caso os adolescentes menos sensíveis (WHITE et al. 2002).

Estudo de Forbes et al. (2013) demonstraram que a exposição ao EtOH (4 injeções intraperitoneal de 3,0g/kg), durante duas semanas, em padrão *binge* intermitente (2 dias consecutivos com intervalos de dois dias), pode alterar a função motora significativamente, tais como, deficiência na coordenação motora, sinais de disfunção no aprendizado motor, bem como uma possível diferença entre os sexos. Este mesmo estudo mostrou uma degeneração significativa de células de Purkinje do cerebelo, o qual foi analisado após três semanas da exposição ao EtOH, além de diferenças significativas no desenvolvimento e crescimento mental entre o controle e grupos tratados com EtOH (FORBES et al. 2013).

Este achado foi confirmado com outros trabalhos, como de Huang et al. (2012) que utilizou camundongos adolescentes, machos e fêmeas e Sherrill et al. (2011) que utilizaram ratos Long-Evans, os quais demonstraram que os animais tratados com EtOH têm crescimento cerebelar atrofiado.

Teixeira et al. (2014) demonstraram que a intoxicação crônica (55 dias) por EtOH (6,5g/kg/dia), de forma intermitente em ratos, no período da adolescência até a

idade adulta (35-90 DPN), induziu deficiências motoras significativas, incluindo locomoção espontânea prejudicada, coordenação e força muscular.

Estas deficiências comportamentais foram acompanhadas por alterações marcantes, como aumento dos níveis de nitrito e peroxidação lipídica no córtex cerebral. Concluindo que a intoxicação contínua por EtOH, neste período de vida, foi capaz de fornecer danos neurocomportamental e neurodegenerativo ao córtex cerebral (TEIXEIRA et al. 2014).

Este cenário justifica o declínio do funcionamento central executivo, decorrente do abuso de EtOH em longo prazo (OSCAR-BERMAN, 2012). Estudos recentes têm demonstrado efeitos semelhantes no consumo pesado e frequentes, embora em menor escala (MONTGOMERY et al. 2012). O consumo excessivo de EtOH até a idade de 24 anos, provavelmente, representa um dano maior ao bom funcionamento executivo do que em fases posteriores da vida (HERMENS et al. 2013).

As funções executivas que podem ser alteradas pelo EtOH compreendem, inibição da resposta, seleção de tarefa, a alternância de tarefas e monitoramento da resposta (GOLDSTEIN e VOLKOW, 2011). Além disso, os efeitos da intoxicação crônica por EtOH, em padrão *binge*, sobre a alternância de tarefas em humanos jovens, promoveu mudanças comportamentais executivas (BESTE, 2014).

1.2.5 EFEITOS DA TOXICIDADE DO MeHg NA PRESENÇA DE EtOH

Os efeitos da toxicidade do MeHg na presença de EtOH devem receber cuidados especiais, pois o MeHg tem facilidade de atravessar as membranas plasmática, encefálica e placentária, além de acumular-se em tecidos específicos, gerando intoxicações ao SNC, rins, fígado, baço, cabelo, coração, unhas e ossos dos recém-nascidos (AZEVEDO, 2003; STERN, 2005).

Aliado a isto, o EtOH aumenta a fluidez das membranas celulares nervosas (EDELFORSS e RAVN-JONSEN, 1990) e altera a permeabilidade da barreira

hematoencefálica, sendo esta fundamental na proteção do SNC contra agentes nocivos (GULATI et al. 1985).

Portanto, em doses mais elevadas de MeHg, o nível deste neurotóxico pode ser desproporcionalmente elevado na presença de EtOH, devido à possibilidade do dano na barreira hematoencefálica e maior entrada de MeHg no SNC (FAZAKAS et al. 2005).

Atualmente, ainda são poucos os estudos que avaliam os efeitos tóxicos de MeHg na presença de EtOH, embora haja avanços nos estudos dos efeitos de MeHg e EtOH isoladamente. Dentre alguns exemplos, temos o de Tamashiro et al. (1986), os quais demonstraram que a intoxicação alcoólica potencializou a toxicidade do MeHg (5mg/kg/10 dias consecutivos via oral) em relação às manifestações neurológicas e mortalidade.

Pesquisa que avaliou os efeitos do MeHg no metabolismo do EtOH, utilizando ratos tratados com cloreto de MeHg (10mg/kg/2 dias consecutivos i.p.) e EtOH (0,4g/kg i.v.), demonstrou que o MeHg diminuiu sutilmente o metabolismo do EtOH, devido à ligação, de forma não-específica, que o MeHg faz com o grupamento sulfidrílico (-SH) presente na enzima álcool desidrogenase (OHMIKA e NAKAI, 1977).

A intoxicação por essas substâncias, em paralelo, também foram investigadas quanto à função e histologia renal. A nefrotoxicidade ficou mais evidente nos animais que receberam as duas substâncias do que naqueles que receberam as drogas isoladas (RUMBEIHA et al. 1991, 1992). Entretanto, esses resultados não foram observados por outros pesquisadores (TURNER et al. 1990).

A intoxicação concomitante destes neurotóxicos apresentou, inicialmente, um ganho de peso corporal de ratos, seguido de perda, os quais apresentaram intensa ataxia (TURNER et al. 1981), dados estes observados em outros estudos posteriores, com potencialização dos efeitos deletérios no SNC (FAZAKAS et al. 2005; PAPP et al. 2005).

Papp et al. (2005) investigou os efeitos agudo do Hg (3,5mg/kg i.p.) em combinação com EtOH, no SNC de ratos. Os resultados deste estudo demonstraram que houve uma grande diminuição na atividade espontânea do córtex de ratos decorrente dos efeitos tóxicos do Hg e que podem ser agravados pelo consumo de

EtOH (5% v.v).

Grandjean e Weihe (1993) demonstraram que o EtOH aumenta a formação de vapor de Hg a partir de Hg iônico no sangue, onde alguma concentração é exalada, causando diminuição mercurial no sangue após ingestão de EtOH. Maia et al. (2009), também detectaram que as concentrações mercuriais em pêlos de ratas grávidas diminuíram quando foi administrado o MeHg conjuntamente com o EtOH.

Nos estudos comportamentais de Maia et al. (2009), foi observado que a intoxicação concomitante de MeHg e EtOH, durante o neurodesenvolvimento em ratos causou distúrbios comportamentais relacionados à ansiedade e comprometimento motor na vida adulta.

Em outro estudo, Maia et al. (2010) procuraram investigar a exposição combinada de MeHg e EtOH em ratos adultos que foram expostos durante o desenvolvimento do SNC. Os resultados de Maia et al. demonstraram um impacto negativo sobre a memória e comportamentos relacionados com o pânico. Ainda no mesmo ano, Maia e colaboradores investigaram a atividade nitrérgica em cérebro de ratos adultos, após exposição pré-natal e sugeriram que há alteração da atividade nitrérgica em diferentes formas, dependendo da região e da camada do SNC.

Uma vez que, os estudos dos efeitos tóxicos de MeHg na presença de EtOH são escassos, se faz necessário mais pesquisas neste seguimento, principalmente seus efeitos no comportamento motor e em períodos da vida ainda pouco investigados, como por exemplo a adolescência.

1.3 Sistema Motor

O sistema motor consiste em duas áreas, representada por uma complexa rede de áreas corticais (áreas motoras primárias e secundárias), na qual se insere o cortex motor (CM), e áreas subcorticais (gânglios da base e cerebelo). Neste sistema, populações neuronais interagem entre si, através de mecanismos

excitatórios e inibitórios, o qual é altamente dinâmico e é influenciado por fatores externos e internos que modulam a percepção sensorial, atenção e comportamento motor (XERRI et al. 1996; ASANUMA e PAVLIDES, 1997; BREAKSPEAR et al. 2003; HOSP e LUFT, 2011).

Este sistema é constituído por um conjunto de 3 unidades: unidade de comando, de controle e de ordenação. O movimento é idealizado, planejado e comandado pelo córtex, com supervisão da unidade de controle, a qual é constituída pelos núcleos da base e cerebelo. O seu funcionamento ocorre por meio de uma alça de retroalimentação, a qual leva informação acerca do movimento pretendido até estruturas de controle, que corrigem, adequam e aperfeiçoam o movimento e reenviam as informações às estruturas corticais (DELONG e WICHMANN, 2007; HANDLEY et al. 2009) como demonstra o modelo da circuitaria dos gânglios da base (Estriado, Núcleo Subtalâmico, Globo Pálido e Substância Negra) (figura 4).

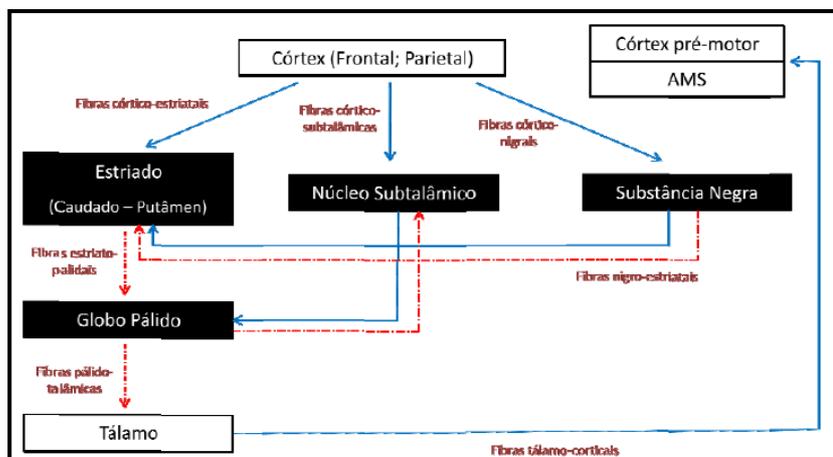


Figura 4: Diagrama esquemático simplificado das conexões dos gânglios da base, onde as linhas contínuas (azuis) mostram as vias excitatórias e as linhas pontilhadas (vermelhas) mostram as vias inibitórias. Fonte: Adaptado de HANDLEY et al. 2009

A capacidade de gerar movimentos corporais coordenados depende da interconexão de uma série de estruturas envolvidas na função motora, dentre elas, destacam-se os núcleos da base, CM e cerebelo (GRAFTON e HAMILTON, 2007) e a ativação cortical o primeiro passo, necessário para a inicialização do movimento

(ADKINS et al. 2006).

Em humanos, o CM pode ser dividido em CM primário (M1), área motora suplementar (AMS) e área pré-motora (APM) (ADKINS et al. 2006; JUAN et al. 2011) (Figura 5).

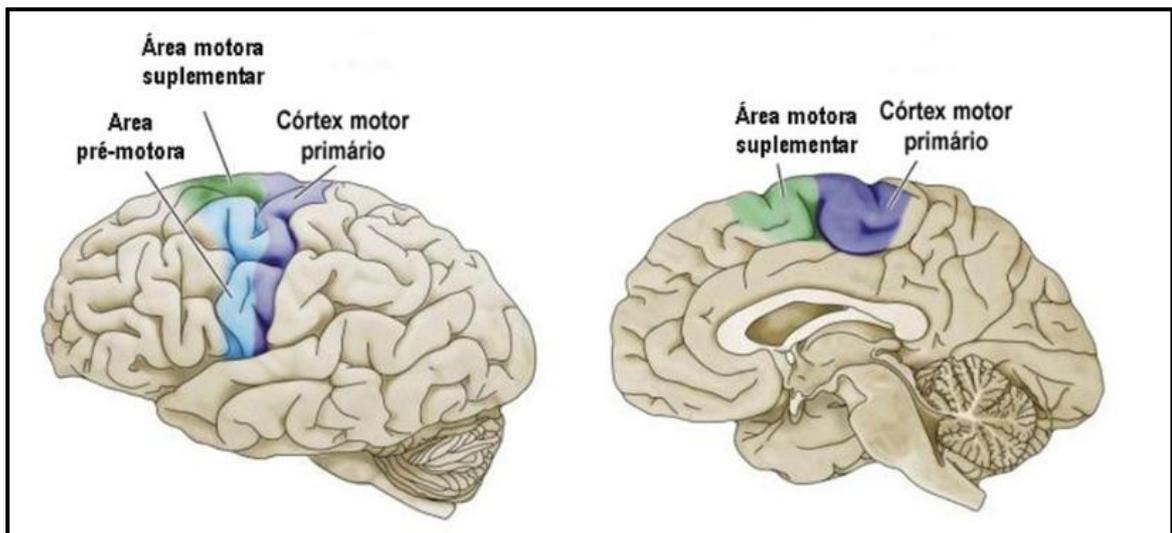


Figura 5: Divisão do Córtex Motor, em Córtex Motor Primário, Área Motora Suplementar e Área Pré-Motora (ADKINS et al. 2006; JUAN et al. 2011). Fonte: Adaptado de http://images.slideplayer.com.br/2/363280/slides/slide_5.jpg

Enquanto que a AMS e a APM estão envolvidas no planejamento da atividade motora, o M1 recebe densas aferências da AMS e APM e mantém-se organizado em agrupamentos neuronais altamente especializados no comando do movimento de cada segmento. A ativação coordenada dessa rede neuronal possibilita o ordenamento multiarticular fino e independente, como os movimentos de alcance e preensão (ADKINS et al. 2006 e JUAN et al. 2011).

Em ratos, o CM é denominado isocórtex frontal (Fr) e pode ser dividido de acordo com suas características morfológicas, neuroquímicas e de padrões de conexões em três áreas: a Fr1 que corresponde, em humanos, ao M1, a Fr2 que corresponde a APM e AMS e a área Fr3 que seria uma subregião da representação somatotópica (PAXINOS, 2004; PAXINOS e WATSON, 2004).

O CM está relacionado à aprendizagem e modelagem motora, onde alguns neurônios, por meio de ramos corticais eferentes do centro motor, auxiliam também na força muscular e movimentos (EVARTS, 1968; FERZOU et al. 2007; SALINAS, 2009). Segundo recentes estudos, Bourguignon et al. (2013) elucidam que pequenas regiões do CM estão associadas à organização, de maneira hierárquica, dos movimentos dirigidos aos alvos/tarefas.

No entanto, pesquisas anteriores relacionam essa hierarquização ao cerebelo, através do processamento temporizador dos movimentos e da observação da ação, uma vez que, neurônios de Purkinje projetam-se para o núcleo cerebelar profundo e, conseqüentemente, para áreas motoras, desempenhando papel fundamental no *loop* córtico-cerebelo-cortical para a orientação visual (PHILLIPS et al. 2009; GALLESE, 1996 e GLICKSTEIN, 2000).

O cerebelo é, fundamentalmente, importante para a coordenação e aprendizagem motora (LAMONT e WEBER, 2012). Representa cerca de 10% do volume cerebral, com uma ampla conexão de feixes de fibras nervosas, contendo aproximadamente 50% de todos os neurônios do encefálo (MARGOLIS et al. 2001) e se comunica com várias regiões do corpo, tais como: fusos musculares, labirinto e núcleos vestibulares através de fibras extrínsecas (SARNA E HAWKES, 2003).

É uma estrutura pequena localizada na fossa craniana, dorsalmente ao tronco encefálico. Em uma divisão anatômica ou parasagital, pode ser dividido em 3 zonas: vérmis (medial), paravermal (intermediária) e hemisférios cerebelares (lateral). A comunicação com o encéfalo ocorre através de pares de feixes nervosos, os pedúnculos superior, médio e inferior (SCHMAHMAN et al. 1999).

Todas as informações eferentes, a partir do córtex cerebelar, convergem para 3 pares de núcleos profundos do cerebelo: o denteado, o interpósito e fastigial, responsáveis, respectivamente, pelo planejamento do movimento, controle dos membros e equilíbrio motor (FITZPATRICK et al. 2008) (Figura 6).

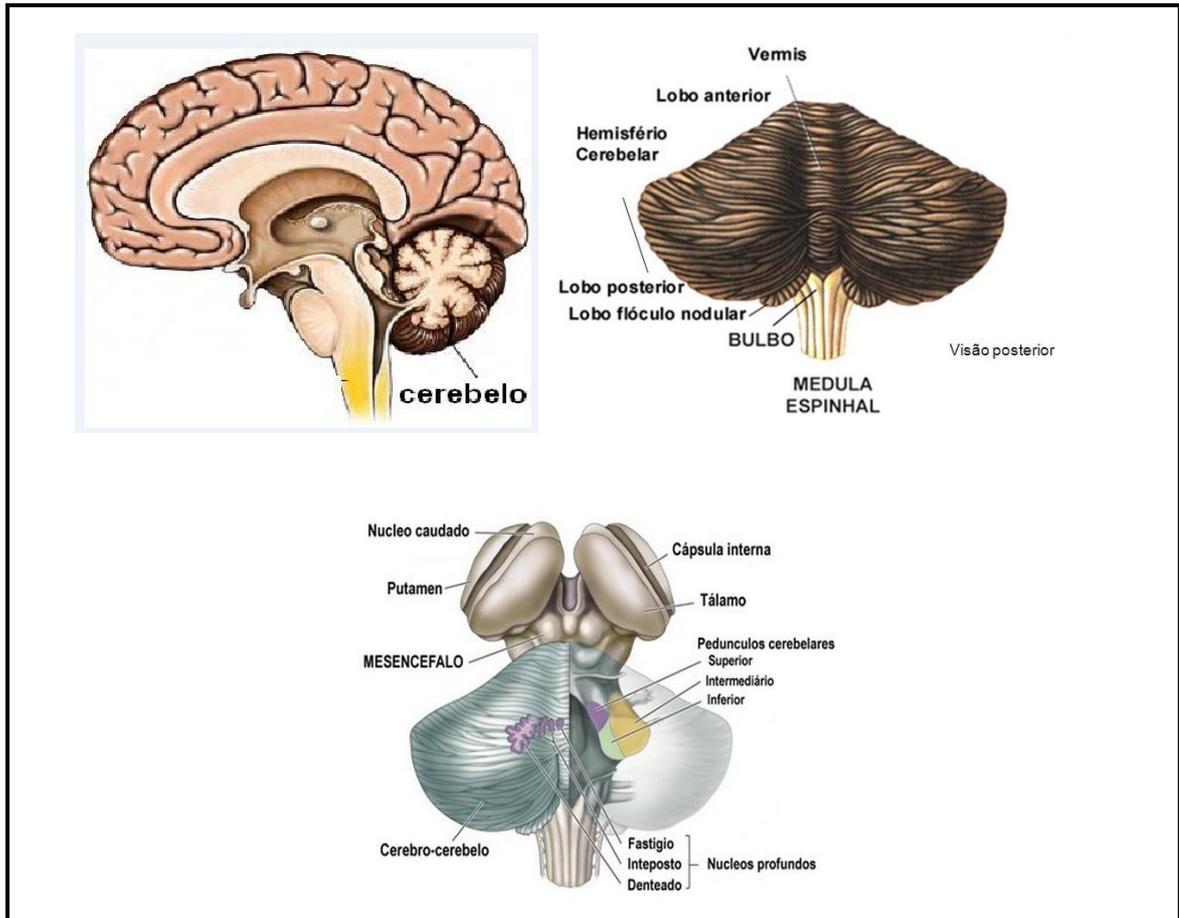


Figura 6: A imagem superior, da esquerda, ilustra a localização do cerebelo, a imagem superior, da direita, (visão posterior) ilustra a sua divisão anatômica, sendo observada a vérmis (zona medial) e hemisférios cerebelares (lateral) (SCHMAHMAN et al. 1999). A imagem inferior ilustra a comunicação do cerebelo com o encéfalo (SCHMAHMAN et al. 1999) e os 3 pares de núcleos profundo do cerebelo (FITZPATRICK et al. 2008). Fonte: Adaptado, respectivamente, de <https://morfofisiobiomed.files.wordpress.com/2014/10/cerebelo.jpg>, http://images.slideplayer.com.br/2/363280/slides/slide_15.jpg e <http://slideplayer.com.br/slide/363280/>

O cerebelo é ligado ao córtex cerebral, através de duas vias, a de recompensa e por “*feedback*”. Feixes aferentes do córtex cerebral terminam em pontos do núcleo da base, que por sua vez transmitem fibras musgosas ao cerebelo. Projeções do tipo “*feedback*” percorrem o córtex cerebelar através dos núcleos profundos do cerebelo e terminam no núcleo contralateral do tálamo ventrolateral, que envia projeções de volta para o córtex cerebral (FITZPATRICK et al. 2008).

Histologicamente, a estrutura cerebelar é formada pelo córtex e pela substância branca cerebelar, sendo que, o córtex cerebelar divide-se em 3 camadas distintas, da mais externa para mais interna: i) camada molecular; ii) de células de Purkinje (CP); e iii) granular. A primeira é composta basicamente por células estreladas e em cesto, bem como por fibras paralelas e dendritos de CP (BOTTA et al. 2007). A camada de neurônios ou CP, que constituem os maiores neurônios do SNC, ramificam-se através da camada molecular e chegam até a superfície do córtex, constituindo a única via eferente do córtex cerebelar, tornando-se o meio integrativo primário desta estrutura (VOOGD e GLICKSTEIN, 1988; O'HEARN e MOLIVER, 2001; VOOGD e RUIGROK, 2004).

A camada granular ou granulosa possui grande quantidade de células granulosas (excitatórias), que se ramificam e originam as fibras paralelas, as células de Golgi (inibitórias) e as fibras musgosas (excitatórias) (FITZPATRICK et al. 2008; O'HEARN e MOLIVER, 2001) (Figura 7).

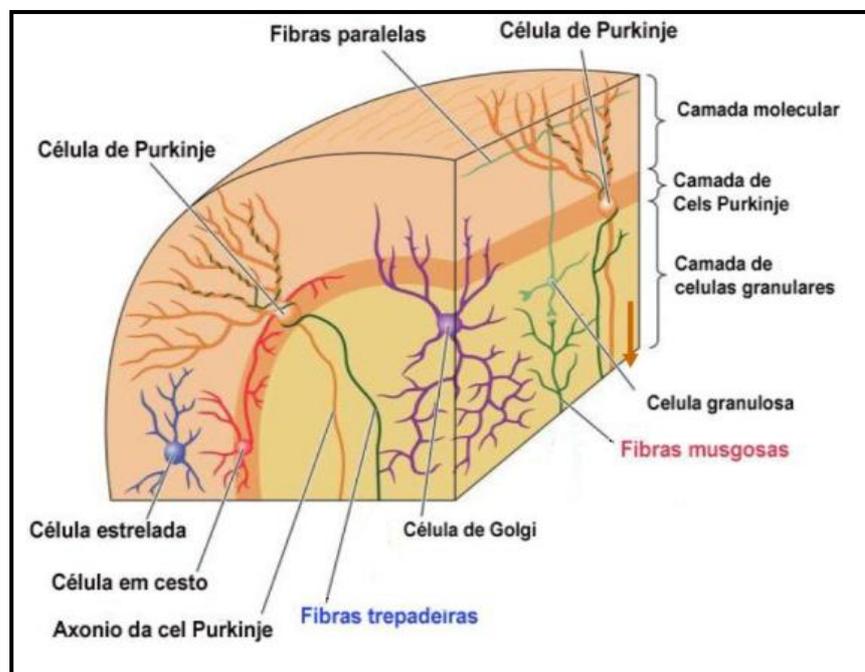


Figura 7: A imagem mostra as três camadas do córtex cerebelar, da mais externa para mais interna: camada molecular, de células de Purkinje (CP) e granular. Fonte: <http://cienciasecognicao.org/neuroemdebate/wpcontent/uploads/2012/08/c%C3%B3rtex-cerebelar.jpg>

As CP têm o papel singular de serem as únicas células do córtex cerebelar de saída e são vitais para a função normal do cérebro, tais como o movimento de ajuste fino e postura (LAMONT e WEBER, 2012). Além disso, desempenham um papel importante na coordenação motora (SCHMOLESKY et al. 2002).

Baseado na descrição acima, a plasticidade do córtex cerebelar deve-se, fundamentalmente, às sinapses das células granulares sobre as CP. O sistema de células granulosas e musgosas codificam o contexto em que ocorrem os movimentos, as fibras trepadeiras sinalizam às CP a necessidade de refinamento do movimento e este potencial das fibras trepadeiras induz à plasticidade da sinapse entre células granulosas e CP, através do potencial de longa duração, melhorando o desempenho e aprendizado do movimento (MAUK, 1997, SALIN et al. 1996).

Dentre suas funções, o cerebelo auxilia na sequência de atividades motoras, monitora e realiza ajustes corretivos nas atividades motoras corporais, além de ser responsável pelo planejamento do próximo movimento sequencial, ajudando na progressão homogênea entre os movimentos, além de ser essencial para atividades rápidas como correr e digitar (GUYTON e HALL, 2006).

1.3.1 DANOS ÀS ESTRUTURAS MOTORAS

Danos que afetam núcleos da base, cerebelo e CM estão associados à deficiência motora, tais como bradicinesia, perda de coordenação, equilíbrio e aprendizagem motora. Estes danos podem ser resultantes de alterações na homeostasia e nas funções destas estruturas, embora não cause paralisia muscular (OGAWA et al. 1985; GUYTON e HALL, 2006; ROEGGE e SCHANTZ, 2006; GRANDJEAN, 2007; AOSAKI et al. 2010; GLASER et al. 2014).

O desequilíbrio do sistema acetilcolinérgico e na atividade da dopamina do estriado (núcleo da base) é a principal hipótese fisiológica de doenças neurológicas que apresentam como sintoma central a bradicinesia (Aosaki et al. 2010). Além de, os núcleos da base, serem responsáveis pela seleção inapropriada do comando do movimento no caso da bradicinesia (BERARDELLI et al. 2001).

Pesquisas relatam que a disfunção cerebelar está associada com ataxia (incoordenação motora) (ZÁDORI et al. 2012; DIZON e KHODAKHAH, 2011), dismetria (uma tendência de movimentos para sob ou além do alvo) (ZHR et al. 2010, PAINE et al. 2004), disdiadococinesia (problemas na realização de movimentos rápidos e repetitivos) e diminuição na aprendizagem motora (PARKS et al. 2003; WEI et al. 2013).

A disfunção cerebelar também está associada ao tremor intencional e hipotonia (diminuição do tônus e força muscular) (LOUIS et al. 2011), além de interromper as quantidades relativas de aceleração e de duração durante o movimento (HUBER et al. 2012).

Pesquisas relatam que a disfunção cerebelar está associada com ataxia (incoordenação motora) (ZÁDORI et al. 2012; DIZON e KHODAKHAH, 2011), dismetria (uma tendência de movimentos para sob ou além do alvo) (ZHR et al. 2010, PAINE et al. 2004), disdiadococinesia (problemas realizando movimentos rápidos e repetitivos) e diminuição na aprendizagem motora (PARKS et al. 2003; WEI et al. 2013).

A disfunção cerebelar também está associada a tremor intencional e hipotonia (diminuição do tônus e força muscular) (LOUIS et al. 2011), além de, interromper as quantidades relativas de aceleração e de duração, durante o movimento (HUBER et al. 2012).

No período da adolescência, os danos ao cerebelo podem ocorrer mais facilmente, uma vez que, esta área ainda não está completamente desenvolvida nesta fase da vida (TIEMEIER, 2010), podendo produzir erros no planejamento e na execução de movimentos, ao invés de paralisia ou movimentos involuntários (FREDERICKS, 1996).

Devido a necessidade de se conhecer os efeitos dos danos motores consequência da exposição concomitante de MeHg e EtOH, o presente estudo buscou avaliar os efeitos no comportamento motor, resultante da intoxicação subcrônica por MeHg, na presença de EtOH, em padrão *binge*, no período da adolescência até início da fase adulta, uma vez que são escassos os estudos que avaliaram os efeitos destes dois neurotóxicos em associação, principalmente para os grupos vulneráveis como mulheres e adolescentes.

II OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos no comportamento motor relacionados ao núcleos da base, cerebelo e córtex motor, em ratas intoxicadas subcronicamente por MeHg na presença de EtOH (*binge*) na fase da adolescência até a fase adulta.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do MeHg, e na presença de EtOH, na locomoção espontânea, através do teste comportamental do Campo Aberto;
- Avaliar os efeitos do MeHg, e na presença de EtOH, na bradicinesia, através do teste comportamental Pole Teste;
- Avaliar os efeitos do MeHg, e na presença de EtOH, no equilíbrio motor, através do teste comportamental *Beam walking Test* (BWT).
- Avaliar os efeitos do MeHg, e na presença de EtOH, na locomoção forçada e equilíbrio motor, através do teste comportamental do Rotarod;

III MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Animais (CEPAE) da UFPA, sob o parecer BIO-CEPAE-UFPA: BIO 209-14 (anexo 1) e obedeceu aos critérios e as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais (COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, 2011).

Foram utilizadas 60 ratos fêmeas, da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará (UFPA), com peso médio de $96,18 \pm 7,10$ gramas, do 37º até 72º DPN, período que corresponde a adolescência e início da fase adulta em modelo animal, pois a janela de suscetibilidade da adolescência, em ratos, esteja por volta do 27º dia pós-natal ao 42º, podendo expandir-se ao 60º no caso de estudos com tratamentos farmacológicos, a fim de englobar tanto as maturações precoces em fêmeas, quanto as tardias em machos (SPEAR, 2000 e 2004; BAVA et al. 2010; DIZON e KHODAKHAH, 2011). Os animais foram pesados semanalmente (total de 5 semanas) para base de cálculo dos volumes das drogas a serem administradas durante o tratamento.

Os animais foram encaminhados à Faculdade de Farmácia/UFPA e mantidos em uma sala de manutenção em condições padronizadas de temperatura (25°C), exaustão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (claro das 7:00 às 19h), água e comida *ad libitum*.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento (LAFICO), da Faculdade de Farmácia, do Instituto de Ciências da Saúde da UFPA.

3.2 Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram divididos, de forma randomizada, em 4 grupos, de acordo com a substância administrada: Controle, MeHg, EtOH e MeHg + EtOH, sendo cada grupo composto por 15 animais e receberam tratamento do 37º ao 72º DPN (Figura 8). Cada grupo foi subdividido em caixas próprias contendo 5 animais para evitar estresse pelo isolamento.

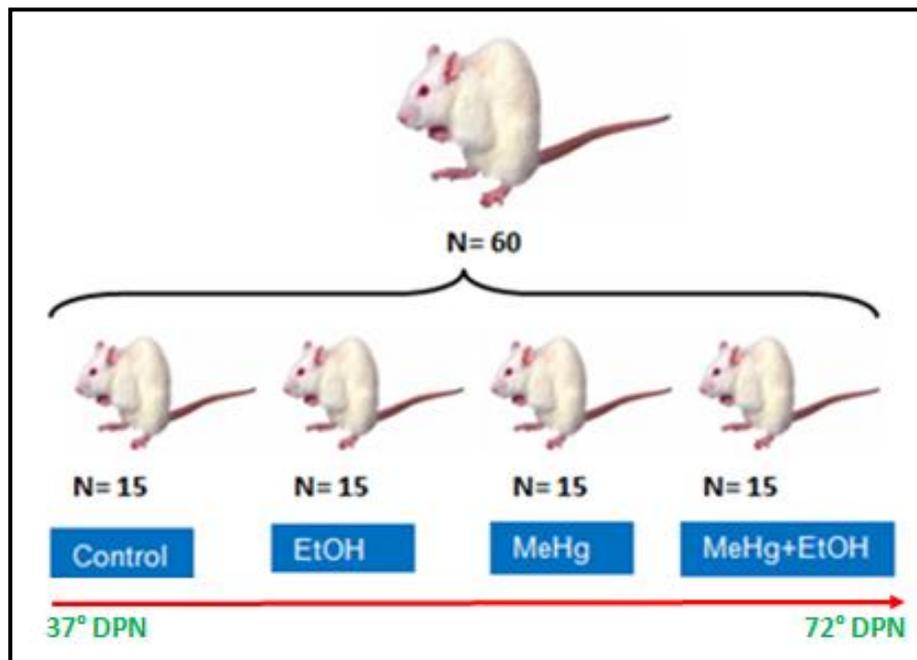


Figura 8: Divisão dos 4 grupos experimentais, Controle, etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e metilmercúrio na presença de etanol (MeHg+EtOH) de acordo com o tratamento utilizado no processo de gavagem, do 37º ao 72º dia de vida pós-natal.

3.3 Tratamento do grupo MeHg

Foi administrado MeHg na dose 0,04mg/kg/dia (dose inferior ao limite aceitável de 0,5mg/kg) às ratas, por via oral (gavagem), através de cânula orogástrica (Insight, Brasil), a fim de mimetizar a intoxicação diária que a população está exposta ao ingerir alimentos contaminados (KONG et al. 2013), durante 35 dias consecutivos (37º ao 72º DPN). Concomitantemente, os animais receberam água

destilada igual ao padrão *binge* (3 dias consecutivos com intervalo de 4 dias/semana) (Figura 9). Semanalmente, foi realizada pesagem dos animais para o reajuste do volume das substâncias a ser administradas.

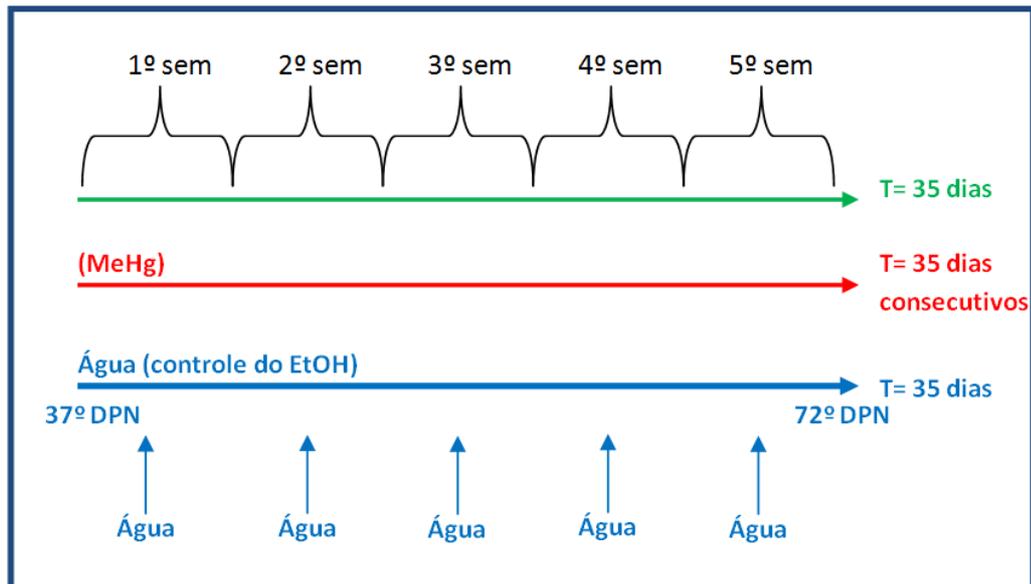


Figura 9: Tratamento do grupo metilmercúrio (MeHg) do 37º ao 72º (DPN), no qual a linha verde demonstra o período total de tratamento, a linha vermelha o tratamento com MeHg (0,04mg/kg/dia) e a linha azul a administração de água destilada, igual padrão *binge* (controle do EtOH), durante os 35 dias (totalizando 5 *binges*).

3.4 Tratamento do grupo EtOH

Foi administrado EtOH (20% P/V) às ratas, por via oral (gavagem), através de cânula orogástrica (Insight, Brasil), a dose 3g/kg/dia (LAUING et al. 2008; LINDTNER et al. 2013), conforme descrição do cálculo abaixo:

Cálculo da dose EtOH:

Dados:

- Densidade do EtOH: 0,79g/ml
- Pureza do EtOH: 99,5%

$$\begin{array}{l} 1) \quad 0,79 \text{ ----- } 99,5\% \\ \quad X \text{ ----- } 20\% \\ \quad X = 0,16\text{g/ml} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 2) \quad 0,16\text{g} \text{ ----- } 1\text{ml} \\ \quad 3\text{g} \text{ ----- } X \\ \quad X = 18,75 \text{ ml} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 3) \quad 18,75 \text{ ml (=3g)} \text{ ----- } 1000\text{g} \\ \quad X \text{ ----- } 100\text{g} \\ \quad X = 1,8\text{ml} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 4) \quad 100\text{g} \text{ ----- } 1,8\text{ml} \\ \quad P \text{ (g)} \text{ ----- } X \\ \quad X = 1,8 \times P / 100, \text{ onde } P = \text{peso do animal em gramas} \end{array}$$

A gavagem (do 37º ao 72º DPN) foi em padrão *binge* (durante três dias consecutivos com quatro de intervalo /semana), até completar 35 dias de intoxicação (totalizando 5 *binges*). Concomitantemente, foi administrado água destilada durante os 35 dias consecutivos para controle do MeHg (Figura 10). Semanalmente foi realizado pesagem dos animais para ajuste do volume da substância a ser administrado.

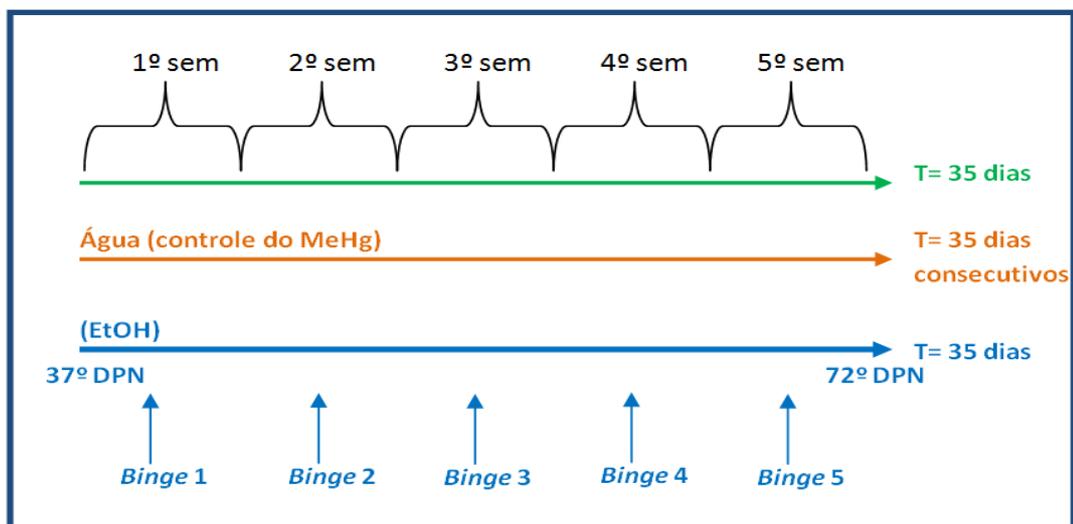


Figura 10: Tratamento do grupo etanol (EtOH), no qual a linha verde demonstra o período total de tratamento, a linha laranja a administração de água destilada durante os 35 dias consecutivos (controle do MeHg) e a linha azul, o tratamento com EtOH (3g/kg/dia), através de gavagem, em padrão *binge*, durante os 35 dias de tratamento, totalizando 5 *binges*.

3.5 Tratamento do grupo MeHg+EtOH

Foi administrado MeHg na dose 0,04mg/kg/dia às ratas, por via oral (gavagem), durante 35 dias consecutivos (37º ao 72º DPN) e concomitantemente, os animais também receberam, através de gavagem, 5 *binges* (3 dias consecutivos com intervalo de 4 dias/semana) de EtOH na dose de 3g/kg/dia (Figura 11). Semanalmente, foi realizado pesagem dos animais para o reajuste do volume das substância a serem administradas.

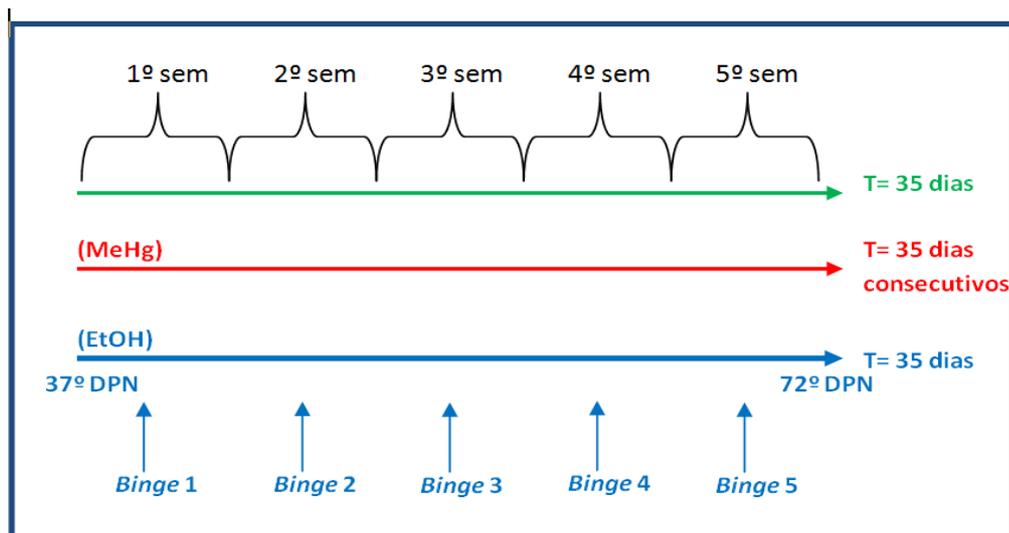


Figura 11: Tratamento do grupo metilmercúrio na presença de etanol (MeHg+EtOH), no qual a linha verde demonstrada o período total de tratamento, a linha vermelha a administração de MeHg (0,04mg/kg/dia) durante os 35 dias consecutivos e a linha azul, o tratamento com EtOH (3g/kg/dia), através de gavagem, em padrão *binge*, durante os 35 dias de tratamento, totalizando 5 *binges*.

3.6 Tratamento do grupo Controle

Foi administrado, por via oral (gavagem), água destilada para mimetizar a administração do MeHg durante 35 dias consecutivos (37^o ao 72^o DPN) e concomitante, os animais também receberam, por gavagem, outra dose de água destilada, igual ao padrão *binge* (3 dias consecutivos com intervalo de 4 dias/semana) para mimetizar a administração do EtOH (Figura 12). Semanalmente, foi realizada pesagem dos animais para o reajuste dos volumes de água destilada a serem administrados.

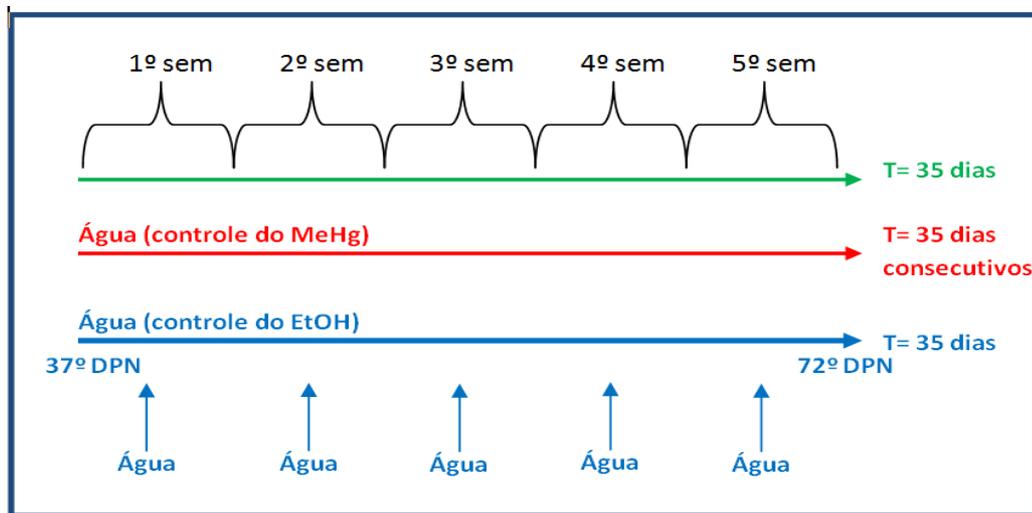


Figura 12: Tratamento do grupo Controle, no qual a linha verde demonstrada o período total de tratamento, a linha vermelha a administração de água destilada (controle do MeHg) durante os 35 dias consecutivos e a linha azul, a outra administração de água destilada (controle do EtOH), no padrão *binge*, durante os 35 dias de tratamento, totalizando 5 *binges*. .

3.7 Testes Comportamentais

Vinte e quatro horas após o último dia de tratamento dos grupos experimentais (72^oDPN), os animais foram encaminhados ao LAFICO para realização dos testes comportamentais. Todos os grupos foram mantidos na sala de experimento por um período de 1 hora para aclimação.

A sala era iluminada com lâmpadas fluorescentes e controlada quanto à temperatura (25°C), odores, ruídos e não excedendo o horário de 19 horas a fim de não interferir no ciclo circadiano do animal. Foi mantido o mesmo experimentador para cada teste comportamental, objetivando minimizar os impactos sobre os resultados destes e a sequência dos testes foram organizados a fim de minimizar o cansaço e estresse dos animais (BOHLEN et al. 2014).

3.7.1 Teste da Atividade em Campo Aberto (*Open-Field Test*)

O teste comportamental do Campo Aberto ou *Open-Field Test* foi desenvolvido para avaliar emocionalidade de animais (HALL, 1934), uma vez que um ambiente não habituado, com abertura superior e fechado lateralmente, induz ao animal o instinto e/ou comportamentos exploratórios, traduzido como locomoção, levantamento e farejamento, ou pode ser interpretado como instinto e/ou comportamentos aversivos, por meio de micções, defecações e o ato de ficar paralisado (NAHAS, 2001).

Atualmente é considerado como teste padrão para uma grande variedade de estudos, principalmente aqueles relacionados aos efeitos de uma droga sobre a atividade locomotora de roedores (MENARD e TREIT, 1999; CHOLERIS et al. 2001), pois é utilizado para avaliar a aprendizagem e atividade locomotora espontânea (AGUIAR, 1995), os quais podem ser medidos através dos parâmetros de distância total percorrida (exploração horizontal) pelo animal no aparato e o número de levantamentos exploratórios (exploração vertical) (BAHI, 2013; OLIVEIRA et al. 2014).

O aparato do Campo Aberto consiste em uma arena de madeira (100x100cm), com paredes de 40 cm de altura, pintado com material impermeabilizante, de cor escura e sem odores pós-secagem (Figura 13).



Figura 13: Figura do aparato do Campo Aberto, representada em uma arena de madeira (100x100cm), com parede de 40 cm de altura e pintado de cor escura. Além de mostrar a posição central que o animal é colocado para início do teste.

Neste experimento, cada animal foi colocado no centro da arena individualmente e foi permitido um tempo máximo de 5 minutos para livre locomoção e exploração do espaço. Para determinar o parâmetro de locomoção total, foi contabilizada a distância total percorrida para cada animal.

Outro parâmetro avaliado foi o número de levantamentos (*rearing*), que foi contabilizado pelo número de vezes em que o animal executava o comportamento de levantar-se, apoiado apenas pelas patas traseiras. Este teste foi filmado, analisado pelo *software* Anymaze que contabilizou os parâmetros supracitados e após seu término, os animais foram submetidos ao *Pole Test*.

3.7.2 TESTE DE DESCIDA EM VIGA VERTICAL (*POLE TEST*)

O *Pole Test* ou Teste de descida em viga vertical, foi descrito inicialmente por Owaga et al. (1985), é um experimento utilizado para avaliar distúrbios de movimento, em especial a bradicinesia (lentidão anormal dos movimentos voluntário) através do parâmetro de tempo de descida (MATSUURA et al. 1997; ANTZOULATOS et al. 2010).

De acordo com o protocolo adotado, este equipamento consiste em uma viga vertical áspera (2cm de largura x 50 cm de altura) apoiada em uma plataforma circular (1cm de espessura e raio = 25 cm), onde animais são colocados no topo da viga, de cabeça para cima, o objetivo é a virada da cabeça para baixo e descida até a plataforma (ANTZOULATOS et al. 2010) (Figura 14).

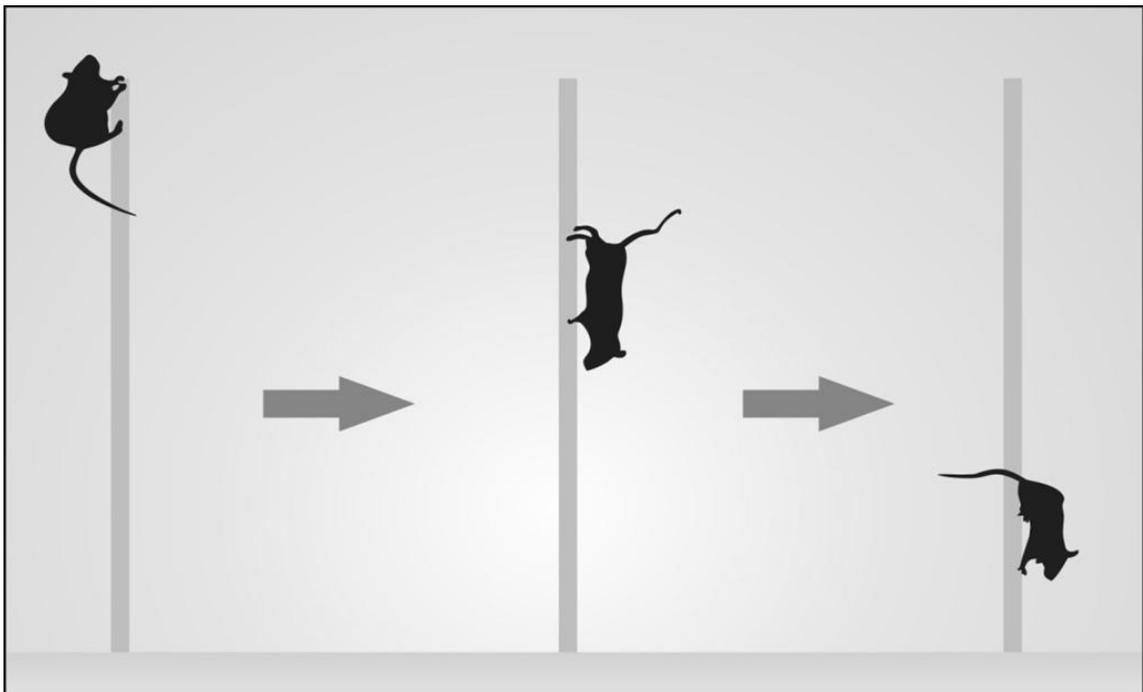


Figura 14: Figura esquemática da tarefa que foi realizada pelos grupos no *PoleTest*. A primeira haste (da esquerda para direita) ilustra como o animal foi posicionado sobre o aparelho. Na segunda haste observa-se a inversão do eixo e na terceira haste a descida até a plataforma do aparato.

O experimento foi realizado após aclimatação inicial de 300 segundos e os escores de tempo de descida foram anotados ao longo de 5 ensaios, limitados a 120 segundos cada, com intervalo de 60 segundos entre eles. O tempo em que os animais efetuaram corretamente a tarefa foi contabilizado. Os animais que não conseguiram virar, ou seja, deslizaram pela viga na mesma posição em que foram colocados no equipamento ou caíram, ainda que já tivessem virado a cabeça pra baixo, foi atribuído o tempo máximo (120s). A média foi calculada com os 3 melhores tempos de cada animal. Após esta avaliação, os animais seguiram para o *BWT*.

3.7.3 TESTE DE EQUILIBRIO EM VIGAS GRADUADAS (*BEAM WALKING TEST - BWT*)

O *Beam Walking Test (BWT)* foi desenvolvido, a princípio, para avaliar deficiências motoras em ratos e camundongos (GOLDSTEIN E DAVIS, 1990). Atualmente é utilizado para avaliar a coordenação motora e equilíbrio através da medição da capacidade dos animais em atravessar uma série de vigas graduada estreitas até alcançar uma plataforma segura (STANLEY et al. 2005; PERRY et al. 1995).

O *BWT* também avalia características atáxicas e distônicas através da dificuldade do animal em transpassar as vigas de diferentes formas e de áreas de secção transversal e a contabilização destas avaliações ocorre através dos paraâmetros de latência da travessia e número de escorregadas (CARTER et al. 1999; KARL et al. 2003 e STANLEY et al. 2005).

O aparato, construído em madeira, consistiu em 2 extremidades suspensas a 50 cm do chão, distanciadas por 1 metro. Em uma extremidade situa-se o início da viga, onde os animais foram colocados e na outra extremidade é uma plataforma segura, com caixa fechada (20x20cm), para qual os animais podem escapar. As vigas de madeira (1m de comprimento) apresentavam 2 tipos de secção transversal: quadrada (28, 12 e 5 mm) e circular (28, 17 e 11 mm), as quais foram posicionadas entre as duas extremidades para que o animal transpasse e cumprisse a tarefa (CARTER et al. 1999) (Figura 15).

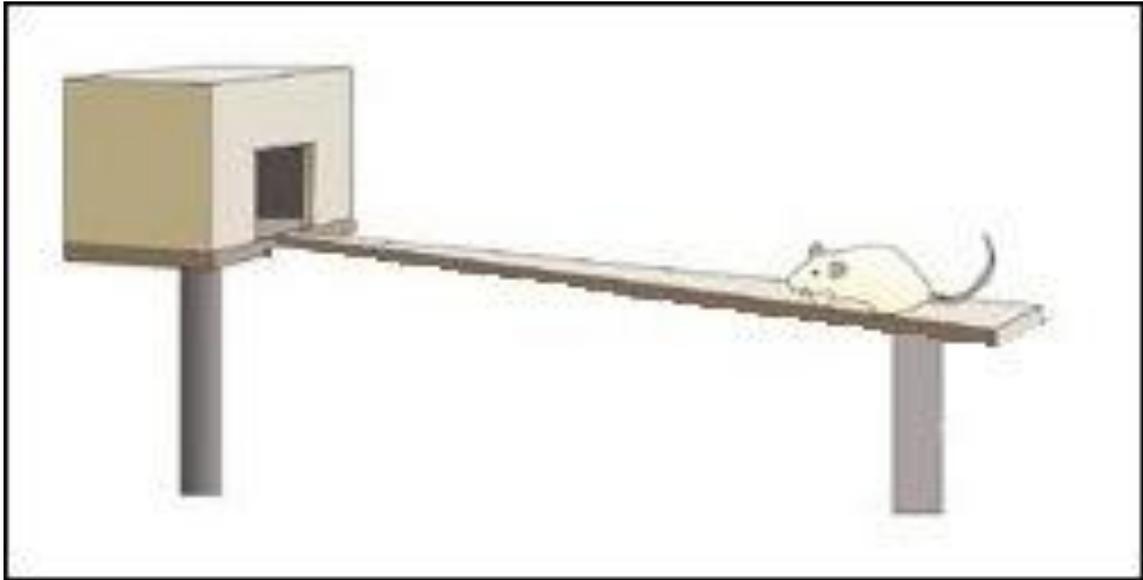


Figura 15: Desenho ilustrativo do aparato do *Beam Walking Test (BWT)*, demonstrando a extremidade de início (onde os animais são colocados para início do teste) e a plataforma segura (caixa fechada).

Os animais foram colocados sobre a viga, na extremidade de início, e tinham um tempo máximo de 60 segundos para atravessá-la e chegar à caixa segura. Este processo era repetido em cada espessura da viga (2 tentativas/espessura de viga), com intervalo de 60s entre elas. Utilizou-se primeiro as vigas quadradas e em seguida as circulares, sempre da vara de maior calibre para a menor. Para os animais que caíram do equipamento, a contagem foi interrompida e os mesmos foram recolocados na extremidade de início e continuou a contagem a partir do tempo marcado na queda, até que se completasse o tempo máximo de cada tentativa (60s).

Neste experimento foram contabilizadas a latência de travessia (tempo que o animal levou para atravessar a viga da extremidade de início até chegar na plataforma segura) de cada uma das vigas e o número de escorregadas, que foi contabilizada pelo número de vezes em que pelo menos uma das patas traseiras escorregava, sendo que o escorregão das duas patas traseiras, de uma só vez, foi contabilizado como 2 escorregadas. Após esta avaliação, os animais seguiram para o último teste comportamental, o teste do *Rotarod*.

3.7.4 TESTE DE LOMOCOÇÃO FORÇADA NA BARRA ROTATÓRIA (*ROTAROD TEST*)

O teste *Rotarod* ou da barra rotatória é um dos principais testes de abordagem para caracterização fenotípica motora em modelos animais de coordenação e equilíbrio, que são avaliados através do parâmetro de tempo de latência (BOCCA et al. 2012) e devido ao repetido número de exposições ao aparelho, mesmo que em velocidade constante, que este também reflete aprendizado motor, além de ser um ensaio adequado para avaliação de deficiências cerebelares (SHIOTSUKI et al. 2010 e LALONDE e STRAZIELLE, 2011)

O teste do *Rotarod* consiste em um aparelho, geralmente desenhado para ratos (BOCCA et al. 2012), automatizado (Insight, Brasil) com uma caixa de acrílico, que contém um cilindro de 8cm de diâmetro, instalado transversalmente à aproximadamente 20cm da base do equipamento, o qual é mantido em rotação através de um motor. A caixa é dividida em 4 baias de aproximadamente 10cm de largura, permitindo a análise de 4 animais simultaneamente (Figura 16).



Figura 16: Figura do equipamento automatizado do *Rotarod*, sendo observada a divisão em 4 baias, permitindo análise de 4 animais simultaneamente.

Fonte: Insight Brasil

Para o teste, cada animal foi colocado sobre a barra rotatória em movimento e mediu-se o tempo de latência (tempo que o animal se equilibrava e permanecia sobre a barra rotatória até cair). O equipamento possui um sistema instalado no solo de cada baia que detecta o impacto da queda, cessando automaticamente o cronômetro.

Segundo adaptação do protocolo de Sharma et al. (2009), os animais foram colocados sobre a barra rotatória, a uma velocidade constante de 16 rotações por minuto (RPM), durante 180 segundos. Os animais foram aclimatados na primeira exposição (treino) e avaliados ao longo de mais 3 exposições, com intervalo de 60 segundos entre elas e o tempo limite do teste foi de 180 segundos. O desempenho no *Rotarod* foi calculado, para cada grupo, em cima do traçado da média da latência até a primeira queda.

3.8 Delineamento Experimental

A figura 17 demonstra o esquema dos procedimentos adotados no presente estudo, delineado desde o tratamento dos quatro grupos experimentais até os ensaios comportamentais, bem como demonstra a sequência dos testes realizados, que teve início com a atividade locomotora espontânea (no Campo Aberto) e foi finalizada com o teste do *Rotarod*.

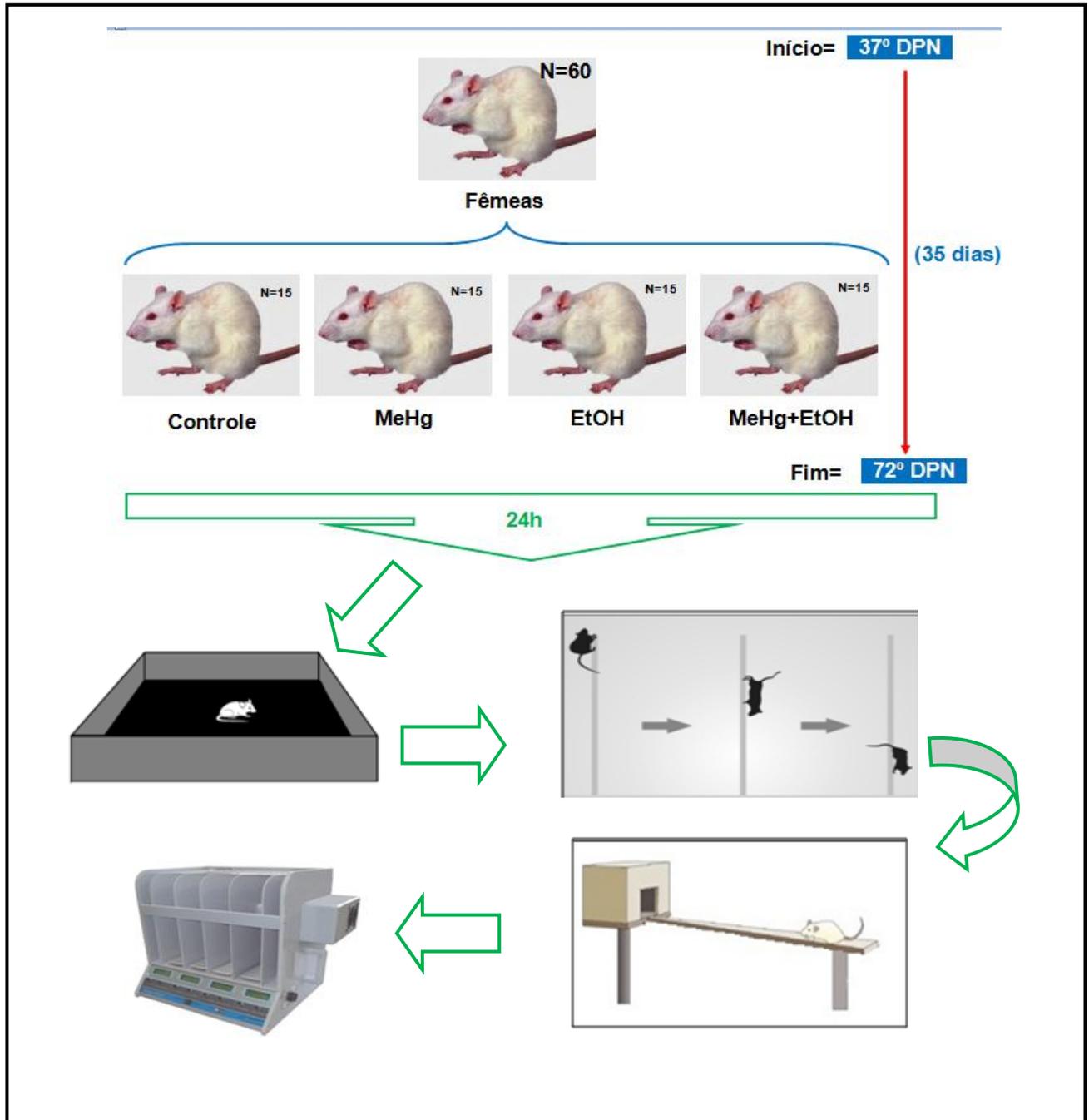


Figura 17: Delineamento experimental do estudo. Inicialmente, as ratas foram tratadas, por gavagem, com água destilada (Controle), metilmercúrio (MeHg), etanol (EtOH) e metilmercúrio com etanol (MeHg+EtOH), do 37° ao 72° DPN (35dias). Após 24h da última administração do tratamento para cada grupo experimental, as ratas foram submetidas aos testes comportamentais: Campo Aberto, Pole Teste, *Beam Walking Test* (BWT) e *Rotarod*, respectivamente.

3.9 Análise Estatística

Todos os dados obtidos dos testes comportamentais foram avaliados pelo teste estatístico Anova de uma via e Tukey como pós-teste para múltipla comparação. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 15 animais de cada grupo experimental. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de $p < 0,05$. A construção gráfica e a análise estatística foram realizadas no programa GraphPadPrism 5.0.

IV RESULTADOS

4.1 Média de Peso dos Animais/grupo

A figura 18 demonstra o peso médio dos grupos experimentais por semana de tratamento (35 dias), onde se observa a ausência de diferença entre todos os grupos.

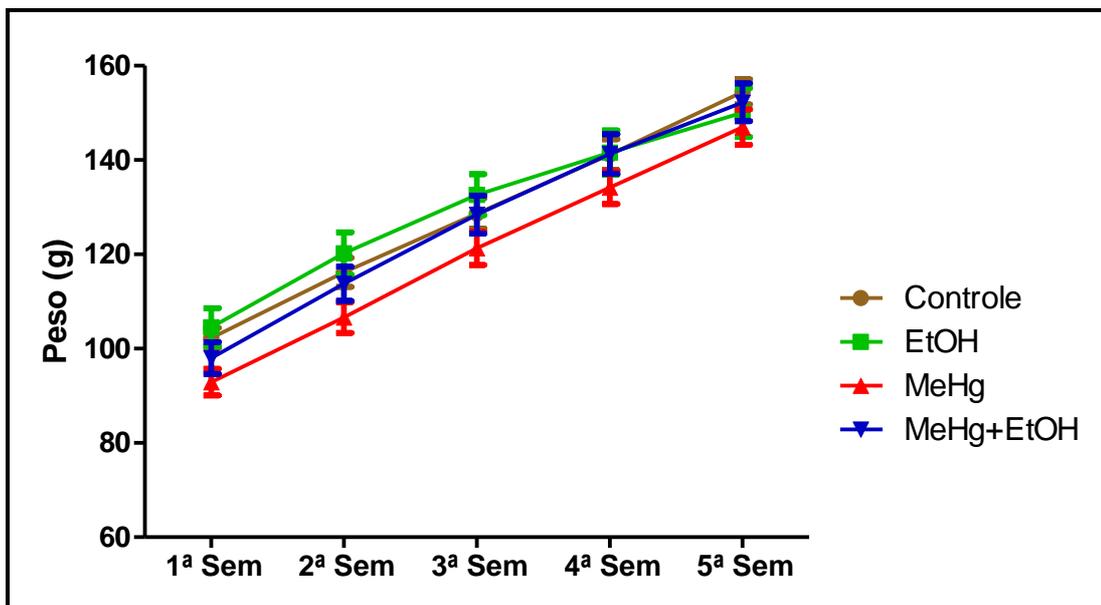


Figura 18: Média dos pesos dos grupos etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e metilmercúrio na presença de etanol (MeHg+EtOH) por semana de tratamento (35 dias). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m, com 15 animais por grupo. (Teste Anova de 1 via seguido de Tukey).

4.2 Teste da Atividade Locomotora Espontânea (Campo Aberto)

A figura 19 demonstra a diminuição da atividade locomotora espontânea, analisada através do parâmetro de distância total percorrida (m), pelo grupo tratado com MeHg, assim como MeHg na presença de EtOH (EtOH+MeHg), em comparação ao grupo controle.

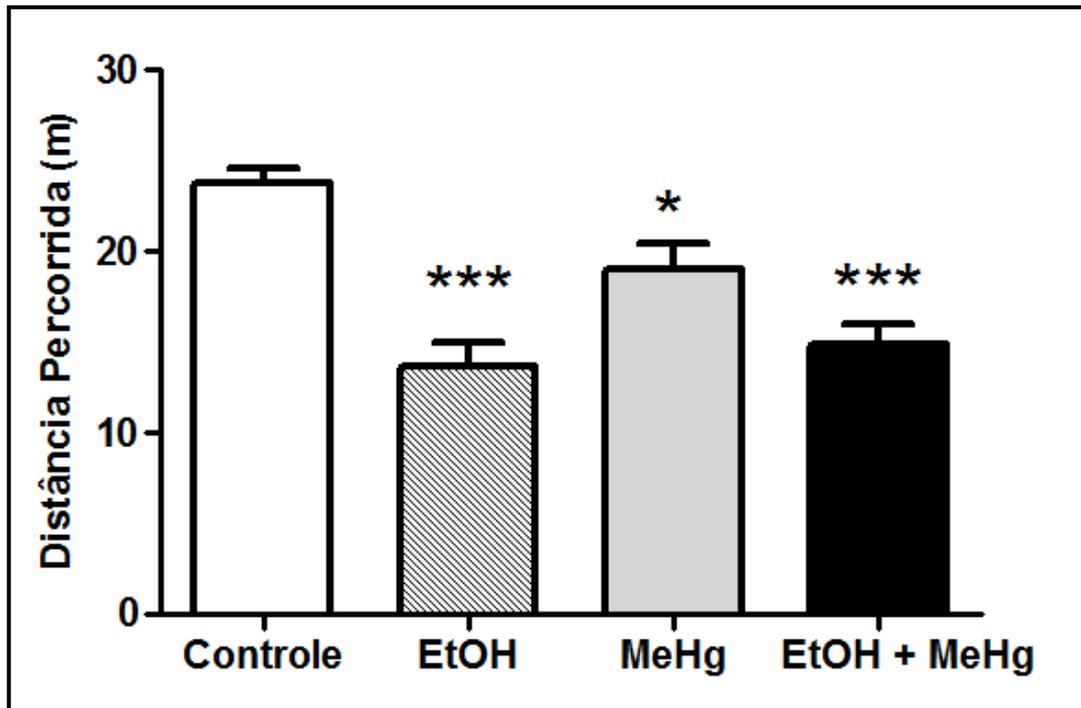


Figura 19: Efeito da intoxicação com etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e metilmercúrio na presença de etanol (MeHg+EtOH) na atividade locomotora espontânea de ratas adolescentes, através do parâmetro de distância total percorrida em metros. Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m da distância percorrida em metros, com 15 animais por grupo. * $p < 0,05$ representa a diferença em relação ao controle; *** $p < 0,01$ representa a diferença em relação ao controle (Teste Anova de 1 via seguido de Tukey).

A figura 20 ilustra o número total de levantamentos exploratórios (*rearings*), demonstrando também diminuição neste parâmetro de locomoção espontânea pelo grupo tratado com MeHg na presença de EtOH (MeHg+EtOH), bem como os grupos tratados com as drogas isoladas (EtOH e/ou MeHg) em relação ao controle. Além disso, o grupo EtOH+MeHg também demonstrou diminuição deste parâmetro em relação ao o grupo MeHg *per se* ($p < 0,0001$).

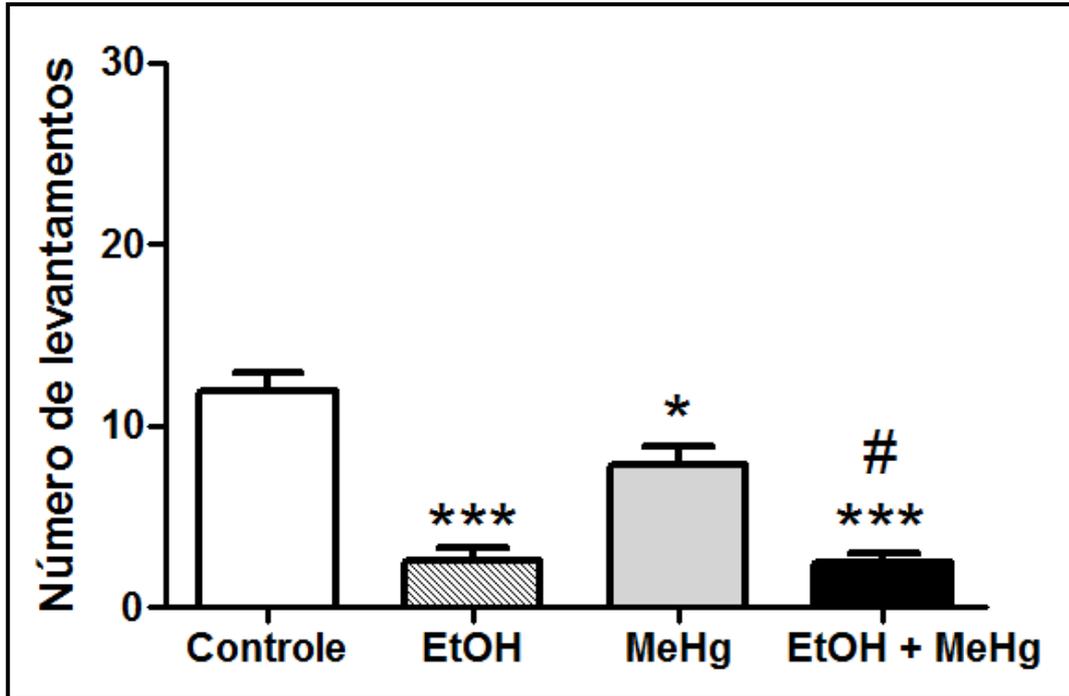


Figura 20: Efeito da intoxicação com etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e metilmercúrio na presença de etanol (MeHg+EtOH) na atividade locomotora espontânea, de ratas adolescentes, através do parâmetro número de levantamentos (*rearings*). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m do número de levantamentos, durante 300 segundos, com 15 animais por grupo. * $p < 0,05$ representa a diferença em relação ao controle; *** $p < 0,01$ representa a diferença em relação ao controle; # $p < 0,0001$ representa a diferença em relação ao grupo MeHg (Teste Anova de 1 via seguido de Tukey).

Portanto, todos os grupos avaliados demonstraram que, tanto distância percorrida (m), quanto para o número de levantamentos (exploração vertical), estavam diminuídos em todos os grupos testados, mostrando que os animais foram afetados pelos efeitos das drogas associadas (MeHg+EtOH) e isoladas (EtOH e/ou MeHg) para a atividade de locomoção espontânea.

4.3 Teste de Descida em Viga Vertical (*Pole Test*)

A figura 21 demonstra os resultados do tempo de descida, em segundos, na determinação do controle de movimento e avaliação de bradicinesia no Pole teste. Todos os grupos tratados apresentaram um aumento no tempo de realização do teste em relação ao grupo controle, a partir da média dos três melhores escores de cada animal.

No entanto, não se observa diferença de comportamento entre os grupos do MeHg na presença de EtOH (MeHg+EtOH) em relação aos grupos *per se* (EtOH e MeHg).

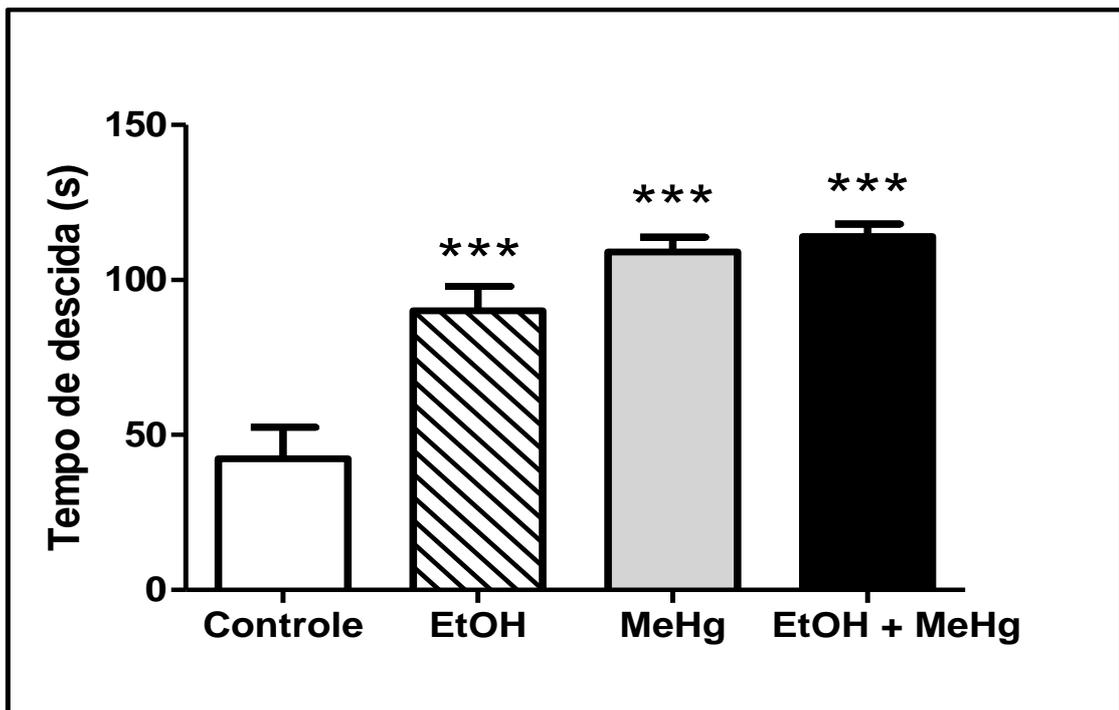


Figura 21: Efeito da intoxicação com etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e metilmercúrio associado ao etanol (MeHg+EtOH) no *Pole* Teste, através do parâmetro tempo de descida de ratas adolescentes. Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m dos 3 melhores ensaios do tempo de descida, com 15 animais por grupo. *** $p < 0,0001$ representa a diferença em relação ao controle (Teste Anova de 1 via seguido de Tukey).

4.4 Teste de Equilíbrio em Vigas Graduadas (BWT)

A figura 22 demonstra os resultados obtidos para as varas quadradas (BWT/Q),

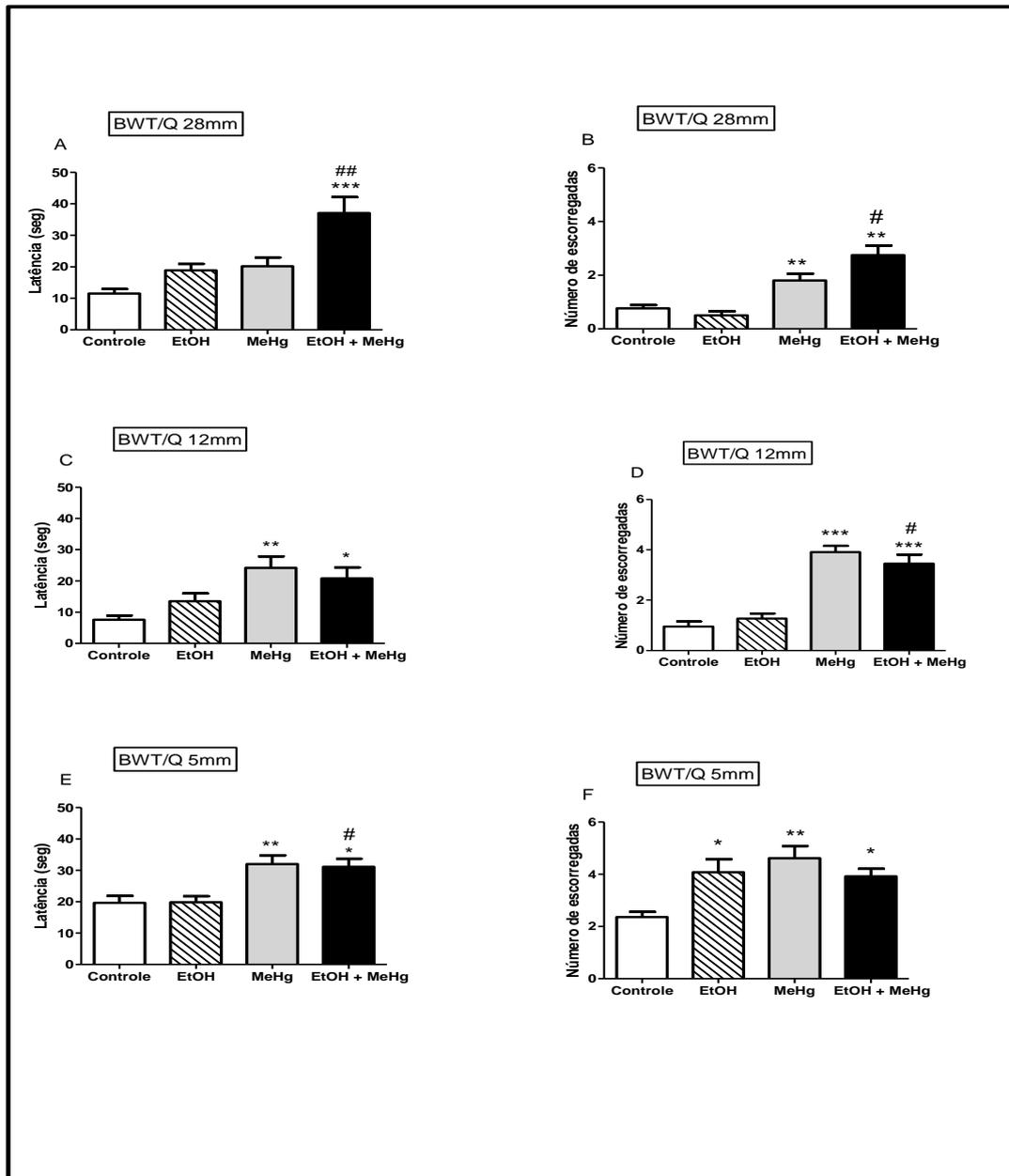


Figura 22: Efeito da intoxicação com etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e metilmercúrio associado ao EtOH (MeHg+EtOH) na coordenação motora de ratas adolescentes, através dos parâmetros de tempo de latência e número de escorregadas nas varas quadradas do teste *Beam Walking* (BWT) nos diâmetros de 28mm (painéis A e B), 12mm (painéis C e D) e 5mm (painéis E e F), durante no máximo 120 segundos, com 15 animais por grupo. Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m.,. * $p < 0,05$ representa a diferença em relação ao controle; ** $p < 0,01$ representa a diferença em relação ao controle; *** $p < 0,0001$ representa a diferença em relação ao controle; # $p < 0,0001$ representa a diferença em relação ao grupo EtOH; ## $p < 0,01$ representa a diferença em relação ao grupo MeHg e EtOH (Teste Anova de 1 via seguido de Tukey).

Nos painéis A e B, a performance nas vigas mais larga (28mm), C e D nas vigas de espessura média (12mm) e E e F nas vigas mais fina (5mm) para os dois parâmetros avaliados, latência (tempo que os animais necessitaram para caminhar sobre a viga da extremidade de início até alcançar a plataforma segura, em segundos), e número de escorregadas (da mais espessa para mais fina respectivamente).

No painel A (vigas de 28 mm) observou-se o aumento do tempo de latência somente pelo grupo da associação em relação ao controle ($p < 0,0001$). O painel B demonstrou que nesta viga houve aumento no número de escorregadas nos grupos MeHg e MeHg+EtOH, em relação ao controle ($p < 0,01$ para ambos). Além disso, o grupo MeHg+EtOH apresentou uma exarcebação do prejuízo motor na latência para executar o trabalho assim como no número de escorregadas em relação ao grupo EtOH ($p < 0,001$).

No painel C (vigas de 12 mm), observou-se o aumento do tempo de latência pelos grupos MeHg e MeHg+EtOH em relação ao controle ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). No parâmetro número de escorregadas nesta viga, o painel D demonstrou que houve aumento deste parâmetro nos mesmos grupos (MeHg e MeHg+EtOH) em relação ao controle ($p < 0,001$ para ambos). Novamente nesta viga, houve um aumento do número de escorregadas do grupo MeHg+EtOH em relação ao grupo EtOH ($p < 0,001$).

No painel E (vigas de 5 mm), observou-se novamente o aumento do tempo de latência para execução da tarefa nos mesmos grupos da viga anterior (MeHg e MeHg+EtOH) em relação ao controle ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente) e aumento no tempo de latência para execução do teste no grupo MeHg+EtOH em relação ao EtOH ($p < 0,05$). O painel F demonstrou que o aumento no número de escorregadas se manteve nos mesmos grupos do painel B e D (MeHg e MeHg+EtOH) em relação ao controle ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente), além do surgimento de diferença para o grupo EtOH em relação ao controle ($p < 0,05$). Portanto, foi demonstrado que o efeito apresentado pelo grupo MeHg+EtOH é semelhante ao apresentado pelo grupo MeHg, isto fica mais evidente no parâmetro de número de escorregadas nos painéis

B e D e para latência nos painéis A e E, os quais demonstram diferença entre os grupos MeHg+EtOH e EtOH.

A figura 23 demonstra os resultados obtidos para as varas circulares (BWT/C).

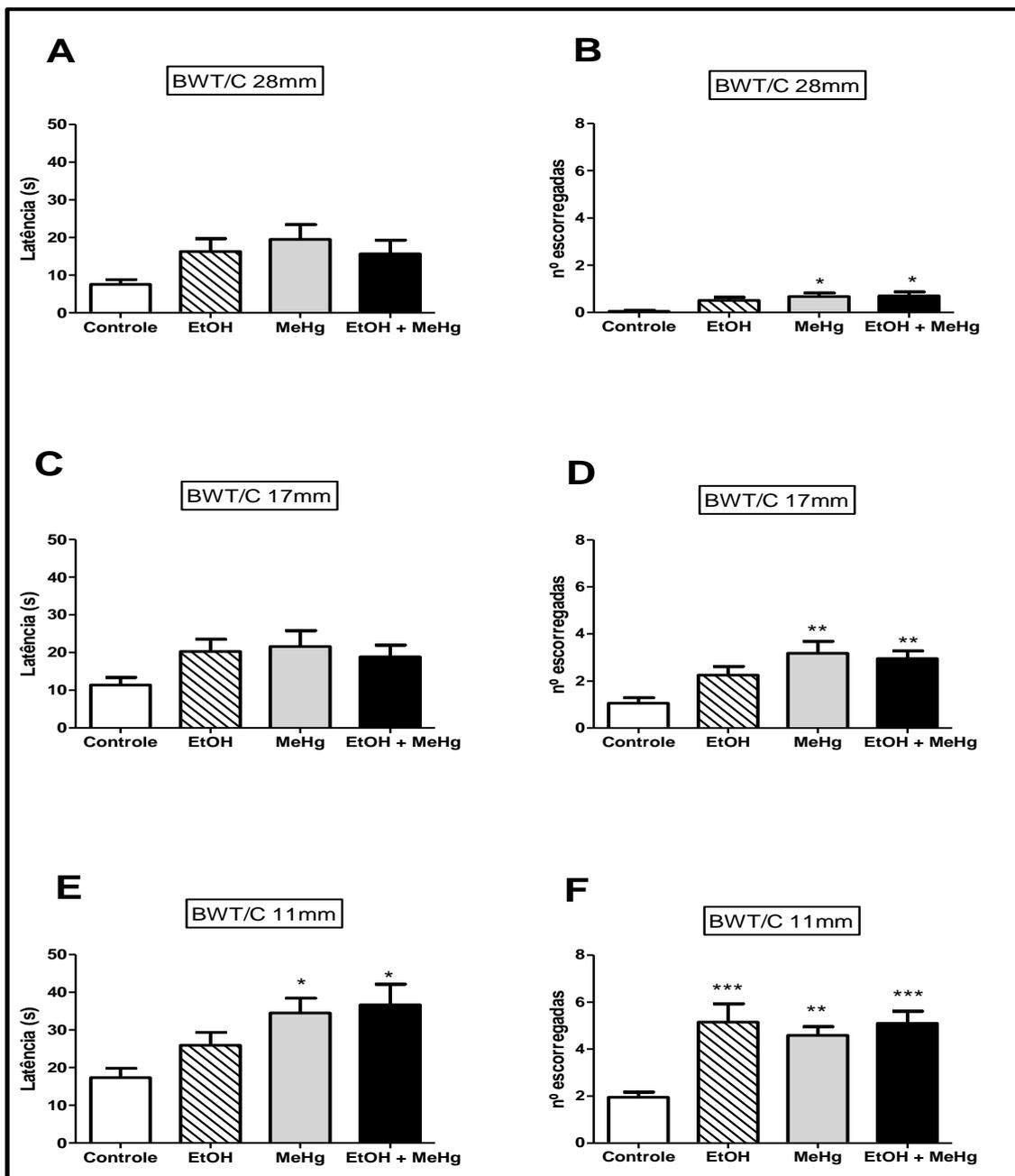


Figura 23: Efeito da intoxicação com etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e metilmercúrio associado ao EtOH (MeHg+EtOH) na coordenação motora de ratas adolescentes, através dos parâmetros de tempo de latência e número de escorregadas, nas varas circulares, do teste *Beam Walking* (BWT), nos diâmetros de 28mm (painéis A e B), 17mm (painéis C e D) e 11mm (painéis E e F), durante no máximo 120 segundos, com 15 animais por grupo. Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ representa a diferença em relação ao controle; ** $p < 0,01$ representa a diferença em relação ao controle; *** $p < 0,0001$ representa a diferença em relação ao controle (Teste Anova de 1 via seguido de Tukey).

Os painéis A e B representam as vigas mais larga (28mm), C e D as vigas de espessura média (17mm) e E e F as vigas mais fina (11mm) para os dois parâmetros avaliados, latência e número de escorregadas, respetivamente.

No painel A (viga de 28mm), observou-se a ausência de diferença para o tempo de latência por todos os grupo tratados (EtOH, MeHg e MeHg+EtOH) em relação ao controle, porém o painel B demonstra o aumento no número de escorregadas nos grupos MeHg e MeHg+EtOH em relação ao controle ($p>0,05$ e $p>0,05$, respectivamente).

No painel C (viga de 17mm), também não foi observada diferença para o tempo de latência entre todos grupos tratados e o controle. No entanto, o painel D demonstrou o aumento no número de escorregadas nos mesmos grupos do painel B (MeHg e MeHg+EtOH) em relação ao controle ($p<0,01$ e $p<0,01$, respectivamente).

No painel E (viga de 11mm), observou-se o aumento do tempo de latência pelos grupos MeHg e MeHg+EtOH em relação ao controle ($p<0,05$ e $p<0,05$, respectivamente). O painel F demonstra novamente o aumento no número de escorregadas pelos mesmos grupos do painel B e D (MeHg e MeHg+EtOH) em relação ao controle ($p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente), além do surgimento de diferença para o grupo EtOH em relação ao controle ($p<0,001$).

4.5 Teste da Locomoção Forçada em Barra Rotatória (*Rotarod Test*)

A figura 24 apresenta os resultados do tempo de latência dos animais sobre o rotarod.

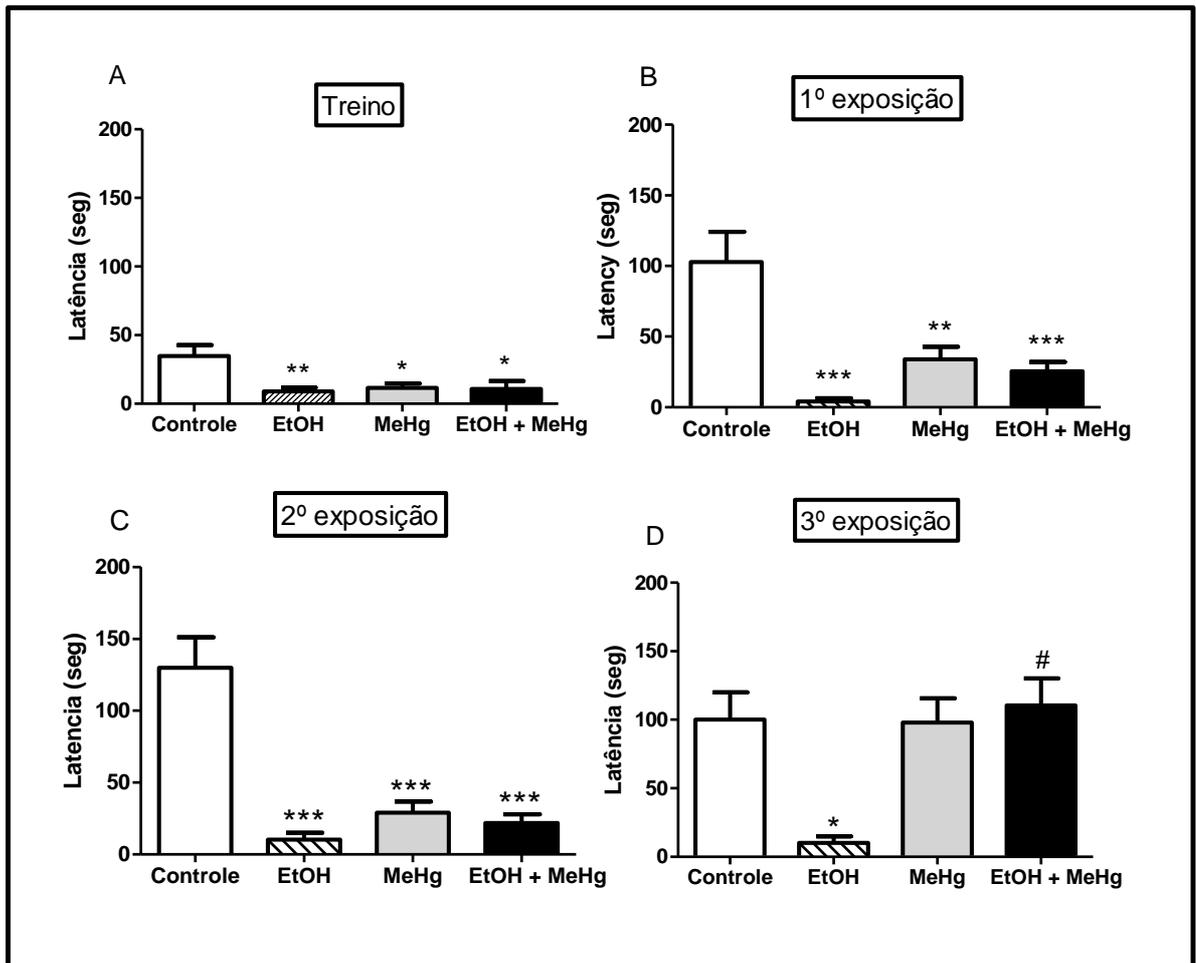


Figura 24: Efeito da intoxicação com etanol (EtOH), metilmercúrio (MeHg) e metilmercúrio associado ao etanol (MeHg+EtOH) na coordenação motora de ratas adolescentes, através do parâmetro do tempo de latência, no Rotarod, nas sessões de treino (painel A), 1ª exposição (painel B), 2ª exposição (painel C) e 3ª exposição (painel D). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m, em 4 seções, durante 180 segundos, a uma velocidade constante de 16rpm, com 15 animais por grupo. * $p < 0,05$ representa a diferença em relação ao controle; ** $p < 0,01$ representa a diferença em relação ao controle; *** $p < 0,0001$ representa a diferença em relação ao controle; # $p < 0,0001$ representa a diferença em relação ao grupo EtOH (Teste Anova de 1 via seguido de Tukey).

No painel A representa a fase treino, onde se observou que todos grupos tratados permaneceram menos tempo na barra rotatória em relação ao grupo controle [(EtOH = $p < 0,01$), (MeHg = $p < 0,05$) e (MeHg+EtOH = $p < 0,05$)].

No painel B (1ª exposição), observou-se o mesmo perfil do painel A, ou seja, todos grupos tratados permaneceram menos tempo na barra rotatória em relação ao grupo controle [(EtOH = $p < 0,0001$), (MeHg = $p < 0,01$) e (MeHg+EtOH = $p < 0,0001$)]

e foi o mesmo comportamento observado na 2^o exposição (painel C), 60 segundos depois.

No entanto, no painel D (3^o e última exposição) observou-se que somente o grupo EtOH ($p < 0,05$) manteve o comportamento de permanecer menos tempo na barra rotatória em relação ao grupo controle, pois houve uma melhora no desempenho dos grupos MeHg e MeHg+EtOH, aproximando-se aos tempos do grupo controle. Também foi observado diferença no grupo MeHg+EtOH em relação ao grupo EtOH ($p < 0,01$).

V DISCUSSÃO

Nesta investigação, os resultados obtidos demonstraram que a exposição em doses abaixo do limite aceitáveis de MeHg per se, assim como na presença de EtOH (MeHg+EtOH), em ratas, no período da adolescência até início da fase adulta, foi capaz de produzir alterações comportamentais referentes à coordenação motora, equilíbrio, bem como na atividade locomotora espontânea e forçada.

Na Amazônia, é bastante comum a presença de garimpos, onde a comunidade no entorno, que tem sua dieta a base de peixe, estão expostas ao consumo crônico destes alimentos contaminados por MeHg. Este fato é bastante evidente em virtude da prática da mineração de Au artesanal e em pequena escala nestas regiões (DIAZ, 2000; PINHEIRO et al. 2008; MALM, 1998; VIEIRA et al. 2015).

No garimpo, o Hg é usado na mineração para extrair o Au através da formação de amálgama, que é aquecida, liberando vapores de Hg e deixando o Au (AMAP/ UNEP, 2013). Os vapores de Hg, que estão livres no ambiente, ficam disponíveis para realizar o seu ciclo, pois se instalam no solo, sedimentos de lagos, rios, baías e oceanos e é transformado principalmente por organismos anaeróbicos em MeHg, que é ingerido pelos peixes, os quais são contaminados e bioacumulados (DIAZ, 2000 e GOLDMAN e SHANNON, 2001).

A contaminação da comunidade garimpeira é evidente, pois 15% das mulheres jovens e adolescentes (idade 13- 29 anos), que vivem nestas regiões, apresentaram taxas de concentração mercurial acima do recomendado pela OMS (PINHEIRO, 2008). Aliado a isto, há um alto consumo de bebidas alcoólicas nestas áreas (CORBETT et al. 2007).

O consumo de EtOH, nas vilas de garimpo, ocorre para aliviar as condições de trabalho ou de forma recreativa objetivando o lazer, principalmente aos finais de semana (SANTOS e CATRAVECHI, 2014), numa forma de consumo que se caracteriza pela ingestão de altas doses de EtOH, por um curto período de tempo, seguido de abstinência, que consiste em um padrão de consumo em *binge* (CREGO et al. 2010; PETIT et al. 2013; JACOBUS e TAPERT, 2013).

Porém, os efeitos deste padrão de consumo, em decorrência da abstinência, são mais severos com o uso crônico e é o padrão mais comum entre as mulheres, principalmente as adolescentes (LARANJEIRA, 2014).

Foi este cenário, de exposição em baixas concentrações de MeHg associado ao abuso de bebidas alcoólicas, em especial para o público das mulheres

adolescentes, que demonstrou a necessidade de entender os efeitos proveniente dessa exposição conjunta (MeHg+EtOH), assim como doses de MeHg consideradas aceitáveis sobre o SNC, principalmente na locomoção espontânea, coordenação motora, equilíbrio e locomoção forçada.

A fim de mimetizar os grupos mais vulneráveis (mulheres adolescentes) para a exposição dos toxicantes, utilizou-se ratas, no período de 37^o ao 72^o DPN, pois a janela de suscetibilidade da adolescência, em ratos, esta por volta do 27^o ao 42^o DPN, podendo expandir-se ao 60^o no caso de estudos com tratamentos farmacológicos (SPEAR, 2000; BAVA et al. 2010, DIZON e KHODAKHAH, 2011).

Durante o período supra citado, todas as ratas receberam os tratamentos, por via oral (gavagem), durante 35 dias, com MeHg na dose 0,04mg/kg/dia, padrão que mimetiza a exposição diária que a população garimpeira está exposta através de peixes contaminados (KONG et al. 2013), em dias consecutivos e com EtOH (3g/kg/dia), dose utilizada pelo nosso grupo e que foi baseada em estudos anteriores (LAUING et al. 2008; LINDTNER et al. 2013), em padrão *binge* (durante três dias consecutivos com intervalo de quatro dias/semana), totalizando 5 *binges*.

Após 24h da última intoxicação dos grupos experimentais (72^o DPN), os animais foram submetidos aos testes comportamentais, que consiste em um tempo hábil para abstinência do EtOH em ratos, pois devido sua farmacocinética, há um declínio gradual após a administração, chegando a zero após 450 minutos (7,5h) (LIVY et al. 2003).

Devido o teste do Campo Aberto ser considerado um teste padrão para uma grande variedade de estudos, principalmente aqueles relacionados aos efeitos de uma droga sobre a atividade locomotora espontânea de roedores (MENARD e TREIT, 1999; CHOLERIS et al. 2001), ele é utilizado para detectar danos na área cortical, uma vez que, sua ativação é o primeiro passo necessário para inicialização de um movimento espontâneo o qual faz parte o CM (ADKINS et al. 2006; SHENOY et al. 2013).

Os resultados obtidos neste teste, para os dois parâmetros: distância total percorrida e n^o de levantamentos, demonstraram que a exposição ao MeHg na presença de EtOH (MeHg+EtOH), prejudicou a locomoção espontânea em ratas

adolescentes. No entanto, este prejuízo não foi maior daqueles demonstrados pelas ratas tratadas pelos neurotóxicos de forma isolada (MeHg e EtOH) para o parâmetro de distância total percorrida. Porém, para o parâmetro de número de levantamentos, o efeito do grupo MeHg+EtOH foi maior do que o apresentado pelo grupo exposto somente ao MeHg e ainda apresentou efeito semelhante ao do grupo tratado somente com EtOH.

A diminuição da locomoção espontânea para a ratas intoxicadas com MeHg+EtOH, através dos 2 parâmetros analisados (distância total percorrida e número de levantamentos) pode ser explicada devido a neurotoxicidade promovida por ambos os tóxicos MeHg e EtOH de forma isolada. Porém, deve-se salientar que foi observado exacerbação dos efeitos prejudiciais dos dois neurotóxicos quando administrados conjuntamente, uma vez que, neste caso, a concentração mercurial encontra-se diminuída tanto no sangue quanto no pêlo dos animais (GRANDJEAN e WEIHE, 2003; MAIA et al. 2009 e FILHO, 2015) e mesmo assim foi capaz de gerar danos semelhantes ao MeHg *per se*.

O MeHg promove distúrbios neurológicos e comportamentais, tais como efeitos neuromusculares e disfunção motora, devido a capacidade deste metal de ser absorvido quase em sua totalidade (cerca de 95%), após a ingestão de peixes contaminados, além de seus efeitos tóxicos estenderem aos outros tecidos em apenas quatro dias (COUNTER, 2004; BUCHANAN, 2004; GRANDJEAN, 2007, OMS, 2014). A ataxia, a paralisia cerebral, restrição do campo visual e deficiência auditiva os principais efeitos neurotóxicos já relatados por intoxicação por este metal (BERNHOF, 2012; CRESPO-LOPEZ et al. 2009; ETO et al. 2002; GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2014).

Estes achados corroboram com o estudo que avaliou os efeitos da exposição crônica de MeHg durante o período pré-natal através de testes comportamentais, realizados em animais recém desmamados (8 semanas de vida) demonstraram uma tendência de menor desempenho no teste do Campo Aberto, (LIANG et al. 2009). Bellum et al. (2007), demonstraram que em curto prazo, a exposição de baixas doses à moderada (1 a 5mg/kg) de MeHg, em ratos adultos jovens, apresentaram prejuízo na coordenação motora e equilíbrio, através da diminuição da distância total percorrida (exploração horizontal) no teste do Campo Aberto.

Dentre as consequências provenientes da intoxicação por MeHg no córtex cerebral, há as alterações mitocondriais nesta estrutura, tais como o alargamento na morfologia e diminuição em até 60% destas organelas (GLASER et al. 2014 e BIAMONTE et al. 2014), resultando em uma diminuição da neuroproteção ocasionada pelo comprometimento da atividade mitocondrial (KUMARI et al. 2012 e MENDELEV et al. 2012). Isto explica os achados pelo estudo de Onishchenko et al. (2007) que ao investigarem os efeitos de longo prazo em ratos jovens que foram expostos ao MeHg (0,5mg/kg/dia) no período pré-natal, através de testes comportamentais, detectaram que embora função motora estivesse normal, houve uma diminuição da atividade exploratória.

Aliado aos efeitos neurotóxicos de MeHg, há os decorrentes ao consumo crônico do EtOH, que afetam diversas populações celulares do SNC, em especial neurônios, expressando seus efeitos deletéricos (GEORGE E FIGUEREDO, 2010; CEDERBAUM et al. 2009) e nos adolescentes, as alterações provocadas por esse consumo, no SNC são maiores, pois o cérebro desta população é mais sensível aos seus efeitos neurotóxicos, em *binge*, que o cérebro adulto (PETIT et al. 2013),

Esta maior sensibilidade é decorrente do cérebro, nesta fase, ainda estar passando por neuromaturação, sendo possível que o consumo de EtOH (em *binge*) pode alterar o seu funcionamento, por mais que haja a abstenção até a idade adulta (GUERRI e PASCUAL, 2010). Além disso, os efeitos neurotóxicos dessa forma de consumo são especialmente perigosos devido às altas doses ingeridas seguidas de abstinência, sendo mais rápidos e mais severos os danos que o consumo crônico em baixas doses (SKALA e WALTER, 2013).

Esta gravidade dos efeitos ocorre devido à retirada abrupta no consumo excessivo, que altera a integridade neuronal de regiões cerebrais vulneráveis como cerebelo e córtex (JUNG e METZGER, 2010) e que se expressam através dos efeitos comportamentais, tais como: sedativo-hipnótico e prejuízos na função motora (FEHR et al. 2006; KUMAR et al. 2009; HEILIG, 2011). O estudo de Bahi (2013), realizado com camundongos, demonstrou que animais com consumo pesado de EtOH apresentam uma menor locomoção no teste do Campo Aberto, em comparação aos animais que não consumiram ou que foram expostos em baixa quantidade. Da mesma forma, Teixeira et al. (2014) demonstraram uma redução significativa deste parâmetro no teste do Campo Aberto, após intoxicação crônica (55 dias) de ratos adolescentes (35º ao 90º DPN) por EtOH (6,5g/kg/dia).

Diante do exposto, houve a confirmação de nossa hipótese de que a associação dos dois neurotóxicos poderiam agravar o dano na exploração espontânea de animais, considerando que ambos compartilham este efeito deletério e que mesmo em menor concentração mercurial, tanto no sangue quanto no pêlo dos animais, decorrente desta associação (GRANDJEAN e WEIHE, 2003; MAIA et al. 2009 e FILHO, 2015) houve a observação do dano.

Em relação ao número de levantamentos no Campo Aberto, houve diminuição do número de levantamentos (exploração vertical) pelo grupo MeHg+EtOH, igualmente aos grupos *per se* de intoxicação. De fato, baixas doses de MeHg foi capaz de diminuir este parâmetro e este dano foi maior quando há associação, que se comportou de forma similar ao grupo tratado somente com EtOH e isto fica mais evidente quando se observa a diferença entre os grupos MeHg+EtOH e o MeHg.

Corroborando com os estudos de Xu et al. (2012) que demonstraram a neurotoxicidade atenuada de MeHg (4 e 12 $\mu\text{mol/kg}$ i.p.) na presença de antagonistas N-metil D-Aspartato (NMDA), neste caso sendo representado pelo EtOH em córtex cerebral de ratos (CORSO et al. 1998).

Aliada a isto, este achado, também corrobora com o estudo de Ohmiya e Nakai, (1977), que avaliaram os efeitos do MeHg (10mg/kg i.p.) sobre o metabolismo do EtOH (0,4g/kg i.v.) e demonstraram a capacidade que o MeHg tem de se ligar, de forma inespecífica, aos grupamentos tióis (-SH) da enzima álcool desidrogenase, ocasionando uma diminuição no metabolismo do EtOH, logo pode resultar em aumento dos seus efeitos neurotóxicos.

Dentre os efeitos neurotóxicos decorrentes do consumo do EtOH, há os efeitos danosos da abstinência, pois sua retirada abrupta no consumo excessivo altera a integridade neuronal de regiões cerebrais vulneráveis, tais como córtex (JUNG e METZGER, 2010), estrutura que se destaca por estar relacionada a função motora (GRAFTON e HAMILTON, 2007).

Pascual et al. (2007) demonstraram que a exposição ao EtOH, durante o período da adolescência pode resultar em alterações motoras na idade adulta, pois ratos Wistar jovens expostos a um protocolo de EtOH (3g/Kg), em *binge* intermitente, tiveram alguns déficits de longo prazo na função motora.

O Pole Teste é um teste comportamental utilizado para avaliar distúrbios de movimento, em especial a bradicinesia (lentidão anormal dos movimentos voluntário) e redução do tônus muscular, que foi avaliado através da capacidade do animal inverter seu eixo e descer até a plataforma (MATSUURA et al. 1997; KARL et al. 2003 e ANTZOULATOS et al. 2010).

Para uma adequada execução do Pole Test é necessário uma homeostase do núcleos da base (OGAWA et al. 1985), pois estas estruturas cerebral participam da alça motora, as quais são responsável pela correção, adequação e aperfeiçoamento dos movimentos (DELONG e WICHMANN, 2007; HANDLEY et al. 2009). Nos casos da bradicinesia, há uma seleção inapropriada no comando do movimento dos núcleos da base, bem como desequilíbrio nesta estrutura (BERARDELLI et al. 2001; AOSAKI et al. 2010).

A avaliação da bradicinesia ocorreu pelo tempo de descida do animal até a base da plataforma (ANTZOULATOS et al. 2010) que, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, foi demonstrado um tempo maior para realização da prova pelo grupo tratado com MeHg+EtOH, bem como pelos grupos tratados com as drogas isoladas MeHg e EtOH, demonstrando a presença de prejuízo motor por todos os grupos.

No entanto, deve-se enfatizar o agravamento para o grupo tratado com a associação dos dois neurotóxicos (MeHg+EtOH) em relação ao grupo MeHg *per se*, uma vez que, quando associado há a diminuição da concentração mercurial tanto no sangue quanto no pêlo dos animais (GRANDJEAN e WEIHE, 2003; MAIA et al. 2009 e FILHO, 2015) e mesmo assim foi capaz de gerar danos.

Este resultado do Pole Test pode ser explicado devido à bradicinesia e diminuição do tônus muscular, que são também efeitos encontrados em processos degenerativos no SNC (FREDERICKS, 1996; PHILLIPS et al. 2009), bem como alterações da circuitaria e comunicação das áreas motoras (ROZAS, 1997; STANLEY et al. 2005; BASTIAN, 2011; RAMEZANI, 2011; ROGERS et al. 2012) que podem ser consequências da exposição ao MeHg (AUGER et al. 2005; ROEGGE e SCHANTZ, 2006) e do EtOH (CEDERBAUM et al. 2009; JUNG e METZGER, 2010).

Bellum et al. (2007) demonstraram os efeitos em curto prazo, da exposição de baixas doses à moderada (1 a 5mg/kg) de MeHg, em ratos adultos jovens, os quais também apresentaram um aumento do tempo de descida no Pole Teste. Estes déficits motores estavam acompanhados de alterações na homeostase dos núcleos da base (BASU et al 2006). Aliado a isto, está bem estabelecido que a intoxicação crônica por EtOH desencadeia uma diminuição do tônus muscular e tremor intencional correlacionado com danos no estriado, que compõe os núcleos da base (FADDA e ROSSETTI, 1998; LORENZ e DELSCHL, 2007; MAIA et al. 2009; LOUIS et al. 2011).

Após o Pole Test foi realizado o BWT, que avalia coordenação motora e o equilíbrio dos animais experimentais, bem como avalia as características atáxicas e distônicas através da dificuldade do animal em transpassar as vigas de diferentes formas (quadradas e circulares) e de diferentes áreas de secção transversal (da maior para o menor calibre) (KARL et al. 2003). Esta avaliação ocorreu pela medição dos parâmetros de latência (tempo, em segundos, que o animal leva para alcançar a plataforma segura) e do número de escorregada durante o caminho percorrido nas vigas graduadas (STANLEY et al. 2005; PERRY et al. 1995).

Os resultados dos grupos experimentais no BWT demonstraram prejuízo motor para as ratas intoxicadas por MeHg na presença de EtOH (MeHg+EtOH) em relação ao grupo controle, nos 2 parâmetros avaliados, ou seja, apresentaram aumento tanto da latência quanto do aumento no número de escorregadas. A primeira exposição deste grupo da associação demonstrou ainda exacerbação do prejuízo motor pela administração dos dois neurotóxicos, visto que este grupo aumentou a latência para execução da tarefa também em relação dos grupos *per se*.

Pode-se inferir também que houve sinergismo, uma vez que, na associação há uma diminuição da concentração mercurial, tanto no sangue quanto no pêlo dos animais (GRANDJEAN e WEIHE, 2003; MAIA et al. 2009 e FILHO, 2015) e ainda sim, foi capaz de gerar danos motores.

Esta tarefa necessita de equilíbrio e coordenação motora adequada para percorrer as vigas de secções transversais, principalmente as mais estreitas. Estes fatores justificam o prejuízo motor ter surgido de forma mais evidente na viga de espessura mais fina, devido o aumento do grau de exigência para a realização do teste.

O fato da aumento da latência nas vigas quadradas ter sido evidente em todas as espessuras das varas e este aumento nas vigas redondas ter aparecido somente na menos calibrosa (11mm) para o grupo tratado com MeHg+EtOH, sugere que ocorreu aprendizagem motora, uma vez que os animais são expostos primeiramente na vigas quadradas e depois às circulares, sendo esta sequência e repetição de exposição responsável pela aprendizagem motora (CRABBE et al. 2003).

No entanto, com o aumento da dificuldade do teste (vara redonda mais fina), foi observado o aumento da latência para execução, igualmente apresentado nas varas quadradas, demonstrando prejuízo motor pelo grupo das drogas associadas. Desta forma, parece que os resultados observados neste aparato demonstram uma similaridade dos prejuízos motores entre os grupos MeHg *per se* e o grupo MeHg+EtOH, sugerindo um possível papel central do MeHg neste efeito motor observado.

Esta mesma similaridade de danos motores entre os grupos MeHg+EtOH e MeHg também foi observada no parâmetro de número de escorregadas deste mesmo teste (tanto nas vigas quadradas, como nas redondas e em todas as espessuras), chegando ser mais evidente pela diferença do grupo MeHg+EtOH, que apresentou maiores danos motores, em relação ao EtOH. Portanto, os resultados apresentados no BWT nas varas circulares ratificam os demonstrados nas varas quadradas, onde há semelhança de efeito entre os grupos MeHg+EtOH e MeHg.

Isto contraria com os achados de Edelfors e Ravn-Jonsen (1990) que demonstraram que o EtOH aumenta a fluidez das membranas nervosas, logo altera a permeabilidade da barreira hematoencefálica, que é fundamental para a proteção contra agentes nocivos (GULATI et al. 1985), evidenciando que o nível de MeHg pode ser desproporcionalmente elevada na presença de EtOH (FAZAKAS et al. 2005) uma vez que os danos promovidos pela associação MeHg+EtOH são parecidos aos encontrados pelo MeHg *per se*.

Sendo o efeito neurotóxico de MeHg dose-dependente (YANG et al. 2015), a exposição, mesmo em baixas doses (menor ou igual a 1 μ M), causa alterações no cerebelo, uma vez que MeHg apresenta tropismo para esta estrutura, que é fundamentalmente, importante para a coordenação e aprendizagem motora

(CASTOLDI et al. 2001; LAMONT e WEBER, 2012). Tais alterações ocorrem através de dano celular nesta estrutura, como a morte de células granulares cerebelares por apoptose, (KUNIMOTO, 1994; CASTOLDI et al. 2000; BERTOSI et al. 2004).

Os estudo de Oleas et al. (2013) demosntraram que os animais com danos na estrutura cerebelar, seja em células de Purkinje ou na comunicação do cerebelo com outras regiões, apresentam aumento de prejuízos nas atividades motoras, como aumento do número de escorregadas no BWT. Isto fica mais evidente com aumento da dificuldade do teste, pois nas varas mais finas (quadradas e redonadas) houve o aumento do numero de escorregada também pelo grupo tratado somente com EtOH, evidenciando seus danos motores.

Continuando a avaliação da coordenação motora e equilíbrio dos animais experimentais, foi realizado o teste Rotarod ou da barra rotatória, que é um dos principais testes de abordagem para caracterização fenotípica (observável) motora em modelos animais, principalmente para ratos (Bocca et al. 2012),

O Rotarod mede distúrbios de marcha e incoordenação motora a partir da capacidade que o animal tem de se manter sobre uma haste giratória, através da verificação do tempo de latência da queda (tempo, em segundos, que o animal consegue manter-se sobre a barra giratória até cair) (KARL et al. 2003). Este aparato avalia também a aprendizagem motora, observados durante às repetidas exposições à barra rotatória , neste caso, um total de 4 exposições, sendo a primeira considerada treino. Desta forma. Este teste possui a capacidade de avaliar deficiências cerebelares (SHIOTSUKI et al. 2010 e LALONDE e STRAZIELLE, 2011).

De acordo com os resultados obtidos, o grupo tratados apresentaram diminuição do tempo de permanência na barra rotatória em relação ao grupo controle nas 3 primeiras exposições. Na última fase do teste, apenas o grupo EtOH apresentou a redução do tempo de latência, que pode ser inferido como prejuízo no aprendizado motor, que não foi observado pelos grupos MeHg e EtOH+MeHg.

Embora o estudo de Bellum et al. (2007) demonstraram que os efeitos, em curto prazo, da exposição de baixas doses à moderada (1 a 5mg/kg) de MeHg, em ratos adultos jovens, apresentaram prejuízo na coordenação motora e equilíbrio

através da diminuição da latência no Rotarod, houve uma melhora de desempenho da latência dos grupos que receberam Hg (MeHg e MeHg+EtOH) na quarta e última exposição.

Este achado corrobora com os estudos de Grandjean e Weihe (1993), os quais já afirmavam que o EtOH aumenta a formação de vapor de Hg a partir de mercúrio iônico no sangue, onde alguma concentração é exalada, causando diminuição mercurial no sangue após ingestão de EtOH. Esse possível efeito cinético mercurial em decorrência do EtOH também foram observados por Maia et al. (2009) e Filho (2015), os quais demonstraram concentrações mercuriais diminuídas em pelos de ratos que foram tratados concomitantemente com o EtOH.

A diminuição da concentração mercurial em decorrência do possível efeito cinético do EtOH sobre o Hg, pode resultar em menor prejuízo na aprendizagem motora pelo grupo MeHg+EtOH, pois no teste do Rotarod, pelo repetido número de exposições ao aparelho, mesmo que em velocidade constante, também reflete aprendizado motor (SHIOTSUKI et al. 2010; LALONDE e STRAZIELLE, 2011). No entanto, esta aprendizagem não foi observada no grupo tratado somente com EtOH, pois houve uma predominância da diminuição do tempo de latência em todas 4 exposições.

Sendo o cerebelo o principal alvo da degeneração induzida por intoxicação por EtOH (THAN e SZABO, 2002; HARVEY e STEPHENS, 2004), danos nesta região interrompe a quantidade relativa a duração do movimento (HUBER et al. 2012), além de diminuir a aprendizagem motora (PARKS et al. 2003; WEI et al. 2011; STOODLEY e SCHMAHMANN, 2010) e o teste Rotarod é comumente usado para avaliar a função do cerebelo (YAMAMOTO et al. 2003; SHIOTSUKI et al. 2010).

Os danos ao cerebelo, que no período da adolescência pode se tornar mais susceptível, uma vez que esta área ainda não está completamente desenvolvida (TIEMEIER et al. 2010), produz erros no planejamento e na execução de movimentos em vez de paralisia ou movimentos involuntários (FREDERICKS, 1996). Além disso, disfunções cerebelares estão associadas com ataxia (ZÁDORI et al.

2012; DIZON e KHODAKHAH, 2011), dismetria (ZHR et al. 2010, PAINE et al. 2004), disdiadococinesia e hipotonia (LOUIS et al. 2011)

O presente estudo corrobora com o estudo de WHITE et al. (2002) que demonstraram que o EtOH produz danos no equilíbrio e coordenação motora e que os animais adolescentes e adultos não diferem na sensibilidade para os seus efeitos em doses relativamente baixas (1,0g/kg) sobre a coordenação motora. Porém, nas doses mais elevadas (2,0 e 3,0g/kg) houve comprometimento motor, tanto para animais adolescentes quanto para os adultos.

Este prejuízo motor pode ser justificado por danos na estrutura cerebelar, seja em CP ou na comunicação do cerebelo com outras regiões, apresentando consequentemente aumento dos prejuízos nas atividades motoras, como por exemplo, a diminuição da latência na queda no Rotarod (OLEAS et al. 2013).

De Bellis et al. (2005), mostraram, através de estudo clínico, que os homens que vivem com o alcoolismo, no início na adolescência, têm volumes cerebelares menores, demonstrando que, embora o cerebelo de jovem podem ser menos sensíveis ao EtOH do que os adultos (FOLTRAN et al. 2011), o seu consumo excessivo, em uma idade precoce, pode levar a efeitos adversos em longo prazo desta parte do cérebro.

Além dos prejuízos na coordenação e aprendizagem motora resultante da exposição intermitente do EtOH (em forma de *binge*) em ratos adolescentes, os déficits mais evidentes ocorreram em períodos tardios da adolescência mostrando um atraso na morte celular ou nas manifestações comportamentais (PASCUAL et al. 2007 e FORBES et al. 2013).

O resumo dos resultados encontrados em cada teste realizado neste trabalho, de acordo com os parâmetros analisados, encontram-se descritos abaixo, enfatizando a possível área motora mais afetada, qual o neurotóxico que desempenhou papel central no dano encontrado, bem como a demonstração se houve aumento do dano quando os neurotóxicos foram associados (MeHg+EtOH) em relação ao danos apresentado pelo MeHg *per se* (quadro 1).

RESUMO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS				
TESTES	CAMPO ABERTO	POLE TESTE	BWT quadrado	ROTAROD
Possível área motora mais afetada	Córtex motor	Núcleos da base	Cerebelo	Cerebelo
Neurotóxico que desempenhou papel central no dano encontrado pelo grupo MeHg+EtOH	EtOH	MeHg	MeHg	MeHg

Quadro 1: Resumo dos resultados encontrados nos testes do Campo Aberto, Pole Teste, BWT e Rotarod.

VI CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a exposição em dose abaixo do limite aceitável de MeHg, no período da adolescência até início da fase adulta, alterou a função motora, evidenciado por déficits na locomoção espontânea, presença de bradicinesia, bem como danos na coordenação motora e equilíbrio. Esta alteração também ocorreu quando a exposição mercurial foi associada à administração de EtOH, no padrão *binge*, porém com exacerbação dos prejuízos detectados, uma vez que, quando associados, o MeHg encontra-se em menor concentração e foi capaz de gerar os danos motores.

Todavia, o conjunto de resultados apresentados evidencia a necessidade de estudos complementares para avaliar possíveis interações entre MeHg e EtOH que explique, de forma mais detalhada, o comportamento observado no grupo da associação, que de uma forma geral, foi similar ao MeHg para alguns testes e ao EtOH em outros parâmetros dos danos motores encontrados.

VII REFERÊNCIAS

- ADKINS, D.L.; BOYCHUK, J.; REMPLE, M.S.; KLEIM, J.A. **Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord.** *J Appl Physiol.* 101: 1776-82, 2006.
- ADRIELLE, J., & SANTOS, T.. **Saúde & Transformação Social Políticas públicas sobre álcool e outras drogas : breve resgate histórico,** 82–89, 2013.
- AGUIAR, M.S.S. **Análise do Comportamento Defensivo Induzido pela Microinjeção do Neuropeptídeo Substância P na Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal de Ratos.** Departamento de Psicologia e Educação, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 1995.
- ALLEN, C.L.; BAYRAKTUTAN, U. **Risk factors for ischaemic stroke.** *Int. J. Stroke.* 3(2): 105 –16, 2008.
- ALTUN, M., BERGMAN, E., EDSTRÖM, E., JOHNSON, H., & ULFHAKE, B. **Behavioral impairments of the aging rat.** *Physiology and Behavior,* 92(5), 911–923, 2007.
- AMAP/UNEP (ARCTIC MONITORING AND ASSESSMENT PROGRAMME/ UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME). **Technical Background Report for the Global Mercury Assessment,** 2013. Disponível: <http://www.amap.no/documents/download/1265> [acesso 22 maio de 2015].
- ANDERSEN, B.B. **Reduction of Purkinje cell volume in cerebellum of alcoholics.** *Brain Research.* 1007: 10 –18, 2004.
- ANTZOULATOS, E.; JAKOWEC, M.W.; PETZINGER, G.M.; WOOD, R.I. **Sex differences in motor behavior in the MPTP mouse model of Parkinson's disease.** *Pharma, Biochem and Behav.* 95(4): 466 –472, 2010.
- AOSAKI T.; MIURA M.; SUZUKI T.; NISHIMURA K.; MASUDA M. **Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: an update.** *Geriatr Gerontol Int* 1:148-57, 2010.
- ASANUMA, H.; PAVLIDES, C. **Neurobiological basis of motor learning in mammals.** *Neuro Report.* 8(4): R1-R6. 1997.
- ASCHER, M., SYVERSEN, T.. **Methylmercury: recent advances in the understanding of its neurotoxicity.** *Ther. Drug Monit.* 27, 278–283, 2005.
- ATLAS, T., HEALTH, M., & ABUSE, S.. **Management of substance abuse ATLAS;: First global report on substance use disorders launched,** 1–6, 2010.
- AUGER, N., KOFMAN, O., KOSATSKY, T., ARMSTRONG, B.. **Low-level**

methylmercury exposure as a risk factor for neurologic abnormalities in adults. *Neurotox* 26, 149–157, 2005.

AZEVEDO FA. **Toxicologia do mercúrio.** São Paulo: RIMA; 272 p, 2003.

BAHI, A. **Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 105: 83-88. 2013

BERARDELLI A.; ROTHWELL J.C.; THOMPSON P.D.; HALLETT M. **Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease.** *Brain* 124 (11):2131-46, 2001.

BARROSO, T., MENDES, A., & BARBOSA, A.. **Análise do fenômeno do consumo de álcool em adolescentes: estudo realizado com adolescentes do 3o ciclo de escolas públicas.** *Revista Latino-americana de Enfermagem*, 17(3), 347-353, 2009.

BASTIAN, A.J. **Moving, sensing and learning with cerebellar damage.** *Curr Opin Neurobiol.* 21(4): 596-601, 2011.

BASU N.; SCHEUHAMMER A.M.; ROUVINEN-WATT K.; GROCHOWINA N.; KLENAVIC K.; EVANS R.D.; CHAN H.M. **Methylmercury impairs components of the cholinergic system in captive mink (*Mustela vison*).** *Toxicol Sci* 91(1):202-209, 2006.

BAVA, S.; THAYER, R.; JACOBUS, J.; WARD, M.; JERNIGAN, T.L.; TAPERT, S.F. **Longitudinal characterization of white matter maturation during adolescence.** *Brain Res.* 1327: 38–46, 2010.

BEENSTOCK, J.; ADAMS, J.; WHITE, M. **The association between time perspective and alcohol consumption in university students: cross sectional study.** *European Journal of Public Health.* 21(4): 438 –443, 2010.

BEETS, M.W.; FLAY, B.R.; VUCHINICH, S.; LI, K.; ACOCK, A.; SNYDER, F.J. **Longitudinal patterns of binge drinking among first year college students with a history of tobacco use.** *Drug Alcohol Depend.* 2009; 103: 1–8.

BELLO SC. **Autism and environmental influences: review and commentary.** *Rev Environ Health;* 22:139–56, 2007.

BELLUM, S., THUETT, K. A., GRAJEDA, R., & ABBOTT, L. C. **Coordination deficits induced in young adult mice treated with methylmercury.** *International journal of toxicology*, 26(2), 115–21, 2007.

BERNHOF, R. A. **Mercury Toxicity and Treatment** : A Review of the Literature, , 2012.

BERTOSSI M, GIROLAMO F, ERREDE M, VIRGINTINO D, ELIA G, AMBROSI L,

RONCALI L. **Effects of methylmercury on the microvasculature of the developing brain.** *Neurotoxicology*; 25: 849-857, 2004.

BESTE, A. S. C.. **Binge drinking and the differential influence of ethanol on cognitive control subprocesses : a novel field of neurotoxicology**, 9–10, 2014.

BIAMONTE, F., LATINI, L., SEAN, F., ZINGARIELLO, M., MARINO, R., LUCA, R. DE, KELLER, F.. **Associations among exposure to methylmercury , reduced Reelin expression , and gender in the cerebellum of developing mice.** *NeuroToxicology* . 45, 67–80, 2014.

BISINOTE, M.C., JARDINS, W.F. **O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente.** *Quimica Nova*. V.27, nº 4, 599–600, 2004.

BOARD, E., OF, S., **Exposure, M., Impacts, H., Of, A., & Minamata, T. H. E. Public health impacts of exposure to mercury and mercury compounds : the role of WHO and ministries of public health in the implementation of the Minamata Convention on Mercury**, (October), 1–3, 3013.

BOHLEN, M., HAYES, E. R., BOHLEN, B., BAILOO, J. D., CRABBE, J. C., & WAHLSTEN, D. **Experimenter effects on behavioral test scores of eight inbred mouse strains under the influence of ethanol.** *Behavioural brain research*, 272, 46–54, 2014.

BOCCA, W., RESENDE, V. DE, & KO, G. M. **Teste De Rotarod : Contribuições No Estudo Das Doenças Neuromusculares , Das Síndromes Extrapiramidais E Das**, RESBCAL, São Paulo, v.1 n.2, p. 202-212, 2012.

BOTTA, P.; MAMELI, M.; FLOYD, K.L.; RADCLIFFE, R.A.; VALENZUELA, C.F. **Ethanol sensitivity of GABAergic currents in cerebellar granule neurons is not increased by a single amino acid change (R100Q) in the alpha6 GABA receptor subunit.** *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 323: 684-691

BOURGUIGNON, M.; DE TIÈGE, X.; DE BEECK, M.O.; BOGAERT, P.V.; GOLDMAN, S.; JOUSMÄKI, V.; HARI, R. **Primary motor cortex and cerebellum are coupled with the kinematics observed hand movement.** *Neuroimage*. 66: 500-507. 2013.

BREAKSPEAR, M.; TERRY, J.R.; FRISTON, K.J. **Modulation of excitatory synaptic coupling facilitates synchronization and complex dynamics in a biophysical model of neuronal dynamics.** *Network*. 14:703–32; 2003.

CARTA, P., FLORE, C., ALINOVİ, R., IBBA, A., TOCCO, M.G., ARU, G., CARTA, R., GIREI, E., MUTTI, A., LUCCHINI, R., RANDACCIO, F.S.. **Sub- clinical neurobehavioral abnormalities associated with low level of mercury exposure through fish consumption.** *Neurotoxicology* 24, 617–623, 2003.

CARTER, R.J.; LIONE, L.A.; HUMBY, T.; MANGIARINI, L.; MAHAL, A.; DUNNETT, S.B.; MORTON, A.J. **Characterization of Progressive Motor Deficits in Mice Transgenic for the Human Huntington's Disease Mutation.** *Journal of Neuroscience.* 19(8): 3248-3257, 1999.

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

CASTOLDI AF, BARNI S, TURIN L, GRANDINI C, MANZO L. **Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury.** *J Neurosci Res;* 60: 775-787, 2000.

CEDERBAUM, A.I.; LU, Y.; WU, D. **Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury.** *Arch. Toxicol.* 83: 519 –548, 2009.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. **A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 25(3): 235-260, 2001.

CLARKSON, T.W..**The three modern faces of mercury.** *Environ. Health Perspect.* 110 (Suppl 1), 11–23, 2002.

CLARKSON, T.W., MAGOS, L.. **The toxicology of mercury and its chemical compounds.** *Crit. Rev. Toxicol.* 36 (8), 609–662, 2006.

COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. **Research Council (US). Guide For The Care And Use Of Laboratory Animals. National** 8ª edição. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.

COMMITTEE ON SUBSTANCE ABUSE. **Policy statement: alcohol use by youth and adolescents: a pediatric concern.** *Pediatrics,* 125, 1078 e 1087, 2010.

CONRY, J. **Neuropsychological deficits in fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects.** *Alcohol Clin Exp Res.*14: 650–5, 1990.

CORBETT CE, EL KHOURI M, COSTA AN, GYURICZA JV, CORBETT JF, FRIZZARINI R, DE ARAÚJO ANDRADE DC, CORDEIRO Q, STRAVOGIANNIS A, CHASSOT CA, VIEIRA JL, PINHEIRO MDA C. **Health evaluation of gold miners living in a mercury-contaminated village in Serra Pelada, Pará, Brazil.** *Arch Environ Occup Health;* 62: 121-128, 2007.

CORSO T.D.; MOSTAFA H.M.; COLLINS M.A. e NEAFSEY E.J. **Brain neuronal degeneration caused by episodic alcohol intoxication in rats: effects of nimodipine, 6,7-dinitro-quinoline-2,3-dione, and MK-801.** *Alcohol Clin Exp Res* 22:217-24, 1998.

COUNTER SA, BUCHANAN LH. **Mercury exposure in Children: a review.** Toxicol Applied Pharmacol; 198: 209-230, 2004.

CRABBE JC, HARRIS RA, KOOB GF. **Preclinical studies of alcohol binge drinking.** Ann N Y Acad Sci 1216:24–40, 2011.

CRABBE, J.C.; METTEN, P.; YU, C.H.; SCHLUMBOHM, J.P.; CAMERON, A.J.; WAHLSTEN, D. **Genotypic differences in ethanol sensitivity in two tests of motor incoordination.** Journal of Applied Physiology, 95. pp. 1338–1351, 2003.

CRAWLEY J. **What's wrong with my mouse: behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice.** 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss; 2007.

CREGO, A.; HOLGUI'N, S.R.; PARADA, M.; MOTA, N.; CORRAL, M.; CADAVEIRA, F. **Binge drinking affects attentional and visual working memory processing in young university students.** Alcohol ClinExp Res.; 33:1870–9, 2009.

CREGO, A.; RODRIGUEZ-HOLGUÍN, S.; PARADA, M.; MOTA, N.; CORRAL, M.; CADAVEIRA, F. **Reduced anterior prefrontal cortex activation in young binge drinkers during a visual working memory task.** Drug Alcohol Depend.; 109: 45-56, 2010.

CRESPO-LÓPEZ, M.E., DE SA´, A.L., HERCULANO, A.M., BURBANO, R.R., DO NASCIMENTO, J.L.M.. **Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system.** Environ. Int. 33, 141–146, 2007.

CRESPO-LÓPEZ, M.E., MACÊDO G.L., PEREIRA S.I. ARRIFANO G.P, PICANÇO-DINIZ D.L. DO NASCIMENTO, J.L., HERCULANO, A.M.,. **Mercury and human genotoxicity: critical consideration and possible molecular mechanisms.** Pharmacol Res. 60, 212–220, 2009.

CRESPO-LÓPEZ ME, MACÊDO GL, ARRIFANO GPF, PINHEIRO MCN, DO NASCIMENTO JLM, HERCULANO AM. **Genotoxicity of mercury: contributing for the analysis of Amazonian populations.** Enviro Int;37:136–141, 2011.

CREWS, F.T.; BRAUN, C.J. **Binge ethanol treatment causes greater brain damage in alcohol-preferring p rats than in alcohol non preferring in rats.** Alcohol ClinExp Res.; 27:1075–82, 2003.

CREWS, F.T.; BRAUN, C.J.; HOPLIGHT, B.; SWITZER, R.C.; KNAPP, D.J. **Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats.** Alcohol Clin Exp Res. 24: 1712 –1723, 2000.

CREWS, F.T.; COLLINS, M.A.; DLUGOS, C.; LITTLETON, J.; WILKINS, L.; NEAFSEY, E. J.; PENTNEY, R.; SNELL, L. D.; TABAKOFF, B.; ZOU, J.; NORONHA,

A. **Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why?** *Alcohol Clin Exp Res.* 28: 350–64, 2004.

CREWS, F.T.; NIXON, K. **Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism.** *Alcohol and Alcoholism.* 44: 115–127, 2008.

CRICHTON, R.R.; DEXTER, D.T; WARD, R.J. **Metal based neurodegenerative diseases-from molecular mechanisms to therapeutic strategies.** *Coord. Chem. Rev.* 252. 1189–1199, 2008.

DAVE V, MULLANEY KJ, GODERIE S, KIMELBERG HK, ASCHNER M. **Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: effects on D-aspartate and serotonin uptake.** *Dev Neurosci* 16:222–231, 1994.

DE BELLIS, M. D., NARASIMHAN, A., THATCHER, D. L., KESHAVAN, M. S., SOLOFF, P., & CLARK, D. B. **Prefrontal cortex, thalamus, and cerebellar volumes in adolescents and young adults with adolescent-onset alcohol use disorders and comorbid mental disorders.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 29, 1590-1600, 2005.

DELONG, M.R.; WICHMANN, T. **Circuits and circuit disorders of the basal ganglia.** *Arch Neurol.* 64: 20-4, 2007.

DIAZ, E. **Mercury Pollution at Gold Mining Sites in the Amazon.** *Environment.* 1–24, 2000.

DIKRANIAN, K.; Qin, Y.Q.; LABRUYERE, J.; NEMMERS, B.; OLNEY, J.W. **Ethanolinduced neuroapoptosis in the developing rodent cerebellum and related brain stem structures.** *Developmental Brain Research.*; 155:1-13, 2005.

DIZON, M.J.; KHODAKHAH, K. **The role of interneurons in shaping Purkinje Cells responses in the Cerebellar Cortex.** *Journal of Neuroscience.* 31(29): 10463-10473. 2011.

EDELFORSS S, RAVN-JONSEN A. **The effect of alcohol in vitro on the nervous cell membranes measured by changes in Ca²⁺ Mg²⁺ ATPase activity and fluidity of the synaptosomal membrane.** *Pharmacol Toxicol*;67:56-60. 29, 1990.

EHP – **Mercury Exposure and Health Impacts among Individuals in the Artisanal and Small-Scale Gold Mining Community: A Comprehensive Review.** ([s.d.]). Recuperado 31 de maio de 2015, disponível em <http://ehp.niehs.nih.gov/1307864/>

ELBREDER, M. F., LARANJEIRA, R., SIQUEIRA, M. M., & BARBOSA, D. A. **Perfil de mulheres usuárias de álcool em ambulatório especializado em dependência química.** *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, 57(1), 9-15, (2008)..

ELLIOTT, E.J.; BOWER, C. **Alcohol and pregnancy: the pivotal role of the obstetrician.** Aust N Z J Obstet Gynaecol. 48: 236 - 239; 2008.

ESTATUTO DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE. Câmara dos Deputados. 7 ed. Brasília, Brasil, 2010.

ETO, K. O. E., OKUNAGA, H. I. T., & AGASHIMA, K. A. N. **An Autopsy Case of Minamata Disease (Methylmercury Poisoning)** — Pathological Viewpoints of Peripheral Nerves, 30(6), 714–722, 2002.

EVARTS, E. V. **Relation of pyramidal tract activity to force exerted during voluntary movement.** J. Neurophysiol. 31: 14–27, 1968.

FARIA, R., VENDRAME, A., SILVA, R., & PINSKY, I. **Propaganda de álcool e associação ao consumo de cerveja por adolescentes.** Revista de Saúde Pública, 45(3), 441–447, 2011.

FARINA, M., ROCHA, J.B., ASCHENER, M.. **Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies.** Life Sci. 89, 555-563, 2011.

FAZAKAS Z, LENGYEL Z, NAGYMAJTÉNYI L. **Combined effects of subchronic exposure to lead, mercury and alcohol on the spontaneous and evoked cortical activity in rats.** *Arh Hig Rada Toksikol*; 56: 249-56, 2005.

FEHR, C.; SANDER, T.; TADIC, A.; LENZEN, K.P.; ANGHELESCU, I.; KLAWE, C.; DAHMEN, N.; SCHMIDT, L.G.; SZEGEDI, A. **Confirmation of association of the GABRA2 gene with alcohol dependence by subtype-specific analysis.** Psychiatr Genet. 16: 9-17, 2006.

FEREZOU, I. ET AL. **Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice.** Neuron 56: 907–923, 2007.

FERRARO, L. TOMSINI M.C; TANGANELLI S.; MAZZA R.; COLUCCIA A.; CARRATU M.R.; GAETANI S.; CUOMO V.; ANTONELLI T.. **Developmental exposure to methylmercury elicits early cell death in the cerebral cortex and long-term memory deficits in the rat.** Int. J. Dev. Neurosci. 27: 165–174, 2009.

FILHO, I.J.A.B.. **Efeitos neurocomportamentais e no estresse oxidativo da exposição concomitante ao metilmercúrio e etanol em ratas da adolescência à fase adulta.** Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, 2015.

FITZPATRICK, L. E., JACKSON, M., & CROWE, S. F. **The relationship between alcoholic cerebellar degeneration and cognitive and emotional functioning.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(3), 466–485, 2008.

FOLTRAN, F., GREGORI, D., FRANCHIN, L., VERDUCI, E., & GIOVANNINI, M. **Effect of alcohol consumption in prenatal life, childhood, and adolescence on child development.** *Nutrition Reviews*, 69(11), 642-659, 2011.

FORBES, A., COOZE, J., MALONE, C., FRENCH, V., & WEBER, J. T. **Effects of intermittent binge alcohol exposure on long-term motor function in young rats.** *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 47(2), 95–102, 2013.

FREDERICKS, C.M.; SALADIN, L.K. DAVIS F.A. **Disorders of the cerebellum and its connections Pathophysiology of the motor systems**, Company, Philadelphia. 445–466, 1996.

GALLASSI, A. D., ALVARENGA, P. G., ANDRADE, A. G., & COUTTOLENC, B. F. **Custos dos problemas causados pelo abuso do álcool.** *Revista de Psiquiatria Clínica*, 35(Supl. 1), 25-30, 2008.

GALLESE, V.; FADIGA, L.; FOGASSI, L.; RIZZOLATTI, G. **Action recognition in the premotor cortex.** *Brain*, 119. 593–609, 1996.

GEORGE, A.; FIGUEREDO, V.M. **Alcohol and arrhythmias: A comprehensive review.** *J. Cardio. Med. (Hagerstown)*. 11: 221 –228, 2010.

GIBB, H.; O'LEARY K.G.. **Mercury Exposure and Health Impacts among Individuals in the Artisanal and Small-Scale Gold Mining Community: A comprehensive review.** *Who*. V.122, n.07, 2014.

GISAH, **Global status report on alcohol and health**, 2014.

GLASER V, NAZARI EM, MULLER YM, FEKSA L, WANNMACHER CM, ROCHA JB, DE BEM AF, FARINA M, LATINI A. **Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex.** *Int J Dev Neurosci* 28:631–637, 2010.

GLASER, V., PAULA, R. DE, ANA, M., HOFFMANN, J., HUMBERTO, J., ALICIA, M., ALEXANDRA, D. P. **Diphenyl diselenide administration enhances cortical mitochondrial number and activity by increasing hemoxygenase type 1 content in a methylmercury-induced neurotoxicity mouse model**, 1–8, 2014.

GLICKSTEIN, M. **How are visual areas of the brain connected to motor areas for the sensory guidance of movement?** *Trends Neurosci.*, 23, pp. 613–617, 2000.

GOHLKE, J.M.; GRIFFITH, W.C.; FAUSTMAN, E.M. **Computational models of ethanol-induced neurodevelopmental toxicity across species: Implications for risk assessment.** Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.83: 1 –11, 2008.

GOLDMAN L.R., SHANNON M.W.. **Committee on Environmental Health. Technical report: mercury in the environment: implications for pediatricians.** Pediatrics 108: 197–205, 2001).

GOLDSTEIN RZ, VOLKOW ND. **Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications.** Nat Rev Neurosci 12:652–669, 2011).

GOLDSTEIN, L.B.; DAVIS, J.N. **Beam-walking in rats: studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury.** J Neurosci Meth. 31: 101–107. 1990

GRAFTON, S.T.; Hamilton, A.F. **Evidence for a distributed hierarchy of action representation in the brain.** Hum. Mov. Sci. 26: 590–61, 2007.

GRANDJEAN, P., LANDRIGAN, P.J.. **Developmental neurotoxicity of industrial chemicals.** Lancet 368 (9553), 2167–2178, 2006.

GRANDJEAN, P., & LANDRIGAN, P. J.. **Neurobehavioural effects of developmental toxicity.** Lancet Neurology, 13(3), 330–8, 2014.

GRANDJEAN P, WEIHE P. **Neurobehavioral effects of intrauterine mercury exposure: potential sources of bias.** Environ Res; 61: 176-183, 1993.

GRANDJEAN P. **Methylmercury toxicity and functional programming.** Reprod Toxicol; 23: 414-420, 2007.

GROTTO D, VALENTINI J, FILLION M, PASSOS CJ, GARCIA SC, MERGLER D et al. **Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon.** Sci Total Environ. 408:806–11, 2010.

GROTTO D., J. VICENTINI, J. P. FRIEDMANN ANGELI et al. **Evaluation of protective effects of fish oil against oxidative damage in rats exposed to methylmercury.** Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 74, no. 3, pp. 487–493, 2011

GUERRI, C., & PASCUAL, M. **Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence.** Alcohol, 44,15-26, 2010.

GULATI A, CHANDISHWAR N, SCHANKER K, SRIMAL RC, DHAWAN, BHARGAVA KP. **Effect of alcohols on the permeability of blood-brain barrier.** Pharmacol Res Commun;17:85-93, 1985.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado De Fisiologia Médica 11.** Ed. Rj . Guanabara Koogan; 2006.

HALL, C.S. **Emocional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual defferences in the emotionality.** J. Comp. Psychol. 18:385-403, 1934.

HANDLEY, A., MEDCALF, P., HELLIER, K., & DUTTA, D. **Movement disorders after stroke.** Age and Ageing, 38(3), 260–266. 2009.

HAO, H.N.; PARKER, G.C.; ZHAO, J.; BARAMI, K.; LYMAN, W.D. **Human neural stem cells are more sensitive than astrocytes to ethanol exposure.** Alcohol ClinExp Res. 27:1310–7, 2003.

HARPER, C. **The Neuropathology of Alcohol-Related Brain Damage.**Alcohol & Alcoholism. 44(2): 136 –140, 2009.

HEATON, M.B.; PAIVA, M.; KUBOVIC, S.; KOTLER, A.; ROGOZINSKI, J.; SWANSON, E.; MADORSKY, V.; POSADOS, M. **Differential effects of ethanol on c-jun N-terminal kinase, 14-3-3 proteins, and Bax in postnatal day 4 and postnatal day 7 rat cerebellum.** Brain Research. 1432: 15-27. 2012.

HEILIG, M.; GOLDMAN, D.; BERRETTINI, W.; O'BRIEN, C.P. **Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction.** Nature Reviews Neuroscience.; 12: 670-684, 2011.

HERCULANO, A.M., CRESPO-LO´PEZ, M.C., LIMA, S.M.A., PICANC -O-DINIZ, D.L.W., DO NASCIMENTO, J.L.M.. **Methylmercury intoxication induces nitric oxide synthase activation in retinal cell culture.** Braz. J. Med. Biol. Res. 39 (3), 411–414, 2006.

HERMENS DF, LAGOPOULOS J, TOBIAS-WEBB J ET AL. **Pathways to alcohol-induced brain impairment in young people: a review.** Cortex J Devoted Study Nerv Syst Behav 49:3–17, 2013.

HERTTUA, K.; MÄKELÄ, P.; MARTIKAINEN, P. **Changes in alcohol-related mortality and its socioeconomic differences after a large reduction in alcohol f** **Epidemiology**, 168: 1110–1118, 2008.

HOLFORD, N.H.G. **Clinical pharmacokinetics of ethanol.** Clin. Pharmacokinet.; 13: 273–292, 1987.

HOSP, J.A.; LUFT, A.R. **Cortical plasticity during motor learning and recovery after ischemic stroke.** Neural Plast. 2011.

HUANG, C., TITUS, J. A., BELL, R. L., KAPROS, T., CHEN, J., & HUANG, R. **A mouse model for adolescent alcohol abuse: stunted growth and effects in brain.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 36(10), 1728-1737, 2012.

IDRUS, N. M. AND NAPPER, R. M. A. **Acute and Long-Term Purkinje Cell Loss Following a Single Ethanol Binge During the Early Third Trimester Equivalent in the Rat.***Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 36: 1365–1373. 2012.

JAATINEN, P.; RINTALA, J. **Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum.** *The Cerebellum*. 332 - 347, 2008.

JACOBUS, J.; TAPERT, S.F. **Neurotoxic Effects of Alcohol in Adolescence.** *Annu. Rev. Clin. Psychol.*; 9:703–21, 2013.

JERNIGAN, D.H.; MONTEIRO, M.; ROOM, R.; SAXENA, S. **Towards a global alcohol policy: alcohol, public health and the role of WHO.** 78 (4), 2000.

JUAN, M.B.L.; HORNO, S.M.; BOSCH, I.B.; MORENO, J.C.; PONS, J.L.; FARINA, D.; IOSA, M.; MOLINARI, M.; TAMBURELLA, F.; RAMOS, A.; CARIA, A.; ESCALANTE, T.S.; BRUNNER, C.; REA, M. **Rehabilitation of gait after stroke: a review towards a top-down approach.** *J Neuroeng Rehabil*. 8: 66; 2011.

JUNG, M.E.; METZGER, D.B. **Alcohol withdrawal and brain injuries: beyond classical mechanisms.** *Molecules*. 15: 4984-5011, 2010.

KARADAYIAN, A.G.; LORES-ARNAIZ, S.; CUTRERA, R.A. **The effect of constant darkness and circadian resynchronization on the recovery of alcohol hangover.** *Behavioural Brain Research*. 268: 94–103, 2014.

KARL, T.; PABST, R.; VONHÖRSTEN, S. **Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research.** *Exp Toxic Pathol*; 55: 69–83, 2003.

KONG HK, WONG MH, CHAN HM, LO SC. **Chronic exposure of adult rats to low doses of methylmercury induced a state of metabolic deficit in the somatosensory cortex.** *J Proteome Res*. Nov 1;12(11):5233-45, 2013.

KOOB, G.; KREEK, M.J. **Stress, dysregulat**, 2007.

KUMAR, S.; PORCU, P.; WERNER, D.; MATTHEWS, D.; DIAZ-GRANADOS, J.; HELFAND, R.; MORROW, A. **The role of GABA receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress.** *Psychopharmacology*. 205: 529-564, 2009.

KUMARI S, MEHTA SL, LI PA. **Glutamate induces mito- chondrial dynamic imbalance and autophagy activation: pre- ventive effects of selenium.** *PLoS ONE* 7:e39382, 2012.

KUNIMOTO M. **Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in**

primary culture. *Biochem Biophys Res Comm*; 204: 310-317, 1994.

LALONDE, R.; STRAZIELLE, C. **Sensorimotor learning in Dab1(scm) (scrambler) mutant mice.** *Behav Brain Res.* 218:350-2, 2011.

LAMONT, M. G., & WEBER, J. T. The role of calcium in synaptic plasticity and motor learning in the cerebellar cortex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(4), 1153-1162, 2012.

LARANJEIRA, R. (Org.). **II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD).** São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP, 2014.

LARANJEIRA, R.; PINSKY, I.; ZALESK, M.; CAETANO, R. **I levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira.** Centro Brasileiro de Informações sobre drogas Psicotrópicas (CEBRID). Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD), 2007.

LAUING, K.; HIMES, R.; RACHWALSKI, M.; STROTMAN, P.; CALLACI, J.J. **Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength.** ; *Alcohol.* 42: 649-656, 2008.

LEITE, L.E.; NOBRE, M.J. **The negative effects of alcohol hangover on high-anxiety phenotype rats are influenced by the glutamate receptors of the dorsal midbrain.** *Neuroscience.* 213: 93-105. 2012.

LEITE BARROSO, M., FARIAS DE OLIVEIRA, G., CHRISTINA FARIAS DE CARVALHO, A., MELO TEIXEIRA BATISTA, H., & BEZERRA DE MENEZES SILVEIRA, G. **Estresse E Uso De Álcool Em Enfermeiros Que Trabalham Em Urgência E Emergência Stress And Alcohol Use In Nurses Who Work In Urgency And Emergency.** *Cad. Cult. Ciênc. Ano IX, 13(2)*, 2015.

LIANG, J., INSKIP, M., NEWHOOK, D., & MESSIER, C. **Neurobehavioral effect of chronic and bolus doses of methylmercury following prenatal exposure in C57BL/6 weanling mice.** *Neurotoxicology and teratology*, 31(6), 372–81, 2009.

LINDTNER, C.; SCHERER, T.; ZIELINSKI, E.; FILATOVA, N.; FASSHAUER, M.; TONKS, N.K.; PUCHOWICZ, M.; BUETTNER, C. **Binge Drinking Induces Whole-Body Insulin Resistance by Impairing Hypothalamic Insulin Action.** *SciTransl Med.*; 5: 170ra14, 2013.

LIVY, D.J.; PARNELL, S.E.; WESTJ. R. **Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice.** *Alcohol.* 2003; 29: 165–171.

LORENZ, D.; DEUSCHL, G. **Update on pathogenesis and treatment of essential tremor.** *Curr Opin Neurol.* 20: 447 e 52, 2007.

LORENZO C. **Vulnerabilidades em saúde Pública: implicações para as políticas públicas.** Rev Bioét.; 2(3): 299-31, 2006.

LOUIS, E.D.; FAUST, P.L.; VONSATTEL, J.P.G. **Purkinje cell loss is a characteristic of essential tremor.** Parkinsonism & Related Disorders. 17(6): 406-409. 2011.

MACKENBACH, J.P. **Socioeconomic inequalities in health in 22 European countries.** The New England Journal of Medicine. 358: 2468 –2481, 2008.

MAIA, C.S.F.; FERREIRA, V.M.M.; DINIZ, J.S.V.; CARNEIRO, F.P.; DE SOUSA, J.B.; DA COSTA, E.T.; TOMAZ, C. **Inhibitory avoidance acquisition in adult rats exposed to a combination of ethanol and methylmercury during central nervous system development.** Behavioural Brain Research. 211: 191 - 197, 2010.

MAIA, C.S.F.; LUCENA, G.M.R.S.; CORRÊA, P.B.F.; SERRA, R.B.; MATOS, R.W.M.; MENEZES, F.C.; SANTOS, S.N.; SOUSA, J.B. COSTA, E.T.; FERREIRA, V.M.M. **Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system.** Neurotoxicology. 30: 23 –30, 2009.

MAIA, C.S.F.; FERREIRA, V.M.M.; KAHWAGE, R.L.; AMARAL, M.N.; SERRA, R.B.; NORO DOS SANTOS, S.; DO NASCIMENTO, J.L.M.; RODRIGUES, L.G.; TRÉVIA, N.; DINIZ, C.W.P. **Adult brain nitrenergic activity after concomitant prenatal exposure to ethanol and methyl mercury.** Acta Histochemica. 112(6): 583 –591, 2009.

MALM O. **Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon.** Environ Res;77:73–78, 1998.

MANGUEIRA, S. D. O. **Promoção Da Saúde E Políticas Públicas Do Álcool No Brasil: Revisão Integrativa Da Literatura Promoción De La Salud Y Las Políticas Públicas De Alcohol En Brasil : Revisión Integradora De La Literatura Health Promotion And Public Policies Of Alcohol In B,** 27(1), 157–168, 2015.

MANZO-AVALOS, S.; SAAVEDRA-MOLINA, A. **Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption.** Int. J. Environ. Res. Public Health.7: 4281 - 4304, 2010.

MARGOLIS, R.L. **Cerebellum and psychiatry.** International Review of Psychiatry 13, 229–231, 2001.

MARUYAMA, K., YORIFUJI, T., TSUDA, T., SEKIKAWA, T., NAKADAIRA, H., & SAITO, H.. **Methyl Mercury Exposure at Niigata , Japan : Results of Neurological Examinations of 103 Adults,** 8–10, 2012.

MATOS, A. M., CARVALHO, R. C., COSTA, C. O. M., GOMES, K. E. P. S., & SANTOS, L. M. **Consumo frequente de bebidas alcoólicas por adolescentes**

escolares: estudo de fatores associados. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 13(2), 302-313, 2010.

MATSUURA, K.; KABUTO, H.; MAKINO, H.; OGAWA, N. **Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion.** *J Neurosci Methods*.73: 45 –8, 1997.

MELONI, J.N.; LARANJEIRA, R. **Custo Social e de Saúde do Consumo do Álcool.** *Revista Brasileira Psiquiátrica*, 26 (supl. I): 7 –10, 2004.

MENARD, J.; TREIT, D. **Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety.** *Neurosci Biobehav Rev*. 23: 591 –613, 1999.

MENDELEV N, MEHTA SL, IDRIS H, KUMARI S, LI PA. **Selenite stimulates mitochondrial biogenesis signaling and enhances mitochondrial functional performance in murine hippocampal neuronal cells.** *PLoS One* 7:e47910, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano emergencial de ampliação do acesso ao tratamento e prevenção em álcool e outras drogas: PEAD 2009-2011.** Brasília, DF: Autor, 2009.

MONTEIRO, C. F. S., DOURADO, G. O. L., GRAÇA JUNIOR, C. A. G., & FREIRE, A. K. N. **Mulheres em uso prejudicial de bebidas alcoólicas.** *Escola Anna Nery*, 15(3), 567-572, 2011.

MONTGOMERY C, FISK JE, MURPHY PN ET AL. **The effects of heavy social drinking on executive function: a systematic review and meta-analytic study of existing literature and new empirical findings.** *Hum Psychopharmacol* 27:187–199. 2012.

MOORE, E.M.; MARIANI, J.N.; LINSENBARDT, D.N.; MELON, L.C.; BOEHM, S.L. II. **Adolescent mice consume greater amounts of limited-access ethanol compared to adults and display continued elevated ethanol intake into adulthood.** *Alcohol Clin Exp Res*. 34: 1–9, 2010.

MORAES, E., CAMPOS, G. M., FIGLIE, N. B, LARANJEIRA, R. R., & FERRAZ, M. B. **Conceitos introdutórios de economia da saúde e o impacto social do abuso de álcool.** *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 28(4), 321-325, 2006.

MUKHERJEE, S., KUMAR DAS, S. & VASUDEVAN, D.M. **Effects of ethanol consumption on different organs - a brief overview.** *Asian Journal of Biochemistry* 2 (6): 386-394, 2007.

NAHAS, T.R. **O teste do Campo Aberto.** Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2001.

NORBERG, A.; JONES, A.W.; HAHN, R.G.; GABRIELSSON, J.L. **Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: Research and forensic applications.** *Clin. Pharmacokinet.* 42: 1 –31, 2003.

NOVAIS G, CÂMARA VM. **Perception of mercury contamination by Brazilian adolescents in a gold mining community: an ethnographic approach.** *Ciência & Saúde Coletiva*, 14(6): 2015-2026, 2009.

O'HEARN, E.; MOLLIVER, M.E. **Organizational principles and**, 2001.

OGAWA, N.; HIROSE, Y.; OHARA, S.; ONO, T.; WATANABE, Y.A **Simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice.** *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 50: 435 –441, 1985.

OLEAS, J.; YOKOI, F.; DE ANDRADE, M.P.; PISANI, A.; LI, Y. **Engineering animal models of dystonia.** *Movement Disorders*, 28(7), 990-1000. 2013

OLIVEIRA, G.B; FONTES JR, E.A.; CARVALHO, S.; SILVA, J.B.; FERNANDES, L.M.P.; OLIVEIRA, M.C.S.P.; PREDIGER, R.D.; GOMES-LEAL, W.; LIMA, R.R.; MAIA, C.S.F. **Minocycline mitigates motor impairments and cortical neuronal loss induced by focal ischemia In rats chronically exposed to ethanol during adolescence.**1561: 23-34, 2014.

OLIVEIRA, M., ROMERA, L. A., & MARCELLINO, N. C. **Lazer e juventude: análise das propagandas de cerveja veiculadas pela televisão.** *Revista da Educação Física/UEM*, 22(4), 535-546, 2011.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Exposure to Mercury: A Major Public Health**, Geneva: WHO, 2007. Available: <http://www.who.int/ipcs/features/mercury.pdf> [acessado 20 may 2015].

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Média Centre**,: WHO, 2013. Available: <http://www.who.int/ipcs/features/mercury.pdf> [acessado 21 may 2015].

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Média Centre, Mercury and health**, 4-7: WHO, 2014. Available: <http://www.who.int/ipcs/features/mercury.pdf> [acessado 22 may 2015].

OHMIYA Y, NAKAI K.. **Effect of methylmercury on the ethanol elimination from the blood and the activity of alcohol dehydrogenase.** *Jpn J Pharmacol* 27(4): 545-5, 1977.

ONISHCHENKO, N., TAMM, C., VAHTER, M., HÖKFELT, T., JOHNSON, J. A., JOHNSON, D. A., & CECCATELLI, S. **Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice.** *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 97(2), 428–37, 2007.

OSCAR-BERMAN M. **Function and dysfunction of prefrontal brain circuitry in**

alcoholic Korsakoff's syndrome. *Neuropsychol Rev* 22: 154–169, 2012.

PAINE, R. W.; GROSSBERG, S.; & VAN GEMMERT, A. W. A. **A quantitative evaluation of the AVITEWRITE model of handwriting learning.** *Human Movement Science.* 23: 837–860, 2004.

PAPP A.; PECZE L. e VEZER T. **Acute effects of lead, mercury and manganese on the central and peripheral nervous system in rats in combination with alcohol exposure.** *Arh Hig Rada Toksikol;* 56: 241-248, 2005.

PARADA, M.; CORRAL, M.; CAAMAÑO-ISORNA, F.; MOTA, N.; CREGO, A.; HOLGUÍN, S.R.; CADAVEIRA, F. **Definición del concepto de consumo intensivo de alcohol adolescente (binge drinking).** *Adicciones.* 23: 53-63, 2011.

PARKS, M. H.; MORGAN, V. L.; PICKENS, D. R.; PRICE, R. R.; DIETRICH, M. S.; NICKEL, M. K. **Brain FMRI activation associated with self-paced finger tapping in chronic alcohol-dependent patients.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 27: 704–711, 2003.

PASCUAL, M.; BLANCO, A. M.; CAULI, O.; MIÑARRO, J.; & GUERRI, C. **Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats.** *European Journal of Neuroscience,* 25(2), 541-550. 2007.

PAXINOS, G. **The rat nervous system.** Academic Press, 25(2), 541-550. 2004.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** Academic Press, 35, 541-550. 2004.

PENTNEY, R. J.; & DLUGOS, C. A. **Cerebellar Purkinje neurons with altered terminal dendritic segments are present in all lobules of the cerebellar vermis of ageing, ethanol-treated F344 rats.** *Alcohol.* 35: 35-43, 2000.

PERRY, T.A.; TORRES, E.M.; CZECH, C.; BEYREUTHER, K.; RICHARDS, S.; DUNNETT, S.B. **Cognitive and motor function in transgenic mice carrying excess copies of the 695 and 751 amino acid isoforms of the amyloid precursor protein gene.** *Alzheimer's Res.* 1: 5 –14, 1995.

PETIT, G.; KORNREICH, C.; VERBANCK, P.; CAMPANELLA, S. **Gender differences in reactivity to alcohol cues in binge drinkers: A preliminary assessment of event-related potentials.** *Psychiatry Research.* 2013; 209: 494-503.

PHILLIPS, J.G.; OGEIL, R.P.; MÜLLER, F. **Alcohol consumption and handwriting: A kinematic analysis.** *Human Movement Science.* 28(5): 619-632. 2009.

PIERCE, D.R.; WILLIAMS, D.K.; LIGHT, K.E. **Purkinje Cell Vulnerability to Developmental Ethanol Exposure in the Rat Cerebellum**. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 23: 1650–1659. 1999.

PIETRZYKOWSKI, A.Z.; FRIESEN, R.M.; MARTIN, G.E.; PUIG, S.I.; NOWAK, C.L.; WYNNE, P.M.; SIEGELMANN, H.T.; TREISTMAN, S.N. **Posttranscriptional regulation of BK channel splice variant stability by miR-9 underlies neuroadaptation to alcohol**. *Neuron*. 59: 274–287, 2008.

PINHEIRO MC, MACCHI BM, VIEIRA JL, OIKAWA T, AMORAS WW, GUIMARÃES GA, COSTA CA, CRESPO-LÓPEZ ME, HERCULANO AM, SILVEIRA LC, DO NASCIMENTO JL. **Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon**. *Environ Res*; 107: 53-59, 2008.

PINSKY, I., SANCHES, M., ZALESKI, M., LARANJEIRA, R., & CAETANO, R. **Patterns of alcohol use among Brazilian adolescents**. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 32(3), 242–249, 2010.

RAMEZANI, A.; GOUDARZI, I.; LASHKARBOLOUKI, T.; GHORBANIAN, M.T.; SALMANI, M.E.; ABRARI, K. **Neuroprotective effects of the 17 β -estradiol against ethanol-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: Biochemical, histological and behavioral changes**. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 100: 144-151, 2011.

ROBERTO, M.; TREISTMAN, S.N.; PIETRZYKOWSKI, A.Z.; WEINER, J.; GALINDO, R.; MAMELI, M.; VALENZUELA, F.; ZHU, P.J.; LOVINGER, D.; ZHANG, T.A.; HENDRICKSON, A.H.; MORRISSETT, R.; SIGGINS, G.R. **Actions of acute and chronic ethanol on presynaptic terminals**. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 30: 222–232, 2006.

ROEGGE, C. S., & SCHANTZ, S. L. **Motor function following developmental exposure to PCBS and/or MEHG**. *Neurotoxicology and teratology*, 28(2), 260–77, 2006.

ROGERS, B.P.; PARKS, M.H.; NICKEL, M.K.; KATWAL, S.B.; MARTIN, P. R. **Reduced Fronto-Cerebellar Functional Connectivity in Chronic Alcoholic Patients**. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 36(2): 294–301. 2012.

ROZAS, G.; GUERRA, M.J.; LABANDEIRA-GARCIA, J.L. **An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of Parkinsonism**. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2: 75–84, 1997.

RUMBEIHA WK, GENTRY PA, BHATNAGAR MK. **The effects of administering methylmercury in combination with ethanol in the rat**. *Vet Hum Toxicol*; 34: 21-25, 1992.

RUMBEIHA WK, YAMASHIRO S, BHATNAGAR MK. **The renal histology and ultrastructure in rats given methylmercury and ethanol in combination**. *Vet*

Hum Toxicol; 33: 539- 544, 1991.

SALINAS, E. **Rank-order-selective neurons form a temporal basis set for the generation of motor sequences.** J. Neurosci. 29, 4369–4380, 2009.

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

SANTOS, J. C. e CATRAVECHI, L. A. **Relações de trabalho na Amazônia Mato-Grossense: o uso da violência contra peões e garimpeiros.** *Élisée Rev. Geo. UEG.* v.3. p. 26–48, 2014.

SARNA, J,R.; HAWKES, R. **Patterned Purkinje cell death in the cerebellum,** 2013.

SCHMAHMANN, J.D., DOYON, J., MCDONALD, D., HOLMES, C., LAVOIE, K., HURWITZ, A.S., KABANI, N., TOGA, A., EVANS, A., PETRIDES, M. **Three-dimensional MRI atlas of the human cerebellum in proportional stereotaxic space.** *Neuroimage* 10, 233–260, 1999.

SCHMOLESKY, M. T., WEBER, J. T., DE ZEEUW, C. I., & HANSEL, C. **The making of a complex spike: ionic composition and plasticity.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 978, 359-390, 2002.

SCHUCKIT, M. **Alcohol and alcoholism.** In *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. Kasper, D.L. et al. Eds. McGraw Hill, New York, 2004.

SHARMA, D.J.; SUNKARIA, A.; BAL, A.; BHUTIA, Y.D.; VIJAYARAGHAVAN, R.; FLORA, S.J.S.; GILL, K.D. **Neurobehavioral impairments, generation of oxidative stress and release of pro-apoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain.** *Toxicol Appl Pharmacol.*; 240: 208-218, 2009.

SHENOY K.V.; SAHANI M. e CHURCHLAND M.M. **Cortical control of arm movements: a dynamical systems perspective.** *Annu Rev Neurosci* 36, 337–359, 2013.

SHER, L. **Alcohol and suicide: neurobiological and clinical aspects.** *The Scientific World Journal.* 6, 700 –706, 2006.

SHERRILL, L. K., BERTHOLD, C., KOSS, W. A., JURASKA, J. M., & GULLEY, J. M. **Sex differences in the effects of ethanol pre-exposure during adolescence on ethanol-induced conditioned taste aversion in adult rats.** *Behavioural Brain Research*, 225(1), 104-109, 2011.

SHIOTSUKIA H.; YOSHIMIB K.; SHIMO Y.; FUNAYAMA M.; TAKAMATSU Y.; IKEDA K.; TAKAHASHI R.; KITAZAWA S. e HATTORI V.. **A rotarod test for**

evaluation of motor skill learning. *Journal of Neuroscience Methods*, 189: 180–185, 2010.

SHUTOH F, OHKI M, KITAZAWA H, ITOHARA S, NAGAO S. **Memory trace of motor learning shifts transsynaptically from cerebellar cortex to nuclei for consolidation.** *Neuroscience*; 139: 767-777, 2006.

SILVEIRA, L.C.L., DAMIN, E.T.B., PINHEIRO, M.C.N., RODRIGUES, A.R., MOURA, A.L.A., CO^ RTES, M.I.T., MELLO, G.A.. **Visual dysfunction following mercury exposure by breathing mercury vapour or by eating mercury-contaminated food.** In: Mollon, J.D., Pokorny, J., Kno- blauch, K. (Eds.), *Normal and Defective Colour Vision*. Oxford University Press, Oxford, England, pp. 407–417, 2003.

SKALA, K.; WALTER, H. **Adolescence and Alcohol: a review of the literature.** *Neuropsychiatrie*. 27:202-211, 2013.

SOUZA, S. L., FERRIANI, M. G. C., SILVA, M. A. I., GOMES, R., & SOUZA, T. C. **A representação do consumo de bebidas alcoólicas para adolescentes atendidos em uma Unidade de Saúde da Família.** *Ciência & Saúde Coletiva*, 15(3), 733-741, 2010.

SPEAR, L.P. **The adolescent brain and age-related behavioral manifestations.** *Neurosci Biobehav Rev*. 24 :417–463, 2000.

SPEAR, L.P.; **The adolescent brain and age-related behavioral manifestations.** *Neurosci Biobehav Rev*. 24: 417 –463, 2000.

STANLEY, J.L.; LINCOLN, R.J.; BROWN, T.A.; McDONALD, L.M.; DAWSON, G.R.; REYNOLDS, D.S. **The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines.** *J Psychopharmacol*. 19(3): 221-227. 2005

STERN AH. **A review of the studies of the cardiovascular health effects of methylmercury with consideration of their suitability for risk assessment.** *Environ Res*; 98: 133- 142, 2005.

STRINGARI, J.; MEOTTI, F.C.; SOUZA, D.O.; SANTOS, A.R.; FARINA, M. **Postnatal methylmercury exposure induces hyperlocomotor activity and cerebellar oxidative stress in mice: dependence on the neurodevelopmental period.** *Neurochem Res*. 31:563–569. 2006.

SULLIVAN, E.V. **Compromised pontocerebellar and cerebellothalamocortical systems: speculations on their contributions to cognitive and motor impairment in nonamnesic alcoholism.** *Alcohol Clin Exp Res*. 27: 1409 –1419, 2003.

TAMASHIRO H, ARAKAKI M, AKAGI H, MURAO K, HIRAYAMA K, SMOLENSKY

MH. **Effects of ethanol on methyl mercury toxicity in rats.** *J Toxicol Environ Health* 18: 595-605, 1986.

TARANUKHIN, A.G.; TARANUKHINA, E.Y.; SARANSAARI, P.; PODKLETNOVA, I.M.; PELTO-HUIKKO, M.; OJA, S.S. **Neuroprotection by taurine in ethanol-induced apoptosis in the developing cerebellum.** *J Biomed Sci*; 17(Suppl. 1): S12, 2010.

TATENO, M.; UKAI, W.; YAMAMOTO, M.; HASHIMOTO, E.; IKEDA, H.; SAITO, T. **The effect of ethanol on cell fate determination of neural stem cells.** *Alcohol ClinExp Res.* 2005; 29: 225–229.

THAN, M. & SZABO, B. **Analysis of the function of GABAB receptors on inhibitory afferent neurons of Purkinje cells in the cerebellar cortex of the rat.** *Eur. J. Neurosci.* 15: 1575 –1584, 2002.

TIEMEIER, H.; LENROOT, R.K.; GREENSTEIN, D.K.; TRAN, L.; PIERSON, R.; GIEDD, J.N. **Cerebellum development during childhood and adolescence: A longitudinal morphometric MRI study.** *NeuroImage.* 2010; 49: 63–70

TEIXEIRA, F. B., SANTANA, L. N. D. S., BEZERRA, F. R., DE CARVALHO, S., FONTES-JÚNIOR, E. A., PREDIGER, R. D., ... LIMA, R. R. **Chronic Ethanol Exposure during Adolescence in Rats Induces Motor Impairments and Cerebral Cortex Damage Associated with Oxidative Stress.** *PLoS ONE*, 9(6), e101074, 2014.

TO, K. O. E., OKUNAGA, H. I. T., & AGASHIMA, K. A. N. **An Autopsy Case of Minamata Disease (Methylmercury Poisoning)—** *Pathological Viewpoints of Peripheral Nerves*, 30(6), 714–722, 2002.

TURNER CJ, BHATNAGAR MK, YAMASHIRO S. **Ethanol potentiation of methyl mercury toxicity: a preliminary report.** *J Toxicol Environ Health*; 7: 665-668, 1981.

UHART, M.; WAND, G.S. **Stress, alcohol and drug interaction: an update of human research.** *Addict Biol.*; 14: 43-64, 2009.

UNEP (United Nations Environment Programme). Module 3: **Mercury Use in Artisanal and Small Scale Gold Mining**, 2008. Disponível: http://www.unep.org/hazardoussubstances/Portals/9/Mercury/AwarenessPack/English/UNEP_Mod3_UK_Web.pdf [acessado 3 Junho de 2015].

UNEP (United Nations Environment Programme). **Reducing Mercury Use in Artisanal and Small-Scale Gold Mining: A Practical Guide**, 2012. Disponível: http://www.unep.org/hazardoussubstances/Portals/9/Mercury/Documents/ASGM/Techdoc/UNEP%20Tech%20Doc%20APRIL%202012_120608b_web.pdf [acessado 3 Junho de 2015].

UNEP (United Nations Environment Programme). **Global Mercury Assessment 2013—Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport**, 2013a. Disponível: <http://www.unep.org/PDF/PressReleases/GlobalMercuryAssessment2013.pdf> [acessado 3 Junho de 2015].

UNEP (United Nations Environment Programme). **Mercury—Time to Act**. 2013c. Disponível: http://www.unep.org/PDF/PressReleases/Mercury_TimeToAct.pdf [acessado 3 Junho de 2015].

VAN SKIKE, C.E.; BOTTA, P.; CHIN, V.S.; TOKUNAGA, S.; MCDANIEL, J.J.; VENARD, J.; DIAZ-GRANADOS, J.L.; VALENZUELA, C.F.; MATTHEWS, D.B. **Behavioral effects of etanol in cerebellum are age dependente: potential system and molecular mechanisms**. *Alcohol Clin Exp Res*. 34: 2070-2080, 2010.

VENGELIENE, V.; BILBAO, A.; MOLANDER, A.; SPANAGEL, R. **Neuropharmacology of alcohol addiction**. *British Journal of Pharmacology*. 154: 299–315, 2008.

VIEIRA, H. C., MORGADO, F., SOARES, A M. V. M., & ABREU, S. N. **Real and Potential Mercury Accumulation in Human Scalp of Adolescents : A Case Study**, 19–27, 2015.

VOOGD J, RUIGROK TJ. **The organization of the corticonuclear and olivocerebellar climbing fiber projections to the rat cerebellar vermis**, 2004.

VOOGD, J., GLICKSTEIN, M. **The anatomy of the cerebellum**, 1998.

WAGNER, G. e ANDRADE, A. **Uso de álcool, tabaco e outras drogas entre estudantes universitários brasileiros**. *Rev. Psiquiatria Clínica*, v.35, n.1, p.48-54, 2008.

WEI, L., XU, Z., DENG, Y., XU, B., WEI, Y., & YANG, T. **Protective effects of memantine against methylmercury-induced glutamate dyshomeostasis and oxidative stress in rat cerebral cortex**. *Neurotoxicity Research*, 24(3), 320–337, 2013.

WEISS, B.. **Why Methylmercury Remains a Conundrum 50 Years after Minamata**, *TOXICOLOGICAL HIGHLIGHT* 97(2), 223–225, 2007.

WEISS, J., TAYLOR, G.R., ZIMMERMANN F., NEBENDAHL, K.. **Collection do Body Fluids, In The Laboratory Rat** (ed. Krinke, G.J.), pp. 485-510. Academic Press: London. 2000.

WHITE, A. M., TRUESDALE, M. C., BAE, J. G., AHMAD, S., WILSON, W. A., BEST, P. J., & SWARTZWELDER, H. S. **Differential effects of ethanol on motor coordination in adolescent and adult rats.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(3), 673–677, 2002.

WILKIE, M.B.; BESHEER, J.; KELLEY, S.P.; KUMAR, S.; O'BUCKLEY, T.K.; MORROW, A.L.; HODGE, C.W. **Acute ethanol administration rapidly increases phosphorylation of conventional protein kinase C in specific mammalian brain regions in vivo.** *Alcohol Clin. Exp. Res.* 31: 1259 –1267, 2007.

WOLLE, C. C.; et al. **Differences in drinking patterns between men and women in Brazil.** *Rev Bras Psiquiatr.* v. 33, n. 4, p. 367-373, 2011.

Xu B.; Xu Z.F.; Deng Y.; Liu W.; Yang H.B. e Wei Y.G. **Protective effects of MK-801 on methylmercury-induced neuronal injury in rat cerebral cortex: Involvement of oxidative stress and glutamate metabolism dysfunction.** *Department of Environmental Health, School of Public Health*, v. 300: 112 -120, 2012.

XERRI, C.; COQ, J.O.; MERZENICH, M.M.; JENKINS, W.M. **Experience-induced plasticity of cutaneous maps in the primary somatosensory cortex of adult monkeys and rats.** *Journal of Physiology Paris.* 90 (3-4): 277-287; 1996.

YAMAMOTO, M.; WADA, N.; KITABATAKE, Y.; WATANABE, D.; ANZAI, M.; YOKOYAMA, M.; NAKANISHI, S. **Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain.** *The Journal of neuroscience*, 23(17), 6759-6767. 2003.

YANG, T., XU, Z., LIU, W., XU, B., DENG, Y., LI, Y., & FENG, S.. **Alpha-lipoic acid protects against methylmercury-induced neurotoxic effects via inhibition of oxidative stress in rat cerebral cortex.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(1), 157–166, 2015.

YORIFUJI, T., TSUDA, T., INOUE, S., TAKAO, S., & HARADA, M.. **Long-term exposure to methylmercury and psychiatric symptoms in residents of,** 37, 907–913, 2011.

ZOU, J.Y.; CREWS, F.T. **TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by nf kappa b inhibition.** *Brain Res.* 1034: 11–24, 2005.

VIII ANEXOS



PARECER 209-14

Projeto: Efeitos neurocomportamentais, avaliação toxicológica e estresse oxidativo da intoxicação concomitante de Metilmercúrio e Etanol em ratas adultas

Coordenador: Cristiane do Socorro Ferraz Maia

Área Temática: Neurociências

Vigência: 04/2014 a 03/2016

Nº no CEPAE-UFPA: 209-14

os)

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação é de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1032/2014 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (N= 60, ratos Wistar) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 02 de abril de 2014

Wallace Gomes Leal
 Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
 Presidente do CEPAE-UFPA