



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR**

**Estudo das respostas comportamentais decorrentes
da exposição combinada de etanol
e metilmercúrio no sistema nervoso
em desenvolvimento**

Cristiane do Socorro Ferraz Maia

**BELÉM-PA
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cristiane do Socorro Ferraz Maia

**Estudo das respostas comportamentais decorrentes
da exposição combinada de etanol
e metilmercúrio no sistema nervoso
em desenvolvimento**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociências

Orientadora: **Profa. Dra. Vania Maria Moraes Ferreira.**

**BELÉM-PA
2005**

ORIENTADORA

Prof. Dra. VÂNIA MARIA MORAES FERREIRA

Os resultados aqui apresentados nesta Dissertação de Mestrado foram obtidos no Laboratório de Neurofarmacologia, Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, em um trabalho de parceria com o Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Cristiane do Socorro Ferraz Maia

Estudo das respostas comportamentais decorrentes da exposição combinada de etanol e metilmercúrio no sistema nervoso em desenvolvimento

Dissertação aprovada pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará. A comissão examinadora foi formada pelos professores:

Profa. Dra. Vania Maria Moraes Ferreira (orientadora)
Departamento de Fisiologia

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento
Departamento de Fisiologia

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
Departamento de Fisiologia

Prof. Dr. José Luiz Vieira
Departamento de Deontologia e Medicina Legal

Belém-PA, 21 de fevereiro de 2005

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Deus, por me permitir vivenciar este momento.
- ✓ À minha família, pela compreensão nas ausências.
- ✓ À Prof. Dra. Vânia Maria Moraes Ferreira por tudo que intelectualmente hoje sou, por ensinar-nos exemplificando sempre a palavra dedicação.
- ✓ À toda equipe do Biotério Setorial da UFPA pela atenção voltada ao cuidado com nossos animais experimentais.
- ✓ Aos Profs. Dr. Cristóvam Wanderley Picanço-Diniz e Dr. José Luiz Martins do Nascimento pelas oportunidades dadas em nos permitir estender essa pesquisa além do aspecto comportamental.
- ✓ Ao Prof. Dr. José Luiz Vieira pelas dosagens mercuriais.
- ✓ Ao Instituto Renato Chaves pelas dosagens alcoólicas.
- ✓ Ao Laboratório de Psicobiologia pela possibilidade de executarmos os experimentos de memória naquela área.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Instituto Evandro Chagas, em especial ao Diretor Edivaldo Carlos Brito Loureiro, Dr. Reinaldo de Amorim Carvalho, Adevaldo da Silva Elleres e Raimundo Bahia Pantoja pelo fornecimento dos animais experimentais utilizados nesta Dissertação de Mestrado. Nosso muito obrigado pela excelência e dedicação em suas atividades.

*“Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz! onde
houver ódio que eu leve o amor; onde houver ofensa que
eu leve o perdão; onde houver discórdia que eu leve a
união;...onde houver trevas que eu leve a luz!...”*

Oração de São Francisco de Assis.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS..... | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xii |

| | |
|---|-------------|
| RESUMO | xiii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| a. Susceptibilidade aos neurotóxicos..... | 02 |
| b. Qual o interesse em se estudar o EtOH?..... | 04 |
| ❖ Aspectos gerais..... | 04 |
| ❖ Aspectos centrais e comportamentais..... | 06 |
| ❖ Mecanismo de ação..... | 08 |
| c. Qual o interesse em se estudar o MeHg?..... | 10 |
| ❖ Aspectos gerais..... | 10 |
| ❖ Aspectos centrais e comportamentais..... | 12 |
| ❖ Mecanismo de ação..... | 14 |
| d. Por que a associação EtOH+MeHg?..... | 16 |
| | |
| 2. OBJETIVOS..... | 18 |
| | |
| 3. METODOLOGIA..... | 19 |
| Animais..... | 19 |
| Tratamento..... | 19 |
| Análises Comportamentais..... | 19 |
| a) Morbi-mortalidade e pesagens das proles..... | 20 |
| b) Avaliação dos sinais neurológicos | 21 |
| c) Atividade locomotora espontânea | 23 |
| d) Labirinto em cruz elevado..... | 24 |
| e) Nado forçado..... | 25 |
| f) Memória..... | 26 |
| g) Dosagem alcoólica..... | 27 |
| h) Dosagem de mercúrio..... | 28 |
| Análise estatística..... | 30 |
| | |
| 4. RESULTADOS..... | 31 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| a) | Morbi-mortalidade e pesagens das proles..... | 31 |
| b) | Avaliação dos sinais neurológicos | 33 |
| c) | Atividade locomotora espontânea | 34 |
| d) | Labirinto em cruz elevado..... | 35 |
| e) | Nado forçado..... | 37 |
| f) | Memória..... | 38 |
| g) | Dosagens alcoólica e mercurial..... | 39 |
| 5. | DISCUSSÃO..... | 41 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 50 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 52 |
| 8. | ANEXOS..... | 68 |

LISTA DOS QUADROS, FIGURAS E GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – Atividades espontâneas e sinais neurológicos..... | 22 |
| Quadro 2 – Dosagem alcoólica..... | 39 |
| Figura 1 – Teste da atividade locomotora | 23 |
| Figura 2 – Teste do labirinto em cruz elevado..... | 24 |
| Figura 3 – Teste do nado forçado..... | 25 |
| Figura 4 – Teste da esquiva inibitória..... | 26 |
| Figura 5 – Dosagem de mercúrio..... | 29 |
| Gráfico 1 – Morbi-mortalidade..... | 31 |
| Gráfico 2 – Pesagem das proles..... | 32 |
| Gráfico 3 – Atividade locomotora espontânea..... | 34 |
| Gráfico 4 – Avaliação de comportamento de ansiedade | 36 |
| Gráfico 5 – Avaliação da depressão..... | 37 |
| Gráfico 6 – Teste de memória..... | 38 |
| Gráfico 7 – Dosagem mercurial | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--|--|
| Na⁺/K⁺ ATPase | Bomba de sódio/potássio ATPase |
| EtOH | Etanol |
| FBF | Frequência nos braços fechados |
| LCE | Labirinto em cruz elevado |
| Hg⁰ | Mercúrio elementar |
| Hg⁺⁺ | Mercúrio - forma divalente |
| MeHg | Metilmercúrio |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| ppm | Partes por milhão |
| %EBA | Porcentagem de entradas nos braços abertos |
| %TBA | Porcentagem de tempo nos braços abertos |
| GABAA | Receptor ácido gama aminobutírico do subtipo A |
| FAS | Síndrome alcoólico-fetal |
| SN | Sistema nervoso |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNP | Sistema nervoso periférico |
| v.o. | Via oral |

RESUMO

O etanol (EtOH) e suas interações têm sido foco de várias pesquisas, visto que todas essas interações se constituem em sérios problemas de saúde e que, infelizmente, até então, nenhuma terapia eficaz é capaz de tratar, ou mesmo prevenir, os malefícios causados por elas. A exposição fetal concomitante de EtOH e mercúrio tem sido freqüente em algumas regiões do país, tornando-se um sério problema de Saúde Pública, principalmente quando trata-se de mulheres gestantes que são dependentes de álcool e que vivem em áreas de garimpo da Bacia Amazônica. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações comportamentais nas proles resultantes da intoxicação fetal por metilmercúrio (MeHg) em ratos fêmeas que consumiram EtOH durante a gravidez. As análises foram realizadas através de modelos/testes experimentais animais usados para avaliar sinais neurológicos, locomoção, ansiedade, depressão e memória. Para esta pesquisa, ratos fêmeas grávidas receberam EtOH 20% p/v (6,5 g/kg/dia, via oral) durante 21 dias e durante mais 21 dias de amamentação. No 15º dia de gestação, as fêmeas receberam MeHg por via oral, na dose de 8 mg/Kg. Os animais controles receberam água de torneira. Todos os testes comportamentais foram realizados com ratos adultos, 2 meses de idade, n=20 animais/tratamento (10 machos e 10 fêmeas). Os resultados demonstraram que ratos que foram expostos ao EtOH durante o período pré-natal, reduziram a porcentagem de freqüência e do tempo de entradas nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado (LCE), comportamento este sugestivo de resposta ansiogênica. Para este grupo, não foi observado resultado significativo em nenhum outro teste experimental. Os animais expostos ao MeHg durante a vida intra-uterina mostraram o mesmo resultado no teste do LCE, aumentada atividade locomotora e tempo de imobilidade no teste do nado forçado, sugestivo de comportamento depressivo. Não foi observada nenhuma função cognitiva relacionada à memória que fosse considerada estatisticamente significativa, quando comparada ao grupo controle no teste da esQUIVA INIBITÓRIA. A exposição ao EtOH+MeHg não modificou a atividade locomotora e o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, comparado ao grupo controle, entretanto mostrou redução na porcentagem da freqüência e do tempo gasto naqueles braços no teste do LCE. Em conjunto, os resultados sugerem que a intoxicação por EtOH e/ou MeHg no Sistema Nervoso Central em desenvolvimento pode ser um risco para os déficits relacionados à ansiedade, prejuízo na locomoção, depressão e funções neurocognitivas. Há uma possibilidade de que o EtOH possa prevenir algumas das respostas produzidas pelo MeHg, mas o exato mecanismo envolvido neste processo necessita ser considerado para futuras pesquisas.

ABSTRACT

Ethanol (EtOH) and its interactions represent the focus of several researches, due they are serious health problems and there is no effective therapy to treat, or even prevent, the harms caused by them. The EtOH and mercury fetal exposition have had a high frequency in some regions of the country, becoming a serious Health Public problem principally related to the pregnant women that are alcoholics and live at Amazon Bay mining areas. The aim of this study was to examine the behavioral changes resulted from EtOH and methylmercury (MeHg) fetal intoxication in pregnant female rat's offspring. The analysis was made through animal behavioral experimental models/tests to examine neurological sights, locomotion, anxiety, depression and memory. For this research, pregnancy female rats received EtOH 20% w/v (6.5 g/kg per day, by oral route) during 21 days and for more 21 days of breast-feeding. At day 15 of pregnancy, the female rats received 8 mg/kg by oral route of MeHg. The control group received tap water. All the behavioral experiments was made with 2 month old rats, n=20 animals per treatment (10 male and 10 female). The present results showed that the rats that received ethanol during prenatal period, reduced the percentage of frequency and time spent in the open arms entries at the elevated plus maze (EPM) test, suggesting an anxiogenic behavioral response. It was not observed significant result at another animal test for this experimental group. The animals exposed to MeHg during intra-uterine life showed the same result at the EPM test, increased locomotor activity and immobility time at the forced swimming test, suggestive of depression. It was not observed any memory-related cognitive function considered statistically significant, when compared to control group on inhibitory avoidance task. The EtOH+MeHg intoxication did not modify the locomotor activity and the immobility time at the forced swimming test, compared to control group, however it showed a greater reduction at the percentage of frequency and time spent in the open arm entries at the EPM test. Taken together, the results suggests that the EtOH and/or MeHg intoxication during the developing central nervous system may be a risc for a deficits related to anxiety, locomotion impairment, depression and neurocognitive functions. There is a possibility that EtOH may prevents some of the MeHg responses, but the precise mechanism involved in this process needs to be considered for future researches.

1. INTRODUÇÃO

A neurotoxicidade é uma mudança estrutural ou uma alteração funcional do sistema nervoso (SN), resultante da exposição aos agentes químicos, biológicos ou físicos. Em adultos, tem seus efeitos principais no sistema nervoso periférico (SNP) e com menor freqüência no sistema nervoso central (SNC), isto porque este último é protegido pela barreira hematoencefálica, a qual previne a passagem de muitos agentes tóxicos endógenos e exógenos ao cérebro. No entanto, quando se trata do SNC em desenvolvimento, este passa a ser mais vulnerável aos danos por neurotóxicos do que em indivíduos adultos, uma vez que, durante o desenvolvimento fetal e neonatal, o SNC está mais sujeito à influência de fatores ambientais advindos tanto da mãe quanto de fontes extramaternais (Costa e cols., 2004; May, 2000; Philbert e cols., 2000).

Nas últimas décadas, vários estudos realizados, principalmente em roedores, têm fornecido um grande número de informações sobre o desenvolvimento do cérebro (Dobbing e Sands, 1993; Legido e cols., 2004; Rodier, 1994; Smart, 1991), onde estas descobertas podem ser consideradas também para humanos. A idade do desenvolvimento de embriões, ou fetos de ratos e humanos, pode ser comparada entre si, quando os aspectos anatômicos e histológicos nas duas espécies são similares na aparência, ainda que as suas exatas idades cronológicas sejam diferentes (Bayer e cols., 1993).

O entendimento dos efeitos deletérios centrais, de curta ou longa duração, resultantes de qualquer interferência no desenvolvimento cerebral, requer não somente

conhecimento de sua natureza, mas também do órgão no momento em que este sofre a agressão (Rodier, 1980).

A) SUSCEPTIBILIDADE DO CÉREBRO EM DESENVOLVIMENTO AOS AGENTES NEUROTÓXICOS

Diversas partes do SNC são formadas em diferentes fases do desenvolvimento; as estruturas são construídas pela proliferação, migração e uma seqüência de passos chamada diferenciação. A função normal requer um certo número de células em localização correta e cada célula com suas próprias características (Rodier, 1994).

A migração celular é um importante processo que ocorre durante o desenvolvimento cerebral, onde os neurônios atingem um local-alvo. O contato entre essas células é importante para a formação dos circuitos neurais que interagem uns com os outros para integrar todas as funções centrais. Essa circuitaria complexa, que envolve as comunicações entre as células nervosas, é responsável por todas as atividades que ocorrem no SNC. Qualquer interferência com a migração celular, como a que ocorre pela presença de neurotóxicos, pode levar a graves efeitos deletérios no desenvolvimento do cérebro (Barres e Barde, 2000; Legido e cols., 2004; LoPachin e Aschner, 1993; Ransom e cols., 2003).

Os vários estágios de desenvolvimento do cérebro humano, embora apresentem variações na taxa de crescimento entre os diferentes mamíferos, dependem, da duração da gravidez (Bayer e cols., 1993; Passingham, 1985). Pesquisas comprovam que as áreas do cérebro desenvolvem-se em diferentes fases da gestação. Em uma única área cerebral, subpopulações de neurônios progridem em variadas dimensões e tempo. Por exemplo, no cerebelo, células de Purkinje desenvolvem-se muito cedo (rato: 13^o.-15^o. dias embrionário, correspondendo à 5^a.-7^a. semanas em seres

humanos), enquanto células granulares são formadas mais tarde (ratos: 4^o.-19^o. dias pós-natal, correspondendo à 24^a.-40^a. semanas em seres humanos) (Bayer e cols., 1993).

O período da organogênese é marcado por progressivas subdivisões das camadas germinais, resultando na diferenciação rudimentar de órgãos, que poderia representar um estágio particularmente sensível da gravidez a insultos teratogênicos. O período organogênico do desenvolvimento em ratos inclui do 7^o.-14^o. dias gestacionais, que corresponde à 3^a.-8^a. semanas da gravidez humana. Em seguida, os órgãos rudimentares firmados entram em uma etapa de crescimento e diferenciação histológica. Este período pós-organogênico, compreende do 15^o.-19^o. dias gestacionais, em ratos e na gravidez humana, este período pós-organogênico corresponde à 9^a.-26^a. semanas gestacionais (Costa e cols., 2004).

Neste estágio de desenvolvimento, os sistemas orgânicos crescem em tamanho e volume e se tornam maduros em relação às suas funções. Neste período se dá um intenso desenvolvimento do SNC. Durante esta fase, a exposição a determinados neurotóxicos, como por exemplo o etanol (EtOH) e o metilmercúrio (MeHg), pode resultar em retardos do crescimento e anormalidades estruturais cerebrais, que podem ser manifestadas, entre outros aspectos, através das alterações comportamentais (Becker e cols., 1996).

B) QUAL O INTERESSE EM SE ESTUDAR O EtOH?

❖ Aspectos gerais

A dependência ao álcool (em especial o EtOH), conhecida como alcoolismo, é um distúrbio crônico, cuja origem pode ser genética, caracterizada pela tolerância aos efeitos do álcool, controle motor prejudicado, síndrome de abstinência quando há parada ou redução no consumo alcoólico, uso continuado devido as conseqüências

adversas e dificuldade em controlar o consumo em decorrência do grande desejo ou compulsão por aquela droga (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 1994; Tabakoff e Hoffman, 1996; Worst e Vrana, 2005).

Esse distúrbio constitui um dos fenômenos mais freqüentes na população brasileira que consome este tipo de droga, com o primeiro contato, ocorrendo durante a adolescência (Carvalho e cols., 1995; Figlie e cols., 2005). Muita atenção é necessária nesta fase, pelo fato do álcool estimular a utilização de outras substâncias (Duhig e cols., 2005). Essa grande freqüência de consumo se deve, principalmente, pelo volume produtivo, facilidade na aquisição das bebidas alcoólicas e situações que motivam o consumo do álcool no Brasil e no mundo (Anzai e cols., 2005; Clark e cols., 2005; Ham e Hope, 2005; Kuntsche e Kuendig, 2005) .

O Brasil produz maciçamente o álcool – acima de 1 milhão de litros desta droga/ano (cerca de 6,6 litros/pessoa/ano). Esta expressiva produção é, em parte, resultante de um enorme programa de plantio de cana-de-açúcar, que foi criado com o objetivo de gerar uma produção barata de álcool, como um substituto do petróleo para automóveis. Um dos efeitos da superprodução de cana-de-açúcar é a depreciação no preço de bebidas alcoólicas. O litro da cachaça, por exemplo, é cotado a menos de US\$ 2.00, o que favorece o consumo deste destilado mais popular produzido a partir da cana-de-açúcar (Laranjeira, 1996).

Apesar da grande quantidade de informações sobre os efeitos deletérios decorrentes do consumo do uso alcoólico, no Brasil ainda são escassas as pesquisas clínicas relacionadas às implicações da intoxicação intrauterina por esta droga. Os efeitos durante a fase de pré-implantação do zigoto não têm sido extensivamente estudados, possivelmente porque o

estágio pré-organogênico da gravidez tem sido visto, por alguns, como sendo o período menos sensível em relação aos efeitos teratogênicos do EtOH (Becker e cols., 1996).

As conseqüências da exposição ao EtOH no período da pré-organogenese são, algumas vezes negligenciadas, devido culminar em aborto espontâneo ou reabsorção do embrião. Tal fato, porém, deve ser considerado como o mais extremo efeito adverso da exposição gestacional àquela droga, porque culmina com a morte embrionária e finalização da gravidez (Becker e cols., 1996; Burd e Wilson, 2004). Quando esses aspectos mais trágicos não ocorrem, retardos do crescimento e anormalidades estruturais cerebrais, que também acarretam várias alterações centrais e/ou comportamentais, podem se fazer presentes (Blume e cols., 2005, Correia e cols., 2005; Lupton e cols., 2004; Sharps e cols., 2005).

❖ **Aspectos centrais e comportamentais**

A visão geral dos aspectos relacionados ao uso e abuso do álcool e suas associações, principalmente na gravidez, inclui não somente as alterações centrais e/ou comportamentais, mas também outros fatores em conjunto, incluindo os mecanismos moleculares, pelos quais essas associações com outros neurotóxicos, influenciam as proteínas celulares, o que determina a sensibilidade ou resistência ao álcool, e quais ações moleculares são responsáveis por conseqüências relacionadas ao abuso desta droga. Esta pesquisa, entretanto, se restringiu aos aspectos comportamentais.

Entre as principais linhas de pesquisas, que ainda mantém a contribuição de nosso país para novas descobertas relacionadas ao tratamento do distúrbio tão complexo como o alcoolismo, incluem-se a interferência do álcool na tolerância à

incoordenação motora, hipotermia; ansiólise; efeitos reforçadores; estimulação locomotora, sensibilização produzida pela associação do álcool e outras drogas (Barreto e cols., 1998; Blatt e Takahashi, 1999; Carreño e cols., 1997; Gevaerd e cols., 1999; Morato e cols., 2004) e problemas associados à Síndrome Alcoólica-Fetal (FAS) (Grinfeld e cols., 1999).

A FAS provoca sérios problemas ao recém-nascido e ao longo do desenvolvimento, além de aumentar o estresse oxidativo sistêmico fetal, devido a ingestão de álcool por mães grávidas (Gauthier e cols., 2005; Leutwyler e cols., 2004; Wilmott, 2004). As características mais debilitantes são mortalidade ainda na vida intrauterina ou graves problemas de desenvolvimento, anormalidades faciais, pequenas fissuras palpebrais, microencefalia e alterações comportamentais, tais como hiperatividade, disfunção motora, déficit de atenção, aprendizagem e memória (Abel, 2004; Floyd e Sidhu, 2004; Lee e cols., 2004). Mesmo crianças que não apresentavam FAS, mas que foram expostas ao álcool no período pré-natal, apresentaram déficits de memória e aprendizado verbal (Neese e cols., 2004; Willford e cols., 2004). Em conjunto, todos esses fatores formam um conhecido e sério problema no tratamento do alcoolismo. Sabe-se que a mulher sendo consumidora freqüente desta droga, ela não muda seus hábitos durante a gravidez (Thomas e Riley, 1998).

Em estudo realizado com porcos-da-índia, a exposição pré-natal ao EtOH resultou em crescimento hipocampal restrito, aumento da atividade locomotora espontânea, déficit na aprendizagem espacial, aumento da expressão de proteínas das subunidades dos receptores ácido gama-aminobutírico (GABA_A) e alteração da modulação de neuroesteróides, dando suporte à hipótese de que a exposição pré-natal ao álcool pode, a longo prazo, produzir mudanças nos sistemas dos receptores

hipocampais, que pode ser um importante fator no déficit da aprendizagem e memória (Iqbal e cols., 2004).

As ações do álcool no cérebro são muito mais complexas do que as citações aqui relatadas, haja vista a diversidade de áreas e diferentes neurotransmissores que são afetados por esta droga (Eckardt e cols., 1998; Guizzetti e Costa, 2005; Valenzuela e cols., 1998). Essas ações, provavelmente, podem ser alteradas por vários mecanismos de ação que, no passado, pareciam difíceis de ser identificados, quanto aos seus efeitos específicos (Blednov e cols., 2005; Valenzuela, 1997).

❖ **Mecanismos de ação**

O EtOH pode passar livremente através da bicamada lipídica das células e afetar vários alvos celulares, incluindo receptores GABA_A, N-metil-D-aspartato (NMDA), glicina, nicotínicos neuronais e serotoninérgico 5-HT₃ (Jung e cols., 2005; Valenzuela, 1997; Valenzuela e cols., 1998) afetando conseqüentemente seus ligantes (Kolb e cols., 2005). Estudos têm indicado que a proteína cinase C é afetada pela exposição a esta droga (MacDonald, 1995), levando à mudança na expressão ou funcionamento dos canais dependentes de cálcio (Walter e cols., 2000) e canais iônicos de ligantes (Costa e cols., 2000). Há também o aumento dos níveis de AMP cíclico e da atividade da proteína quinase A que são necessárias para o EtOH potencializar as correntes Gabaérgicas (Davies, 2003).

Os receptores GABA_A são importantes alvos farmacológicos para os efeitos do EtOH no SNC e parecem ocupar um lugar central na mediação desses efeitos (Dodd e cols., 2004; Mehta e Ticku, 2005). Este mecanismo parece ser o responsável por disparar neurodegeneração por apoptose em diversas áreas do encéfalo em

desenvolvimento. Segundo Ikonomidou e cols. (2000), esta vulnerabilidade coincide com o período de sinaptogênese, que em humanos se estende desde o sexto mês de gestação até vários anos após o nascimento. Durante este período, a exposição transitória àquela droga poderia promover a morte de milhões de neurônios no cérebro em formação, o que ajudaria a explicar a massa cerebral reduzida e os distúrbios neurocomportamentais associados com a FAS (Davies, 2003; Olney, 2004).

O mecanismo pelo qual a cascata apoptótica se inicia através da ativação dos receptores GABA_A é desconhecido, mas uma ligação entre esses receptores e o influxo de cálcio, através de canais de cálcio do tipo L dependentes de voltagem, tem sido mostrada em um modelo de sistema composto de proliferação de células precursoras neurais (Ma e cols., 2001; Hsiao e cols., 2004).

Em cérebros adultos, drogas gabamiméticas têm efeitos diferenciados do que naqueles em desenvolvimento. Essas drogas protegem cérebros adultos contra neurotoxicidade por excitotoxicidade das drogas antagonistas NMDA (Farber e cols., 2004; Ishimaru e cols., 1995; Kim e cols., 1999; Olney e cols., 1991) enquanto em cérebros em desenvolvimento, as drogas gabamiméticas agem em consenso com drogas antagonistas NMDA para produzir respostas aditivas de neurodegeneração apoptótica (Ikonomidou e cols., 2000). Esses pesquisadores relataram que o EtOH parece agir durante o neurodesenvolvimento através de um mecanismo dual, que envolve o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e ativação excessiva de receptores do tipo GABA_A.

Estudos demonstram que o funcionamento normal dos canais iônicos, glutamatérgicos ou gabaérgicos, é crítico para o crescimento, proliferação, diferenciação, migração, plasticidade e morte celular programada de neurônios

(Ebralidze e cols., 1996; Forrest e cols., 1994; Iwasato e cols., 1997). Existem evidências que indicam que os canais iônicos cerebrais dos fetos ou neonatos, que sofreram exposição ao EtOH na gravidez são afetados, podendo gerar mau funcionamento cerebral (Costa e cols., 2000). Os efeitos do EtOH, do MeHg ou de ambos, sobre estas proteínas fetais podem afetar o neurodesenvolvimento normal e, assim, gerar conseqüências para o resto da vida do indivíduo.

C) QUAL O INTERESSE EM SE ESTUDAR O MeHg?

❖ Aspectos gerais

O mercúrio é um metal pesado, que pode se apresentar sob 3 formas: o mercúrio elementar (Hg^0 - também conhecido como mercúrio metálico), compostos de mercúrio inorgânico (principalmente cloreto de mercúrio) e mercúrio orgânico (principalmente MeHg) (Counter e Buchanan, 2004). Esta última forma pode ser absorvida por inalação, pele e trato gastrointestinal. A inalação do vapor é a rota mais importante de contaminação pelo Hg^0 , uma vez que aproximadamente 80% do que é inalado ficam retidos nos alvéolos, passam para a circulação sanguínea e é rapidamente oxidado para a forma divalente (Hg^{++}) (Cherian e cols., 1978; Teisinger e Fiserova-Bergerova, 1965).

O MeHg, quando ingerido, é quase totalmente absorvido pelo trato gastrointestinal (em torno de 95%), estendendo-se aos outros tecidos em apenas quatro dias. Ele é lentamente desmetilado a mercúrio inorgânico, principalmente através de macrófagos da flora intestinal e enzimas do fígado fetal, através de mecanismos ainda desconhecidos (Counter e Buchanan, 2004).

A partir de estudos em animais e no homem, constatou-se que o mercúrio circulante se acumula em vários órgãos, principalmente no SNC, nos rins, na tireóide, na hipófise, no fígado, no pâncreas, nos testículos, nos ovários e na próstata. Este perfil de distribuição pode ser sintetizado como uma preferência por órgãos de origem ectodérmica e células epiteliais de uma forma geral. Os rins são os principais órgãos de depósito de mercúrio, após exposição a sua forma elementar e seus sais inorgânicos, encontrando-se neles 50% a 90% do total depositado nos tecidos (WHO, 1991). De acordo com Counter e Buchanan (2004), 50% do MeHg ingerido é encontrado no fígado, e 10% no SNC.

A maior fração do MeHg ingerida é excretada na urina (10%) e fezes (90%) como um complexo glutationa-MeHg (Norseth e Clarkson, 1970; Rowland e *cols.*, 1980) e 16% do mercúrio excretado no leite materno está na forma de MeHg (Counter e Buchanan, 2004). Uma parte deste MeHg presente na bile pode sofrer recirculação hepato-biliar, prolongando a meia-vida biológica (alcançando dois meses) desse composto no organismo, o que é dependente da espécie do mercúrio, da dose de contaminação, do tipo de animal e do sexo (Counter e Buchanan, 2004; Dutczak e *cols.*, 1991).

O mercúrio representa um grave problema ambiental devido a sua bioacumulação na cadeia alimentar aquática, criando, como consequência, um risco elevado de exposição em baixas doses por um longo tempo (Berlin, 1986; Knobeloch e *cols.*, 2005). A principal fonte da exposição materna ao mercúrio orgânico, na forma de MeHg, é o consumo de peixes (Knobeloch e *cols.*, 2005). A exposição fetal, por sua vez, é o resultado do consumo materno de peixes, inalação de vapores de mercúrio e o uso de cremes tópicos que contém este metal (Counter e Buchanan, 2004). Quando a contaminação ocorre durante o desenvolvimento, os níveis no SNC são muito maiores, trazendo sérias consequências centrais e comportamentais (Gutknecht, 1981).

❖ **Aspectos centrais e comportamentais**

O MeHg é um neurotóxico que pode interferir no desenvolvimento do feto. É transportado pelos eritrócitos (90%), com uma pequena fração ligada a proteínas do plasma. Por ser lipossolúvel, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e placentária, acumulando-se no SNC e no embrião (Counter e Buchanan, 2004; Lackowicz e Anderson, 1980), sendo que no SN do feto é possível encontrar maiores concentrações que no da mãe (Feng e cols., 2004).

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

Estudos realizados em grupos de crianças nas Ilhas Seychelles e Faroe, observou-se a ocorrência de diversos tipos e graus de disfunções e déficits neuropsicológicos que poderia estar associada com a exposição

intrauterina a baixas doses de MeHg (Bertossi e cols., 2004; Grandjean e cols., 1997, 1998) e as crianças apresentavam sérias complicações de memória, atenção, déficits na linguagem e percepção visual-espacial (Counter e Buchanan, 2004; Grandjean e cols., 1997). Com níveis altos de MeHg, entretanto, observou-se a perda de neurônios em cada lobo cerebral e efeitos no desenvolvimento, como reflexos de hiperatividade, surdez, cegueira, paralisia cerebral, deficiência mental e paralisias gerais (Amin-Zaki e cols., 1974; Tsubaki e Irukayama, 1977).

De acordo com Bertossi e cols. (2004), o dano celular no cerebelo de embriões tratados com MeHg subsidia a afirmação que esse neurotóxico exerce sua ação nas populações neuronais e gliais, através de um ou mais mecanismos. Alguns mecanismos dos danos causados pelo MeHg têm sido propostos, com possíveis relevâncias. A interferência observada do MeHg no movimento neuronal e diferenciação celular, pode ser resultado do impedimento da repolarização e formação dos microtúbulos (Castoldi e cols., 2001; Clarkson, 1993; WHO, 1990). Os efeitos na migração neuronal em culturas de células revelam cessação do movimento celular a 10 μMol de MeHg (Costa e cols., 2004). Apesar das fortes evidências da neurotoxicidade, os exatos mecanismos pelos quais o dano ao SNC ocorre, precisam ser elucidados.

❖ **Mecanismos de ação**

Vários são os alvos celulares e moleculares da exposição ao MeHg no SN, incluindo barreira hematoencefálica; citoesqueleto; transporte axonal; produção, secreção, captação e metabolismo dos neurotransmissores; sinalização celular; síntese de proteínas, DNA e RNA; sistemas respiratórios e geração de energia (Counter e Buchanan, 2004; Shafer e *cols.*, 2002).

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

O aumento da liberação espontânea de neurotransmissor, observado no início da exposição ao MeHg, parece depender do aumento da concentração intracelular de cálcio, a partir da liberação deste íon por organelas intracelulares e não apenas pela sua entrada através da membrana plasmática, uma vez que o aumento da concentração extracelular de cálcio e o bloqueio dos canais de cálcio da membrana plasmática não previnem completamente esse efeito (Atchison, 1986; Atchison e Narahashi, 1982; Miyamoto, 1983).

O MeHg também inibe a recaptação do neurotransmissor ou de seus precursores pelo botão sináptico (Levesque e *cols.*, 1992; O'Kursky, 1989). Este efeito

parece ser devido ao comprometimento da bomba de Na^+/K^+ ATPase e, portanto, à diminuição do gradiente eletroquímico criado por esta enzima, necessário ao funcionamento dos transportadores de neurotransmissores da membrana plasmática (Rajanna e Hobson, 1985). Em ratos adultos o MeHg se acumula nos astrócitos, interferindo na captação de glutamato, resultando em altas concentrações do neurotransmissor no meio extracelular perturbando a homeostase neuronal (Costa e cols., 2004; Juarez e cols., 2005).

É bem conhecido que os astrócitos têm um papel ativo no desenvolvimento e função do SNC, que por haver a presença de junções do tipo *gap*, há um trabalho funcional que mantém a composição fisiológica do fluido extracelular que, entre outras funções, preserva os neurônios da excitotoxicidade mediada pelo glutamato, que tem sua recaptção inibida pelo MeHg (Juarez e cols., 2005). A redução de astrócitos diante da contaminação pelo MeHg, pode ser resultante mais do prejuízo de suas células precursoras, do que da degeneração da astróglia. (Aschner e Kimelberg, 1996; Barres e Barde, 2000; Ransom e cols., 2003).

Finalmente, sabe-se que o MeHg também afeta a transmissão sináptica através do comprometimento funcional das enzimas de síntese de neurotransmissores (Omata e cols., 1982; Tsuzuki, 1981). Esta resposta deve-se à sua grande afinidade por ligantes contendo grupos tióis, de tal forma que ele inativa as enzimas com grupos sulfidril, assim comprometendo o metabolismo celular, a síntese de neurotransmissores, a transmissão sináptica, a homeostase de íons e a síntese proteica, assim como todos fenômenos dependentes de enzimas alvos deste neurotóxico (Atchinson e Hare, 1994; Feldman, 1999).

D) QUAL O INTERESSE EM SE ESTUDAR A ASSOCIAÇÃO EtOH x MeHg?

Muito embora a toxicidade desses dois compostos isolados seja bem estudada, a interação entre eles não é bem entendida. Entre os resultados encontrados, foram observados os efeitos do EtOH quanto à morbimortalidade e distribuição do mercúrio nos tecidos de ratos tratados oralmente com dose diária de 5 mg/kg de MeHg, por 10 dias consecutivos. O EtOH potencializou a toxicidade do MeHg quanto as manifestações neurológicas e mortalidade (Tamashiro e *cols.*, 1986). Além disso, essa associação levou inicialmente a um ganho, seguida de uma perda, dos pesos corporais de ratos que apresentaram intensa ataxia (Turner e *cols.*, 1981).

Os efeitos do cloreto de MeHg no metabolismo do EtOH também aparece como alvo de pesquisa. Dose diária de 10 mg/kg do primeiro neurotóxico, dado intraperitonealmente por dois dias consecutivos e 0,4 g/kg do segundo, dado intravenosamente, 24 hs após o pré-tratamento, mostrou que o MeHg teve pouca influência no metabolismo do EtOH devido as suas ligações não-específicas com grupo sulfidril no organismo (Ohmiya e Nakai, 1977). As associações dessas substâncias também foram investigadas quanto à função e histologia renal, onde a nefrotoxicidade ficou mais evidente nos animais que receberam a associação das substâncias do que naqueles que receberam as drogas isoladas (Rumbeiha e *cols.*, 1991, 1992). Esses resultados, entretanto, não foram observados por outros pesquisadores (Turner e *cols.*, 1990), enquanto outros tentam entender outros aspectos dessas interações (McNeil e *cols.*, 1988; Sano e *cols.*, 1990)

Uma vez que o EtOH é um agente neurotóxico amplamente consumido, seria importante desenhar estudos que visem examinar os efeitos da administração combinada com MeHg no desenvolvimento do SN em ratos, principalmente porque a literatura sobre essa interação é bastante escassa. Os estudos, aqui propostos,

pretendem colaborar no sentido de preencher esta lacuna, investigando possíveis interações toxicocinéticas entre os dois elementos que levem a um aumento ou, até mesmo, diminuição de seus efeitos isolados.

Outro interesse em investigarmos a interação EtOH x MeHg é regional. A Amazônia Brasileira possui muitos garimpos, em cujas áreas a população tem crescido consideravelmente em decorrência da busca pelo ouro. É sabido que nessas regiões, o consumo de bebidas alcoólicas é elevado, assim como é grave também o problema da contaminação ambiental pelo mercúrio, utilizado na amalgamação durante o processo de extração do ouro (Bisinoti e Jardim, 2004; Brabo e cols., 2000; Dorea, 2003; Harada e cols., 2001). Mulheres grávidas que vivem nessas áreas, e que consomem bebidas alcoólicas, expõem os filhos à mortalidade na vida intrauterina ou a problemas futuros graves de desenvolvimento e alterações comportamentais, tais como hiperatividade, disfunção motora, déficit de atenção e aprendizagem (Costa e cols., 2004; Satoh, 2003).

A questão central nesta pesquisa, portanto, é avaliar os efeitos da exposição a dois neurotóxicos, EtOH e MeHg, no SN em desenvolvimento. Dado que os efeitos da exposição de longa duração à drogas, produzidos em animais são similares aqueles em humanos, então os resultados deste trabalho podem ser de grande valia para compreender como a interação a esses neurotóxicos produz diferentes respostas comportamentais.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral: Analisar as respostas comportamentais decorrentes da exposição combinada do EtOH e MeHg durante o desenvolvimento do sistema nervoso.

Objetivos Específicos

- ✓ Observar os vários sinais e sintomas neuronais decorrentes dos efeitos do EtOH e/ou MeHg, nas proles de ratas intoxicadas com essas substâncias durante a gravidez.
- ✓ Verificar as respostas comportamentais de alteração locomotora, ansiedade, depressão e memória dos ratos adultos que foram submetidos à contaminação aos dois neurotóxicos, durante o desenvolvimento embrionário.

3. METODOLOGIA

ANIMAIS: Ratos Wistar, machos e fêmeas (20 casais), com 3 meses, provenientes do Instituto Evandro Chagas, foram mantidos no Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, em condições padronizadas e, de acordo com as possibilidades, procurou-se seguir algumas das recomendações para criação e uso de

animais para atividades de ensino e pesquisa, constantes no Capítulo V da Lei 1153, de 1995 (que revoga a lei 6638, de 8 de maio de 1979), decretada pelo Congresso Nacional (ver anexos, páginas 68-77).

TRATAMENTO: Tão logo foi detectada a gravidez nas fêmeas (através da observação de tampões na região vaginal), as que pertenciam aos grupos EtOH (5 fêmeas) e EtOH+MeHg (5 fêmeas) foram tratadas com 6,5 g/kg de álcool (20% p/v) por 21 dias de gestação e mais 21 dias de amamentação. Os animais controles (5 fêmeas) receberam água de torneira. No 15^o dia da gravidez, as fêmeas dos grupos MeHg (5 fêmeas) e EtOH+MeHg receberam, por via oral (v.o.), dose única de 8 mg/kg de MeHg. As doses de EtOH (Maier e West, 2001) e de MeHg (Zanoli e cols., 2001; Baraldi e cols., 2002) foram baseada na literatura e em resultados pilotos realizados em nosso Laboratório de Neurofarmacologia.

ANÁLISES COMPORTAMENTAIS: Após o nascimento, as proles foram mantidas com a mãe até o 21^o dia (desmame), sendo então separada por sexo e grupo experimental (controle, EtOH, MeHg, e EtOH+MeHg), contabilizando um total de 40 ratos machos e 40 ratos fêmeas (sendo 10 ratos de cada sexo por tratamento). Ao atingir 2 meses de idade, todos foram testados quanto a atividades espontâneas, sinais neurológicos e comportamento de auto-limpeza, atividade locomotora, seguida dos testes para avaliar a ansiedade (labirinto em cruz elevado (LCE)), depressão (teste do nado forçado) e memória (teste da esQUIVA inibitória). Para maior homogeneização dos dados, os resultados dos machos e das fêmeas foram agrupados.

a) Morbi-mortalidade e Pesagens das proles

A morbi-mortalidade caracteriza-se por morte após nascimento e/ou doença congênita. Foi avaliada levando-se em consideração o número de bebês que eram gerados pela quantidade de bebês mortos (e/ou com aparência de alguma doença em que, geralmente, os mesmos sempre morriam). Os cuidados observados para se verificar o número exato de bebês implicava na procura, por entre a serragem, na manhã seguinte ao nascimento, de possíveis natimortos.

Como a maioria das proles nascia durante a noite, a primeira pesagem era sempre efetuada na manhã seguinte. Todos os bebês eram retirados, individualmente, de suas caixas pelo pesquisador, com os devidos cuidados de ter as mãos calçadas com luvas, para evitar o contato direto dos animais com as mãos e evitar rejeição, posteriormente, pelas mães. A seguir, eram transferidos para uma balança previamente forrada com toalhas de papel, para favorecer uma condição de conforto aos recém-nascidos. As pesagens eram feitas a cada 5 dias, finalizando essa etapa no 20º. dia. No 21º. dia, final da etapa do desmame, as sexagens (separação por sexo) eram realizadas para evitar o cruzamento entre os machos e fêmeas da mesma linhada. A seguir, os animais eram mantidos agrupados. Uma única pesagem foi realizada na fase adulta, que se deu exatamente aos 2 meses, antes da realização dos testes comportamentais.

b) Avaliação das atividades espontâneas e sinais neurológicos

Essas observações foram realizadas somente na fase adulta. Foram as primeiras avaliações realizadas, para evitar que possíveis estresses, decorrentes das posteriores etapas experimentais, viessem a interferir nas análises, constituindo resultados falso-positivos. Para isso, dois observadores que não tinham conhecimento prévio a que grupo pertencia cada animal, trabalhavam com duas planilhas em

separado. Essa era uma forma de, no final das avaliações, uma análise comparativa ser realizada com mais precisão.

Os animais foram mantidos isolados, em caixas apropriadas, por um prazo mínimo de 1h, para que todas as avaliações não pudessem ser mascaradas pela presença de outros animais, caso continuassem agrupados. Somente uma pessoa (não os avaliadores), tinha conhecimento a que grupo pertencia cada animal, através de etiquetas com numerações aleatórias colocadas sobre as verdadeiras etiquetas que identificavam cada caixa. No final, as corretas identificações eram concedidas aos avaliadores. Em seguida, os animais eram novamente agrupados.

As análises foram realizadas através de escores (0-3), baseadas em uma versão modificada de Lal e cols. (1988), conforme o quadro 1. Os *comportamentos espontâneos*, incluindo atividade geral, espasmos, sacudidas, contorções e tremores na cabeça, foram observados durante 15 seg. As *respostas ao manuseio*, incluíram vocalização e esquiva. Os *sinais neurológicos* foram observados baseados nos tremores gerais e convulsões. Foi também levada em consideração nas avaliações a *ausência do comportamento de auto-limpeza*, observada pela presença de partes sujas com urina, fezes ou alimentos, que poderiam proporcionar coloração e manchas nos pêlos dos ratos.

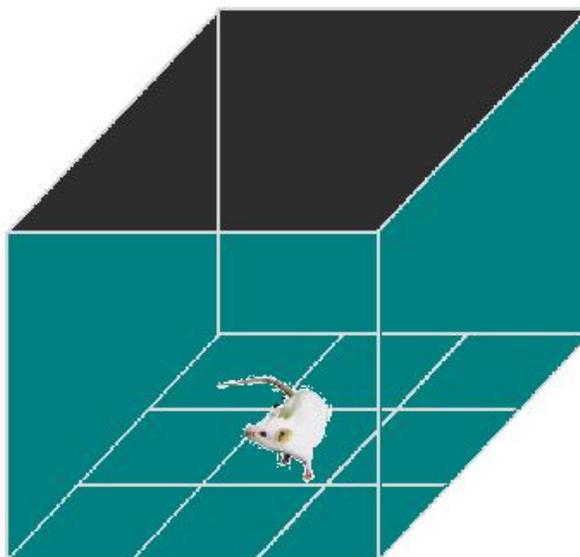
Quadro 1 – Atividades espontâneas, resposta ao manuseio e sinais neurológicos, de acordo com escala modificada de Lal e cols. (1988).

| ATIVIDADE ESPONTÂNEA AVALIADA 15 SEG ANTES DO MANUSEIO | | | | |
|--|-------------|---------------|---------------------|------------------------------|
| | Escores | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Atividade geral | Imobilidade | Sem locomoção | Locomoção ocasional | Locomoção contínua ou rápida |
| Espasmos, sacudidas e contorções | | Uma vez | Duas ou mais | Graves ou Continuados |

| | | | | |
|---|-----------------------------------|---|--|---|
| Tremores na cabeça | | Movimentos fásicos da cabeça e vibração das vibrissas | Maior que o normal | Tremores graves ou contínuos |
| RESPOSTA AO MANUSEIO | | | | |
| Vocalização | Sem som | Um som de baixa intensidade | Vocalização alta | Vocalizações altas, repetitivas e contínuas no início do manuseio |
| Esquiva | | Esquiva rápida | Move-se p/ trás da gaiola e emite movimentos evasivos | Pressiona o corpo firmemente contra a parede de trás da gaiola |
| SINAIS NEUROLÓGICOS | | | | |
| Rigidez dos músculos axiais por palpação | Flácido | Tônus muscular normal | Tensão elevada | Rigidez |
| Tremor na cauda | Flácida | Tensão normal | Tremores e rigidez | Rigidez e sacudidas |
| Tremores gerais | | Normal | Tremor | Tremores constantes |
| Tarefas motoras | O rato cai imediatamente na caixa | Descida suave | Descida incoordenada | Gasta mais que 5 seg para descer |
| Postura de apoio sobre as patas | Corpo relaxado | Sentar normal, agachado ou apoiado nas 4 patas | Patas afastadas | Corpo abaixado e patas posteriores estendidas |
| Convulsões | | nenhuma | Clonus das patas anteriores e tremores de todo o corpo | Convulsões tônico-clônicas |
| Tremores ao levantar o animal pela cauda | | Tremores das patas anteriores ao girar 180° | Tremores e extensão das patas anteriores ao girar 180° | Tremores e extensão das patas anteriores sem girar 180° |
| OUTROS | | | | |
| Ausência do comportamento de autolimpeza | Limpo | Cor alaranjada | Uma parte suja com urina, fezes ou alimentos. | Mais que uma parte suja |

c) Atividade locomotora espontânea

A atividade locomotora foi avaliada 24h após a avaliação das atividades espontâneas, respostas ao manuseio, sinais neurológicos e ausência de comportamento de auto-limpeza. Para este teste, foi utilizada uma arena em madeira (60x60x35 cm), onde o chão foi dividido em 9 quadrantes (figura 1). Antes do início dos experimentos, os animais foram levados ao laboratório por um período de, no mínimo, uma hora para aclimação e habituação ao ambiente do teste. Não foi considerada atividade locomotora quando o animal colocava uma, duas ou três patas em um dos quadrantes, com retorno ao quadrante original. Cada animal foi testado individualmente por um período de 5 min. Todos os experimentos foram conduzidos entre 8:00 e 12:00 h, com o objetivo de evitar as variações circadianas que podiam interferir com os resultados experimentais. Em seguida, os animais foram transferidos para o centro do LCE.



d) Figura 1 - Teste da atividade locomotora – O interior da arena, dividida em 9 quadrantes, facilita a contagem da atividade locomotora.

Trata-se de um equipamento em madeira, na forma de cruz (figura 2), elevado 50 cm do chão, com dois braços abertos (50x10 cm) e dois fechados (50x10x40 cm),

opostos entre si (Handley e Mithani, 1984). Cada rato foi colocado no centro do LCE, com a face voltada para um dos braços fechados e colocado para explorar o equipamento por 5 min. Um observador fez as anotações do nº. de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos/fechados. Após observar cada animal, o LCE foi limpo com álcool 10% (v/v).

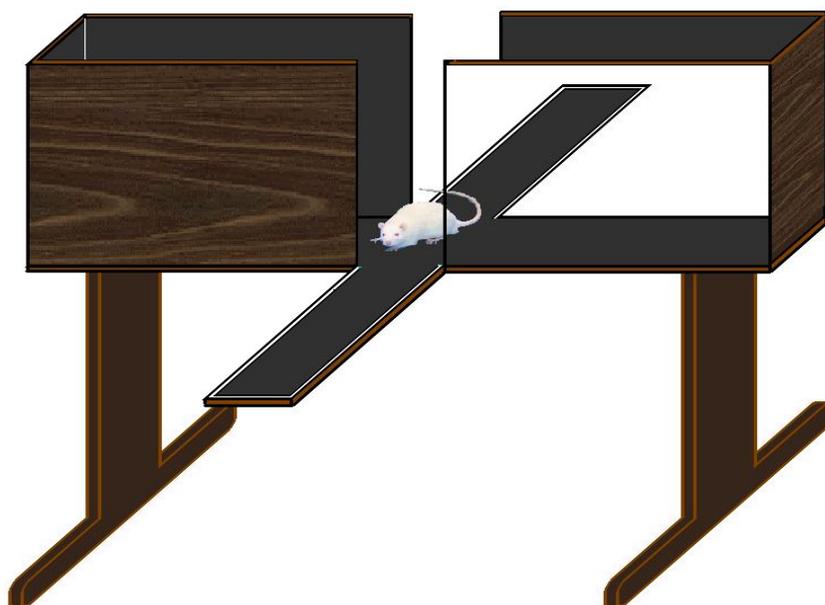


Figura 2 - Teste do labirinto em cruz elevado – Dois braços abertos, opostos aos dois braços fechados, facilitam a avaliação comportamental de ansiedade.

As percentagens de entradas nos braços abertos foram calculadas em relação ao número total de entradas nos dois braços e ao tempo de exploração nesses braços, em relação ao tempo total do experimento. O efeito ansiolítico ou ansiogênico foi definido pelo aumento ou diminuição (respectivamente) na proporção das entradas nos braços abertos, relativo ao número total de entradas em ambos os braços, e no tempo de exploração naqueles braços, relativo ao tempo total experimental (Pellow e cols., 1985).

e) Teste do nado forçado

Os animais avaliados no teste do nado forçado (Porsolt e cols., 1978) foram colocados em um cilindro Plexiglass, contendo 35cm de água a uma temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (figura 3). Os ratos exibiram dois tipos de comportamentos em um tempo de 5 min: *fuga*, que foi observada nos primeiros dois minutos; e *imobilidade contínua* (permanecia flutuando, mantendo somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água), nos três últimos minutos. Os dois minutos iniciais (fuga) foram considerados para habituação ao teste. As avaliações foram realizadas por um experimentador que não possuía conhecimento prévio a que grupo pertencia cada animal.

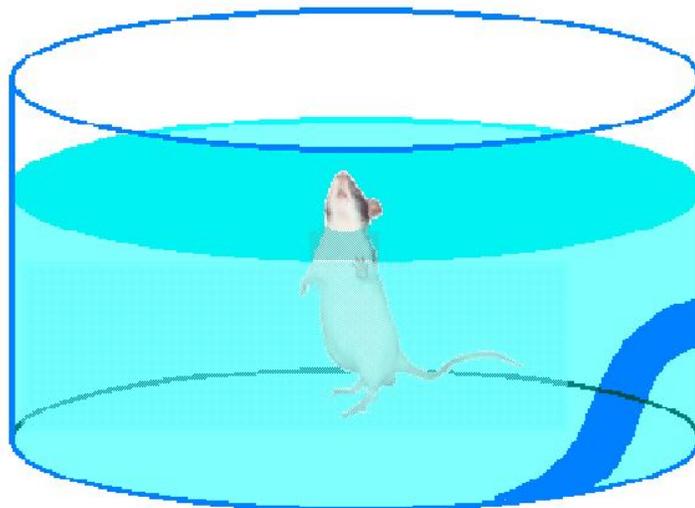


Figura 3 - Teste do nado forçado – O nível da água é um fator importante. O mesmo encontra-se em quantidade suficiente para não permitir que o animal encoste a cauda no fundo, não interferindo, portanto, na avaliação do comportamento depressivo.

f) Teste da esQUIVA inibitória

Utilizou-se o teste da esQUIVA inibitória para avaliação da memória, conforme descrito por Costa e Tomaz (1998). O aparato utilizado neste teste consistiu de uma caixa confeccionada com placas de alumínio (50x50x35 cm), com assoalho de barras de cobre, distribuídas com uma distância de 0,9 cm entre si, que estavam conectadas a um estimulador elétrico. Sobre as grades do assoalho foi colocada uma plataforma de madeira cilíndrica (15x5 cm), revestida de material impermeável (figura 4).



Figura 4 -Teste da esQUIVA inibitória – Na foto à esquerda, a vista frontal do equipamento; À direita, através da vista superior, é possível ver a plataforma de madeira e as grades de ferro.

Os procedimentos realizados para avaliar a memória foram os seguintes:

- No primeiro dia da análise, os animais foram habituados à caixa experimental, permanecendo no interior do aparato por 5 min.
- No segundo dia, foram determinadas as linhas de base 1 (LB1) e base 2 (LB2). Na LB1, o animal foi colocado sobre a plataforma e cronometrado o tempo (em segundos) correspondente à permanência dele sobre a plataforma. Após a descida, o animal foi retirado do aparato e decorridos 5 minutos foi feita a determinação da LB2. Nesta etapa, o animal foi levado novamente ao aparato, porém imediatamente após a descida, foi aplicado um choque elétrico de 1 miliampére (1mA), durante 1 seg, nas patas do rato, sendo, em seguida, novamente retirado do aparato e agrupado.
- O terceiro dia consistiu de nova medida de latência para o animal descer da plataforma com as quatro patas no assoalho. O tempo de permanência do animal na plataforma no terceiro dia permitiu inferir sobre os efeitos dos neurotóxicos no desempenho da tarefa dos animais. O limite de tempo para todas as tentativas foi de 300 segs.

g) Dosagem alcoólica

O nível alcoólico sanguíneo foi determinado no final de todas as etapas experimentais. O método utilizado foi de Widmarck modificado, que é utilizado pelo Instituto Renato Chaves. O método consistiu na coleta de 2 ml de sangue por punção cardíaca, com o animal anestesiado com éter, após terem sido avaliados pelos testes comportamentais. O sangue foi acondicionado em um frasco de vidro com tampa contendo 3 gotas de EDTA 6%, sendo, em seguida, homogeneizado imediatamente, de

forma lenta e contínua, para não haver rompimento das hemáceas. As principais etapas de um longo procedimento estão a seguir:

- Em um becker graduado, adicionou-se 10 ml de dicromato de potássio 0,1N e 10 ml de ácido sulfúrico PA. Por se tratar de uma reação exotérmica foi necessário diminuir a temperatura refriando o becker em corrente de água fria.
- Transferiu-se 2 ml de sangue com anticoagulante, através de pipeta graduada, para um erlenmeyer de 250ml. Lavou-se a mesma pipeta com 2 ml de água destilada, deixando-se escorrer para o interior do erlenmeyer. O processo de homogeneização foi contínuo em todas as etapas seguintes.
- 10 ml de solução saturada de ácido pícrico, para haver desproteinização do sangue, foi também adicionado ao erlenmeyer.
- Destilou-se a mistura contida no erlenmeyer até obter-se um volume de 2ml de destilado, que foi coletado diretamente em um becker contendo uma mistura sulfocrômica.
- 5ml de solução de iodeto de potássio a 5% foi adicionado à etapa anterior, onde todo o processo de homogeneização foi feito por 2 minutos em capela com exaustão, devido à liberação de vapores de iodo.
- 3 gotas de solução de amido a 2% foram incluídas à etapa anterior para, em seguida, titular-se lentamente com solução de tiosulfato de sódio 0,1N até a virada para a cor azul celeste persistente.
- O volume gasto para a virada da cor foi anotado e o valor correspondente a dosagem alcoólica foi calculada, fazendo-se uso de uma tabela de Rouger Douris (dados completos e tabela de Rouger-Douris em anexo na página 79).

h) Dosagem de mercúrio

O nível de mercúrio dos animais, obtido através dos pêlos coletados das proles na fase adulta, foi avaliado por meio da técnica de espectrofotometria de absorção atômica, com amalgamação em lâminas de ouro, realizada no equipamento Mercury Analyser SP3D/NIC, composto de 3 partes: a primeira chamada MD1 e a segunda MA1, consistiam em um espectrofotômetro e um controlador do atomizador, respectivamente; e a terceira chamada Mercury SP, que era o próprio atomizador.



Figura 5 - Aparelhagem utilizada nas avaliações da dosagem do mercúrio (Mercury Analyser SP3D/NIC).

Para tal, os seguintes procedimentos foram realizados:

- Os pêlos foram lavados com água destilada e acetona e depois secos em capela de exaustão de gases durante 3 dias. Após esse período, cerca de 50 mg de pêlo foram colocados em uma baqueta com aditivos na seguinte disposição:

M + Amostra (pêlos) + M + B + M

Aditivo B: Hidróxido de Alumínio

Aditivo M: Hidróxido de cálcio + Carbonato de cálcio, na proporção de 1/1.

- Colocou-se a baqueta no atomizador para aquecimento (giro em torno de 800°C), para fazer com que o mercúrio da amostra se tornasse vapor, passasse por 3 lâminas de ouro para sofrer amalgamação e por uma solução de fosfato de sódio e fosfato ácido de potássio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$) para neutralizar o pH e, em seguida, para o espectrofotômetro (comprimento de onda de 287 nm) que continha uma lâmpada de mercúrio para aferir a concentração de mercúrio total. Depois de analisado o vapor de mercúrio, o mesmo foi armazenado em um filtro de grafite.

OBS: A Organização Mundial da Saúde (OMS) não preconizou valores de referência para pêlos, portanto os estudos fizeram comparações com os valores estabelecidos para cabelo, cujo valor de referência foi de 10 ppm.

ANÁLISE ESTATÍSTICA: Todos os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, as comparações múltiplas *post-hoc* foram conduzidas usando-se o teste de Newman Keuls. Para comparação entre duas amostras foi utilizado o teste de Bonferroni. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e a probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

a) Morbi-mortalidade e Pesagens das proles

Em todos os grupos de animais foi observado um grau de morbi-mortalidade, as diferenças não foram estatisticamente significantes, para a amostra aqui apresentada. No entanto, levando-se em consideração todos os grupos de EtOH e/ou MeHg, desde que iniciaram essa pesquisa, o grau de mortalidade foi superior a esses dados demonstrados, com significantes diferenças estatísticas.

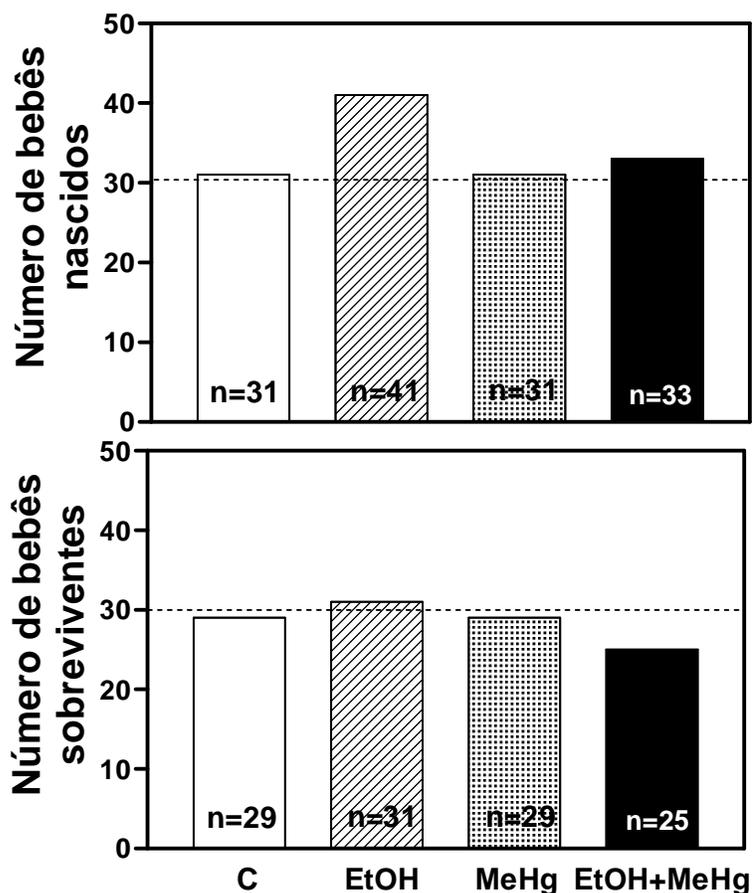


Gráfico 1 – Número total de bebês provenientes de diferentes grupos (C=controles, EtOH= animais que receberam EtOH durante a vida intrauterina, MeHg = animais que receberam MeHg durante a vida intrauterina e EtOH+MeHg = animais que receberam EtOH+MeHg na vida intrauterina). O painel superior representa o nº. de proles que nasceu e o painel inferior o número de proles que sobreviveram até a fase adulta.

No que se refere à última pesagem dos animais na fase de desmame (gráfico 2, parte superior), foram observadas diferenças em todos os grupos quando comparados ao controle – EtOH [F(3,12)= 3,941, $p < 0,05$]; MeHg [F(3,12)= 4,789, $p < 0,05$]; EtOH x MeHg [F(3,12)= 3,633, $p < 0,05$]. Essas diferenças, entretanto, não foram observadas na fase adulta, quando os animais atingiram 2 meses de idade (gráfico 2, parte inferior).

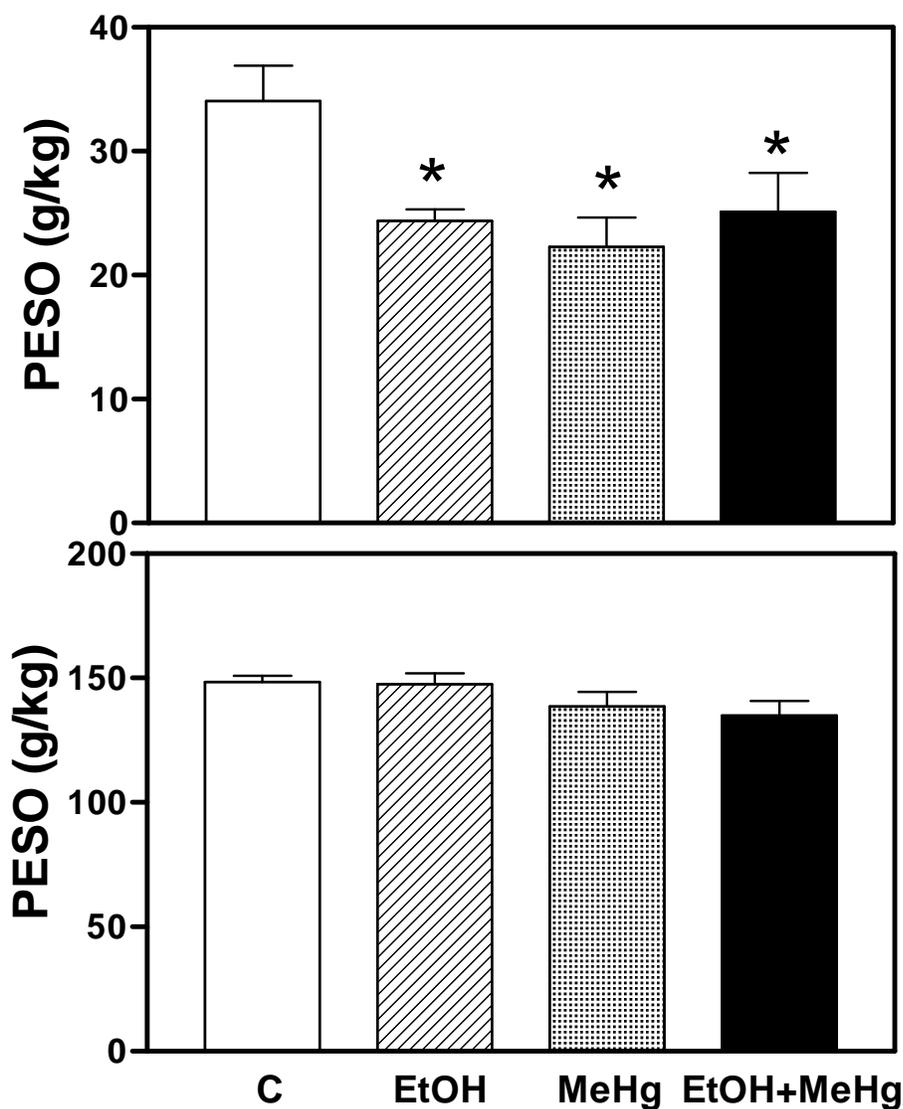


Gráfico 2 – Pesagens das proles dos grupos Controle (C), EtOH, MeHg e EtOH+MeHg, na fase de desmame (gráfico superior) e aos 2 meses de idade (gráfico inferior). * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo controle (Teste de Newman Keuls).

b

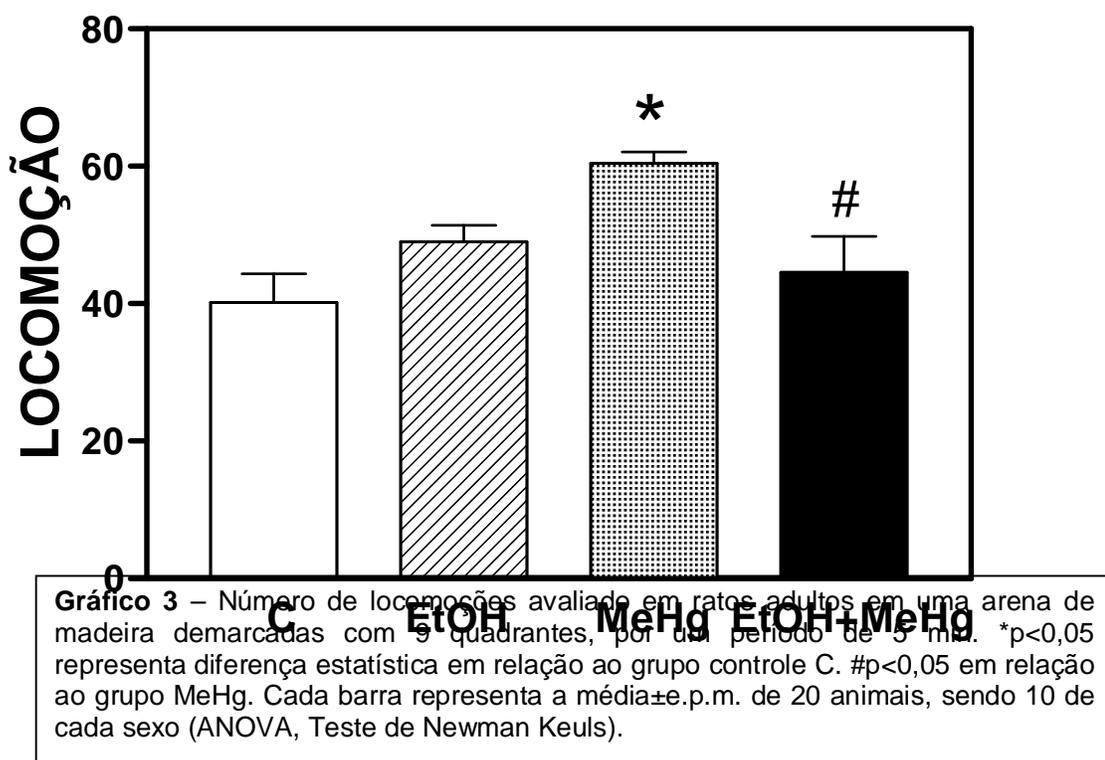
Quando os animais foram avaliados quanto às observações comportamentais de atividades espontâneas, respostas ao manuseio, respostas neurológicas e ausência de comportamentos de autolimpeza, não se detectou diferença entre os animais, quando se compararam as avaliações feitas por dois observadores, que não tinham conhecimento prévio dos grupos a que pertenciam.

Foi possível observar dentro da atividade espontânea que os animais ficavam imóveis ou se locomoviam ocasionalmente. Não foram detectados espasmos, sacudidas, contorções ou tremores na cabeça. A preservação do silêncio foi fundamental nessa e nas outras etapas, para evitar que o estresse favorecesse a obtenção de resultados falso-positivos. Quando manuseados, os animais apresentaram vocalização de baixa intensidade ou, na maioria das vezes, não emitiam nenhum tipo de som. Da mesma forma, o manuseio não favoreceu a esquiva dos animais, independente do grupo experimental.

Nas últimas etapas, todos os animais apresentaram comportamentos muito similares. Quando o dedo indicador era colocado na direção dos músculos axiais dos animais, os mesmos não apresentavam, diante da palpação, nenhum tipo de rigidez. Quando as pontas das caudas foram levantadas apresentavam-se maleáveis ou com tensão normal. A postura de apoio sobre as patas foi classificada como sentado normal, agachado ou mesmo apoiado sobre as quatro patas. Os animais em estudo não apresentaram convulsões e nem tremores ao serem levantados pela cauda e girados. Para finalizar, nenhuma espécie de resíduos sólidos foram encontrados na forma de crosta, fixados aos pêlos dos animais.

c) Atividade locomotora espontânea

A ANOVA mostrou que a exposição ao MeHg (8 mg/kg) durante a vida intrauterina levou ao aumento da atividade locomotora dos animais na fase adulta, atingindo uma resposta com um efeito-teto significativo, quando comparada aos animais controles [F(3,79)= 5,548; p<0,01]. No entanto, quando o MeHg foi administrado às ratas grávidas em tratamento crônico com EtOH, não se observou a mesma resposta das proles tratadas somente com MeHg, uma vez que o grupo EtOH+MeHg atingiu valores semelhante aqueles animais que consumiram somente água de torneira ou EtOH. Quando se comparou essa resposta com aquela dos animais que receberam somente MeHg, a estatística foi de [F(3,79)= 4,329, p<0,01] (gráfico 3).



d) Labirinto em cruz elevado.

Quando comparado ao grupo controle, proles adultas que foram expostas ao EtOH durante a vida intra-uterina, reduziram a percentagem de entradas nos braços

abertos (%EBA) [F(3,79)=3,615; p<0,05] e a percentagem de tempo naqueles braços (%TBA) [F(3,79)= 2,952; p<0,05], no teste do LCE. Resultado semelhante foi observado para o grupo que recebeu somente MeHg onde ocorreu uma redução na %EBA [F(3,79)= 4,220; p<0,05] e %TBA [F(3,79)= 3,968; p<0,05]. Na mesma direção, o tratamento com EtOH+MeHg durante a vida intra-uterina afetou a %EBA [F(3,79)= 7,368; p<0,001] e %TBA [F(3,79)= 8,984; p<0,001], das proles na fase adulta. A frequência de entradas nos braços fechados (EBF) não foi afetada pelo EtOH ou MeHg quando essas drogas foram dadas individualmente durante a gravidez, não interferindo com o comportamento locomotor avaliado neste teste. Ao contrário, a EBF foi afetada no grupo EtOH+MeHg [F(3,79)= 4,845; p<0,01], quando comparado aos controles.

Foi observada diferença quando se comparou o grupo EtOH+MeHg com os animais tratados somente com EtOH (%EBA [F(3,79)= 3,753; p<0,05]; %TBA [F(3,79)= 6,032; p<0,001]; EBF [F(3,79)= 5,421; p<0,001]) ou somente com MeHg (%EBA [F(3,79)= 3,148; p<0,05]; %TBA [F(3,79)= 5,016; p<0,05]; EBF [F(3,79)= 5,998; p<0,001]). Essa diferença na frequência de EBF, comentada anteriormente, pode estar refletindo resposta típica do comportamento relacionado ao consumo de drogas, com efeitos do tipo sedativo, mas não resposta ansiogênica (Gráfico 4).

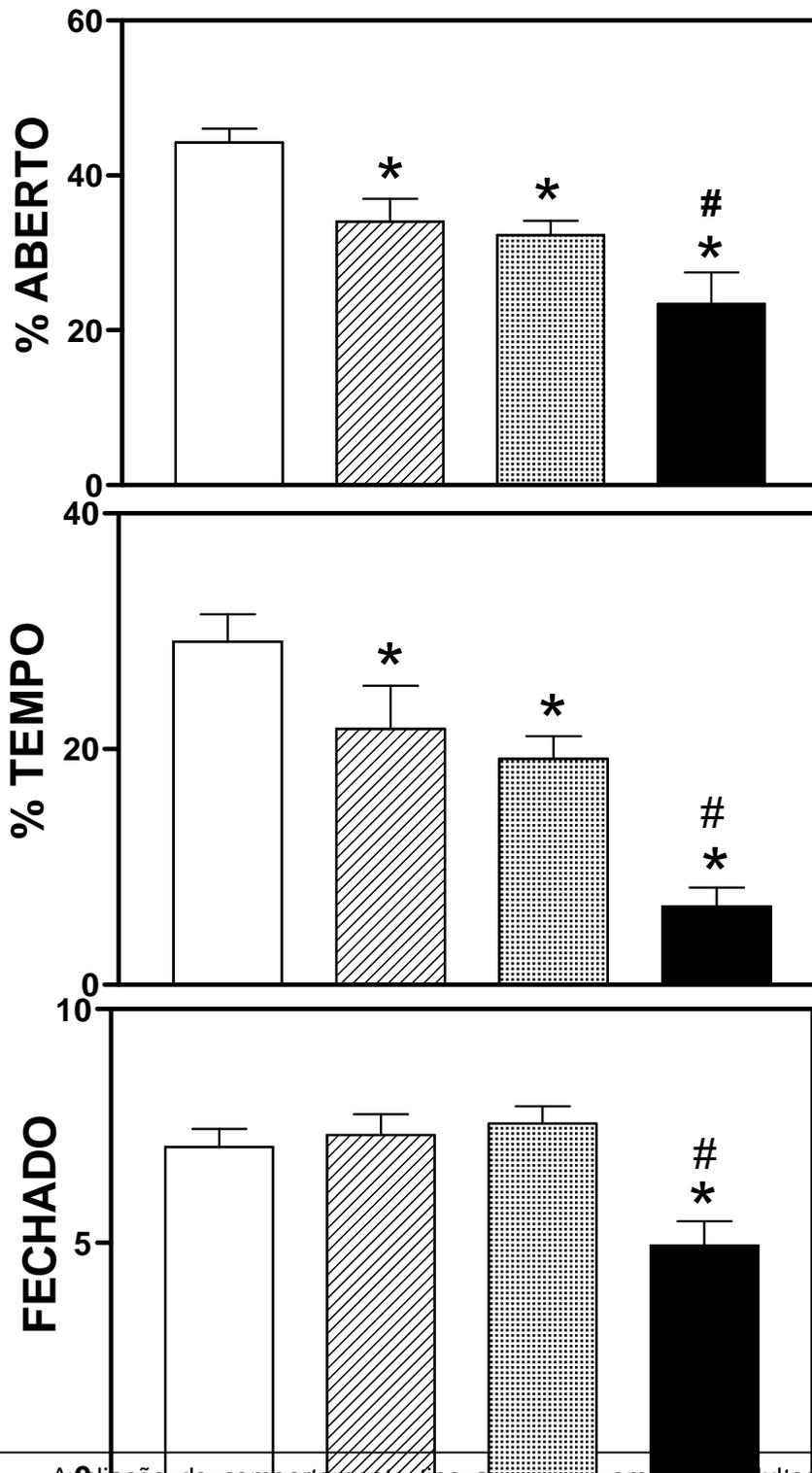
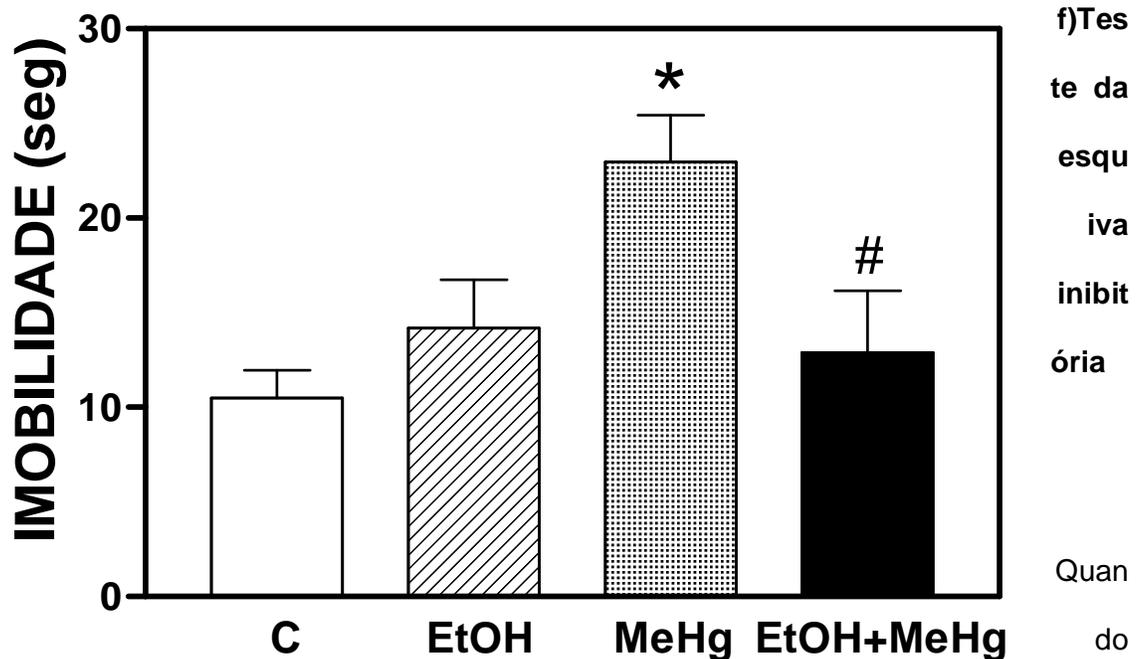


Gráfico 4 – Avaliação do comportamento tipo ansiedade em ratos adultos, aos 2 meses de idade, testados no Labirinto de Cruz elevado. *p<0,05 diferença estatística em relação ao grupo controle C. #p<0,05 em relação aos grupos EtOH e MeHg *per se*. Cada barra representa a média±e.p.m. de 20 animais, sendo 10 de cada sexo (ANOVA, Teste de Newman Keuls).

Como mostrado no gráfico 5, comparando-se os resultados em relação ao grupo controle, os animais que receberam somente MeHg na vida intra-uterina, aumentaram o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, mantendo somente pequenos movimentos necessários para manter a cabeça fora da água [F(3,79)= 4,941; p<0,01]. Quando comparado ao grupo administrado com MeHg *per se*, os animais que receberam a interação EtOH+MeHg na vida intra-uterina, a exemplo do que aconteceu na atividade locomotora, manteve uma resposta basal semelhante aos animais controles [F(3,79)= 3,985; p<0,05].



Quando analisados os dados da LB1, não foram observadas diferenças estatísticas entre os

grupos. Na LB2, a associação

Gráfico 5 – Avaliação do tempo de imobilidade em ratos adultos aos 2 meses de idade. *p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo Controle (C). #p<0,05 em relação ao grupo MeHg. Cada barra representa a média±e.p.m. de 20 animais, sendo 10 de cada sexo (ANOVA, Teste de Newman Keuls).

o EtOH+MeHg apresentou uma resposta reduzida, quando comparada ao grupo MeHg [F(3,79)= 4,349; p<0,05]. Na avaliação durante o teste, todos os animais aumentaram o

tempo de latência na plataforma. Foi observado que a interação dos dois neurotóxicos, apresentou diferença em relação aos grupos: controle [F(3,79)= 6,117; p<0,001]; EtOH [F(3,79)= 3,759; p<0,05] e MeHg [F(3,79)= 3,522; p<0,05], conforme gráfico 6.

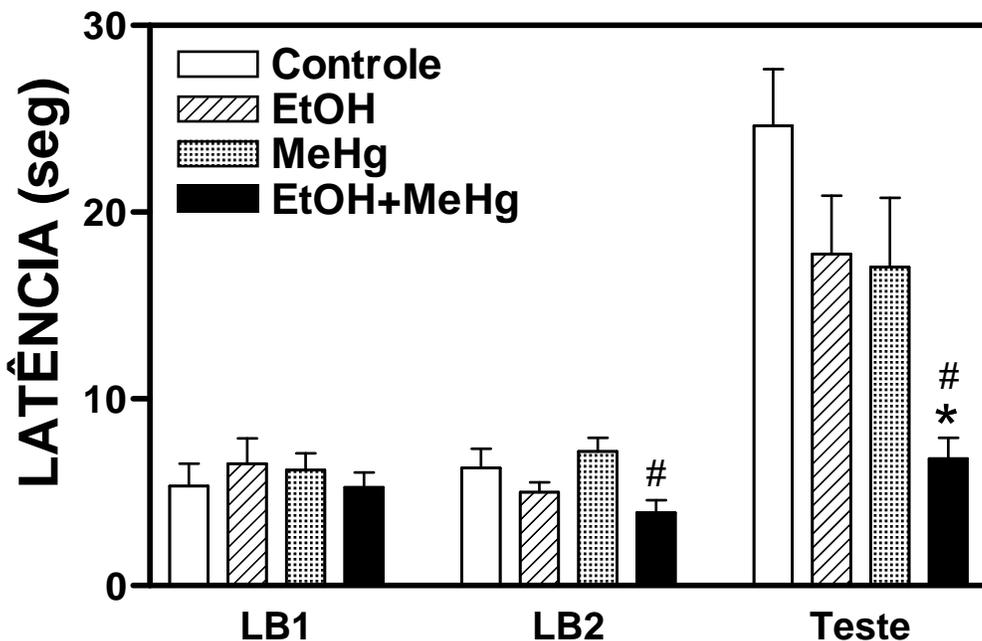


Gráfico 6 – Memória avaliada no teste da esQUIVA inibitória, em ratos adultos, aos 2 meses de idade. *p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo Controle (C) no dia do teste. #p<0,05 em relação ao grupo EtOH e/ou MeHg. Cada barra representa a média±e.p.m. de 20 animais, sendo 10 de cada sexo (ANOVA, Teste de Newman Keuls).

g) Dosagens: alcoólica e mercurial

Não foram observadas diferenças significantes ns dosagens alcoólicas. Como na avaliação os valores nunca ultrapassavam 1,09 na escala de Rouger-Douris, então sugere-se que o nível alcoólico não atingiu ou ultrapassou 0,06% mg/dl, nível máximo permitido em humanos para não comprometimento de muitas das atividades motoras e locomotoras.

Quadro 2 – Resultados das médias da dosagem alcoólica nos diferentes grupos

| TRATAMENTO | MÃE | PROLE |
|------------|------|-------|
| C | 0,74 | 0,64 |
| EtOH | 0,56 | 0,47 |
| MeHg | 0,66 | 0,67 |
| EtOH+MeHg | 0,57 | 0,77 |

Quanto à concentração de mercúrio total (gráfico 7), observou-se que o grupo tratado de mães com MeHg *per se* ($5,86 \pm 2,06 \mu\text{g/g}$) mostrou valores maiores do que aqueles encontrados no grupo materno onde se administrou a associação EtOH+MeHg ($1,91 \pm 1,29 \mu\text{g/g}$). Proles pertencentes ao grupo MeHg *per se* ($3,82 \pm 0,43 \mu\text{g/g}$) apresentou valores de maiores que o grupo de associação ($1,63 \pm 0,21 \mu\text{g/g}$). Foi possível notar, então, que a distribuição de Hg total mostrou-se muito abaixo do Limite de Tolerância Biológico para amostras de cabelos que é de $10,0 \mu\text{g/g}$, adotado pela Organização Mundial de Saúde para humanos (WHO, 1990). Os animais controles apresentaram níveis praticamente nulos, quando avaliados através do mesmo procedimento.

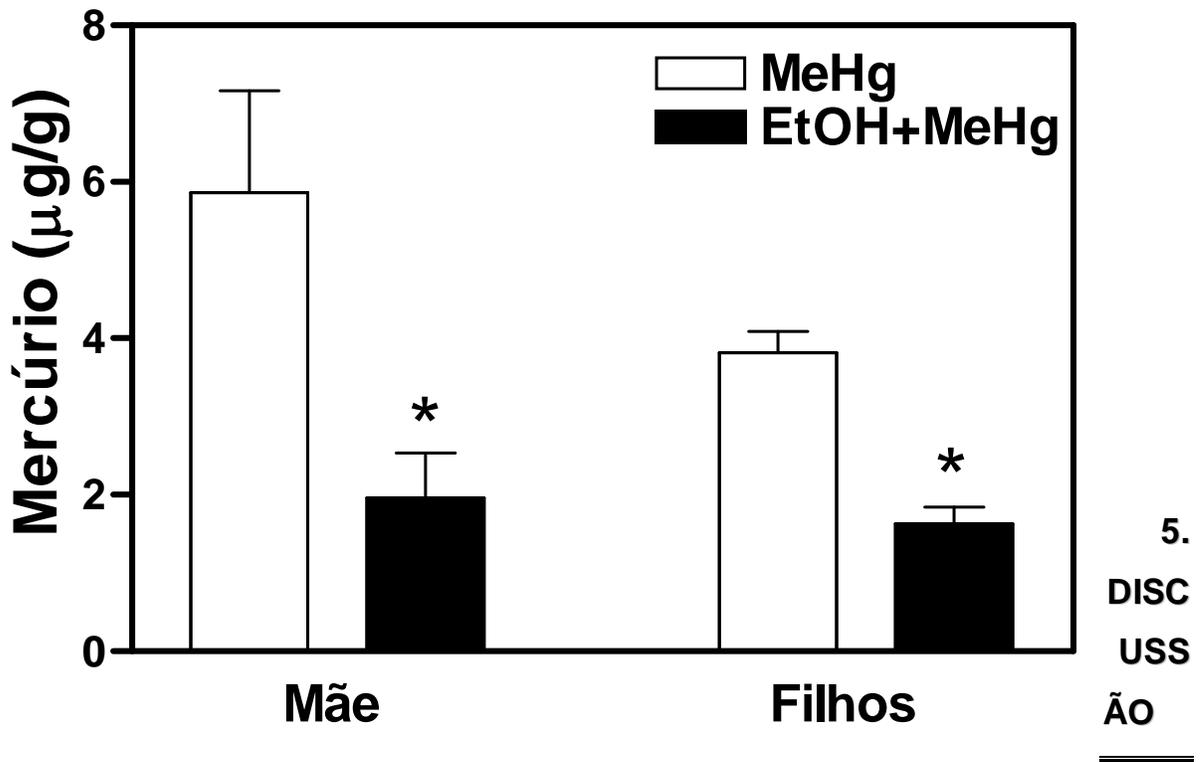


Gráfico 7 – Dosagem mercurial avaliada nos pêlos de ratos que receberam MeHg ou EtOH+MeHg. O gráfico plotado representa os pêlos de mães que terminaram o período de amamentação e das proles (resultados de machos e fêmeas agrupados), na fase adulta. * $p < 0,05$ indica diferença em relação ao grupo MeHg. Cada barra representa a média \pm e.p.m. de 3 e 6 animais, respectivamente para mães e filhos (ANOVA, Teste de Bonferroni).

neurotóxicos interterram naquelas respostas, em graus variados e dependendo do modelo experimental investigado.

Observou-se que muitas características típicas de animais, cujas mães receberam EtOH durante a gravidez, como aquelas relacionadas ao número de animais e variação dos pesos dos mesmos não foram afetadas, no entanto isso não foi um fator primordial para, e correlacionado com, o desencadeamento das alterações comportamentais observadas. Apesar de não haver acompanhamento do número de

abortos que possam ter ocorrido diante dos diferentes tratamentos, é provável que isso, não necessariamente, possa ter interferido nos resultados observados nesta pesquisa.

Levando em consideração as colocações anteriormente citadas, quando comparado com seres humanos, o aumento na taxa de abortos espontâneos foi observado em casais, onde a concentração de mercúrio metálico em suas urinas estava em concentrações elevadas antes da gestação (Cordier e cols., 1991). Similarmente, quando mulheres foram expostas ocupacionalmente ao mercúrio metálico (como, por exemplo, dentistas e suas assistentes), sofreram mais abortos espontâneos, bebês natimortos, deformações congênitas e desordens menstruais do que grupos de mulheres que não foram expostas ao metal pesado (Khan e cols., 2004).

Depois dessas observações, foram iniciados os testes comportamentais, onde os animais foram avaliados aos 2 meses de idade. Esta idade foi escolhida uma vez que, em ratos, o desenvolvimento total dos mecanismos de síntese, metabolismo e recaptação dos neurotransmissores GABA, glutamato e outros, bem como os receptores para estes neurotransmissores estão completos, aproximadamente, nessa idade (Bentivoglio e cols., 1991; Insel e cols., 1990), o que corresponde aos 5 anos de idade em humanos. Estudos ontogenéticos comportamentais têm mostrado que abaixo de 2 meses de idade muitos padrões adultos de comportamento defensivo não estão completamente estabelecidos (Hard e cols., 1982; Masur e cols., 1980).

Existem evidências de que em certas fases do desenvolvimento, embora os elementos sinápticos estejam completos, os mecanismos de transdução não estão plenamente formados (Insel e cols., 1990). Neste experimento, a exposição ocorreu durante a fase em que os animais ainda estavam sendo gerados, o que pode ter

impedido a formação da cascata de sinalização, importante para homogeneização das respostas comportamentais entre os grupos.

Estudos prévios observaram que ratos apresentam aumento de alterações comportamentais ligado à ansiedade no LCE em função da idade, sugerindo que aos 2 meses aqueles animais são menos ansiosos do que com 4 e 5 meses, independentemente do sexo (Imhof e cols., 1993). Por esta razão optou-se por trabalhar com os animais com 2 meses de idade, para que os resultados finais relacionados com esse e os demais comportamentos não fossem mascarados pelo efeito-teto das drogas.

Em relação ao teste para avaliação da ansiedade, foi observado que o EtOH diminuiu a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos no teste do LCE, confirmando o efeito ansiogênico dessa droga, quando administrada diante de uma exposição prolongada (Da Silva e cols., 2004). As alterações nas percentagens de entradas nos braços abertos, juntamente com a ausência de efeito na frequência de entrada nos braços fechados, sugerem que o efeito ansiogênico do EtOH tenha sido específico, e não dependente de uma resposta sugestiva de comportamento tipo sedativo. Nessa situação, o animal acaba permanecendo nos braços abertos por conta do elevado grau de sedação e não por conta da redução da ansiedade.

Neste mesmo teste, quando analisados os animais provenientes de mães que receberam somente MeHg, a resposta idêntica àquela observada para o EtOH se fez presente, sendo ainda mais expressiva quando da associação dos dois neurotóxicos. Neste último caso, a frequência nos braços fechados foi alterada, mostrando que as respostas observadas, diferentes daquelas que ocorreram com as drogas isoladas, eram similares àquelas apresentadas diante do uso de drogas sedativas, cujos animais

podem estar comportamentalmente afetados, apesar de fisiologicamente aparentarem normais (Ferreira e Morato, 1996, 1997).

Outros parâmetros comportamentais observados foram aqueles relacionados à atividade locomotora e à depressão, que antecedeu e sucedeu, respectivamente, o teste do LCE. Esses comportamentos não conseguiram se correlacionar tendo em vista que o grupo de animais com MeHg apresentou um comportamento de maior excitabilidade, demonstrado pela maior atividade locomotora, quando os animais foram colocados para explorar a arena de madeira. Essa resposta foi compatível com outros testes comportamentais similares (Becker e cols., 1996) e também corroborando os resultados encontrados por Dietrich e cols. (2005), que observaram um significativo prejuízo motor de camundongos tratados com MeHg, resposta esta dependente do tempo e da dose administrada por via oral, em dose única e em altas doses. Ao contrário, quando os animais foram avaliados no tanque, apresentaram redução no tempo de mobilidade, característica sugestiva de comportamento depressivo.

Apesar desta contradição, sabe-se que a atividade no campo aberto pode ser influenciada por muitos fatores, incluindo medo e emoção, os quais podem favorecer a maior exploração do animal no teste ao qual é submetido. Esses resultados reforçam os argumentos de Riley e cols. (1986) que relatam que o aumento da atividade locomotora de ratos no teste do campo aberto, induzido pela exposição ao EtOH durante a gravidez, é amplamente compatível com o aumento na atividade exploratória. Pensando nesta linha, supõe-se que aqueles fatores são freqüentes nos quadros depressivos. No teste do nado forçado, os animais do grupo EtOH aumentaram o tempo de imobilidade, sugestivo de comportamento de apatia, um dos sinais do quadro de depressão. Essa observação foi mais nítida quando da contaminação somente com

MeHg. Quando os dois neurotóxicos foram associados, uma resposta antagônica ocorreu, permanecendo o efeito-teto similar aos dos animais controles.

As diferentes respostas produzidas pelos dois neurotóxicos, em que a associação produz uma resposta contrária às respostas das drogas *per se*, já foram observadas por diferentes pesquisadores, em diferentes desenhos experimentais (Martin e Naleway, 2004). Uma das prováveis explicações para este fato está relacionada a algum mecanismo de proteção que seja estimulado por um dos neurotóxicos sobre o outro, que não é desencadeado quando os neurotóxicos são usados separadamente.

Nota-se que esta resposta, observada neste estudo, pode ser dependente do desenho experimental. A exposição ao álcool no período pré-natal foi demonstrada através do aumento da atividade locomotora no período pré-desmame (Bond e Di Giusto, 1977), porém houveram muitas falhas ao se tentar reproduzir este efeito em outras pesquisas (Abel, 1979). Já no período pós-natal, a exposição ao álcool tem sido mostrada por aumentar a atividade de ratos no campo aberto tanto no período pré-desmame quanto na fase adulta (Kelly e cols., 1987).

Da mesma forma que a avaliação da ansiedade, uma resposta sinérgica foi observada quando os animais foram avaliados no teste da esQUIVA inibitória. Neste teste, os grupos de animais não mudaram o comportamento quando avaliados durante as linhas de base 1 e 2, mas após receberem um choque de 1 miliampère, todos os animais lembraram do evento, permanecendo na plataforma por muito mais tempo. Os grupos Controle, EtOH e MeHg não mostraram diferença significativa entre eles, entretanto, novamente, o grupo EtOH+MeHg, não apresentou a mesma resposta apresentada pelas drogas isoladas, uma vez que apresentou o processo de retenção

de memória prejudicado. Estes resultados também foram compatíveis com aqueles obtidos por Danielsson e *cols.* (1993), quando detectou em ratos adultos, efeitos como hiperatividade e déficit de aprendizado em proles de ratas grávidas expostas ao mercúrio.

Este estudo com ratos adultos reproduz aqueles com humanos nos quais o MeHg pode favorecer os déficits nas funções neurocognitivas. Nesses últimos experimentos a concentração de mercúrio nos cabelos de vítimas acometidas de contaminação mercurial encontrava-se na faixa de 0,56 a 13,6 $\mu\text{g/g}$, tendo a concentração média ficado na faixa de $4,2 \pm 2,4 \mu\text{g/g}$. Esses níveis de mercúrio nos cabelos estavam associados com as alterações detectáveis na aprendizagem verbal e memória, que se encontravam prejudicadas, de uma forma dependente da dose (Yokoo e *cols.*, 2003), sendo que em outros estudos esses déficits foram superiores aqueles observados na performance motora (Grandjean e *cols.*, 1997).

Nos pêlos dos animais deste experimento, a concentração mais alta encontrada de MeHg foi no grupo de mães que receberam apenas MeHg ($5,86 \pm 2,06 \mu\text{g/g}$), onde não houve significativo prejuízo na memória dos animais, que foi observado com a associação desse neurotóxico com EtOH. Estes resultados são contraditórios aqueles que mostraram déficits de aprendizagem e memória em ratos adultos aos 60 dias, que igual a este estudo, foram prenatalmente expostos à mesma dose de MeHg no início (8º. dia) ou em estado avançado de gravidez (15º. dias) (Zanoli e *cols.*, 2001; Baraldi e *cols.*, 2002). Essa diferença pode estar implicada no tipo de modelo experimental utilizado.

É atualmente aceito, que a exposição pré-natal ao EtOH pode alterar a plasticidade sináptica hipocampal e afetar tanto o aprendizado e memória, que

dependem do hipocampo, quanto causar outros defeitos mentais (Prediger e cols., 2004). A exposição ao EtOH no período pré-natal, como comentado na Introdução, produz déficits cognitivos e comportamentais em proles adultas de porcos-da-índia e altera os padrões de expressão e as propriedades farmacológicas dos receptores GABA_A hipocâmpais, com diminuição das respostas aos neuroesteróides endógenos, podendo assim ter influência na expressão tanto das disfunções cognitivas quanto comportamentais (Iqbal e cols., 2004).

Neste experimento, apesar de não terem sido investigados os prováveis mecanismos de ação envolvidos com essas respostas, para que assim houvesse melhor entendimento dos processos que pudessem estar ocorrendo, pode-se afirmar que as doses dos neurotóxicos utilizados durante o período de desenvolvimento não foram suficientes para afetar, de forma significativa, os processos de memória, pelo menos no teste aqui empregado, salvo quando as associações aos dois neurotóxicos foram consideradas. Isso acaba reforçando outros trabalhos que associam os possíveis efeitos sinérgicos deletérios entre o EtOH e o mercúrio (Santos e cols., 2004).

Vale enfatizar que não se pode justificar as respostas comportamentais aqui observadas, pela alteração nas concentrações alcoólicas sanguíneas, visto que não apresentaram alterações que indicassem embriaguez. Em humanos, quando presentes níveis alcoólicos sanguíneos elevados (> 150 mg/dl) são considerados amnésicos (Goldstein, 1983). Nas concentrações de 100 mM (400 mg/dl de álcool no sangue) os efeitos podem ser fatais, principalmente em decorrência da depressão respiratória e hipotensão (Diamond e Messing, 1994; Urso e cols., 1981). Essa intoxicação é muito pior nos indivíduos não tolerantes (Woodward, 1999), visto que as pessoas

dependentes são mais resistentes à intoxicação alcoólica do que aquelas não dependentes (Schuckit, 1994).

Também em seres humanos, baixas concentrações alcoólicas sanguíneas, provocam sensação de euforia ou desinibição. Assim que a concentração de EtOH no sangue aumenta, a função motora é prejudicada e a fala torna-se arrastada. Com concentrações sanguíneas entre 200mg/dL e 300 mg/dL (entre 43 mmol/L e 65 mmol/L), pode ocorrer vômito e o organismo pode entrar em estupor. Concentrações sanguíneas ainda mais altas podem resultar em coma (500mg/dL ou 109 mmol/L), ou há risco potencial de falha respiratória e morte (Davies, 2003).

As alterações nas respostas comportamentais dos ratos, aqui testados, não parecem refletir variações por causa da idade (como já discutido anteriormente) ou do metabolismo do EtOH, visto que os níveis alcoólicos no sangue foram similares entre os vários grupos. O mesmo não ocorreu para os níveis de concentração mercurial investigada nos pêlos das proles. Como observado, os níveis de mercúrio no grupo EtOH+MeHg foram consideravelmente reduzidos quando comparado com o grupo MeHg isolado. Estes resultados refletem os obtidos comportamentalmente para a atividade locomotora e depressão.

A monitorização biológica do MeHg em humanos pode ser realizada coletando-se amostras de cabelo, cordão umbilical e sangue (Counter e Buchanan, 2004). Baseado na interpretação dos dados do acidente no Iraque, a Organização Mundial de Saúde (1940), concluiu que o aumento no risco em 5% de efeitos adversos no neurodesenvolvimento, devem ocorrer quando os níveis de mercúrio no cabelo materno estiverem em torno de 10 a 20 partes por milhão (ppm) e o risco aumenta mais de 30% quando esta concentração se encontra em torno de 70 ppm (WHO,

1990). A concentração de mercúrio considerada segura no cordão umbilical é de 29 ppm (Pichichero e cols., 2002). Nos animais testados neste estudo, foram coletadas amostras de pêlos dos animais, sem realizar nenhuma análise comparativa com outros tipos de amostras como sangue, para descartar qualquer alteração dependente da amostra coletada.

É provável que em algumas situações, um mecanismo de proteção desencadeado pelo EtOH possa estar acontecendo, uma vez que em determinadas situações investigadas, a presença dessa droga impediu as respostas produzidas pelo MeHg sozinho, mas isso é dependente do modelo experimental e do tipo de comportamento que se está avaliando. Através desta pesquisa, tem-se a perspectiva de resultados que preencham muitas das lacunas existentes na literatura específica do consumo pré-natal de álcool, principalmente porque, até onde é conhecido, esta é a primeira pesquisa a investigar de uma forma mais ampla e conjunta as interações do MeHg em animais expostos ao álcool durante a vida intrauterina, utilizando testes comportamentais já amplamente conhecidos.

O entendimento de como mudanças específicas em várias funções de sistemas que podem estar implicados com a susceptibilidade às drogas, fornece um ponto de partida para o desenvolvimento de medicamentos. Haja vista que as atuais estratégias de tratamento e prevenção do alcoolismo e suas interações ainda são geralmente ineficazes, o entendimento dos mecanismos de ação que levam ao desenvolvimento da dependência ao álcool e suas associações se faz necessário.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que a exposição intrauterina ao MeHg é capaz de interferir com os efeitos do EtOH consumido na fase pré-natal. Isto foi inferido a partir das seguintes observações:

1. Apesar de não terem sido observadas variações no número de bebês, pesos das proles na fase adulta, atividades espontâneas, resposta ao manuseio, sinais neurológicos e comportamento de auto-limpeza, as respostas comportamentais foram perceptíveis.
2. Ainda que as dosagens alcoólicas não tenham sido significantes entre os grupos, alterações comportamentais decorrentes do uso crônico se fizeram presentes.
3. As dosagens de mercúrio total em pêlo de rato foram afetadas nas proles e nas mães contaminadas com MeHg ou duplamente intoxicada com EtOH+MeHg, quando comparadas aos controles.
4. Proles duplamente contaminadas com EtOH e MeHg, preservam as respostas de atividade locomotora apresentadas pelos animais controles ou contaminadas somente com EtOH, o que diferiu dos animais contaminados somente com MeHg, que apresentou uma grande estimulação na locomoção.
5. No teste do LCE, os grupos contaminados com EtOH ou MeHg durante a vida intra-uterina, mostraram redução nas percentagens de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, sem afetar a frequência nos braços fechados, o que caracterizou acentuado comportamento sugestivo de resposta ansiogênica.

6. No teste do LCE o grupo contaminado por EtOH+MeHg durante a vida intra-uterina, mostrou redução nas percentagens de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, entretanto afetou a frequência nos braços fechados, mostrando que a resposta observada foi mais deletéria do que aquela observada com as drogas isoladas, sugerindo comportamento típico de resposta sedativa.
7. O teste do nado forçado mostrou que a associação dos dois neurotóxicos reduziu o grau de imobilidade apresentado pelo MeHg *per se*.
8. No teste da esquiva inibitória, a associação dos dois neurotóxicos prejudicou a retenção de memória, reduzindo a latência na plataforma no dia do teste.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel EL. Prenatal effects of alcohol on open-field behavior, step-down latencies and "sleep-time" . *Behav. Neur. Biol.*, 45: 406-410, 1979.

Abel E. Paternal contribution to fetal alcohol syndrome. *Addict. Biol.*, 9:127-133, 2004.

- Amin-Zaki L, Elhassani S, Majeed MA, Clarkson TW, Doherty RA, Greenwood M. Intra-uterine methylmercury poisoning in Iraq. *Pediatrics*, 54: 587-595, 1974.
- Anzai Y, Kuriyama S, Nishiro Y, Takahashi K, Ohkubo T, Ohmori K, Tsubono Y, Tsuji I. Impact of alcohol consumption upon medical care utilization and costs in men: 4-year observation of National Health Insurance beneficiaries in Japan. *Addiction*, 100: 19-27, 2005.
- Aschner M, Kimelberg AK. The role of glia in neurotoxicity. *Boca Raton: CRC Press*, 1996.
- Atchison WD. Calcium-dependent and -independent effects of methylmercury on spontaneous and potassium evoked release of acetylcholine at the neuromuscular junction. *JPET*, 237: 672-680, 1986.
- Atchison WD, Narahashi T. Methylmercury induced depression of neuromuscular transmission in the rat. *Neurotoxicology*, 3: 37-50, 1982.
- Atchison WD, Hare MF. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. *FASEB*, 8: 622-629, 1994.
- Baraldi M, Zanoli P, Tascetta F, Blom JM, Brunello N. Cognitive deficits and changes in gene expression of NMDA receptors after prenatal methylmercury exposure. *Environ Health Perspect.*, 110 : 855-858, 2002.
- Barres BA, Barde Y-A. Neuronal and glial cell biology. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10: 642-648, 2000.
- Barreto PS, Lemos T, Morato GS. NMDA-receptor antagonists block the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Addict. Biol.*, 3: 55-64, 1998.
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*, 14: 83-144, 1993.
- Becker HC, Diaz-Granados JL, Randall CL. Teratogenic actions of ethanol in the mouse: a minireview. *Pharmacol. Bioch. Behav.*, 55: 501-513, 1996.

- Bentivoglio M, Spreafico R, Alvarez-Bolado G, Sanchez MP, Fairen A. Differential expression of Gaba_A receptor complex in the dorsal thalamus and reticular nucleus: an immunohistochemical study in the adult and developing rat. *Eur. J. Neurosci.*, 3: 118-125, 1991.
- Berlin M. Mercury. In: L. Friberg, G.F. Nordberg, V.B. Vouk (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*, Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, pp. 387-445, 1986.
- Bertossi, M., F. Girolamo, M. Errede, D. Virgintino, G. Elia, L. Ambrosi, L. Roncali. Effects of Methylmercury on the Microvasculature of the Developing Brain. *Neurotoxicology*, 25: 849-857, 2004.
- Bisinoti MC, Jardim WF. O comportamento do metilmercúrio no ambiente. *Quim. Nova*, 27: 593-600, 2004.
- Blatt SL, Takahashi RN. Experimental anxiety and the reinforcing effects of ethanol in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32: 457-461, 1999.
- Blednov Y, Bergeson SE, Walker D, Ferreira VMM, Kuziel W, Harris AR. Perturbation of chemokine networks by gene deletion alters the reinforcing action of ethanol. *Behav. Brain Res.*, 2005, submitted.
- Blume AW, Schmalzing KB, Marlatt GA. Memory, executive cognitive function, and readiness to change drinking behavior. *Addict. Behav.*, 30: 301-314, 2005.
- Bond NW, Di Giusto EL. Prenatal alcohol consumption and open-field behavior in rats: effects of age at time of testing. *Psychopharmacology*, 58: 69-71, 1977.
- Brabo ES, Santos EO, Jesus IM, Mascarenhas AFS, Faial KF. Mercury contamination of fish and exposures of an Indigenous Community in Para State, Brazil. *Environ. Res.*, 84: 197-203, 2000.
- Burd L, Wilson H. Fetal, infant, and child mortality in a context of alcohol use. *Am. J. Med. Genet. C; Semin. Med. Genet.*, 127: 51-58, 2004.
- Carreño CFT, Ferreira VMM, Morato GS. Ethanol-induced hypothermia in rats is antagonized by dexamethasone. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30: 69-72, 1997.

- Carvalho V, Pinsky I, De Souza e Silva R, Carlini-Cotrim B. Drug and alcohol use and family characteristics: a study among Brazilian high-school students. *Addiction*, 90: 65-72, 1995.
- Castoldi AF, Coccini T, Ceccatelli S, Manzo L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res. Bull Neurosci.*, 55: 197-203, 2001.
- Cherian MG, Hursh JG, Clarkson TW, Allen J. Radiocative mercury distribution in biological fluids and excretion in human subjects after inhalation of mercury vapor. *Arch. Environm. Health*, 33: 190-214, 1978.
- Choi BH, Lapham LW, Amin-Zaki L, Saleem T. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 37: 719–733, 1978.
- Choi BH. The effects of methylmercury on the developing brain. *Prog. Neurobiol.*, 32: 447-470, 1989.
- Clark DB, Cornelius JR, Kirisci L, Tarter RE. Childhood risk categories for adolescent substance involvement: a general liability typology. *Drug Alcohol. Depend.*, 77: 13-21, 2005.
- Clarkson TW. Mercury: major issues in environmental of health. *Environ. Health Perspect.*, 100: 31-38, 1993.
- Cordier S, Deplan F, Mandereau L. Paternal exposure to mercury and spontaneous abortions. *Brit. J. Ind. Med.*, 48: 375-381, 1991.
- Correia CJ, Benson TA, Carey KB. Decrease substance use following increases in alternative behaviors : A preliminary investigation. *Addict. Behav.*, 30: 19-27, 2005.
- Costa JC, Tomaz C. Posttraining administration of substance P and its N-terminal fragment block the amnestic effects of diazepam. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 69: 65-70, 1998.

- Costa TC, Savage DD, Valenzuela CF. A review of the effects of prenatal or early postnatal ethanol exposure on brain ligand-gated ion channels. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24:706-715, 2000.
- Costa LC, Aschner M, Vitalone A, Syversen T, Soldin OP. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44: 87-110, 2004.
- Counter SA, Buchanan. Mercury exposure in Children: a review. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 198: 209-230, 2004.
- Da Silva GE, Ramos A, Takahashi RN. Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37: 1511-1517, 2004.
- Danielsson BR, Fredricksson A, Dahlgren L, Gardlund AT, Olsson L, Dencker L, Archer T. Behavioural effects of prenatal metallic mercury exposure in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* , 15: 391-396, 1993.
- Davidson PW, Myers GJ, Weiss B. Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics*, 113:1023-1029, 2004.
- Davies, M. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J. Psych. Neurosc.*, 28: 263-274, 2003.
- Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th. ed.: DSM-IV. Washington, D.C.: American Psychiatric Association, 1994.
- Diamond I, Messing RO. Neurologic effects of alcoholism. *West J. Med.*, 161: 279-287, 1994.
- Dietrich MO, Mantese CE, Anjos G, Souza DO, Farina M. Motor impairment induced by oral exposure to methylmercury in adult mice. *Environm. Toxicol. And Pharmacol.*, 19: 169-175, 2005.
- Dobbing J, Sands J. The quantitative growth and development of the human brain. *Arch. Dis. Child.*, 48: 757-767, 1993.

- Dodd PR, Foley PF, Buckley T, Eckert AL, Innes DJ. Genes and gene expression in the brain of the alcoholic. *Addict. Behav.*, 29: 1295-1309, 2004.
- Dorea JG. Fish are central in the diet of Amazonian riparians: should we worry about their mercury concentrations?. *Environ. Res.*, 92: 232-244, 2003.
- Duhig AM, Cavallo DA, McKee SA, George TP, Krishnan-Sarin S. Daily patterns of alcohol, cigarette, and marijuana use in adolescent smokers and nonsmokers. *Addict. Behav.*, 30: 271-283, 2005.
- Dutczak WJ, Clarkson TW, Ballatori N. Biliary-hepatic recycling of a xenobiotic: gallbladder absorption of methylmercury. *Am. Journ. Physiol.*, 260: G873-G880, 1991.
- Ebraldize AK, Rossi DJ, Tonegawa S, Slater NT. Modification of NMDA receptor channels and synaptic transmission by targeted disruption of the NR2C gene. *J. Neurosci.*, 16: 5014-5025, 1996.
- Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li T-K, Tabakoff B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22: 998-1037, 1998.
- Farber NB, Heinkel C, Dribben WH, Nemmers B, Jiang X. In the adult CNS, ethanol prevents rather than produces NMDA antagonist-induced neurotoxicity. *Brain Res.*, 1028: 66-74, 2004.
- Feldman RG. *Occupational and Environmental Neurotoxicology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.
- Feng W, Wang M, Li B, Liu J, Chai Z, Zhao J, Deng G. Mercury and trace element distribution in organic tissues and regional brain of fetal rat after in utero and weaning exposure to low dose of inorganic mercury. *Toxicol. Lett.*, 152(3):223-234, 2004.
- Ferreira VMM, Morato GS. Influence of age and pre-treatment with D-cycloserine on the behavior of ethanol-treated rats tested in the elevated plus-maze apparatus. *Addict. Biol.*, 1: 395-404, 1996.

- Ferreira VMM, Morato GS. D-cycloserine blocks the effects of ethanol and HA-966 in rats tested in the elevated plus-maze. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 21: 1638-1642, 1997.
- Figlie NB, Dunn J, Laranjeira R. Motivation for change in alcohol dependent outpatients from Brazil. *Addict. Behav.*, 30: 159-165, 2005.
- Floyd RL, Sidhu JS. Monitoring prenatal alcohol exposure. *Am. J. Med. Genet. C; Semin. Med. Genet.*, 127: 3-9, 2004.
- Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor, JA, Curran T. Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron*, 13: 325-338, 1994.
- Gauthier TW, Ping XD, Harris FL, Wong M, Elbahesh H, Brown LA. Fetal alcohol exposure impairs alveolar macrophage function via decreased glutathione availability. *Ped. Res.*, 57: 76-81, 2005.
- Gevaerd MS, Sultowski ET, Takahashi RN. Combined effects of diethylpropion and alcohol on locomotor activity of mice: participation of the dopaminergic and opioid systems. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32: 1545-1550, 1999.
- Goldstein DB. Pharmacology of alcohol. New York, NY, Oxford University Press, 1983.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sorensen N, Dahl R, Jorgensen PJ. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19: 417-428, 1997.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F. Cognitive performance of children prenatally exposed to 'safe' levels of methylmercury. *Environ. Res.*, 77: 165-172, 1998.
- Grinfeld H, Goldenberg S, Segre CAM, Chadi G. Fetal alcohol syndrome in São Paulo, Brazil. *Paediat. Perin. Epid.*, 13: 496-497, 1999.
- Guizzetti M, Costa LG. Disruption of cholesterol homeostasis in the developing brain as a potential mechanism contributing to the developmental neurotoxicity of ethanol: an hypothesis. *Med. Hypotheses*, 64: 563-567, 2005.

- Gutknecht J. Inorganic mercury (Hg^{2+}) transport through lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.*, 61: 61-66, 1981.
- Ham LS, Hope DA. Incorporating social anxiety into a model of college student problematic drinking. *Addict. Behav.*, 30: 127-150, 2005.
- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 327: 1-5, 1984.
- Harada M, Nakanishi J, Yasoda E, Pinheiro MCN, Oikawa T, Guimarães GA, Cardoso BS, Kizaki T, Ohno H. Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects. *Environ. Intern.*, 27: 285-290, 2001.
- Hard E, Engel J, Musi B. The ontogeny of defensive reactions in the rat: influence of the monoamine transmission systems. *Scand. J. Psychol.*, Suppl. 1, 90-96, 1982.
- Hare MF, Atchison WD. Comparative actions of methylmercury and divalent inorganic mercury on nerve terminal and intraterminal mitochondrial membrane potentials. *JPET*, 261: 166-172, 1992.
- Hsiao S, DuBois DW, Miranda RC, Frye GD. Critically timed ethanol exposure reduces GABA A R function on septal neurons developing in vivo but not in vitro. *Brain Res.*, 1008: 69-80, 2004.
- Huang L, Cox C, Myers GJ, Davidson PW, Cernichiari E, Shamlaye CF, Sloane-Reeves J, Clarkson TW. Exploring nonlinear association between prenatal methylmercury exposure from fish consumption and child development: evaluation of the Seychelles Child Development Study nine-year data using semiparametric additive models. *Environ. Res.*, 97: 100-108, 2005.
- Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovská V, Horster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056-1060, 2000.

- Imhof JT, Coelho ZMI, Schmitt ML, Morato GS, Carobrez AP. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus-maze apparatus. *Behav. Brain Res.*, 56: 177-180, 1993.
- Insel TR, Miller LP, Gelhard RE. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain - I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*, 35: 31-43, 1990.
- Iqbal U, Dringenberg HC, Brien JF, Reynolds JN. Chronic prenatal ethanol exposure alters hippocampal GABA-A receptors and impairs spatial learning in the guinea pig. *Behav. Brain Res.*, 150: 117-125, 2004.
- Ishimaru M, Fukamauchi F, Olney JW. Halothane prevents MK-801 neurotoxicity in the rat cingulate cortex. *Neurosci. Lett.*, 193:1-4, 1995.
- Iwasato T, Erzurumlu RS, Huerta PT, Chen DF, Sasaoka T, Ulupinar E, Tonegawa S. NMDA receptor-dependent refinement of somatotopic maps. *Neuron*, 19: 1201-1210, 1997.
- Juang MS, Yonemura K. Increased spontaneous transmitter release from presynaptic nerve terminal by methyl mercuric chlorid. *Nature*, 256: 211-213, 1975.
- Juarez BI, Portillo-Salazar H, González-Amaro R, Mandeville P, Aguirre JR, Jiménez ME. Participation of N-methyl-D-aspartate receptors on methylmercury-induced DNA damage in rat frontal cortex. *Toxicol.*, 207: 223-229, 2005.
- Jung S, Akabas MH, Harris RA. Functional and Structural Analysis of the GABAA Receptor {alpha} 1 Subunit during Channel Gating and Alcohol Modulation. *J. Biol. Chem.*, 280: 308-316, 2005.
- Kelly SJ, Pierce DR, West JR. Microencephaly and hyperactivity in adult rats can be induced by neonatal exposure to high blood alcohol concentrations. *Exp Neurol.*, 96: 580-593, 1987.
- Khan AT, Atkinson A, Graham TC, Thomson SJ, Ali S, Shireen KF. Effects of inorganic mercury on reproductive performance of mice. *Food Chem. Toxicol.*, 42: 571-577, 2004.

- Kim SH, Price MT, Olney JW, Farber NB. Excessive cerebrocortical release of acetylcholine induced by NMDA antagonists is reduced by gabaergic and α 2-adrenergic agonists. *Psychiatry*, 4: 344-352, 1999.
- Knobeloch L, Anderson HA, Imm P, Peters D, Smith A. Fish consumption, advisory awareness, and hair mercury levels among women of childbearing age. *Environ. Res*, 97: 220-227, 2005.
- Kolb JE, Trettel J, Levine ES. BDNF enhancement of postsynaptic NMDA receptors is blocked by ethanol. *Synapse*, 55: 52-57, 2005.
- Kuntsche EN, Kuendig H. Do school surroundings matter? Alcohol outlet density, perception of adolescent drinking in public, and adolescent alcohol use. *Addict. Behav.*, 30: 151-158, 2005.
- Lackowicz JR, Anderson CJ. Permeability of lipid bilayers to methylmercuric chloride: quantification by fluorescence quenching of a carbazole labeled phospholipid. *Chem. Biol. Interaction*, 30: 309-323, 1980.
- Lal H, Harris CM, Benjamin D, Springfield AC, Bhadra S, Emmett-Oglesby MW. Characterization of a pentylenetetrazol-like interoceptive stimulus produced by ethanol withdrawal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 247: 508-518, 1988.
- Laranjeira R. Liquorspeak and the developing world. *Addiction*, 91: 1870-1871, 1996.
- Lee KT, Mattson SN, Riley EP. Classifying children with heavy prenatal alcohol exposure using measures of attention. *J. Int. Neuropsychol.*, 10: 271-277, 2004.
- Legido A, Valencia I, Smith JD. Fetal neurological evaluation. *Rev. Neurol.*, 39: 454-464, 2004.
- Leutwyler J, Daeppen JB, Gerber S, Hohlfeld P. Pregnancy and alcohol consumption. *Rev. Med. Suisse Romande*, 124: 47-50, 2004.
- Levesque PC, Hare MF, Atchison WD. Inhibition of mitochondrial Ca^{2+} release diminishes the effectiveness of methylmercury to release acetylcholine from synaptosomes. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 115: 11-20, 1992.

- LoPachin RM, Aschner M. Glial-neuronal interactions: the relevance to neurotoxic mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 118: 141-158, 1993.
- Lupton C, Burd L, Harwood R. Cost of fetal alcohol spectrum disorders. *Am. J. Med. Genet. C; Semin. Med. Genet.*, 127: 42-50, 2004.
- Ma W, Pancrazio JJ, Andreadis JD, Shaffer KM, Stenger DA, Li BS, Zhang L, Barker JL, Maric D. Ethanol blocks cytosolic Ca²⁺ responses triggered by activation of GABA A receptor/Cl⁻ channels in cultured proliferating rat neuroepithelial cells. *Neuroscience*, 104:913-922, 2001.
- MacDonald RL. Ethanol, γ -aminobutyrate type A receptors, and protein kinase C phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92:3633-3635, 1995.
- Maier SE, West JR. Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. *Alcohol*, 23: 49-57, 2001.
- Martin MD, Naleway C. The inhibition of mercury absorption by dietary ethanol in humans: cross-sectional and case-control studies. *Occup. Environ. Med.*, 61:e8, 2004.
- Masur J, Schutz MT, Boerngen R. Gender differences in open-field behavior as a function of age. *Dev. Psychobiol.*, 13: 107-110, 1980.
- Matsumoto H, Koya G, Takeuchi T. Fetal minamata disease. A neuropathological study of two cases of intrauterine intoxication by a methyl mercury compound, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 24: 563-574, 1964.
- May M. Disturbing behavior: neurotoxic effects in children. *Environ. Health Perspect.*, 108: A262-267, 2000.
- McNeil SI, Bhatnagar MK, Turner CJ. Combined toxicity of ethanol and methylmercury in rat. *Toxicology*, 53: 345-363, 1988.
- Mehta AK, Ticku MK. Effect of chronic administration of ethanol on GABA(A) receptor assemblies derived from alpha(2)-, alpha(3)-, beta (2)- and gamma (2)-subunits in the rat cerebral cortex. *Brain Res.*, 1031: 134-137, 2005.

- Miyamoto MD. Hg²⁺ causes neurotoxicity at an intracellular site following entry through Na⁺ and Ca²⁺ channels. *Brain Res.*, 267: 375-379, 1983.
- Morato GS, Ortiga RM, Ferreira VMM. Involvement of nitric oxide-dependent pathways of dorsolateral periaqueductal gray in the effects of ethanol in rats submitted to the elevated plus-maze test. *Behav. Brain Res.*, 153: 341-349, 2004.
- Neese S, La Grange L, Trujillo E, Romero D. The effects of ethanol and silymarin treatment during gestation on spatial working memory. *BMC Complement Altern. Med.*, 4: 4, 2004.
- Norseth T, Clarkson TW. Studies on the biotransformation of Hg-203-labeled methylmercury chloride. *Arch. Environm. Health*, 21: 717-727, 1970.
- O'Kursky JR. Methylmercury-induced movement and postural disorders in developing rat: high-affinity uptake of choline, glutamate, and γ -aminobutyric acid in the cerebral cortex and caudate putamen. *J. Neurochem.*, 53: 999-1006, 1989.
- Ohmiya Y, Nakai K. Effect of methylmercury on the ethanol elimination from the blood and the activity of alcohol dehydrogenase. *Jpn J. Pharmacol.* 27: 545-551, 1977.
- Olney JW, Labruyere J, Wozniak DF, Price MT, Sesma MA. Fetal. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism prevention. *Science*, 254: 1515-1518, 1991.
- Olney JW. Fetal alcohol syndrome at the cellular level. *Addict. Biol.*, 9: 137-149, 2004.
- Omata S, Hirakawa E, Daimon Y, Uchiyama M., Nakashita H, Horigome T, Sugano I, Sugano H. Methylmercury induced changes in the activities of neurotransmitter enzymes in nervous tissue of the rat. *Arch. Toxicol.*, 51: 285-294, 1982.
- Passingham RE. Rates of brain development in mammals including man. *Brain Behav. Evol.*, 26: 167-175, 1985.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 14: 149-167, 1985.

- Philbert MA, Billingsley ML, Reuhl KR. Mechanism of injury in the central nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 43-53, 2000.
- Pichichero ME, Cernichiari E, Lopreiato J, Treanor J. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thimerosal: a descriptive study. *Lancet*, 360: 1737-1741, 2002.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressants treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, 47: 379-391, 1978.
- Prediger RD, Batista LC, Miyoshi E, Takahashi RN. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. *Behav. Brain Res.*, 153:149-157, 2004.
- Rajanna B, Hobson M. Influence of mercury on uptake of [³H]dopamine and [³H]norepinephrine by rat brain synaptosomes. *Toxicol. Lett.*, 27: 7-14, 1985.
- Ransom B, Behar T, Nedegaard M. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci.*, 26: 620-622, 2003.
- Riley EP, Barron S, Driscoll CD, Hamlin RT. The effects of physostigmine on open-field behavior in rats exposed to alcohol prenatally. *Alcohol Clin Exp Res.*, 10: 50-53, 1986.
- Rodier PM. Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Dev. Med. Child Neurol.*, 22: 525-545, 1980.
- Rodier PM, Vulnerable periods and processes during central nervous system development. *Environ. Health Perspect.*, 102 (Suppl. 2): 121-124, 1994.
- Rowland I, Davies M, Evans J. Tissue content of mercury in rats given methylmercury chloride orally: influence of intestinal flora. *Arch. Env. Health*, 35: 155-160, 1980.
- 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.

- 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.
- Sano K, Shimojo N, Yamaguchi S. Effects of methylmercury on ethanol-induced sleeping time of mice. *Nippon Eis. Zass.*, 45: 717-722, 1990.
- Santos EC, Camara Vde M, Brabo Eda S, Loureiro EC, de Jesus IM, Fayal K, Sagica F. Mercury exposure among Pakaanóva Indians, Amazon Region, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 19: 199-206, 2004.
- Satoh H. Behavioral teratology of mercury and its compounds. *Tohoku J. Exp. Med.*, 201: 1-9, 2003.
- Schuckit MA. Low level of response to alcohol as a predictor of future alcoholism. *Am. J. Psychiatry*, 151: 184-189, 1994.
- Shafer TJ, Atchison WD. Block of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake into synaptosomes by methylmercury: Ca^{2+} and Na^{+} -dependence. *JPET*, 248: 696-702, 1989.
- Shafer TJ, Meacham CA, Barone Jr., S. Effects prolonged exposure to nanomolar concentrations of methylmercury on voltage-sensitive sodium and calcium currents in PC12 cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 136: 151-164, 2002.
- Sharps MJ, Price-Sharps JL, Day SS, Villegas AB, Nunes MA. Cognitive predisposition to substance abuse in adult attention deficit hyperactivity disorder. *Addict. Behav.*, 30: 355-359, 2005.
- Smart JL. Critical periods in brain development. In: *The Childhood Environment and Adult Disease* (Ciba Found. Symp. 156), pp. 109-128, Winchester, PA: Wiley, 1991.
- Tabakoff B, Hoffman PL. Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron*, 16: 909-12, 1996.
- Takeuchi T, Eto K. A Tragic Story of Water Pollution. In: *The Pathology of Minamata Disease*, Kyushu University Press, Fukuoka, pp. 51-174, 1999.

- 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.
- Teisinger J, Fiserova-Bergerova V. Pulmonary retention and excretion of mercury vapors in man. *Ind. Med. Surg.*, 34: 580, 1965.
- Thomas JD, Riley EP. Fetal Alcohol Syndrome. *Alcohol Health Res. World*, 22: 47-53, 1998.
- Tsubaki T, Irukayama K. (eds.). Minamata disease: methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan. *Elsevier*, New York, 1977.
- Tsuzuki Y. Effects of chronic methylmercury exposure on activities of neurotransmitter enzymes in rat cerebellum. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 60: 379-381, 1981.
- Turner CJ, Bhatnagar MK, Yamashiro S. Ethanol potentiation of methyl mercury toxicity: a preliminary report. *J. Toxicol. Environ. Health.* 7: 665-668, 1981.
- Urso T, Gavaler JS, Van Thiel DH. Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. *Life Sci.*, 28: 1053-1056, 1981.
- Valenzuela CF. Alcohol and neurotransmitter interactions. *Alcohol Health Res. World*, 21: 144-148, 1997.
- Valenzuela CF, Cardoso RA, Wick MJ, Weiner JL, Dunwiddie TV, Harris RA. Effects of ethanol on recombinant glycine receptors expressed in mammalian cell lines. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22: 1132-1136, 1998.
- Walter HJ, McMahon T, Dadgar J, Wang D, Messing RO. Ethanol regulates calcium channel subunits by protein kinase C delta-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 275: 25717-25722, 2000.
- WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). Environmental Health Criteria 101 Methylmercury. Geneva: World Health Organization, 1990.

- WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). Environmental Health Criteria 118 Inorganic Mercury. Geneva: World Health Organization, 1991.
- Willford JA, Richardson GA, Leech SL, Day NL. Verbal and visuospatial learning and memory function in children with moderate prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 28: 497-507, 2004.
- Wilmott RW. Characteristics of fetal alcohol syndrome. *Journ. Pediat.*, 145: A1, 2004.
- Woodward JJ. Overview of the effects of alcohol on the cerebral nervous system. *Neurochem. Intern.*, 35: 93-94, 1999.
- Worst TJ, Vrana KE. Alcohol and gene expression in the central nervous system. *Alcohol Alcohol.*, 40: 63-75, 2005.
- Yokoo EM, Valente JG, Grattan L, Schmidt SL, Platt I, Silbergeld EK. Low level methylmercury exposure affects neuropsychological function in adults. *Environ. Health.*, 2: 8, 2003.
- Yuan Y, Atchison WD. Disruption by methylmercury of membrane excitability and synaptic transmission of CA1 neurons in hippocampal slices of the rat. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 120: 203-215, 1993.
- Zanoli P, Cannazza G, Baraldi M. Prenatal exposure to methyl mercury in rats: focus on changes in kynurenine pathway. *Brain Res. Bull.*, 55: 235-238, 2001.

8. ANEXOS

SECRETARIA DE ASSUNTOS PARLAMENTARES

Lei 1.153, de 1995 (revoga a lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979)

--- Principais pontos obedecidos encontram-se grifados ---

Capítulo IV – Das Condições e Uso de Animais para Ensino e Pesquisa Científica

Art. 11. Compete ao Ministério da Ciência e Tecnologia licenciar as atividades destinadas à criação de animais, ao ensino e à pesquisa científica de que trata esta lei.

Art. 12. A criação ou utilização de animais para pesquisa fica restrita, exclusivamente, às instituições credenciadas junto ao CONCEA.

Art. 13. Qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional que crie ou utilize animais para ensino e pesquisa deverá requerer credenciamento junto ao CONCEA, para uso de animais, desde que, previamente, crie a CEUA.

Art. 14. O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado quando, antes, durante e após o experimento, receber cuidados especiais, conforme estabelecido pelo CONCEA.

§ 1º O animal será submetido a eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, conforme as diretrizes do Ministério da Ciência e Tecnologia, sempre que, encerrado o experimento, ou em qualquer de suas fases, for tecnicamente recomendado aquele procedimento, ou quando ocorrer intenso sofrimento.

§ 2º Excepcionalmente, quando os animais utilizados em experiências ou demonstrações não forem submetidos à eutanásia, poderão sair do biotério após a intervenção, ouvida a respectiva CEUA quanto aos critérios vigentes de segurança, desde que destinados a peças idôneas ou entidades protetoras de animais devidamente legalizadas, que por eles queiram responsabilizar-se.

§ 3º Sempre que possível, as práticas de ensino deverão ser fotografadas, filmadas ou gravadas de forma a permitir sua reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais.

§ 4º O número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento será o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento.

§ 5º Experimentos que possam causar dor ou angústia desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas.

§ 6º Experimentos cujo objetivo seja o estudo dos processos relacionados à dor e a angústia exigem autorização específica da CEUA, em obediência a normas estabelecidas pelo CONCEA.

§ 7º É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares, ou relaxantes musculares, em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas.

§ 8º É vedada a reutilização do mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa.

§ 9º Em programa de ensino, sempre que forem empregados procedimentos traumáticos, vários procedimentos poderão ser realizados num mesmo animal, desde

que todos sejam executados durante a vigência de um único anestésico e que o animal seja sacrificado antes de recobrar a consciência.

§ 10º Para a realização de trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados, serão consideradas as condições e normas de segurança recomendadas pelos organismos internacionais aos quais o Brasil se vincula.

Art. 15. O CONCEA, levando em conta a relação entre o nível de sofrimento para o animal e os resultados práticos que se esperam obter, poderá restringir ou proibir experimentos que importem em elevado grau de agressão.

Art. 16. Todo projeto de pesquisa científica ou atividade de ensino será supervisionado por profissional de nível superior, graduado ou pós-graduado na área biomédica, vinculado a entidade de ensino ou pesquisa credenciada pelo CONCEA.

Decreto-lei completo apresenta-se, posteriormente, anexado.



Secretaria de Assuntos Parlamentares

PROJETO DE LEI

Dispõe sobre criação e uso de animais para atividades de ensino e pesquisa.

O CONGRESSO NACIONAL decreta:

Capítulo I

DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 1º Esta Lei estabelece critérios para a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional.

§ 1º A utilização de animais em atividades de ensino fica restrita a estabelecimentos de ensino superior ou técnico de 2º grau.

§ 2º São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

§ 3º Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária.

Art. 2º O disposto nesta Lei aplica-se aos animais das espécies classificadas como *Filo Chordata*, *sub-filo Vertebrata*, observada a legislação ambiental.

Art. 3º Para as finalidades desta lei, entende-se por:

I - *Filo Chordata*: animais que possuem como características exclusivas um eixo dorsal de sustentação, um sistema respiratório derivado da faringe, um sistema nervoso tubular oco e dorsal e um coração localizado ventralmente em relação ao tubo digestivo;

II - *Sub-filo Vertebrata*: animais que possuem notocorda na fase embrionária, substituída gradativamente pela coluna vertebral cartilaginosa ou óssea, encéfalo e esqueleto interno cartilaginoso ou ósseo;

III - Ciência básica: domínio do saber científico cujas prioridades residem na expansão das fronteiras do conhecimento independentemente de suas aplicações;

IV - Ciência aplicada: domínio do saber científico cujas prioridades residem no atendimento das necessidades impostas pelo desenvolvimento social, econômico e tecnológico;

V - Imunobiológicos: derivados biológicos destinados a imunizações ou reações imunitárias;

VI - Experimentos: procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e preestabelecidas;

VII - Eutanásia: prática que acarreta a morte do animal, sem provocar dor ou ansiedade, visando a evitar sofrimento, mediante técnicas específicas e preestabelecidas;

VIII - Centro de criação: local onde são mantidos os reprodutores das diversas espécies animais, dentro de padrões genéticos e sanitários preestabelecidos, para utilização em atividades de ensino e pesquisa;

IX - Biotério: local dotado de características próprias onde são criados ou mantidos animais de qualquer espécie, destinados ao campo da ciência e tecnologia voltado à saúde humana e animal;

X - Laboratório de experimentação animal: local provido de condições ambientais adequadas, bem como de equipamentos e materiais indispensáveis à realização de experimentos em animais, que não podem ser deslocados para um biotério.

Capítulo II

DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

(CONCEA)

Art. 4º Fica criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Art. 5º Compete ao CONCEA:

I - expedir e fazer cumprir normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II - credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica;

III - monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituem a utilização de animais em ensino e pesquisa;

IV - estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;

V - estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;

VI - estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;

VII - manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais, de que trata o artigo 8º desta Lei;

VIII - apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs;

IX - elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;

X - assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa tratadas nesta Lei.

Art. 6º O CONCEA é constituído por:

I - Plenário;

II - Câmaras Permanentes e Temporárias;

III - Secretaria-Executiva.

§ 1º São Câmaras Permanentes do CONCEA, a de Ética, a de Legislação e Normas e a de Técnica, conforme definido no regimento interno.

§ 2º A Secretaria-Executiva é responsável pelo expediente do CONCEA e terá o apoio administrativo do Ministério da Ciência e Tecnologia.

§ 3º O CONCEA poderá valer-se de consultores "ad-hoc" de reconhecida competência técnica e científica, para instruir quaisquer processos de sua pauta de trabalhos.

Art. 7º O CONCEA será presidido pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia e integrado por:

I - um representante de cada órgão e entidade a seguir indicados:

- a) Ministério da Ciência e Tecnologia;
- b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- c) Ministério da Educação e do Desporto;
- d) Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal;
- e) Ministério da Saúde;
- f) Ministério da Agricultura e do Abastecimento;
- g) Universidades Federais;
- h) Academia Brasileira de Ciências;
- i) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência;
- j) Federação das Sociedades de Biologia Experimental;
- l) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;
- m) Federação Nacional da Indústria Farmacêutica;

II - dois representantes das Sociedades Protetoras de Animais legalmente estabelecidas no País.

§ 1º Nos seus impedimentos, o Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia será substituído, na presidência do CONCEA, pelo Secretário-Executivo do respectivo Ministério.

§ 2º O presidente do CONCEA terá o voto de qualidade.

§ 3º Os membros do CONCEA não serão remunerados, sendo os serviços por eles prestados considerados, para todos os efeitos, de relevante serviço público.

Capítulo III

DAS COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

Art. 8º É condição indispensável, para o credenciamento das instituições com atividades de ensino e pesquisa com animais, a constituição prévia de Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA), prevista no art. 13.

Art. 9º As CEUAs são integradas por:

I - médicos veterinários e biólogos;

II - docentes e pesquisadores na área específica; e

III - um representante de sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

Art. 10. Compete à CEUA:

I - cumprir e fazer cumprir, no âmbito de suas atribuições, o disposto nesta Lei e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais para ensino e pesquisa, especialmente nas resoluções do CONCEA;

II - examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável;

III - manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados, ou em andamento, na instituição, enviando cópia ao CONCEA;

IV - manter cadastro dos pesquisadores que realizem procedimentos de ensino e pesquisa, enviando cópia ao CONCEA;

V - expedir, no âmbito de suas atribuições, certificados que se fizerem necessários junto a órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos ou outros.

VI - notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de qualquer acidente com os animais nas instituições credenciadas, fornecendo informações que permitam ações saneadoras.

§ 1º Constatado qualquer procedimento em descumprimento às disposições desta Lei, na execução de atividade de ensino e pesquisa, a respectiva CEUA determinará a paralisação de sua execução, até que a irregularidade seja sanada, sem prejuízo da aplicação de outras sanções cabíveis.

§ 2º Quando se configurar a hipótese prevista no parágrafo anterior, a omissão da CEUA acarretará sanções à instituição, nos termos dos arts 17 e 20 desta Lei.

§ 3º Das decisões proferidas pela CEUA cabe recurso, sem efeito suspensivo, ao CONCEA.

§ 4º Os membros da CEUA responderão pelos prejuízos que, por dolo, causarem às pesquisas em andamento.

§ 5º Os membros da CEUA estão obrigados a resguardar o segredo industrial, sob pena de responsabilidade.

Capítulo IV

DAS CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO E USO DE ANIMAIS PARA ENSINO

E PESQUISA CIENTÍFICA

Art. 11. Compete ao Ministério da Ciência e Tecnologia licenciar as atividades destinadas ao ensino e à pesquisa científica de que trata esta Lei, observado o disposto no artigo seguinte.

Art. 12. A criação ou a utilização de animais para ensino e pesquisa ficam restritas, exclusivamente, às instituições credenciadas pelo CONCEA.

Art. 13. Qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional que crie ou utilize animais para ensino e pesquisa deverá requerer credenciamento junto ao CONCEA, para uso de animais, desde que, previamente, crie a CEUA.

§ 1º A critério da instituição, e mediante autorização do CONCEA, é admitida a criação de mais de uma CEUA por instituição.

§ 2º Na hipótese prevista no parágrafo anterior, cada CEUA definirá os laboratórios de experimentação animal, biotérios e centros de criação sob o seu controle.

Art. 14. O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado quando, antes, durante e após o experimento, receber cuidados especiais, conforme estabelecido pelo CONCEA.

§ 1º O animal será submetido à eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, preferencialmente com aplicação de dose letal de substância depressora do sistema nervoso central, sempre que, encerrado o experimento, ou em qualquer de suas fases, for tecnicamente recomendado aquele procedimento, ou quando ocorrer intenso sofrimento.

§ 2º Excepcionalmente, quando os animais utilizados em experiências ou demonstrações não forem submetidos à eutanásia, poderão sair do biotério após a intervenção, ouvida a respectiva CEUA quanto aos critérios de segurança, desde que destinados a pessoas idôneas ou entidades protetoras de animais devidamente legalizadas, que por eles queiram responsabilizar-se.

§ 3º Sempre que possível, as práticas de ensino deverão ser fotografadas, filmadas ou gravadas, de forma a permitir sua reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais.

§ 4º Os projetos de pesquisa devem demonstrar a relevância de seus resultados para o progresso da ciência.

§ 5º O número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento será o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento.

§ 6º Experimentos que possam causar dor ou angústia desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas.

§ 7º É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares, ou de relaxantes musculares, em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas.

§ 8º É vedada a reutilização do mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa.

§ 9º Em programa de ensino, sempre que for necessário anestésiar o animal, vários procedimentos poderão ser realizados num mesmo animal, desde que todos sejam executados durante a vigência de um único período anestésico e que, se necessário, o animal seja sacrificado antes de recobrar a consciência.

§ 10 Para a realização de trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados, serão consideradas as condições e normas de segurança recomendadas pela Organização Mundial de Saúde ou pela Organização Pan-Americana de Saúde.

Art. 15. O CONCEA, levando em conta a relação entre o nível de sofrimento para o animal e os resultados práticos que se esperam obter, poderá restringir ou proibir experimentos que importem em elevado grau de agressão.

Art. 16. Todo projeto de pesquisa científica ou atividade de ensino será supervisionado por profissional de nível superior, graduado ou pós-graduado na área biomédica, vinculado a entidade de ensino ou pesquisa credenciada pelo CONCEA.

Capítulo V

DAS PENALIDADES

Art. 17. As instituições que executem atividades reguladas por esta Lei estão sujeitas, em caso de transgressão às suas disposições e ao seu regulamento, às penalidades administrativas de:

I - advertência;

II - multa de R\$5.000,00 (cinco mil reais) a R\$20.000,00 (vinte mil reais);

III - interdição temporária;

IV - suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico;

V - interdição definitiva.

Parágrafo único. A interdição por prazo superior a trinta dias somente poderá ser determinada em ato do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, ouvidos os órgãos competentes mencionados no art. 21 desta Lei.

Art. 18. Qualquer pessoa, que execute de forma indevida atividades reguladas por esta Lei ou participe de procedimentos não autorizados pelo CONCEA, será passível das seguintes penalidades administrativas:

I - advertência;

II - multa de R\$1.000,00 (mil reais) a R\$5.000,00 (cinco mil reais);

III - suspensão temporária;

IV - interdição definitiva para o exercício da atividade regulada nesta Lei.

Art. 19. As penalidades previstas nos artigos 17 e 18 desta Lei, serão aplicadas de acordo com a gravidade da infração, os danos que dela provierem, as circunstâncias agravantes ou atenuantes e os antecedentes do infrator.

Art. 20. As sanções previstas nos artigos 17 e 18 desta Lei serão aplicadas pelo CONCEA, sem prejuízo de correspondente responsabilidade penal.

Capítulo VI

DISPOSIÇÕES GERAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 21. A fiscalização das atividades reguladas por esta Lei fica a cargo dos órgãos competentes dos Ministérios da Agricultura e do Abastecimento, da Saúde e do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, nas suas respectivas áreas de competência.

Art. 22. Qualquer pessoa que, por ação ou omissão, interferir nos centros de criação, biotérios e laboratórios de experimentação animal, de forma a colocar em risco a saúde pública e o meio ambiente, estará sujeita às correspondentes responsabilidades civil e penal.

Art. 23. As instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa existentes no País antes da data de vigência desta Lei, deverão:

I - criar a CEUA, no prazo máximo de noventa dias, após a regulamentação referida no art. 27 desta Lei;

II - compatibilizar suas instalações físicas, no prazo máximo de cinco anos, a partir da entrada em vigor das normas técnicas estabelecidas pelo CONCEA, com base no art. 5º, inciso V, desta Lei.

Art. 24. O CONCEA, mediante resolução, recomendará às agências de amparo e fomento à pesquisa científica o indeferimento de projetos, por qualquer dos seguintes motivos:

I - que estejam sendo realizados, ou propostos para realização, em instituições por ele não credenciadas;

II - que estejam sendo realizados sem a aprovação da CEUA;

III - cuja realização tenha sido suspensa pela CEUA.

Art. 25. O CONCEA, solicitará aos editores de periódicos científicos nacionais que não publiquem os resultados de projetos por qualquer dos seguintes motivos:

I - realizados em instituições por ele não credenciadas;

II - realizados sem a aprovação da CEUA;

III - cuja realização tenha sido suspensa pela CEUA.

Art. 26. Os recursos orçamentários necessários ao funcionamento do CONCEA serão previstos nas dotações do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Art. 27. Esta Lei será regulamentada no prazo de 180 dias.

Art. 28. Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 29. Revoga-se a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979.

Brasília,

DOSAGEM ALCOÓLICA MÉTODO DE WIDMARK MODIFICADO

Material:

- Aparelho de destilação Simples;
- Aparelho de Titulação (Bureta 10 mL);
- Becker (50 mL);
- Erlenmeyer (250 mL);

- Pipetas (2, 5 e 10 mL);
- Sistema de Aquecimento.

Reagentes:

- Ácido Pícrico (Solução Saturada – 15g/1000mL);
- Dicromato de Potássio 0,1 N [K_2CrO_7];
- Ácido Sulfúrico PA [H_2SO_4];
- Solução de Amido 2%;
- Iodeto de Potássio a 5% [KI];
- Tiosulfato de Sódio 0,1 N [$Na_2SO_3 \cdot 5H_2O$]

Técnica:

Como descrita anteriormente na metodologia

Fundamento:

O excesso de dicromato de potássio 0,1 N põe quantitativamente o lodo em liberdade, dando a solução coloração parda. O lodo liberado é titulado com uma solução de Tiosulfato de Sódio 0,1 N, na presença de solução de amido a 2% (3 gotas) até coloração Azul Celeste persistente, sem tonalidade intermediária.

Fórmula (Cálculo):

$$\frac{(10 - N) \times 1,15}{V.A.}$$

Onde:

N = Nº de mL gasto de Tiosulfato de Sódio

1,15 = Constante (equivalente em gramas da quantidade de etanol para decompor 1mL de $K_2Cr_2O_7$ 0,1 N)

V.A = Volume da amostra de sangue destilado

TABELA DE ROUGER-DOURIS

| | |
|-------------|--------------------------|
| 0,00 a 1,09 | Não Justifica Embriaguez |
| 1,10 a 1,59 | Embriaguez Com Ressalva |
| 1,60 a 3,09 | Embriaguez |
| 3,10 a 4,09 | Embriaguez Completa |
| 4,10 a 6,00 | Embriaguez Profunda |

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)