

ANÁLISE ELETROCORTICOGRÁFICA E HEMATOLÓGICA DE RATOS WISTAR EXPOSTOS AO METILMERCÚRIO PELA VIA TRANSPLACENTÁRIA E MAMÁRIA, DURANTE O TERÇO FINAL DA GESTAÇÃO E PERÍODO DE LACTAÇÃO

RESUMO

O mercúrio está presente em todo ambiente, encontrado em diversas formas, sendo o metilmercúrio a forma na qual o mercúrio apresenta maior toxicidade. Mediante ao exposto, este trabalho teve como objetivo elucidar alguns efeitos causados pela exposição ao metilmercúrio durante o terço final do período gestacional e durante a lactação, avaliando a toxicidade provocada pelo metilmercúrio a partir do 14º dia de gestação até o 14º dia pós-natal por meio de eletroencefalograma e avaliação das alterações hematológicas. Foram utilizadas ratas da linhagem wistar, sendo quatro ratas fêmeas e suas proles, que corresponderam a 32 ratos wistar jovens. As ratas foram agrupadas em dois grupos com dois animais em cada, o grupo controle, que recebeu água filtrada, e o grupo que recebeu água com metilmercúrio, em concentração de 0,04mg/mL. Cada grupo foi mantido em gaiola individualizada e o volume de água ingerido foi medido a cada 24 horas. Para avaliação do eletroencefalograma foram implantados eletrodos na duramater em 18 animais, que constituíram dois grupos com nove animais em cada, um grupo cuja mãe recebeu metilmercúrio (0,04mg/mL) na água fornecida (grupo tratado) e outro cuja mãe não teve contato com metilmercúrio (grupo controle). A coleta de sangue foi feita imediatamente após a aquisição do registro eletroencefalográfico. Os resultados dos registros eletrocorticográficos apresentaram diferença estatística significativa nos animais tratados. Na análise hematológica, os animais tratados apresentaram uma diminuição significativa da taxa leucocitária, devido a uma acentuada linfopenia. Os animais tratados também apresentaram uma diminuição significativa no número de hemácias e hemoglobinas. O volume de plaquetas também foi alterado na presença do metilmercúrio. Neste trabalho foi possível observar que as alterações nos parâmetros hematológicos sugerem que a exposição crônica ao metilmercúrio pode acarretar em déficit do sistema imune, bem como quadros de anemia e distúrbios da coagulação. Os animais neonatos são mais susceptíveis aos efeitos neurológicos causados pela exposição ao mercúrio devido ao maior afinidade deste ao tecido nervoso em desenvolvimento. As alterações neurológicas encontradas nos ratos expostos ao metilmercúrio sugerem a necessidade de aplicação de técnicas quantitativas para avaliação das funções somatossensoriais, bem como o

monitoramento periódico do quadro clínico e toxicológico, tendo em vista a elevada neurotoxicidade desse composto.

Palavras-chave: metilmercúrio, eletroencefalograma, análise hematológica, efeitos pós-natais.

ABSTRACT

Mercury is present throughout the environment, found in different forms, being methylmercury the form in which mercury has the highest toxicity. By the above, this study aimed to elucidate some effects caused by exposure to methylmercury during the final third of pregnancy and during lactation, assessing the toxicity caused by methylmercury from the 14th day of gestation to the 14th day postnatal through electroencephalogram and evaluation of haematological disorders. Wistar strain rats were used, four female rats and their offspring, corresponding to 32 young Wistar rats. The rats were divided into two groups with two animals in each, the control group, which received filtered water, and the group that received water with methylmercury concentration of 0.04 mg / mL. Each group was kept in individual cage and the volume of water ingested was measured every 24 hours. To evaluate the electroencephalogram electrodes were implanted in the duramater in 18 animals, which constituted two groups of nine animals each, a group whose mother received methylmercury (0.04 mg / ml) in the provided water (treated group) and another whose mother had not contact with methylmercury (control group). The blood sample was taken immediately after the acquisition of electroencephalographic record. The results of the electroencephalographic records showed statistically significant differences in treated animals. In the hematological analysis, the treated animals showed a significant decrease in leukocyte rate due to a severe lymphopenia. Treated animals also showed a significant decrease in the number of red blood cells and hemoglobin. The platelet volume was also altered in the presence of methylmercury. In this study it was observed that the changes in hematological parameters suggest that chronic exposure to methylmercury can lead to deficit of the immune system, as well as pictures of anemia and coagulation disorders. The neonatal animals are more susceptible to neurological effects caused by exposure to mercury due to its greater affinity for the nervous tissue in development. The neurological changes seen in rats exposed to methylmercury suggest the need for application of quantitative techniques for the evaluation of somatosensory functions, as well as periodic monitoring of the clinical and toxicological status, given the high neurotoxicity of this compound.

Keywords: methylmercury, electroencephalogram, haematological tests postnatal effects.

1. Introdução

O mercúrio (Hg) está presente em todo ambiente, sendo encontrado em três formas: mercúrio elementar (Hg^0), sais inorgânicos (Hg^+ e Hg^{2+}) e compostos orgânicos, a exemplo do Metilmercúrio (MeHg), cada qual diferindo quanto aos níveis de toxicidade e propriedades físico-químicas (CLARKSON, 1997; GOLDMAN & SHANNON, 2001; HOLMES et al., 2009). Quando o mercúrio combina com carbono, os compostos formados são chamados de “orgânicos”, compostos de mercúrio ou organomercuriais. Há um número potencialmente grande de compostos de organomercuriais, porém, o composto orgânico de mercúrio mais comum no meio ambiente é o metilmercúrio, também conhecido como monometilmercúrio (OPAS, 2011).

No Brasil, a liberação do metal por atividades humanas duplicou nos últimos 100 anos, superando a forma natural de liberação (SCHUSTER *et al.*, 2002). Na região Amazônica a contaminação por mercúrio se deu principalmente em virtude da mineração de ouro e mais recentemente a intensa ocorrência de incêndios florestais, o que leva ao acúmulo de altos níveis deste metal tanto no solo como nos rios. Em algumas regiões, a concentração de mercúrio nos peixes, por exemplo, excede os níveis permitidos por leis brasileiras que está em torno de 0,5mg/Kg (WASSERMAN et al., 2001; BISINOTI & JARDIM, 2004).

O metilmercúrio (MeHg) é considerado o composto orgânico de mercúrio mais tóxico (AMIN-ZAKI et al., 1974; CLARKSON, 2002; NASCIMENTO, 2007). Uma vez formado, o metilmercúrio entra na cadeia alimentar através de rápida difusão e forte ligação com as proteínas da biota aquática, atingindo sua concentração máxima em tecidos de peixes, principal fonte de contaminação de MeHg para a população indígena e ribeirinha da Amazônia (MICARONI; BUENO; JARDIM, 2000). Modelos experimentais com roedores mostraram que, assim como em humanos, a toxicidade do MeHg é maior no sistema nervoso central (SNC) (AUCOTT et al, 2003; HAYKAL-COATS et al., 1998).

Pesquisas sobre a exposição pré-natal a MeHg, em várias espécies de animais de laboratório e também em humanos, confirmam uma maior vulnerabilidade do cérebro fetal a esse metal (CASTOLDI et al., 2008; DREIEM et al., 2009; SAKAMOTO et al., 2013). O MeHg pode causar distúrbios persistentes no comportamento motor e alterações neuropatológicas gerais, incluindo morte de células neuronais e inflamação do nervo posterior em ratos. Além disso, outros eventos moleculares estão envolvidos na neurotoxicidade induzida pelo MeHg tais como, aumento nas concentrações de cálcio (Ca^{2+}) intracelular, na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nas concentrações de glutamato

extracelular via inibição da captação deste neurotransmissor pelos astrócitos (ASCHNER et al., 2007; FARINA et al., 2011).

Diante do exposto torna-se importante obter informações acerca dos possíveis efeitos pós-natais causados pela exposição ao metilmercúrio, durante o terço final do período gestacional e durante a lactação, com isso, objetivou-se nesse trabalho investigar os riscos da intoxicação causada pelo metilmercúrio durante o período gestacional a partir dos 14 dias de gestação até o 14º dia pós-natal para avaliar a toxicidade provocada pelo metilmercúrio através de eletroencefalograma e alterações hematológicas.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Animais

Para o trabalho foram utilizadas quatro fêmeas adultas e suas proles que corresponderam a 32 ratos wistar jovens, pesando entre 39 e 46g. Os animais foram obtidos do Biotério Central de Universidade Federal do Pará, ainda em vida intrauterina no 14º dia de gestação, as fêmeas gestantes foram acondicionadas individualmente e mantidas no Biotério de Experimentação do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, ambiente com temperatura regulada (25 -28 °C), e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*. A pesquisa foi regida segundo os preceitos da legislação nacional para utilização e criação de animais para experimentação e os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), após o projeto de pesquisa ter sido submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Uso de Animais da UFPA (CEPAE-UFPA 243-14).

1.2. Substâncias químicas

O anestésico cloridrato de quetamina foi obtido do Laboratório Köing (Santana de Parnaíba, SP, Brasil), O cloridrato de xilazina foi obtido do laboratório Vallée (Montes Claros, MG, Brasil), O anestésico local lidocaína foi obtido pelo laboratório Hipolabor (Sabará, MG, Brasil), Metilmercúrio do Laboratório SIGMA.

1.3. DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS DO EXPERIMENTO

Neste experimento, os animais foram distribuídos aleatoriamente da seguinte forma: Quatro ratas grávidas pesando $242,5 \pm 8,386g$ foram agrupadas em 2 grupos com 2 animais em cada, respectivamente, grupo controle e o grupo tratado com metilmercúrio na

concentração de 0,04mg/mL na água fornecida. Cada grupo ficou em gaiola individualizada e o volume de água ingerido foi medido a cada 24 horas. O grupo controle recebeu água filtrada durante 21 dias. Para o grupo tratado o fornecimento de metilmercúrio na água iniciou no terço final da gestação e foi realizado até o 14º dia pós-parto. A prole foi mantida com a mãe até sua desmama que ocorreu aos 21 dias. Este procedimento foi feito devido aos animais da prole passarem a beber água a partir do 14º dia, o que poderia mascarar a contaminação pela via intrauterina e mamária. A média de peso dos animais após o parto foi de $192,3 \pm 6,652$ g e a média de animais nascidos foi de $8,5 \pm 1,291$.

1.4. Eletroencefalograma dos animais

Para constatação das alterações eletroencefalográficas foram implantados eletrodos acomodados na duramater em 18 animais, que constituíram dois grupos com 9 animais, um grupo tratado cuja a mãe recebeu metilmercúrio (0,04mg/mL) na água fornecida e outro controle cuja a mãe não teve contato com metilmercúrio.

1.5. Procedimento para a implantação do eletrodo

Os animais foram anestesiados com uma associação de Cloridrato de Xilazina (5 mg/kg) e Cloridrato de Cetamina (50mg/kg) por via intraperitoneal. Após o animal apresentar a perda de reflexo interdigital foi fixado no aparelho esterotáxico, para a implantação de eletrodos. O procedimento foi iniciado com a tricotomia da pele da região da cabeça, com adequada assepsia, foi feita a infiltração de lidocaína a 2% no local da incisão cirúrgica que contem 1,0 cm rostro-caudal na linha mediana, expondo a superfície óssea do crânio. A lidocaína também foi aplicada no conduto auditivo externo para reduzir os efeitos da pressão das barras do aparelho esterotáxico. Após a exposição do osso do crânio foram feitas duas perfurações com aparelho odontológico, obedecendo as coordenadas esterotáxicas 0,0 mm para bregma, 1 mm latero-lateral, onde foram implantados os eletrodos que apresentam 1 mm de diâmetro e acomodados na duramater, e fixado com acrílico autopolimerizante de uso odontológico.

1.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após o procedimento cirúrgico foram mantidos 9 animais por caixa e acondicionados no biotério de experimentação. Foram formados dois grupos de 9 animais (controle e tratado). No sétimo dia após a cirurgia, que corresponde ao 28º dia de idade, os eletrodos foram

conectados a um sistema de aquisição de dados, composto por um amplificador de alta impedância (Grass Technologies, P511), monitorado por um osciloscópio (Protek, 6510), os dados foram continuamente digitalizados em uma taxa de 1 KHz por um computador equipado com uma placa de aquisição de dados (National Instruments, Austin, TX) os dados foram armazenados em disco rígido e, processado através de um software especializado (LabVIEW express). O eletrodo de registro estava localizado no lado direito do hemisfério, e do lado esquerdo o eletrodo de referência. Todo o experimento foi executado dentro da gaiola de Faraday.

Após 10 minutos de acomodação, foi feito o registro que teve duração de 10 minutos para cada animal.

1.7. Análise de dados

Para as análises dos sinais adquiridos uma ferramenta foi construída usando a linguagem de programação Python versão 2.7. As bibliotecas Numpy e Scipy foram usadas para o processamento matemático e a biblioteca Matplotlib para os gráficos. A interface gráfica foi desenvolvida utilizando a biblioteca PyQt4.

Os gráficos de amplitude demonstram a diferença de potencial entre os eletrodos de referência e de registro. Nos sinais foram observadas 1000 amostras por segundo. Os espectrogramas foram calculados usando uma janela de Hamming com 256 pontos (256/1000 segundos), cada quadro foi gerado com uma sobreposição de 128 pontos por janela. Para cada quadro a densidade de potência espectral (PSD) foi calculada pelo método periodograma média de Welch. O histograma de frequência foi gerada pelo primeiro cálculo do PSD do sinal usando a janela de Hamming com 256 pontos, sem sobreposição, com o PSD, resultando um histograma construído com caixas de 1 Hz . Para analisar a diferença entre os experimentos, um gráfico com a média e desvio padrão de PSD de vários experimentos foi construído, cada onda do gráfico foi gerada a partir de um conjunto de testes, onde o PSD foi gerado e calculado a média e o desvio padrão de cada grupo, para o cálculo da janela PSD Hamming foi usado 256 pontos sem sobreposição.

1.8. Avaliação hematológica

A coleta de sangue foi feita imediatamente após a aquisição do registro eletroencefalográfico, desta forma manteve-se o grupo de animais dos grupos anteriores, sendo

primeiro grupo (n=9) representado pelo grupo controle, e grupo tratado, após a coleta o sangue foi analisado no Laboratório de Análises Clínicas da ICB/UFPA para análise de hemograma e leucograma.

Foram analisados os seguintes parâmetros hematológicos: leucócito total, linfócitos, monócitos, granulócitos, hemácias (RBC: red blood cell), hemoglobina (HGB: hemoglobin), hematócrito (HCT: hematocrit), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume eritrocitário (RDW), amplitude de Distribuição das Plaquetas com base no tamanho (PDW), volume plaquetário médio (VPM) plaquetas (PLT) e plaquetócrito (PCT).

1.9. Procedimento de análise de hg_{total}

Os pêlos dos animais foram coletados para a quantificação de metilmercúrio, tanto da mãe quanto da prole. Este procedimento foi feito no laboratório de análise de mercúrio do Instituto de Doenças Tropicais da Universidade Federal do Pará.

O equipamento utilizado para a quantificação do Hg total em amostras de tecido foi o detector de mercúrio automático, denominado comercialmente de Mercury Analyzer, Modelo SP3D da Nippon Corporation-Japão.

4.10. Análise estatística

As comparações dos valores de potência foram feitas usando o ANOVA usando o software GraphPad Prism ® 5 . Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2. Resultados

2.1. Animais tratados

As quantidades de metilmercúrio consumida diariamente pelos animais nos períodos de gestação e lactação apresentaram diferenças significativas. Durante o período de gestação houve um menor consumo de água, com média de $18,54 \pm 1,808$ mL/dia, quando comparado ao período de lactação, que foi de $25,19 \pm 3,222$ mL/dia (tabela 1). Desta forma, houve diferença nas médias diárias de consumo de metilmercúrio para animais em gestação ($3,0393 \pm 0,3$ mg/kg) e lactação ($5,1408 \pm 0,658163$ mg/kg).

Os animais expostos ao metilmercúrio durante a gestação também apresentaram episódios cada vez mais frequentes de sonolência e letargia, ou seja, adquiriram características atípicas para o perfil do animal, além disso, os neonatos apresentaram tamanhos e pesos abaixo do normal.

Tabela 1 - Quantidade média do consumo diário de água ingerida durante os períodos de gestação e lactação, e relação com a dosagem ingerida de metilmercúrio por quilograma de animal por dia.

	Gestação	Lactação
Peso (Gramas)	244 ± 1,414	196 ± 8,485
Água consumida (mL)	18,54 ± 1,808	25,19 ± 3,222
Metilmercúrio (mg)	0,7416 ± 0,072	1,0076 ± 0,129
Dose mg/Kg	3,0393 ± 0,3	5,1408 ± 0,658163

Os resultados encontrados quanto à quantidade de metilmercúrio consumida diariamente pelos animais durante a gestação e lactação apontam que a maior ingestão líquida verificada no segundo período representa um fator agravante para o feto, tendo em vista a maior exposição ao organomercúrio.

2.2. *Eletrocorticogramas*

De acordo com a análise dos dados dos traçados eletroencefalográficos, o traçado obtido dos animais do grupo controle (Figura 1A) demonstra maior estabilidade e menor amplitude de disparo, quando comparado aos animais tratados (Figura 2A), que demonstra maior amplitude de variação do disparo. O espectograma na Figura 1C mostra que os níveis de energia são detectados nas frequências mais baixas no potencial de campo nos animais controle, na Figura 2C existe maior distribuição de energia nas frequências mais elevadas. Desta forma podemos constatar que de acordo com o demonstrativo de traçado existe maior variação de energia no potencial de campo registrado em animais que tiveram contato com o metilmercúrio em relação aos animais controle.

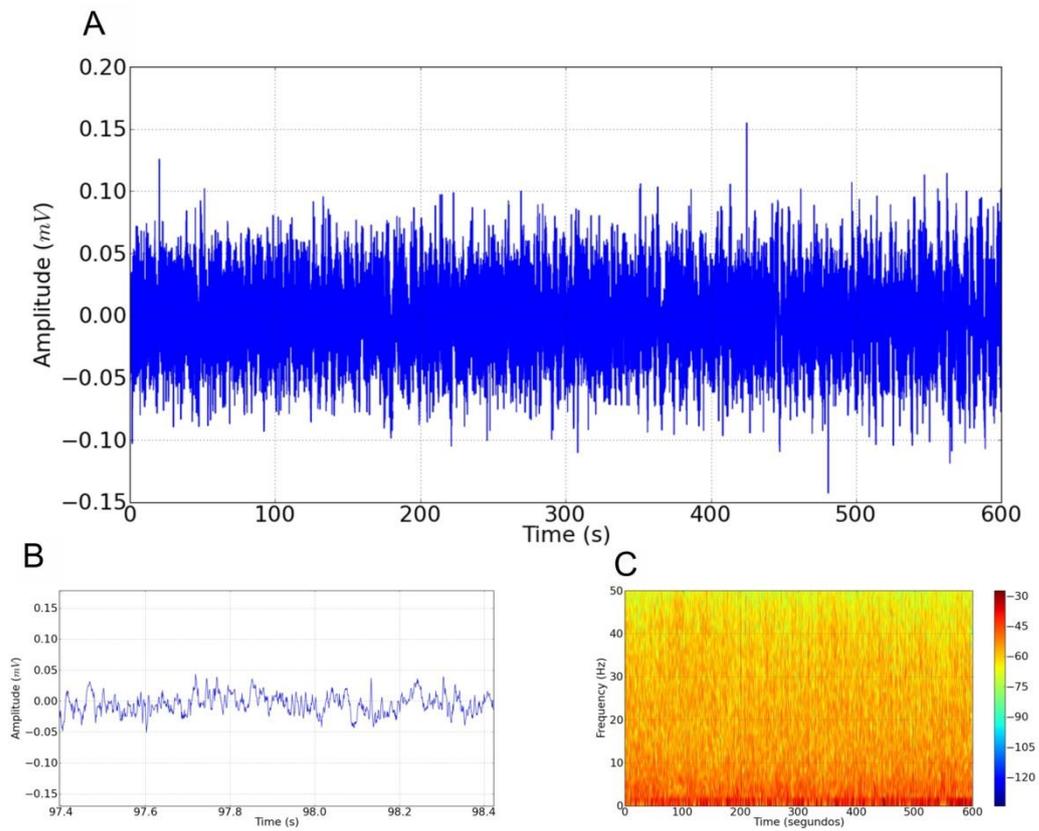


Figura 1. Registro eletrocorticográfico de um animal no estado basal do grupo de animais controle (A), amplificação do traçado basal demonstrando o perfil do registro em 1 segundo (B) e espectrograma basal demonstra a concentração de força nas frequências de 0 a 50Hz (C).

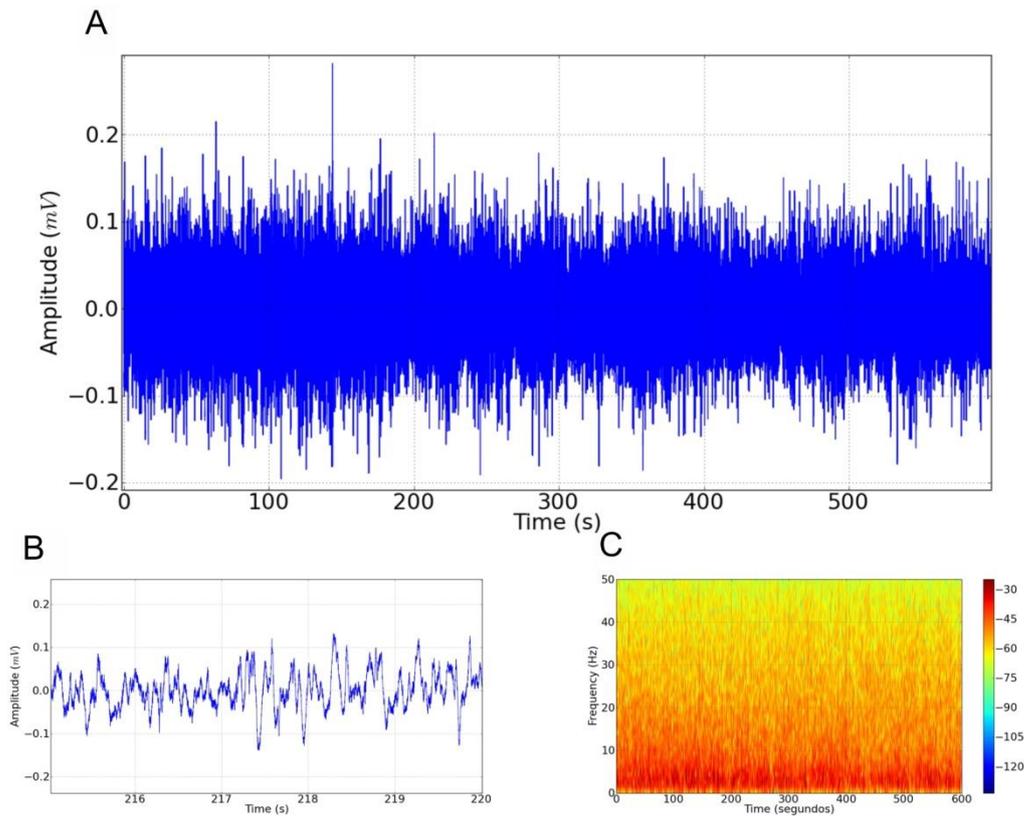


Figura 2. Registro eletrocorticográfico obtido de um animal cuja mãe foi tratada com metilmercúrio (A), demonstrativo da ampliação de 5 segundos demonstrando as características do traçado padrão (B). Espectrograma demonstra a diferença de distribuição de forças entre 0 a 50 Hz (C) (n= 9).

A comparação da distribuição da média de amplitude por frequência demonstra que os animais que tiveram contato com o metilmercúrio apresentaram maior amplitude, e menor variação entre as médias, o que demonstra maior força na captação do potencial de campo quando comparado com o registro controle (Figura 3A), o que pode se tornar mais claro quando se mede a frequência linear no intervalo de 0 a 50Hz, o controle apresentou média de $0,4664 \pm 0,2177 \text{ mV}^2/\text{ Hz} \times 10^{-3}$ em relação ao tratado com mercúrio com média de amplitude de $2,245 \pm 0,5627 \text{ mV}^2/\text{ Hz} \times 10^{-3}$ demonstrando diferença estatística $P < 0,001$. Este fato pode ser comprovado de acordo com a distribuição de energia nos espectrogramas apresentados na figura 3.

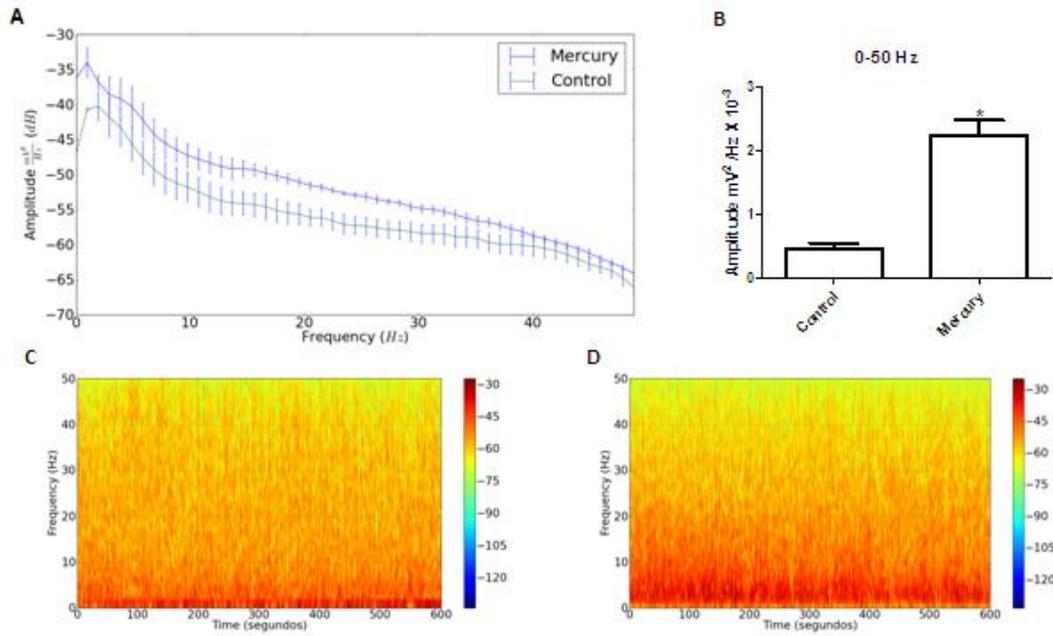


Figura 3. Média de amplitude nas frequências de 0 a 50Hz comparando animal controle e animal tratado com metilmercúrio em escala logarítmica (A), diferença de potência em escala linear entre os animais (B), comparação de distribuição de energia entre espectrograma controle (C) e espectrograma dos animais que tiveram contato com metilmercúrio (D).

A distribuição de amplitude em escala linear demonstra para a força theta entre animais controle ($0,1355 \pm 0,04498 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e tratados ($0,4513 \pm 0,2368 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), que houve diferença estatística significativa com valor de $P= 0,0047$ Figura 4 A . Os espectrogramas demonstram a diferença de intensidade de energia na entre 4 a 10 Hz durante o registro de 10 minutos Figura 4.

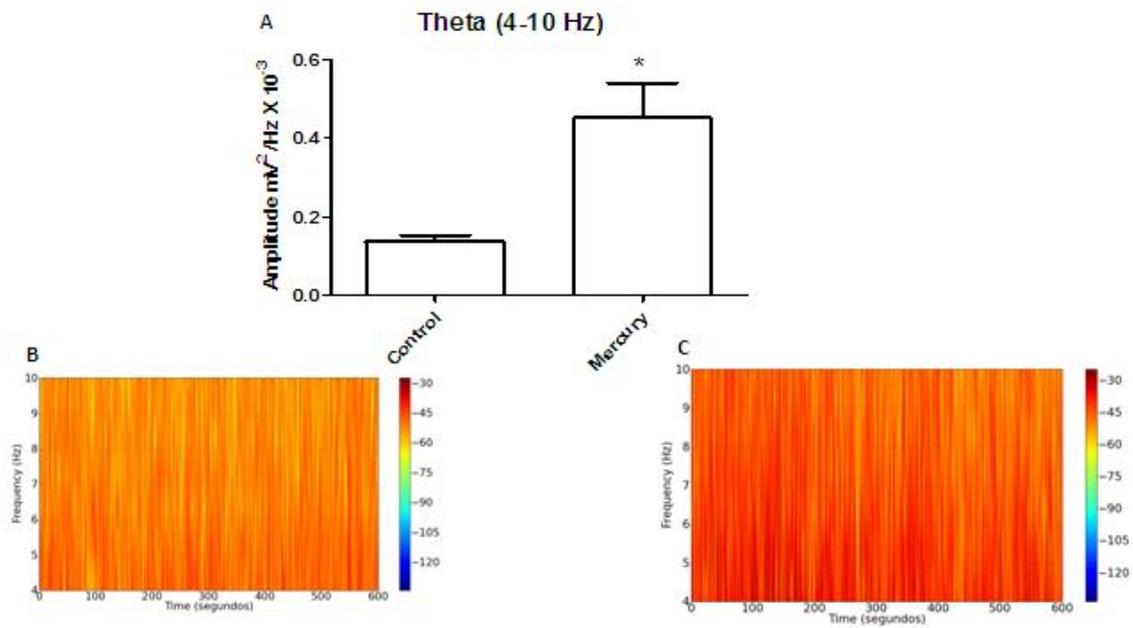


Figura 4. Avaliação das médias de distribuição de potência obtidas no registro da Eletrocorticografia (ECoG) para amplitudes de Theta (4-10Hz) (A), comparação de distribuição de energia entre espectrograma controle (B) e espectrograma dos animais tratados com mercúrio (C).

A distribuição de amplitude em escala linear demonstrada para a força Gamma aumenta para os animais tratados com metilmercúrio (média de $0,08701 \pm 0,01432 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) quando comparados ao controle (média de $0,0421 \pm 0,01006 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), constatando diferença estatisticamente significativa com valor de $P < 0,001$ (Figura 5A). Os espectrogramas demonstram a diferença de intensidade de energia distribuída entre 20 a 50 Hz durante o registro de 10 minutos (Figura 5).

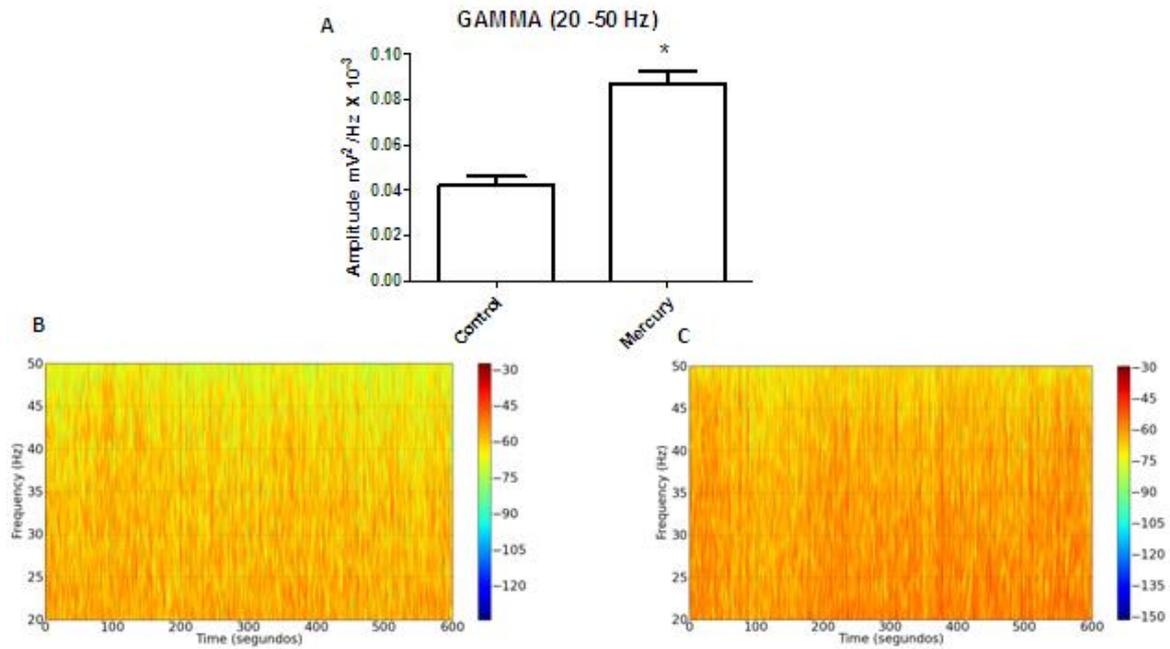


Figura 5. Médias de distribuição linear de potência obtidos no registro electrocorticográfico (ECoG) para amplitudes de Gamma (20-50Hz) (A), comparação de distribuição de energia entre espectrograma controle (B) e espectrograma dos animais tratados com mercúrio no intervalo de frequência correspondente à Gamma(C).

Foram identificados sete padrões de traçados electrocorticográficos nos animais que entraram em contato com mercúrio (Figura 6). Cada padrão de traçado apresentou nível de energia correspondente. Desta forma, o padrão 1 (P-1), que corresponde ao traçado da Figura 6A, apresentou média de $3,18 \pm 0,4442 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ e contribuiu para o aumento da amplitude entre as frequências correspondentes ao intervalo de 0-50 Hz. Para P-2, que corresponde à Figura 6B, foi observada a média de $1,061 \pm 0,1844 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, P-3 (Figura 6C) a média foi de $1,147 \pm 0,2102 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, P-4 (Figura 6D) com média de $1,469 \pm 0,3601 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, P-5 (Figura 6E) com média de $4,195 \pm 0,3782 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, P-6 (Figura 6F) com média de $2,678 \pm 0,4685 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ e P-7 (Figura 6G) que apresentou média de $4,781 \pm 0,5630 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$. Comparado ao nível médio de amplitude obtida nas frequências de 0 a 50 Hz, que correspondeu à média de $2,245 \pm 0,5630 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, os padrões que mais contribuíram para o aumento da amplitude no potencial de campo dos animais em contato com o metilmercúrio, em ordem crescente, foram P-6, P-1, P-5 e P-7.

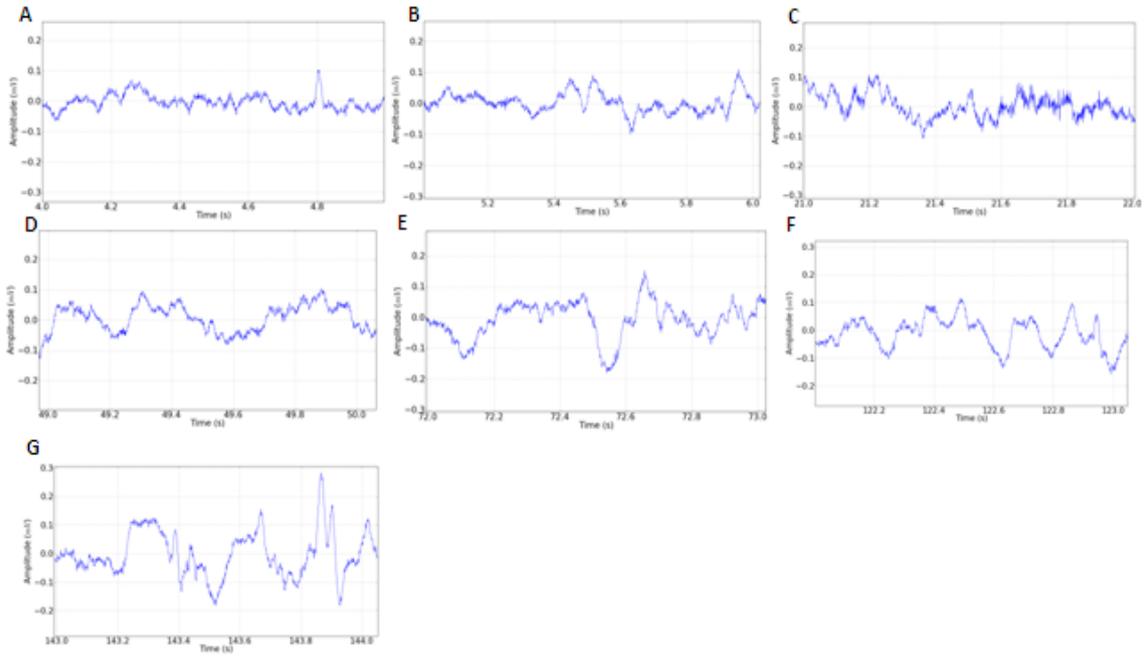


Figura 6. Padrões de disparos (P) encontrados durante o registro eletrocorticográfico dos animais que tiveram contato com metilmercúrio, classificados de acordo com o padrão apresentado e níveis de energia no traçado.

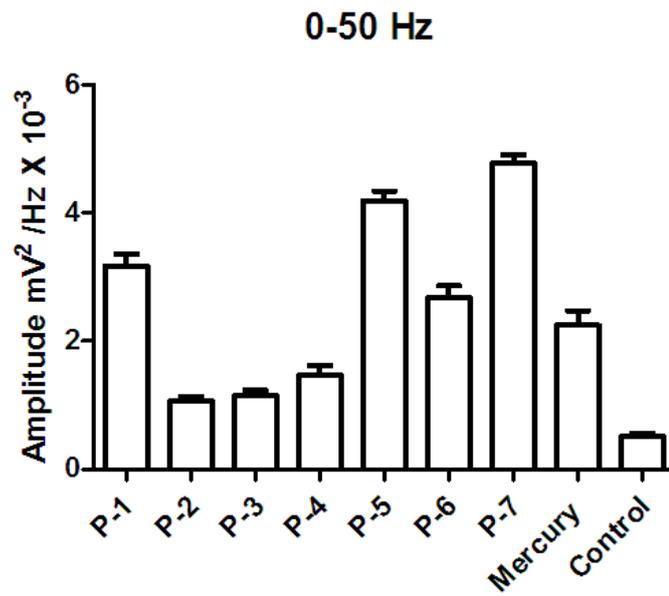


Figura 7. Comparação entre os níveis de amplitude dos padrões de traçados observados durante o registro dos animais intoxicados por metilmercúrio.

2.3. Análise hematológica

Na Tabela 2 é possível observar que os animais que entraram em contato com o metilmercúrio apresentaram diminuição na taxa leucocitária, o que pode ser constatado a partir da média de leucócitos encontrados no controle ($12,06 \pm 2,189 \times 10^3/\text{mm}^3$) e tratado ($8,590 \pm 2,666 \times 10^3/\text{mm}^3$) demonstrando diferença estatística com valor de $P= 0,0127$. A diferença estatística foi devido aos animais que entraram em contato com o mercúrio apresentarem uma linfopenia acentuada, onde a média do controle foi de $7,886 \pm 1,560 \times 10^3/\text{mm}^3$ e do tratado de $4,640 \pm 1,108 \times 10^3/\text{mm}^3$, possuindo diferenças estatísticas significativas ($P=0,0001$). Em relação a monócitos e granulócitos não houve diferença estatística.

Tabela 2 - Leucograma dos animais controle e tratados com metilmercúrio.

	Leucócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$	Linfócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$	Monócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$	Granulócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$
Controle	$12,06 \pm 2,189^*$	$7,886 \pm 1,560^*$	$1,957 \pm 0,5593$	$2,157 \pm 0,3952$
Mercúrio	$8,590 \pm 2,666$	$4,640 \pm 1,108$	$1,860 \pm 0,8784$	$2,171 \pm 0,8769$

A comparação entre o hemograma dos animais controle ($6,179 \pm 0,4246 \times 10^6/\text{mm}^3$) e animais tratados ($5,452 \pm 0,5640 \times 10^6/\text{mm}^3$) demonstrou diferença estatística entre os resultados onde o valor de $P= 0,0116$, comprovando diminuição do número de hemácias nos animais que entraram em contato com o mercúrio. As médias dos níveis de hemoglobina nos animais controle ($11,23 \pm 0,7455 \text{ g/dL}$) e animais tratados ($10,15 \pm 0,9721 \text{ g/dL}$) apresentaram diferença significativa ($P=0,0263$), também demonstrando que os níveis de hemoglobina diminuíram nos animais que entraram em contato com o metilmercúrio. Os outros parâmetros avaliados não apresentaram diferenças estatísticas significativas (Tabela3).

Tabela 3 - Parâmetros eritrocitários observados nos animais controle e tratados.

	RBC X10 ⁶ /mm ³	HGB g/dL	HCT %	MCV μm ³	MCH Pg	MCHC g/dL	RDW %
Controle	6,179± 0,4246*	11,23± 0,7455*	35,31± 2,338	57,14± 2,911	18,19± 0,8174	31,80± 0,3109	15,43± 0,8301
Mercúrio	5,452± 0,5640	10,15± 0,9721	29,58± 9,84	59,5± 1,080	18,63 ±0,49	31,34± 0,4452	16,27± 1,322

Na Tabela 4 podem ser observados os parâmetros relacionados com as plaquetas. O único parâmetro que foi estatisticamente diferente (P= 0,0384) está relacionado ao volume da plaqueta, que no controle teve média de $6,943 \pm 1,344 \mu\text{m}^3$ e no tratamento com MeHg média de $5,89 \pm 0,5216 \mu\text{m}^3$, demonstrando que o volume da plaqueta alterou na presença do metilmercúrio.

Tabela 4 - Parâmetros plaquetários obtidos nos animais controle e tratados com metilmercúrio.

	PLT X10 ⁶ /mm ³	MPV μm ³	PDW %	PCT %
Controle	457,6± 221,6	6,943± 1,344*	8,10± 2,117	0,2954±0,1207
Mercúrio	482,5± 270,7	5,89±0,5216	8,25±2,486	0,2881± 0,1695

6. Discussão

6.1. Animais tratados

Durante o a fase de lactação os animais tratados apresentaram um maior consumo de água e conseqüentemente um maior consumo de metilmercúrio, e assim expondo a prole ao metilmercúrio através do leite materno (Tabela 1). Estudos experimentais demonstram que tanto o Hg quanto o MeHg podem ser excretados no leite materno, tornando-se esta uma forma de contaminação na fase lactacional (MANFROI et al., 2004; FRANCO et al., 2006).

Os animais expostos ao metilmercúrio apresentaram letargia, sonolência, baixo peso e características atípicas para o padrão de comportamento normal da espécie, possivelmente pela passagem do metilmercúrio pela placenta e pela influencia no desenvolvimento fetal e neonatal. Independente da forma química, o mercúrio atravessa rapidamente a barreira

placentária e atinge o feto em concentrações, no mínimo, iguais às maternas e tende a acumular-se no tecido cerebral. Amoras (2011) detectou a presença de mercúrio em nove tecidos e órgãos do feto abortado, exceto no líquido amniótico, indicativo da aparente incapacidade fetal em eliminar aqueles compostos. (AMORAS, 2011).

O período de recém-nascido é indubitavelmente crítico, tendo em conta o número e a variedade dos fatores ambientais lesivos que possam agir neste período. Além disso, nele se evidenciam algumas entidades clínicas atualmente bem definidas, conseqüentes à exposição materna a agentes químicos (AMORAS, 2011). Vale ressaltar ainda que o metabolismo do crescimento cerebral encontra-se em intensa atividade, sendo a provisão de nutrientes (ou sua deficiência) de relevância fundamental no futuro desempenho neuromotor. Como resultado deste processo, certos nutrientes e substâncias são incorporados pelo sistema nervoso em desenvolvimento, o qual é mais vulnerável aos danos do Hg orgânico que o cérebro adulto, o que torna o feto mais suscetível a riscos (VIEIRA, 2011).

6.2. Eletrocorticogramas

Um dos principais alvos do MeHg é o cérebro, e os resultados obtidos foram significativos quanto às alterações eletroencefalográficas nos animais expostos ao mercúrio, visto que o eletrocorticograma representa o registro superficial do campo elétrico estabelecido no conjunto de sinapses, traduzindo assim o estado alterado da atividade elétrica fisiológica da conexão neocortical. O eletroencefalograma EEG apresenta uma relação direta com a atividade pós-sináptica dinâmica no neocórtex (ação oscilatória e ação transitória) (MURIAS et al., 2007; ROBERTS et al., 2008), a partir da diferença de potencial entre dois eletrodos, avaliando a maturação cerebral, as flutuações dos níveis de vigília, fisiológicas (sono) ou patológicas, e a detecção e análise de eventos paroxísticos (FONSECA et al., 2011).

Neste experimento, os resultados dos traçados elecorticográficos dos animais controle (Figura 1A) e dos animais tratados (Figura 2A), demonstraram uma diferença de amplitude de disparo considerável, onde os animais tratados apresentaram menor estabilidade e maior amplitude de disparo em comparação ao grupo controle, na Figura 2C é possível observar uma maior distribuição de energia no espectrograma comparada a Figura 1C. Isto é devido ao MeHg afetar diretamente os mecanismos de neurotransmissão, incluindo liberação e absorção de neurotransmissores, inativação metabólica e eventos pós-sinápticos associados com a ativação do receptor (ATCHISON, 2005).

Alguns neurotóxicos interferem indiretamente na neurotransmissão por interação, por exemplo, com o metabolismo da energia, os canais de sódio, ou ATPases. Além disso, as alterações de qualquer parâmetro da neurotransmissão resultam de morte neuronal devido a efeitos citotóxicos da neurotóxicos (ORRENIUS; NICOTERA, 1994). Embora o dano tóxico provocado por metilmercúrio possa ser intrinsecamente prevalente nos neurônios, muitas das evidências publicadas sugerem que a lesão neuronal em resposta a percentagem de metilmercúrio representa muito provavelmente alterações do controle do meio extracelular pelos astrócitos (SHANKER et al, 2001).

As manifestações clínicas da neurotoxicidade podem incluir cefaléia, dificuldade com a memória e alteração de comportamento como agressividade, desorientação e psicose. A apresentação neurotóxica mais frequente nos seres humanos é uma síndrome límbica-cerebelar aguda. É caracterizada por zumbido, insônia, depressão, afeto incognuente, defeitos na memória, confusão mental, crise convulsiva e também observa-se uma lentificação ao EEG. As manifestações neurológicas podem se apresentar agudamente ou permanecerem latentes por três dias ou mais (SAARY & HOUSE, 2002).

Piikivi & Tolonen (1989) notaram significante diminuição e atenuação do EEG, predominando na área occipital, secundariamente na região parietal e quase ausente na frontal em 41 trabalhadores de indústria de cloroálcalis, que operaram aproximadamente 15.6 anos em baixa exposição ao Hg. Langauer et al (1988) encontraram maior frequência de alterações do EEG nos trabalhadores com aumento de mercúrio urinário (HgU).

Fourtes et al em 1995, descreveram um caso de intoxicação com mercúrio oriundo de um termômetro que quebrou e foi espalhado na residência por um aspirador de pó, uma das crianças da residência, apresentou 306 µg/dL de mercúrio urinário (HgU). Após dois meses, teve convulsão, alteração do eletroencefalograma (EEG) e discreta neuropatia periférica.

Quanto a atividade cortical, o evento primário era provavelmente o desvio da atividade espontânea de frequências mais elevadas devido, pelo menos parcialmente, ao efeito do MeHg na modulação ascendente colinérgica. Diminuição do nível dopaminérgico extracelular também pode ter contribuído para essa alteração de frequência (VOROBYOV et al., 2003).

É possível observar no espectrograma dos animais tratados uma maior amplitude de frequência e menor variação entre médias, comparados aos animais controle (Figura 3A), tal depressão geral dos potenciais evocados corticais (mais tempo de latência e duração menor nos

ratos tratados) pode ser uma consequência do aumento da atividade espontânea de alta frequência, um estado em que as conexões intracorticais predominam sobre a entrada tálamo-cortical (REMOND e LESEVRE, 1967).

Segundo Sirois e Atchison (1996) a diminuição na condução axonal e o aumento no atraso sináptico, devido aos efeitos de canais iônicos de MeHg podem contribuir para que os potenciais evocados sejam alterados. O aumento espontâneo e diminuição dos potenciais evocados corticais foi observado em estudos anteriores com mercúrio inorgânico (SCHULZ et al., 1997).

6.3. Análise hematológica

Os resultados da análise do leucograma (Tabela 2) apontou que o decréscimo na taxa leucocitária deve-se principalmente aos linfócitos, que segundo os valores obtidos está abaixo da média. Apesar disso não houve alterações significativas quanto ao número de monócitos. Um estudo utilizando linfócitos e monócitos demonstrou que a citotoxicidade do mercúrio (orgânico ou inorgânico) em linfócitos e monócitos resultou em sinais de apoptose nesses tipos celulares devido a alterações na atividade mitocondrial dessas células, (SHENKER *et al*, 2000).

A redução de função das células linfóides é resultado da citotoxicidade induzida pelo mercúrio. Linfócitos e monócitos tratados com mercúrio (tanto orgânico como inorgânico) exibem sinais funcionais e morfológicos de morte celular, como profundo decréscimo na produção de adenina, alteração na síntese de fosfolípídeo e um aumento de íons cálcio. Como estas células evidenciam mudanças nucleares e de membrana que são consideradas características de uma célula em processo de morte celular programada, pode-se concluir que células linfóides tratadas com mercúrio são levadas a apoptose (GUO et al., 1998).

O processo de apoptose é regulado em diferentes níveis (GREE, 1998). Recentemente, verificou-se que uma das etapas do processo apoptótico é mediada por uma mudança no status funcional da mitocôndria (conhecida como transição de permeabilidade da membrana), que levaria a perda de potencial transmembrana, geração de espécies reativas de oxigênio e extravasamento de citocromo-C. Estas alterações na atividade mitocondrial desempenham um papel importante no início das reações em cascata que levam à morte celular. Experimentos recentes de indução de apoptose em células-T por mercúrio (orgânico ou inorgânico) mostram

que este processo é precedido por eventos críticos que incluem a mudança na permeabilidade de membrana na mitocôndria (HENKER, B.J.; GUO, T.L.; SHAPIRO, I.M., 2000).

Os parâmetros eritrocitários verificados neste trabalho apontaram a esperada diminuição do número de hemácias e dos níveis de hemoglobina nos animais que entraram em contato com o organomercúrio. Após a ingestão, 90% do metilmercúrio encontrado no sangue está ligado a hemoglobina nas células vermelhas do sangue, embora parte se ligue às proteínas plasmáticas. O MeHg se liga a resíduos de cisteína da cadeia alfa e beta da hemoglobina (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000). Uma vez na circulação sanguínea, o mercúrio pode se ligar com outras moléculas com grupamentos tiol (SH), como o aminoácido cisteína, a glutatona, a N-acetilcisteína, a albumina e a homocisteína (CLARKSON, 2006).

Shaw et al. (1991) observaram em camundongos uma redução significativa ($p < 0,05$) do número de Hemoglobina (Hb), eritrócitos (Er), e hematócrito (Ht) após quatro e 14 dias da injeção de MeHg por via intraperitoneal ($24 \mu\text{gHg.g}^{-1}$ PV). Munro et al (1980) expuseram ratos a $0,25 \text{ mg / kg}$ de Hg por dia durante até 26 meses. Machos expostos apresentaram uma diminuição dos valores do hematócrito e da hemoglobina, assim como sinais evidentes de neurotoxicidade e aumento da mortalidade em comparação com os controles não expostos. As alterações hematológicas não foram observadas em ratas expostas.

Segundo Ishikawa (2007), trabalhando com biomagnificação em ratos, em seus resultados para a série vermelha, não houve diferença estatística significativa entre animais tratados com metilmercúrio e animais controle. Estes resultados corroboram com Shigematsu et al. (2000), que inocularam solução contendo MeHg (dose: $2 \mu\text{gHg.g}^{-1}$ PV) por 25 dias consecutivos e também não observaram diferença significativa para os parâmetros hematológicos (Er, Ht e Hb) em comparação a um grupo controle inoculados com solução salina.

Acredita-se que a tendência anêmica causada pelo metilmercúrio ocorre devido ao processo de lise dos eritrócitos. Esta lise, induzida por agentes hemolíticos como os metais pesados, pode estar associada ao alto grau de peroxidação no organismo dos mamíferos. O processo de peroxidação destrói as defesas antioxidantes intrínsecas das células, resultando em um estresse oxidativo. As células sob estresse oxidativo, desenvolvem varias disfunções, em razão das lesões causadas aos lipídeos, proteínas e DNA (ERCAL et al., 2001). Assim, os trabalhos de RANA e BOORA (1992) e SENER et al. (2007) relataram o aumento de

peroxidação lipídica e diminuição da glutathione peroxidase em ratos oralmente expostos ao HgCl_2 , o que implicou na presença de danos oxidativo tecidual em diversos órgãos do animal.

Na Tabela 4, é possível observar que houve diferença estatística significativa no número de plaquetas dos animais tratados. Kostka et al. (1989) examinaram a coagulabilidade do sangue em ratos expostos a uma dose única de cloreto de metilmercúrio a 17,9 mg / kg por dia ou de cinco dias consecutivos de administração com 8 mg / kg por dia. A coagulação sanguínea foi medida 1, 3 e 7 dias após a administração da dose única ou 24 h após os cinco dias consecutivos de administração. Observou-se uma redução no tempo de coagulação e um aumento nas concentrações de fibrinogênio no plasma em ambos os grupos de dose de MeHg.

7. Conclusão

A partir dos resultados encontrados neste trabalho, pode-se concluir que as alterações nos parâmetros hematológicos verificados sugerem que a exposição crônica ao metilmercúrio pode acarretar em déficit do sistema imune, bem como quadros de anemia e distúrbios da coagulação, devido à linfopenia, diminuição do hematócrito e diminuição de fibrinogênio, respectivamente. Também foi possível observar que os neonatos são mais susceptíveis aos efeitos neurológicos causados pela exposição ao mercúrio devido ao maior afinidade deste ao tecido nervoso em desenvolvimento.

As alterações neurológicas encontradas nos ratos expostos ao metilmercúrio sugerem a necessidade de aplicação de técnicas quantitativas para avaliação das funções somatossensoriais, bem como o monitoramento periódico do quadro clínico e toxicológico, tendo em vista a elevada neurotoxicidade desse composto.

Referencias bibliográficas

AMIN-ZAKI, L.; ELHASSANI, S.; MAJEED, M. A.; CLARKSON, T. W.; DOHERTY, R. A.; GREENWOOD, M. Intra-uterine methylmercury poisoning in Iraq. *Pediatrics*, New York, v. 54, p. 587–595, 1974.

AMORAS, W.W. **Interferentes Bio-Sócio-Ambientais na Exposição ao Mercúrio em Crianças Ribeirinhas de Diferentes Regiões da Amazônia**. Belém, 2011. 103 f. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) – Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, 2011.

ASCHNER, J. L., ASCHNER, M. Methyl mercury Neurotoxicity: Exploring Potential Novel Targets. *The Open Toxicology Journal*, v. 1, p. 1-10, 2007.

ATCHISON, W.D. Is chemical neurotransmission altered specifically during methylmercury-induced cerebellar dysfunction? **Trends Farmacol Sci** 26(11):549-557, 2005.

AUCOTT, M.; MCLINDEN, M.; WINKA, M. Release of mercury from broken fluorescent bulbs. **Journal of the Air & Wast Management Association**, Pittsburgh, v. 53, n. 2, p. 143-151, 2003.

BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Quim Nova**, 27:593–600, 2004.

CASTOLDI, A. F.; ONISHCHENKO, N.; JOHANSSON, C. T.; RODA, C. E.; VAHTER, M.; CECCATELLI, S.; MANZO, L. Neurodevelopmental toxicity of methylmercury: laboratory animal data and their contribution to human risk assessment. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, New York, v. 51, n. 2, p. 215-229, 2008.

CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. **Crit Rev Clin Lab Sci.**, 34:369–403, 1997.

CLARKSON, T.W. The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspective**, 110: 11-23, 2002.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Crit Rev Toxicol**, v. 36, n. 8, p. 609-662, 2006.

DREIEM, A.; SHAN, M.; OKONIEWSKI, R. J.; MORRISSEY, S. S.; SEEGAL, R. F. Methylmercury inhibits dopaminergic function in rat pup synaptosomes in an age-dependent manner. **Neurotoxicology and Teratology**, Elmsford, v. 31, n. 5, p. 312-317, 2009.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative estresse part I: mechanisms involved inmetal-induced oxidative damage. *Curr. Top.Med. Chem.*, v. 1, n. 6, p. 529-539, 2001.

FARINA M, ROCHA JB, ASCHNER M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci.* 89: 555–563, 2011.

FONSECA, L; PIANETTI, G; XAVIER, G. **Compêndio de Neurologia Infantil**. 2nd ed. **MedBook**; 2011.

FRANCO, J.L.; TEIXEIRA, A.; MEOTTI, F.C.; RIBAS, C.M.; STRINGARI, J.; GARCIA POMBLUM, S.C.; MORO, A.M.; BOHRER, D.; BAIRRO, A.V.; DAFRE, A.L.; SANTOS, A.R.; FARINA, M. Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. **Environ Res**, 102: 22-28, 2006.

FUORTES LJ, WEISMAN DN, GRAEFF ML, BALE JR JF, TANNORS R, PETERS C. Immune thrombocytopenia and elemental mercury poisoning. **J Toxicol Clin Toxicol**, 33:449-55, 1995.

GOLDMAN, L. R.; SHANNON, M. W. American academy of pediatrics: committee on environmental health technical report: mercury in environment: implications for pediatricians. **Pediatrics**, 108: 197–205, 2001.

GREEN, DR - Apoptotic Pathways: The roads to ruin. **Cell**, 94:695-698, 1998.

GUO, TL; MILLER, M; SHAPIRO, IM e SHENKER, BJ – Mercuric Chloride Induces Apoptosis in Human T Lymphocytes: Evidence of Mitochondrial Dysfunction. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 153:250-257, 1998.

HAYKAL-COATES, N.; SHAFER, T. J.; MUNDY, W. R.; BARONE, S. Effects os gestacional methylmercury exposure on immunoreactivity of specific isoforms of PKC and enzymes activity during pos-natal development of the rat brain. **Developmental brain research**, Amsterdam, v. 109, p. 33-49, 1998.

HENKER, BJ; GUO, TL e SHAPIRO, IM - Mercury-Induced Apoptosis in Human Lymphoid Cells : Evidence That the Apoptotic Pathway Is Mercurial Species Dependent. **Enviromental Research**. 2000, 84A:89-99.

HOLMES P, JAMES K A F, LEVY LS. Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Sci Total Environ.*, 408(2): 171–82, 2009.

ISHIKAWA, N.M. Intoxicacao alimentar por metilmercúrio em tilápia do nilo e sua biomagnificação em ratos wistar. 2007, 121f. Tese (Doutorado em Aquicultura de Aguas Continentais). Centro de aquicultura da unesp Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

KOSTKA, B.; MICHALSKA, M.; KRAJEWSKA, U.; WIERZBICKI, R. Blood coagulation changes in rats poisoned with methylmercuric chloride (MeHg). **Polish Journal of Pharmacology & Pharmacy**. vol. 41, n.2, p. 183 – 189, 1989.

LANGAUER LH, KURZBAUER H, ZAJAC NM. Value of electroencephalographic studies for the evaluation of the neurotoxic effect of metallic mercury. **Neurol Neurochir Pol**, 22: 489-94, 1988.

MANFROI, C.B.; SCHWALM, F.D.; CERESER, V.; ABREU, F.; OLIVEIRA, A.; BIZARRO, L.; ROCHA, J.B.; FRIZZO, M.E.; SOUZA, D.O.; FARINA, M. Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. **Toxicol Sci**, 81:172-178, 2004.

MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio: revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 487-495, 2000.

MURIAS, M; WEBB, SJ; GREENSON, J; DAWSON, G. Resting state cortical connectivity reflected in EEG coherence in individuals with autism. **Biol Psychiatry**. 62(3): 270–3, 2007.

MUNRO, I.C.; NERA, S.M.; CHARBONNEAU, S.M.; JUNKINS, B.; ZAWIDZKA, Z. Chronic toxicity of methylmercury in the rat. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, v. 3, 437-447, 1980.

NASCIMENTO E. L. Mercúrio no Plâncton de um Lago Natural Amazônico, Lago Puruzinho (Brasil). **Journal Brazil Society Ecotoxicology**, v.2, n.1, p.67-72, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Toxicological effects of methylmercury. Washington: **National Academy Press**. 2000. 365 p.

ORENIUS, S.; NICOTERA, P. The calcium ion and cell death. *J. Neural. Transm. Suppl.* 3: 1-11, 1994.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Cooperação Técnica entre Brasil, Bolívia e Colômbia: Teoria e Prática para o Fortalecimento da Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Mercúrio. Brasília, 2011.

PIIKIVI L, TOLONEN U. EEG findings in Chlor-alkali workers subjected to low long term exposure to mercury vapour. **Br J Ind Med**, 46:370-5, 1989.

RANA, S.V.S.; BOORA, P.R. Antiperoxidative mechanisms offered by selenium against liver injury caused by cadmium and mercury in rat. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 48, n. 1, p. 120-124, 1992.

REMOND, N., LESEVRE, V., Variations in average visual evoked potential as a function of the alpha rhythm phase (Autostimulation). In: Cobb, W., Morocutti, C. (Eds.), **The Evoked Potentials**. Elsevier, Amsterdam, pp. 42–521, 1967.

ROBERTS, TPL; SCHMIDT, GL; EGETH, M; BLASKEY, L; REY, MM; EDGAR, JC; et al. Electrophysiological Signatures: Magnetoencephalographic Studies of the Neural Correlates of Language Impairment in Autism Spectrum Disorders. **Int J Psychophysiol**. 68(2):149–60, 2008.

SAARY MJ, HOUSE RA. Preventable exposure to trimethyl tin chloride: a case report. **Occup Med**, 52(4): 227-30, 2002.

SAKAMOTO, M.; YASUTAKE, A.; KAKITA, A.; RYUFUKU, M.; CHAN, H.M.; YAMAMOTO, M.; OUMI, S.; KOBAYASHI, S.; WATANABE, C. Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat cerebrum. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 6, p. 2862-2868, 2013.

SHENKER, B.J.; GUO, T.L.; SHAPIRO, I.M. Mercury – Induced Apoptosis in Human Lymphoid Cells: Evidence that the Apoptotic Pathways Is Mercurial Species Dependent. **Environmental Research**. 84A : 89-99. 2000.

SCHUSTER, P.F., KRABBENHOFT, D.P., NAFTZ, D.L., CECIL, L.D., OLSON, M.L., DEWILD, J.F. Atmospheric mercury deposition during the last 270 years: a glacial ice core record of natural and anthropogenic sources. **Environ Sci Technol**. 36: 2303-10, 2002.

SENER, G.; SEHIRLI, O.; TOZAN, A.; VELIOGLU-OVUNC, A.; GEDIK, N.; OMURTAG, G.Z. *Ginkgo biloba* extract protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 543-550, 2007.

SHAW, B.P.; DASH, S.; PANIGRAHI, A.K. Effects of methylmercury chloride treatment on hematological characteristic and erythrocyte morphology of Swiss mice. *Environ. Pollut*, v. 72, p. 43-52, 1991.

SIROIS, Y.E., ATCHISON, W.D. Effects of mercurials on ligand- and voltage-gated ion channels: a review. *Neurotoxicolog*, 17: 63–84, 1996.

VIEIRA, Solange Mendes. **Estudo da Presença de Mercúrio em Leite Materno em Puéperas Ribeirinhas e da Cidade de Porto Velho-RO**, 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Núcleo de Ciências Exatas e da Terra, Fundação Universidade Federal de Rondônia, 2011.

VOROBYOV, V.V., SCHIBAEV, N.V., MORELLI, M., CATRA, A.P. EEG modifications in the cortex and striatum after dopaminergic priming in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*, 972: 177–185 2003.

WASSERMAN, J. C.; HACON, S. S.; WASSERMAN, M. A. Ciclo do mercúrio no meio ambiente amazônico. *Revista Mundo e Vida*, v. 2, n. 2, p. 46-53. 2001.