

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EXPOSIÇÃO DE EMBRIÕES DE *Gallus domesticus* AO
ACETATO DE CHUMBO E SEUS EFEITOS SOBRE A HISTOLOGIA
CEREBELAR E O COMPORTAMENTO NO PERÍODO PÓS-NATAL
INICIAL**

LILIANNA BIANCHINI DALLANHOL RIVERO

**Florianópolis
Fevereiro de 2005**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EXPOSIÇÃO DE EMBRIÕES DE *Gallus domesticus* AO
ACETATO DE CHUMBO E SEUS EFEITOS SOBRE A HISTOLOGIA
CEREBELAR E O COMPORTAMENTO NO PERÍODO PÓS-NATAL
INICIAL**

LILIANNA BIANCHINI DALLANHOL RIVERO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Neurociências da UFSC como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Yara Maria Rauh Müller

**Florianópolis
Fevereiro de 2005**

Aos meus amores, Miguel e Théo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que ilumina, protege e abençoa com tantas graças a minha vida.

À toda minha família, pai, mãe, Eliza, Paulinho, meus sogros, cunhados e cunhadas, pelo estímulo, apoio, interesse que demonstraram durante todas as etapas deste processo.

Ao meu esposo, Miguel, pelo amor, amizade, apoio e paciência. Ao nosso presentinho Théo, motivo de tantas alegrias e a todos, família e amigos, que se esforçaram para que ele sentisse menos a minha ausência, sem vocês eu não teria conseguido.

À Prof^a Yara, por sua orientação na realização deste trabalho, pelo exemplo profissional e pessoal e pela amizade.

Aos professores do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, Evelise, Dib, Cristine e Paulo, que acompanharam as várias etapas de meu trabalho, sempre interessados, presentes e prontos a ajudar.

Ao Nivaldo, por sua constante disposição e alegria, sempre resolvendo tudo.

À Márcia e Janaína, por me mostrarem como funcionava um laboratório, por tudo que me ensinaram.

Às amigas Suzana e Márcia, pela imensa colaboração e amizade, construída na bancada e nas viagens aos congressos, compartilhando mais do que ciência...vida.

Aos queridos amigos Marcos, Lízia, Talita, Rafael e Marcela, por fazerem do Laboratório um ambiente alegre, musical, de amizade e companheirismo e o melhor lugar para se trabalhar.

À amiga Patrícia pela disponibilidade, disposição e ajuda em todos os momentos, em vários momentos. Sempre com boa vontade, paciência e alegria.

Às amigas que já passaram pelo laboratório na pesquisa, extensão ou monitoria, Crislei, Jaqueline, Ana Beatriz, Charlene, Juliana, Viviane, Karoline e Andréa que contribuíram de diversas formas para meu crescimento.

A todos os professores do curso de Pós-graduação em Neurociência, principalmente professores André de Ávila Ramos e Mauro Luís Vieira, pela dicas e atenção dispensada.

A todos os colegas da Neuro, que estão terminando...ou iniciando esta jornada.

Aos amigos e amigas pelo interesse, força e compreensão de meu afastamento durante o mestrado.

À Empresa Macedo, Koerich/AS, pela doação do material biológico para a realização desse estudo.

À Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste estudo foram investigados os efeitos da exposição embrionária a diferentes doses de acetato de chumbo sobre a histologia cerebelar e o comportamento de *Gallus domesticus* no período pós-natal inicial. Foram utilizados 24 animais, divididos igualmente em quatro grupos experimentais, grupo-controle fechado (GC1), que não sofreu intervenção, grupo-controle aberto (GC2), grupo acetato de chumbo 18,75 μ g e 37,5 μ g (GA1 e GA2), diluídos em 1ml de solução salina (0,9%). Os animais foram acompanhados em ambiente experimental durante a primeira semana de vida com registro do ganho de peso e do repertório comportamental, além da realização de testes de comportamento, em campo aberto e no labirinto em "T". O cerebelo desses indivíduos foi estudado histologicamente, através de técnicas de microscopia de luz, a fim de visualizar a deposição do acetato de chumbo no tecido nervoso e de verificar alterações morfológicas, resultantes da administração *in ovo* do metal (E5) durante o período embrionário. Em todos os grupos experimentais registramos alguma alteração das características externas. Em todos os dias de observação o peso de GC1 foi superior aos demais, enquanto o de GA1 foi o menor. Entretanto, ao final do estudo (D6 e D7), esse parâmetro apresentou-se equivalente entre os grupos. A observação das categorias no repertório comportamental evidenciou diferenças de algumas categorias entre os grupos experimentais. Os testes realizados no campo aberto mostraram, através dos indicadores de ambulação utilizados em nossos experimentos, que os indivíduos dos grupos expostos ao metal apresentaram menor atividade locomotora geral e menor atividade exploratória do que os indivíduos dos grupos-controle. Em relação ao comportamento de alternância espontânea realizado no labirinto em T, percebeu-se preferência pelo lado com o estímulo luminoso. A análise da histologia cerebelar revelou que o acetato de chumbo nas doses utilizadas alterou a distribuição dos tipos celulares e organização das camadas do córtex cerebelar. O acetato de chumbo, através da técnica histoquímica da autometalografia de Timm, mostrou-se depositado por todo o cerebelo, porém com diferenças na intensidade nas camadas cerebelares entre as duas doses utilizadas. A caracterização das células em apoptose, realizada através da coloração com Hoescht 33258, mostrou núcleos apoptóticos em maior número nos grupos expostos ao acetato de chumbo. Nossos resultados demonstraram que *Gallus domesticus*, nos estágios precoces de desenvolvimento embrionário, são suscetíveis à exposição ao acetato de chumbo, que, nas doses utilizadas, provou ser capaz de alterar o desenvolvimento embrionário normal – interferindo na organização histológica do cerebelo e no comportamento normal da espécie.

Palavras-chave: Chumbo, *Gallus domesticus*, cerebelo, comportamento, desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

This study investigated the effect of embryonic exposition of different doses of lead acetate on the cerebellum histology and *Gallus domesticus*'s behavior at early post-natal period. The 24 animals had been equally divided in four experimental groups, control group closed (GC1), that it did not suffer intervention, control group open (GC2), lead acetate group 18,75 μ g and 37,5 μ g (GA1 and GA2), diluted in 1ml of saline solution (0,9%). The animals were monitored on experimental environment during the first week of life with register of the profit of weight and the behavioral repertoire, beyond the accomplishment behavior tests, in open field and the labyrinth in "T". The cerebellum of these individuals was histologically studied, through techniques for light microscopy, in order to visualize the deposition of lead acetate in the nervous tissue and to verify alterations in morphology, resultant of the *in egg* administration of the metal (E5), during the embryonic period. In all the experimental groups we register some alteration of external characteristics. In every days the weight of GC1 it was superior to the others, while of GA1 was the minor one. However, in the end of the study (D6 and D7) this parameter was equivalent between groups. The categories of the behavioural repertoire evidenced differences of some categories between the experimental groups. The tests carried through in the open field had shown, through the used pointers of ambulation in our experiments, that the individuals of the groups exposed to the metal had presented minor general locomotive activity and lesser exploration activity of that the individuals of the control groups. In relation to the spontaneous alternations behavior in T-maze, preference for the side with the luminous stimulation was perceived. The analysis of the cerebellar histology disclosed that the lead acetate in the used doses modified the distribution of the cellular types and organization of the cerebellar cortex layers. The lead acetate, through the histochemical technique of Timm autometalography, revealed deposition for all cerebellum, with differences of intensity in the cerebellar's layers between the two used doses. The characterization of the apoptotic cells, carried through Hoescht 33258 labeling, showed apoptotic nuclei in bigger number in the lead acetate exposed groups. Our results had demonstrated that *Gallus domesticus*, in the early embryonic development, is susceptible to the exposition to lead acetate, since the same, in the used doses, it proved to be capable to modify the normal embryonic development - intervening with the histologic organization of the cerebellum and with the normal behavior of the species.

Key-words: Lead, *Gallus domesticus*, cerebellum, behavior, embryonic development.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	ORGANIZAÇÃO DO SNC	11
1.2	NEUROTOXICIDADE	15
1.3	COMPORTAMENTO	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	MODELO BIOLÓGICO	23
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	24
3.3	PROCEDIMENTOS PÓS-ECLOSÃO	26
3.3.1	Estudo do comportamento	27
3.3.2	Testes de comportamento	29
3.3.3	Análise quantitativa do comportamento	31
3.4	ESTUDO HISTOLÓGICO	32
3.5	ANÁLISE DAS LÂMINAS	34
3.5.1	Determinação da deposição do acetato de chumbo no córtex cerebelar	34
3.5.2	Estereologia dos cortes histológicos	35
3.5.3	Contagem manual de células apoptóticas na camada molecular do córtex cerebelar	36
4	RESULTADOS	37
4.1	PESO DOS INDIVÍDUOS	37
4.2	REPERTÓRIO COMPORTAMENTAL	40
4.3	TESTES COMPORTAMENTAIS	43
4.3.1	Comportamento Exploratório	43
4.3.2	Comportamento de alternância espontânea em D6	50
4.4	RESULTADOS HISTOLÓGICOS	52
4.4.1	Locais de deposição do acetato de chumbo no córtex do cerebelo	58
4.4.2	Estereologia dos tipos celulares no cerebelo	60
4.4.2.1	<i>Células de Purkinje no córtex cerebelar</i>	60
4.4.2.2	<i>Neurônios dos núcleos do cerebelo</i>	61
4.4.3	Contagem das Células Apoptóticas na Camada Molecular	61
5	DISCUSSÃO	63
	REFERÊNCIAS	73

LISTA DE ABREVIATURAS

CG – Camada granular do cerebelo

CM – Camada molecular do cerebelo

CP – Camada das células de Purkinje do cerebelo

cp – célula de Purkinje

E3 – Terceiro dia embrionário

E5 – Quinto dia embrionário

HH – Estádio embrionário postulado por Hamburger e Hamilton

ng – neurônio granular

[Pb(CH₃CO₂)₂] – Acetato de chumbo

SBC – Substância Branca do cerebelo

SNC – Sistema nervoso central

VV – Vesícula vitelínica

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

A) FIGURAS

Figura 1 – Vesículas cerebrais primitivas (A) e secundárias (B).....	12
Figura 2 – Organização das camadas do tubo neural (A) e a sua diferenciação na organização das camadas do cerebelo (B)	13
Figura 3 – Desenho esquemático de uma folha cerebelar	14
Figura 4 – Incubadora utilizada no estudo (Petersime, Mibo E-1)	24
Figura 5 – Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E3	25
Figura 6 – Embrião em E5 (B)	25
Figura 7 – Habitat experimental, caixa-ninho (36x47x33cm)	26
Figura 8 – Descrição das categorias do repertório comportamental de <i>Gallus domesticus</i>	27
Figura 9 – Testes comportamentais realizados nos grupos experimentais de <i>Gallus domesticus</i> em D5 e D6. A - Campo Aberto Padrão. B - Campo Aberto com estímulos. C - Labirinto em T. D - Labirinto em T com estímulo luminoso	30
Figura 10 – Esquema em câmara clara (125X) da segunda folha cerebelar	34
Figura 11 – Graticula de Weibel	35
Figura 12 – Ganho de peso (g) de <i>Gallus domesticus</i>	37
Figura 13 – Categorias de movimentos cefálicos, movimentos de asa e locomoção nos grupos experimentais de <i>Gallus domesticus</i>	41
Figura 14 – Tempo total de exploração dos objetos e da latência dos grupos experimentais de <i>Gallus domesticus</i> em D5 (A) e D6 (B)	47
Figura 15 – Tempo total de exploração dos estímulos nos grupos experimentais de <i>Gallus domesticus</i> em D5 (A) e D6 (B)	47
Figura 16 – Tempo necessário para atingir a plataforma central nos grupos experimentais de <i>Gallus domesticus</i> em D5 (A) e D6 (B)	48
Figura 17 – Tempo médio necessário para alternar o braço no labirinto em T nos indivíduos que apresentaram o comportamento de alternância espontânea nos grupos experimentais em D6	49
Figura 18 – Tempo médio necessário para alternar o braço no labirinto em T nos indivíduos que apresentaram o comportamento de alternância espontânea nos grupos experimentais em D6	50
Figura 19 – Vista geral de parte do cerebelo de <i>Gallus domesticus</i> (GC2). Hematoxilina e eosina (100X).....	52
Figura 20 – Camadas do córtex cerebelar de <i>Gallus domesticus</i> em D8 dos grupos experimentais. A- GC1, B- GC2, C- GA1, D-GA2. Hematoxilina e eosina (400X).....	53
Figura 21 – Córtex cerebelar de <i>Gallus domesticus</i> em D8 dos grupos experimentais. A- GC1, B- GA1, C-GA2. Violeta de cresila (1000X).....	53

Figura 22 – Neurônios dos núcleos cerebelares de Gallus domesticus em D8 dos grupos experimentais. A- GC1, B- GA1, C-GA2. Violeta de cresila (1000X)	54
Figura 23 – Secção sagital do cerebelo de Gallus domesticus (GC1) em D8. Técnica TIMM contracoloração Hematoxilina. (400X).....	54
Figura 24 – Secção sagital do cerebelo de Gallus domesticus em D8, expostos ao chumbo em E5. A- GA1- 18,75mg de acetato de chumbo. B- GA2- 37,5mg de acetato de chumbo. Técnica TIMM, (400X).....	55
Figura 25 – Camadas do córtex de Gallus domesticus em D8 dos grupos experimentais. A- GC1, B- GA1, C-GA2. Hoescht (1000X)	55
Figura 26 – Detalhe das camadas do córtex cerebelar de Gallus domesticus em D8 dos grupos experimentais. A- GC1, B- GA1, C-GA2. Hoescht (1000X).....	56
Figura 27 – Camada molecular do córtex cerebelar de Gallus domesticus em D8 dos grupos experimentais. A- GC1, B- GC2, C-GA1, De E-GA2. Hoescht (1000X)	56
Figura 28 – Desenhos esquemáticos na câmara clara (X) indicando a deposição de acetato de chumbo nas camadas corticais do cerebelo de Gallus domesticus. A- GC1, B- GC2, C- GA1, D-GA2	58
Figura 29– Quantidade média de células apoptóticas na camada molecular do córtex cerebelar de Gallus domesticus nos grupos experimentais analisados	61

B) TABELAS

Tabela 1 – Peso médio (g) dos grupos experimentais de Gallus Domesticus em cada dia de vida (D1 a D7).....	38
Tabela 2 – Categorias do repertório comportamental em Gallus domesticus registradas nos grupos experimentais durante os seis dias observados (D2 a D7)	40
Tabela 3 – Categorias comportamentais observadas em Gallus domesticus no Campo Aberto Padrão A nos grupos experimentais analisados em D5 e D6	44
Tabela 4 – Categorias comportamentais observadas em Gallus domesticus no Campo Aberto-B nos grupos experimentais analisados em D5 e D6	46
Tabela 5 – Impregnação do Acetato de chumbo pela Autometalografia de Timm nas três camadas do córtex cerebelar de Gallus domesticus	58
Tabela 6– Estereologia das células de Purkinje de Gallus domesticus nos grupos experimentais	59
Tabela 7 – Estereologia dos neurônios dos núcleos do cerebelo dos grupos-controle e dos grupos expostos ao acetato de chumbo	60

1 INTRODUÇÃO

Nas aves, as fases do desenvolvimento embrionário correspondentes à clivagem e blastulação precedem a postura dos ovos; nesse momento o embrião se encontra em estágio de blastoderma, estrutura discoidal constituída por duas camadas, o epiblasto e o hipoblasto (GILBERT, 2001). A embriogênese só prosseguirá, em ambiente natural ou experimental, se existirem condições favoráveis à expressão gênica e fenotípica do programa de morfogênese e organogênese estabelecidos para a espécie (WOLPERT, 1998).

Os embriões de aves são usualmente utilizados como modelo para estudos experimentais nas áreas de embriologia comparada e biologia do desenvolvimento devido a algumas condições consideradas favoráveis, como o fato de os ovos serem do tipo megalécito – dispendo de reservas nutricionais e não dependendo portanto do meio externo – e apresentarem membranas envoltórias resistentes, de o tempo total de desenvolvimento ser considerado de curta duração e de os embriões desenvolverem-se na ausência do organismo materno e na região superior do ovo, permitindo que o desenvolvimento embrionário possa ser acompanhado diariamente em laboratório (SCHOENWOLF, 1999).

A espécie de ave mais utilizada em estudos de laboratório é a galinha doméstica (*Gallus domesticus*), sendo necessário incubar os ovos por um período de 21 dias, em temperatura de 38°C, oxigenação e umidade apropriadas para que a eclosão possa ocorrer (GONZALES, 1994; DIAS, 1996).

O acompanhamento e a descrição do desenvolvimento embrionário de *Gallus domesticus* foi caracterizado inicialmente por Hamburger e Hamilton (1951), que, em seus estudos, relacionaram o aparecimento das estruturas embrionárias com o tempo de desenvolvimento. Essas relações são definidas e organizadas em estágios (HH), o que permite acompanhar as rápidas transformações embrionárias, que não poderiam ser registradas apenas em função do dia de desenvolvimento. Assim, o

conhecimento das etapas do desenvolvimento embrionário nos permite acompanhar a organização estrutural básica do sistema nervoso central.

1.1 Organização do SNC

O processo de neurulação em embriões de *Gallus domesticus* inicia-se após 20 horas de incubação (5HH), quando as células da ectoderme sobrejacentes à notocorda, através do processo de indução primária, formam a placa neural (GONZALES, 1994). A placa neural se espessa e invagina, formando o sulco neural e as pregas neurais, as quais são evidentes com 21 ou 22 horas. Sua fusão inicia-se com 26 horas (7HH) na região que corresponderá ao cérebro médio (mesencéfalo) e progride cefálica e caudalmente; com 43 horas (11HH) a estruturação básica do tubo neural já é reconhecida na região dorsal do corpo do embrião (HAMBURGER; HAMILTON, 1951).

O tubo neural é constituído por uma única camada de células neuroepiteliais, pseudoestratificadas, dispostas ao redor do canal central. A maioria dessas células, através de proliferação, migração e diferenciação celular, que ocorre do centro do tubo para a superfície, formam uma segunda camada, a zona intermediária ou do manto. A terceira camada a se organizar, mais externa, é a zona marginal, formada principalmente por prolongamentos dos neurônios e das células gliais. As células que não migraram revestem o canal central e constituem a camada ventricular ou endimária (JACOBSON, 1991).

A diferenciação do tubo neural nas várias regiões do sistema nervoso central (SNC) ocorre simultaneamente em três níveis distintos: em nível anatômico, o tubo neural sofre dilatações e constrictões para organizar a parede e as cavidades do encéfalo e da medula espinhal; histologicamente, as populações celulares da parede do tubo se rearranjam de várias maneiras para formar as diferentes regiões funcionais; e em nível celular, o neuroepitélio se diferencia nos neuroblastos e glioblastos, que originarão os numerosos tipos de neurônios e células da glia presentes no sistema nervoso (GILBERT, 2001).

De 33 a 38 horas de incubação (10 HH), são reconhecíveis na região anterior do tubo neural as três vesículas encefálicas primárias, o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo (Figura 1). Com 38 horas de incubação, formam-se

cinco vesículas; o prosencéfalo se diferencia em telencéfalo e diencéfalo, o rombencéfalo estrutura o metencéfalo e mielencéfalo e o mesencéfalo permanece na forma primitiva (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) (Figura 1). No quinto dia as cinco vesículas encefálicas apresentam-se bem discerníveis e iniciam a sua diferenciação para constituir as regiões características do cérebro jovem e do adulto (AREY, 1974).

O telencéfalo originará o córtex cerebral e os núcleos da base, o diencéfalo formará o epitélamo, tálamo e hipotálamo, o mesencéfalo pouco vai se diferenciar, o metencéfalo corresponderá ao cerebelo e ponte e o mielencéfalo estruturará o bulbo (Figura 1). Na região posterior ao mielencéfalo o tubo neural mantém a forma cilíndrica, constituindo a medula espinhal primitiva, que se transformará na medula espinhal (LENT, 2001).

Durante a embriogênese normal do SNC ocorre a apoptose, processo altamente regulado de deleção celular, responsável pela morte de neurônios que falharam ao formar contatos sinápticos ou não receberam fatores de crescimento imprescindíveis para sua sobrevivência (OPPENHEIM, 1991). A apoptose é um evento fundamental do desenvolvimento normal e da homeostase no adulto em todas as espécies (YAGINUMA, 2001).

A partir deste momento voltaremos nossa atenção à embriologia do cerebelo, sua histogênese, morfologia e funcionamento, informações necessárias à compreensão do presente estudo.

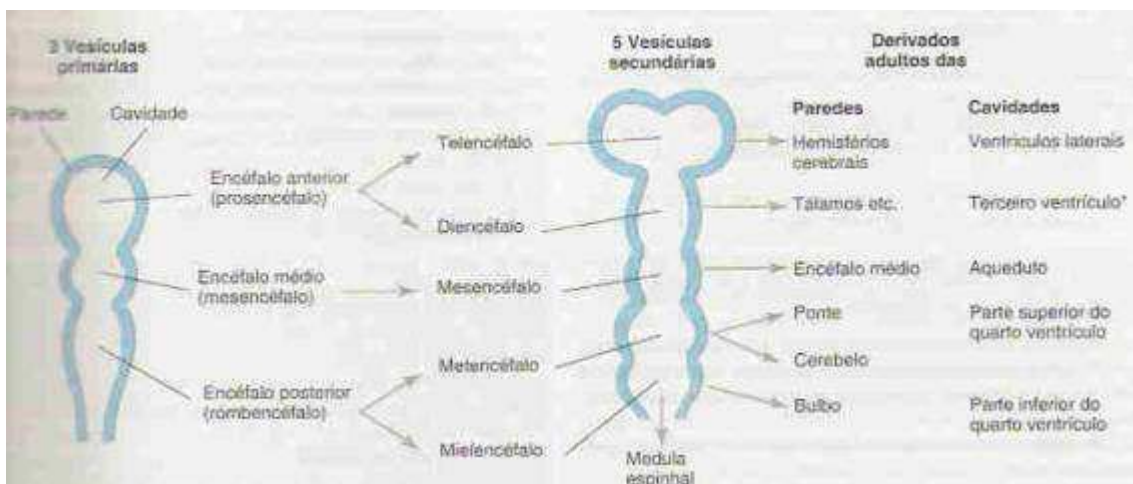


Figura 1 – Desenho esquemático das vesículas cerebrais primitivas (A) e secundárias (B), listando as estruturas derivadas de cada vesícula.

Fonte: Moore; Persaud (2004)

O cerebelo inicialmente é constituído por uma cavidade central envolta por três camadas (ventricular, do manto e marginal), formadas a partir da diferenciação do tubo neural (Figura 2A). Os neuroblastos da camada do manto migram e colocam-se na parte mais superficial da camada marginal, proliferam e formam a camada granular externa. Essas células que migraram para a superfície sofrem intensa proliferação e, ao se diferenciar, dispõem-se no sentido contrário à migração primitiva, ou seja, de fora para dentro, constituindo a camada granular interna. A camada ventricular gera uma grande variedade de neurônios e células da glia, inclusive as células de Purkinje. Elas se movem para a superfície, vindo a constituir a camada de Purkinje, posicionada entre a camada molecular, a mais externa, e a camada granulosa, que passa a ser a camada mais interna do córtex cerebelar (Figura 2B). Os núcleos cerebelares (denteado, globoso, emboliforme e fastigial) derivam das células do manto, que permaneceram em suas posições originais.

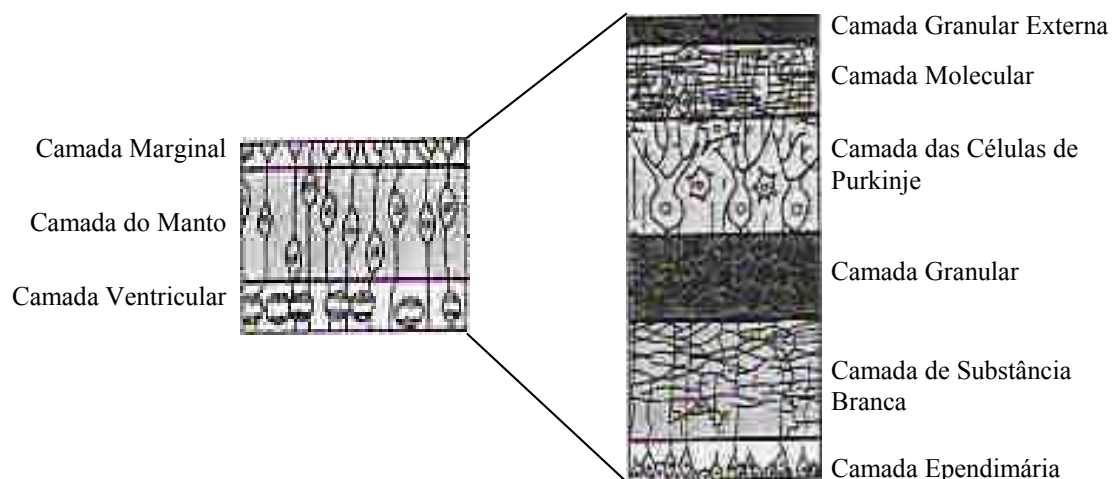


Figura 2 – Esquemas evidenciando a organização das camadas do tubo neural (A) e a sua diferenciação na organização das camadas do cerebelo (B).

Fonte: Gilbert (2001) – Adaptado

Os dendritos das células de Purkinje ocuparão grande parte da camada molecular e seus axônios farão sinapses com células dos núcleos cerebelares. Esses rearranjos celulares garantem a estrutura estratificada do cerebelo como o conhecemos, formado por um córtex composto por três camadas e uma substância branca interna, em cujo interior estão incrustados quatro núcleos cerebelares, já citados acima (LENT, 2001).

O cerebelo tem convoluções semelhantes às do córtex cerebral, porém elas são menores e menos profundas. Assim como o telencéfalo, o cerebelo também apresenta um córtex externo, substância branca interna e núcleos profundos na substância branca. A observação microscópica de uma única folha do cerebelo ou “folha” cerebelar possibilita reconhecer a organização dos tipos celulares (Figura 3). A camada mais externa do córtex é chamada de camada molecular, é ocupada principalmente por axônios e dendritos e praticamente livre de corpos celulares. A camada média é formada por uma fileira única de grandes neurônios, as células de Purkinje. Internamente à camada das células de Purkinje há uma densa camada de pequenos neurônios, chamados de células granulares. Finalmente, no centro de cada folha está a substância branca (medula), constituída dos axônios conectados com as camadas do córtex cerebelar.

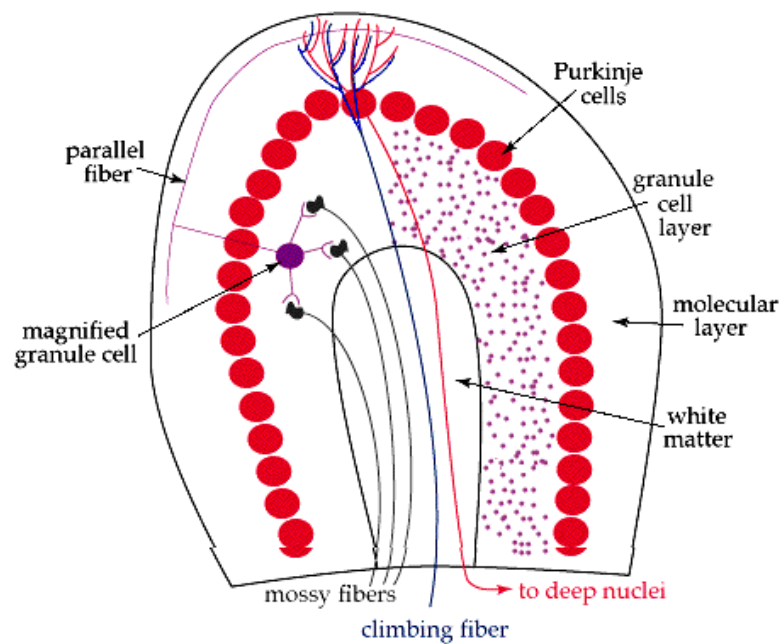


Figura 3 – Desenho esquemático de uma folha cerebelar, mostrando os tipos celulares de cada camada cortical e as relações entre eles.

Fonte: Diana Weedman Molavi, disponível em <thalamus.wustl.edu/course/cerebell.html>

A camada molecular consiste de um arranjo de tratos paralelos de fibras nervosas originárias dos núcleos encefálicos localizados fora do cerebelo.

As células da camada de Purkinje estão regularmente espaçadas e dispostas tridimensionalmente, enviando dendritos dispostos em ângulo reto com as fibras paralelas da camada molecular, constituindo um exemplo clássico de neurônio de integração; sua função é receber os impulsos de várias fontes e enviar um único sinal integrado do seu próprio axônio, trabalho realizado simultaneamente por todas as células de Purkinje.

A camada granular, a mais interna, consiste de células neurogлияis e milhões de pequenos neurônios, as células granulares. O axônio da célula de Purkinje atravessa a camada granular sem interagir com ela, e seus sinais vão aos circuitos apropriados do SNC que controlam a integração da resposta muscular com os órgãos efetores.

Os tipos celulares presentes no cerebelo e as relações dessas populações entre si e com outras populações no restante do SNC mantêm um padrão conservativo, porém sua estrutura anatômica externa mostra grandes variações entre a classe dos vertebrados, podendo variar desde uma simples placa em alguns anfíbios até uma estrutura altamente pregueada, típica de mamíferos e aves (BUTLER; HODOS, 1996).

O cerebelo participa da coordenação dos movimentos mais complexos, integrando as informações sensoriais com os comandos cognitivos, e mantém o equilíbrio e a postura (LENT, 2001). O estágio de desenvolvimento do cerebelo ao nascer está relacionado com o desenvolvimento da capacidade de locomoção e coordenação motora de determinada espécie. Alguns animais já nascem com um cerebelo completamente desenvolvido e com capacidade de movimento coordenado a partir do momento que nascem, como é o caso das aves. Por outro lado, há animais que precisam de cuidados ao nascer, como filhotes de cachorro, rato e humanos, pois o cerebelo está ainda imaturo, e a morfogênese, mielinização e histogênese só se completam algumas semanas após o nascimento (BUTLER; HODOS, 1996).

1.2 Neurotoxicidade

O Sistema Nervoso em desenvolvimento apresenta uma grande permeabilidade vascular, sendo bastante vulnerável aos agentes externos, e,

dependendo da natureza dos agentes, eles podem acarretar danos estruturais em diferentes regiões e em estágios distintos de desenvolvimento (COLE; LEE, 1997).

O encéfalo do embrião é especialmente vulnerável aos danos induzidos por agentes químicos que atravessam a membrana hematoencefálica imatura, já que ela exerce a sua função apenas após a diferenciação de grande parte dos sistemas orgânicos.

Durante o desenvolvimento de um organismo, existem períodos considerados críticos para a maturação normal – um deles parece ocorrer durante o crescimento rápido do cérebro no período perinatal. Essa etapa inclui a maturação dos axônios e dendritos em desenvolvimento e o estabelecimento de conexões neurais, sinaptogênese, além de um grande número de mudanças bioquímicas (BORTOLAZZI et al., 1999).

Diversas substâncias podem agir sobre os mecanismos da embriogênese, alterando o padrão normal da espécie, como a insulina, que, quando administrada em embriões de *Gallus domesticus* no segundo dia, causa nanismo ou atraso no desenvolvimento (DIAS; MÜLLER, 1999). Heaton e Bradley (1995) observaram que, em embriões de *Gallus domesticus*, a exposição crônica ao etanol no período pré-natal reduz a atividade neurotrófica e diminui a motilidade dos embriões em consequência da redução acentuada no número de motoneurônios presentes na coluna lateral motora. Embriões de *Gallus domesticus* tratados com acetato de chumbo no terceiro ou quinto dias de desenvolvimento embrionário (CARVALHO, 2002; SCHATZ, 2003) apresentaram comprometimento no padrão de desenvolvimento e alterações morfológicas, como hemorragias, hidrocefalia, extrusão visceral e malformações de face.

Chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênio são metais pesados tóxicos que não desempenham funções nutricionais ou estruturais, sendo raramente encontrados nos organismos vivos (MOREIRA et al., 2001). O chumbo é virtualmente onipresente no meio ambiente como resultado de sua ocorrência natural e de sua utilização industrial, introduzido no ambiente através dos gases automotivos, operações de solda e mineração e indústrias secundárias, como manufaturas de tintas e materiais de construção. Como todo metal pesado, degrada-se lentamente no meio ambiente, persistindo durante décadas no solo e no leito dos

rios, e, não sendo metabolizado pelos animais, ocorre o processo de bioacumulação (EPA, 2001). As rotas de exposição incluem ingestão de água ou comida contaminadas e inalação de poeira com chumbo (GARBER; HEIMAN, 2002). A permanência indesejável do chumbo no ambiente é considerado um problema de saúde pública, pois provoca contaminação ambiental e ocupacional. O chumbo e seu sulfato são pouco absorvidos e praticamente inócuos, no entanto os sais solúveis de chumbo, como cloreto, nitrato e acetato, são considerados venenos muito ativos (COLE; LEE, 1997). Em crianças, a exposição crônica ao chumbo durante o desenvolvimento está relacionada com prejuízos cognitivos, definindo a neurotoxicidade do chumbo como um problema de saúde pediátrico significativo (LASLEY; GILBERT, 2000).

Entre os poluentes ambientais, o chumbo é um dos mais danosos, afetando principalmente os indivíduos jovens (BRESSLER et al., 1999). Durante o período embrionário, devido à intensa proliferação e diferenciação celular e a sinaptogênese, a intoxicação pelo chumbo acarreta graves conseqüências no padrão estrutural e funcional do corpo dos indivíduos (MOREIRA et al., 2001). Estudos comprovam que o chumbo apresenta ação deletéria sobre o desenvolvimento das espécies a ele expostas, tais como ratos (ANTONIO et al., 2000; DEARTH et al., 2002), aves (NARBAITZ, 1985; ANWER et al., 1988) e humanos (ZAREMBSKI et al., 1983; ROTHEMBERG et al., 1999).

O chumbo atravessa a membrana hematoencefálica e causa efeitos imediatos nos indivíduos expostos, pois altera o metabolismo e a fisiologia cerebral. Essas alterações funcionais resultam em modificações morfológicas que podem permanecer mesmo após os níveis de chumbo baixarem, mostrando efeitos estruturais, bioquímicos e comportamentais de longa duração (NEHRU; SIDHU, 2001). Por ser lipossolúvel, o chumbo é capaz de se acumular no organismo, caracterizando-se como um potente agente neurotóxico (AL-SALEH, 1994). No sistema nervoso o chumbo atua bloqueando ou dificultando a transmissão nervosa, por interferir no transporte de cálcio, nos mecanismos de adesão celular, na síntese e liberação de neurotransmissores, na função glutamatérgica e na ativação da proteína quinase C (JOHNSTON; GOLDSTEIN, 1988, GUILARTE et al., 1994; BRESSLER et al., 1999). O comprometimento da função nervosa leva à perda de memória, dificuldade de concentração e diminuição da capacidade cognitiva (LOCEY

et al., 1998). Estudos também demonstram déficit nas funções cognitivas e comportamentais em crianças, bem como em animais experimentais, mesmo em níveis baixos de contaminação (FINKELSTEIN et al., 1998).

O cerebelo e o hipocampo são estruturas-alvo da ação neurotóxica do chumbo (ALFANO; PETIT, 1981; ADHAMI et al., 1996), ambos estão envolvidos em processos cognitivos (AKHONDZADEH, 1999) e sofrem alterações estruturais em resposta aos agentes neurotóxicos (WALKER et al., 1989).

Estudos in vivo e in vitro têm sido realizados para avaliar os efeitos do chumbo no hipocampo. Ratos expostos ao chumbo mostraram prejuízo da indução da potencialização de longa duração (LTP) na região CA1 e do giro denteado do hipocampo (GILBERT et al., 1996) e inibição da formação e manutenção da LTP em fatias de hipocampo (ALTMANN et al., 1993), caracterizando-se a LTP no hipocampo como o principal modelo experimental usado no estudo do papel das sinapses nos processos de neurotoxicidade (BRESSLER, 1999). Chen e colaboradores (2004a) mostraram que, em cultura primária de neurônios hipocampais de embriões de rato expostos ao acetato de chumbo, ocorreu a inibição do crescimento e da diferenciação dos neurônios hipocampais, estimulação da hiperplasia glial e aumento da apoptose (CHEN et al, 2004b). El-Sokkary e colaboradores (2003) verificaram danos morfológicos severos no volume nuclear e redução da densidade neuronal no hipocampo e corpo estriado em ratos expostos ao acetato de chumbo. Lasley e Gilbert (2000) demonstraram que o metal prejudica a plasticidade sináptica hipocampal.

A intoxicação pelo chumbo vem sendo associada com alterações no comportamento motor, o que tem levado os pesquisadores a dedicar uma maior atenção a estudos neuroquímicos e morfológicos do cerebelo (ANTONIO et al., 2000; 2002), uma das regiões importantes envolvidas no controle desse aspecto do comportamento. O cerebelo parece modular os níveis de atividade motora geral, pois danos de diversas origens no cerebelo em desenvolvimento podem resultar em problemas com a coordenação motora (BORTOLAZZI et al., 1999). A alteração na atividade motora é um dos efeitos mais estudados da intoxicação pelo chumbo, e prejuízos no aprendizado têm sido descritos mesmo em doses muito baixas (ANTONIO et al, 2002).

Em galinha doméstica, a intoxicação pelo chumbo, assim como por outro metal pesado, pode levar à inibição do crescimento e à redução da produção de ovos (VODELA *et al.*, 1997). Em experimento realizado por Mazliah e colaboradores (1989), a administração diária do acetato de chumbo levou a uma intoxicação crônica. Durante o período em que as galinhas sobreviveram, controles da função motora e da velocidade da condução nervosa mostraram que ocorre falha na amplitude da resposta motora, degeneração de neurônios motores da medula espinhal, perda de axônios motores e atrofia muscular.

Na primeira semana pós-natal, exceto o sistema reprodutor, todos os demais sistemas orgânicos apresentam-se funcionais, observando-se inclusive uma grande atividade muscular. Os pintos apresentam um alto índice de metabolismo, o que propicia um crescimento muito rápido, com aumento substancial de peso, além de apresentarem intensa atividade locomotora (MAGALDI, 1974). Essas características funcionais permitem a realização de estudos que evidenciam o comprometimento provocado por agentes tóxicos já nos primeiros dias de vida.

1.3 Comportamento

Os danos no SNC de animais expostos ao chumbo podem ser verificados submetendo-os a tarefas para avaliação da aprendizagem e memória tais como campo aberto, comportamento de alternar espontâneo (BARRET; LIVESEY, 1985) e aprendizado latente em labirinto (RODRIGUES *et al.*, 1993).

O termo atividade exploratória é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal e refere-se ao conhecimento do ambiente no qual o indivíduo se encontra (NAHAS, 1999). Nos animais estudados em laboratório os comportamentos que levam a uma ampliação das informações sobre determinado ambiente incluem andar/correr em círculos, cheirar, levantar-se nas patas traseiras, direcionar-se para determinado estímulo, manipular objetos e levá-los à boca, entre outros. Na literatura estão descritas duas formas de estudar a exploração em animais; a primeira é a exposição do animal a uma alteração ambiental discreta e localizada e a segunda, o confinamento a um ambiente nunca experimentado anteriormente, como um labirinto ou campo aberto. A alteração discreta pode ser realizada introduzindo-se estímulos novos próximos ou dentro do viveiro ou ainda

em um ambiente já relativamente familiar. O animal pode exibir uma ampla variedade de respostas, como ataque, fuga, imobilização, manuseio e contato com o objeto, entre outros, dependendo da espécie, experiência prévia e tipo de estímulo em questão.

O campo aberto foi originalmente descrito para testar os efeitos de ambientes não familiares sobre a emocionalidade em ratos. O teste consiste na mensuração dos comportamentos realizados pelo animal em um espaço novo e amplo, do qual ele não pode escapar. Segundo Nahas (1991), o desencadeamento desses comportamentos depende da interação do animal com vários fatores do teste, como manuseio na transferência para o campo aberto; exposição ao ambiente de teste, do aparelho em si e seus arredores; experiência prévia com a situação de teste, ou seja, também é possível mensurar aprendizado no campo aberto. A repetição da exposição do animal no campo aberto, em dias consecutivos, traz vantagem quanto à possibilidade de investigar aprendizagem e realizar uma análise temporal. O intervalo entre as sessões geralmente é de 24 horas, pois o ritmo circadiano influencia os comportamentos mensurados. É possível ainda realizar uma avaliação da atividade exploratória do animal no campo aberto a partir da introdução ou retirada de estímulos. Esse método parece ser apropriado para demonstrar possíveis diferenças entre animais normais e com danos cerebrais em termos de habilidade em adquirir e utilizar informação espacial, bem como para habituação à atividade exploratória.

A habituação em campo aberto permite uma expressão natural do comportamento em um ambiente novo, presumivelmente não aversivo (O'KEEFE; NADEL, 1978), e é aplicado em vários modelos animais, como em galinhas (WEBSTER; HURNIK, 1990), codornas (JONES et al., 1991), macacos (FERGUNSON; BOWMAN, 1990) e ratos (LUTHMAN et al., 1992), pois diferentes espécies exibem comportamentos distintos no teste do campo aberto.

A atividade locomotora no campo aberto é usada para medir a toxicidade induzida pelo chumbo (MOREIRA et al, 2001), pois medidas de atividade motora são sensíveis aos efeitos do metal (BORTOLAZZI et al., 1999) e por estudos indicarem que as áreas cerebrais envolvidas na atividade motora, como córtex cerebral, gânglios basais e cerebelo, são afetadas por esse metal (CORREA et al., 2004). A alteração na atividade motora é um dos efeitos mais estudados da intoxicação pelo

chumbo, mas prejuízos no aprendizado têm sido descritos com doses muito baixas (ANTONIO et al., 2002).

O comportamento de alternância espontânea tem sido utilizado para avaliar a integridade do sistema nervoso em diversos modelos biológicos (HUGHES, 2004). Essa tarefa é baseada na tendência natural dos animais em explorar seqüencialmente e sucessivamente novos espaços (EINAT; SZECHTMAN, 1995). Por ser uma expressão da motivação de explorar, tal fenômeno deve estar presente em todos os animais (HASKELL et al., 1998)

Embriões de galinhas vêm sendo utilizados como modelo experimental para estudo de desenvolvimento (SANES, 1992; WOLPERT, 1998), principalmente do SNC, pois permitem a incubação artificial e o acompanhamento do desenvolvimento embrionário diário, podendo-se facilmente avaliar as características normais e as alterações. Esse modelo experimental se adapta muito bem às condições do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/BEG/CCB/UFSC, por ser de simples manuseio, possuir tempo de desenvolvimento relativamente curto e não ser oneroso. Nessas condições experimentais também é possível observar as ações de um agente tóxico, como o chumbo, sobre o desenvolvimento do SNC destes embriões.

O Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal vem realizando pesquisas com embriões de *Gallus domesticus* em relação à ação da insulina e tunicamicina (DIAS, 1996; DIAS; MÜLLER, 1999), do ácido retinóico (RIES, 1998), da lesão mecânica (IGNÁCIO, 1998) e do acetato de chumbo (CARVALHO, 2002; SCHATZ, 2003) sobre o desenvolvimento, com ênfase no SNC.

Pode-se verificar a deposição do acetato de chumbo nos tecidos utilizando-se a técnica histoquímica de autometalografia de Timm (SANTOS, 1999). Testes de comportamento em embriões de *Gallus domesticus* expostos ao chumbo podem ajudar a elucidar as razões dos prejuízos causados em indivíduos expostos acidentalmente ao chumbo. Dessa maneira, pode-se estabelecer um modelo experimental para o estudo dos processos relacionados ao desenvolvimento e comportamento, tanto de embriões submetidos ao acetato de chumbo como de animais-controle normais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da exposição embrionária a diferentes doses de acetato de chumbo sobre a histologia cerebelar e o comportamento de *Gallus domesticus*.

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever as características externas dos indivíduos dos grupos-controle e tratados ao nascer;
- Aferir o peso corporal na primeira semana de vida de todos os grupos;
- Identificar as alterações no repertório comportamental dos pintos jovens tratados com acetato de chumbo;
- Analisar, através de testes de comportamento no campo aberto e no labirinto em T, as respostas dos indivíduos dos grupos experimentais;
- Caracterizar, através de técnicas histológicas e histoquímicas, o comprometimento da estrutura celular e tecidual do cerebelo considerando as diferentes doses de acetato de chumbo administradas;
- Proceder à contagem dos tipos celulares presentes no cerebelo dos indivíduos dos quatro grupos experimentais analisados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo biológico

A espécie utilizada neste estudo foi *Gallus domesticus*, que, de acordo com Berger (1971), apresenta a seguinte classificação taxonômica:

Classe Aves

Ordem Galliformes

Família Phasianidae

Gênero Gallus

Espécie *Gallus domesticus*

Embriões e pintos jovens dessa espécie foram obtidos a partir da incubação de ovos fertilizados doados pela Empresa Macedo - Koerich S/A – Município de São José/SC.

A amostra consistiu em ovos fertilizados de forma ovalada, coloração bege, peso médio de 63g, que foram limpos com algodão, datados e estocados a um intervalo de temperatura entre 10°C e 15° C por um período não superior a três dias (ROMBOLI et al., 1984). Posteriormente os ovos foram incubados em posição horizontal em incubadora apropriada para estudos de desenvolvimento embrionário de aves a uma temperatura constante de 38° C e condições de oxigenação e umidade adequadas para a embriogênese dessa espécie (GONZALES, 1994) (Figura 4).

A nomenclatura utilizada neste trabalho, usual em estudos do desenvolvimento embrionário, considera como E1 o primeiro dia embrionário, E2 o segundo dia embrionário e assim sucessivamente, até E21, correspondente ao dia normal de eclosão (HOUENOU; OPPENHEIM, 1994; YAGINUMA et al., 2001). Para o período pós-natal foi adotado o termo D1 para o primeiro dia de vida, até D8, quando foram concluídos os experimentos.



Figura 4 – Incubadora utilizada no estudo (Petersime, Mibo E-1), mostrando a disposição dos ovos durante a incubação.

3.2 Grupos experimentais

No momento da incubação dos ovos, o embrião encontra-se no estágio de blástula (WOLPERT, 1998). Nas condições de incubação acima indicadas, tem continuidade o desenvolvimento das estruturas intra e extra-embrionárias. No terceiro dia embrionário (E3), o embrião encontra-se no estágio 20HH (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) e apresenta relativamente pouca vascularização extra-embrionária, o que permite a abertura do ovo sem prejudicar seu desenvolvimento.

Os ovos foram distribuídos em quatro grupos, cada um constituído de seis indivíduos (n=6):

- a) Grupo-controle 1 (GC1) - ovo intacto;
- b) Grupo-controle 2 (GC2) - ovo com abertura;
- c) Grupo acetato de chumbo 1 (GA1) - 18,75 μ g diluído em 1ml de salina;
- d) Grupo acetato de chumbo 2 (GA2) - 37,5 μ g de diluído em 1 ml de salina.

Em E3 os ovos, com exceção do grupo-controle 1 (GC1), foram retirados da incubadora e, em ambiente asséptico, efetuou-se um orifício na região da câmara de ar, com a finalidade de promover o descolamento da membrana interna da face mediana superior e a conseqüente descida do embrião. Na face mediana superior foi

realizada uma abertura de cerca de 1 cm de diâmetro, para observação do embrião e administração do acetato de chumbo (Figura 5A e 5B). Após o tratamento, a abertura foi protegida com fita adesiva (1,5 cm) e os ovos recolocados na estufa (38°C).

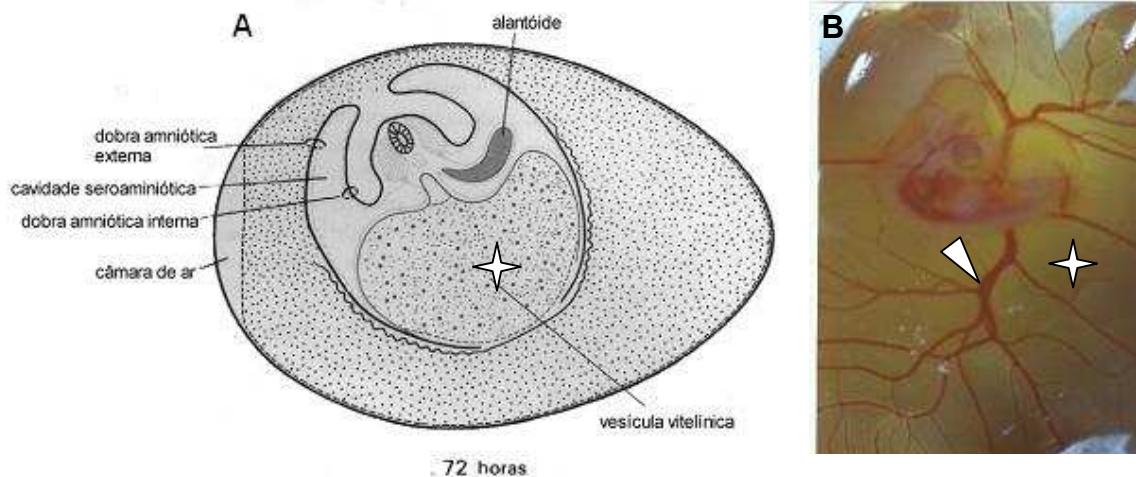


Figura 5 – Embrião de *Gallus domesticus* em E3. A – Esquema didático mostrando o embrião e os anexos embrionários (Houillon, 1972). B – Vista lateral do embrião. As setas apontam a vascularização extra-embrionária (◄) e a vesícula vitelínica (★).

No quinto dia embrionário (E5), com o auxílio de uma agulha hipodérmica ultrafina, foi injetado 0,1ml de solução salina (0,9% - Tayuyna), contendo acetato de chumbo na vesícula vitelínica (GA1 e GA2), numa região próxima ao embrião, a uma profundidade de até 1,0 mm (DIAS, 1996) (Figura 6). Os ovos foram então recolocados na incubadora, prosseguindo seu desenvolvimento embrionário.

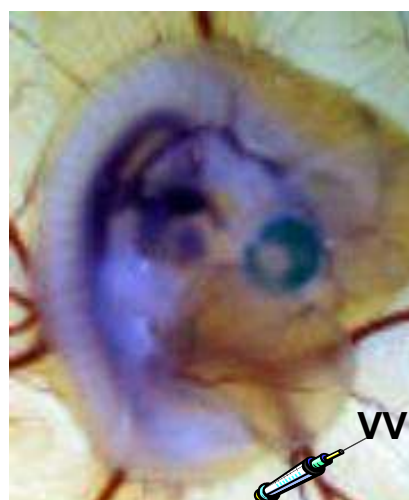


Figura 6 – Foto de embrião em E5 (B) mostrando o local de aplicação do acetato de chumbo na vesícula vitelínica (VV).

A sobrevivência e a viabilidade dos embriões foram analisadas diariamente – após a retirada da fita durex e através da observação a olho nu ou com lupa de mão –, avaliando-se características como o padrão de crescimento das estruturas (bico, membros), batimento cardíaco, movimentos do embrião, vascularização extra-embriônica e aspecto do vitelo. Esses procedimentos não foram realizados com o GC1, já que esses ovos foram incubados intactos.

Os indivíduos que completaram seu desenvolvimento (E21) e eclodiram (D1) foram pesados em balança digital (0,01g) e transferidos para a caixa-ninho, onde permaneceram durante oito dias para análise do comportamento, correspondendo a 10% do total de ovos incubados.

3.3 Procedimentos pós-eclosão

O habitat experimental era constituído por uma caixa-ninho de madeira com dimensões de 36cm de largura, 47cm de comprimento e 33cm de altura, com capacidade para acompanhar simultaneamente três a quatro pintos em condições de adequada oxigenação. A lâmpada de 40 wats, colocada a 30 cm dos pintos garantiu a temperatura e claridade (permanente) do ambiente (Figura 7).



Figura 7 – Habitat experimental dos pintos de *Gallus domesticus* acompanhados em laboratório, caixa-ninho de madeira (36x47x33cm) com água e comida *ad libidum*.

Nos dois primeiros dias de vida não foi disponibilizado alimento aos pintos, pois eles dispõem de reserva nutricional própria (HOUILLON, 1972). Posteriormente foi oferecida ração para pintos (Supra Inicial) e água *ad libidum*.

O ganho do peso corporal dos indivíduos dos grupos experimentais foi mensurado diariamente, como parâmetro relevante da toxicidade do acetato de chumbo sobre o desenvolvimento desses animais.

3.3.1 Estudo do comportamento

Baseado em artigos de Burger e Gochfeld (1995 e 2000), que estudaram o comportamento de gaivotas em laboratório e no habitat natural, e também em nossas observações preliminares, foi realizado um teste piloto, no qual os animais foram filmados em dois turnos durante 10 minutos (RIVERO et al., 2003). Os dados obtidos permitiram estabelecer que o tempo de observação seria correspondente a 5 minutos diários, em qualquer período, a partir do segundo dia de vida (D2), pois no primeiro dia os animais apresentaram pouca atividade. Esses resultados permitiram a caracterização do repertório comportamental dos indivíduos na caixa-ninho (Rivero et al., 2004) em 26 tipos de comportamentos, coletados no etograma de *Gallus domesticus*. Os que foram considerados mais significativos e constantes foram organizados em oito categorias e quantificados nos indivíduos dos quatro grupos experimentais (Figura 8).

CATEGORIAS	DESCRIÇÃO DOS COMPORTAMENTOS INTEGRANTES DAS CATEGORIAS
1. Movimentos Cefálicos	Virar a cabeça: inverter a direção ou posição da cabeça.
	Sacudir a cabeça: agitar repetidas vezes a cabeça.
	Esticar o pescoço: estender, alongar ou espichar o pescoço.
2. Movimentos de Asas	Abrir as asas: estender ou esticar asas.
	Bater as asas: agitar as asas.
3. Movimentos de Locomoção	Andar: movimentar-se dando passos, caminhar.
	Pular: saltar, elevar-se do chão impulsionando o corpo rapidamente.
	Voar: elevar-se do chão com o uso das asas.
	Empoleirar: ato de saltar e equilibrar-se em base estreita.
4. Movimentos Anômalos	Arrastar: mover-se a custo, sem afastar o corpo do chão.
	Cair: ir ao chão por desequilíbrio.
	Cambaleiar: oscilar para os lados por não agüentar as pernas.
5. Inatividade	Apoiar: encostar-se apoiando seu peso na parede ou em outro indivíduo.
	Sentar: tomar assento no chão.
	Deitar: estender-se no chão.
6. Bicar	Bicar o chão ou parede: dar bicadas, picar com o bico.
7. Auto-limpeza	Bicar-se ou esfregar-se com a pata: no intuito de manter-se asseado.
	Raspar o bico: limpar esfregando o bico no chão.
8. Interação Social	Contato: exercer o sentido do tato, toque em outro indivíduo.
	Bicar o outro: picar outro indivíduo.

Figura 8 – Quadro explicativo com a descrição das categorias do repertório comportamental de *Gallus domesticus* definida em testes pilotos.

Os animais experimentais (GC1, GC2, GA1, GA2) foram filmados diariamente em fitas de VHS, durante cinco minutos na caixa-ninho, de D2 a D7, para registrar a freqüência da ocorrência do repertório comportamental estabelecido previamente.

Foi realizado teste de fidedignidade para comprovar a confiabilidade dos registros da ocorrência dos comportamentos e detectar o treino dos observadores. As imagens foram analisadas por dois observadores, que realizaram o registro. Os dados dos observadores, quando comparados, atingiram nível de concordância igual ou superior a 70% (FAGUNDES, 1999). Efetuou-se a média da frequência de cada categoria para cada animal em cada dia e em seguida calculou-se a média da frequência de cada categoria comportamental por grupo experimental durante os seis dias observados.

3.3.2 Testes de comportamento

Os danos no SNC de animais expostos ao chumbo podem ser verificados submetendo-os a testes de comportamento para avaliação e mensuração de variáveis como locomoção e exploração. O campo aberto é largamente utilizado para medir a atividade exploratória e locomoção geral (MEERLO, 1999; GOULART et al., 2001) e o comportamento de alternar espontâneo baseia-se na tendência de os animais explorarem novos locais seqüencial e sucessivamente (EINAT; SZECHTMAN, 1995; MELLO et al., 1999).

Considerando que a maioria dos testes de comportamento costuma ser realizada em estudos de mamíferos, algumas adaptações foram necessárias para a utilização dos testes em nosso modelo animal.

1. Comportamento exploratório em campo aberto: utilizada uma caixa de madeira com frente de vidro, com dimensão de 40x60x50cm de altura, com chão dividido em 25 quadrados iguais. Os animais foram submetidos no quinto e sexto dia de vida a sessões de 5 minutos em cada um dos testes descritos a seguir:

a) Teste de campo aberto - padrão (CA-A): nesta tarefa foram registrados os comportamentos descritos na figura 8, exceto interação social. Considerando o objetivo do teste, foi também observado o número de quadrados cruzados pelo animal (cruzamento), o número de fezes eliminadas durante a tarefa e a latência para sair do quadrado central. A inclusão da variável cruzamento exclui automaticamente o

comportamento andar, integrante da categoria 3 (movimentos de locomoção) da Figura 8 (Figura 9A).

- b) Teste de campo aberto com imobilização prévia em caixa escura (CA-B): foi colocada uma caixa de plástico de cor preta sobre o animal, de modo que ele ficou preso num espaço escuro limitado por aproximadamente 2 minutos; depois a caixa foi retirada e registraram-se suas reações, conforme descrito no item acima.
 - c) Campo aberto com estímulos (CA-C): neste teste, em cada um dos quatro quadrantes da caixa foram colocados estímulos diferentes (caixa, comedouro, pote plástico transparente e ripa de madeira). O pinto foi colocado no centro da caixa e registrou-se a latência para sair do primeiro quadrado e o tempo que ele passava explorando cada estímulo (Figura 9B).
 - d) Campo aberto com estímulo em plataforma elevada (CA-D): no centro do campo aberto colocou-se uma plataforma central de 15x15cm e 2cm de altura, sobre a qual havia um estímulo apetitivo (comida). Observou-se o número de tentativas para alcançar o estímulo e o tempo gasto para atingi-lo.
- 2. Teste da alternância espontânea:** realizado no quinto dia, em uma caixa de madeira com formato em T, com braços menores medindo 20cm e braço maior de 34cm de comprimento, com inclinação de 20°. Tanto os braços menores como o maior mediam 8cm de largura e 20cm de altura. Foram realizados dois testes utilizando-se o labirinto em T:
- a) Teste de alternância sem estímulo: O pinto foi colocado na extremidade do braço longo e registrou-se o período de latência que ele levou para entrar em um dos braços menores. O animal foi então retirado do labirinto e recolocado, após um intervalo de 15 segundos, no braço longo. Registrou-se novamente o tempo transcorrido até alcançar um dos braços menores. O teste foi repetido no máximo cinco vezes e suspenso assim que o animal alternou o braço escolhido inicialmente. Foi registrado o número de tentativas para o indivíduo alternar

espontaneamente o braço escolhido na primeira vez, num total de no máximo cinco tentativas, e o tempo total que o pinto levou para alternar o braço (Figura 9C).

- b) Teste de alternância com estímulo: Este teste realizou-se conforme descrição do item anterior, mas com a inclusão de um estímulo luminoso em um dos braços menores do labirinto em T, a fim de verificar a orientação pela luz (Figura 9D).

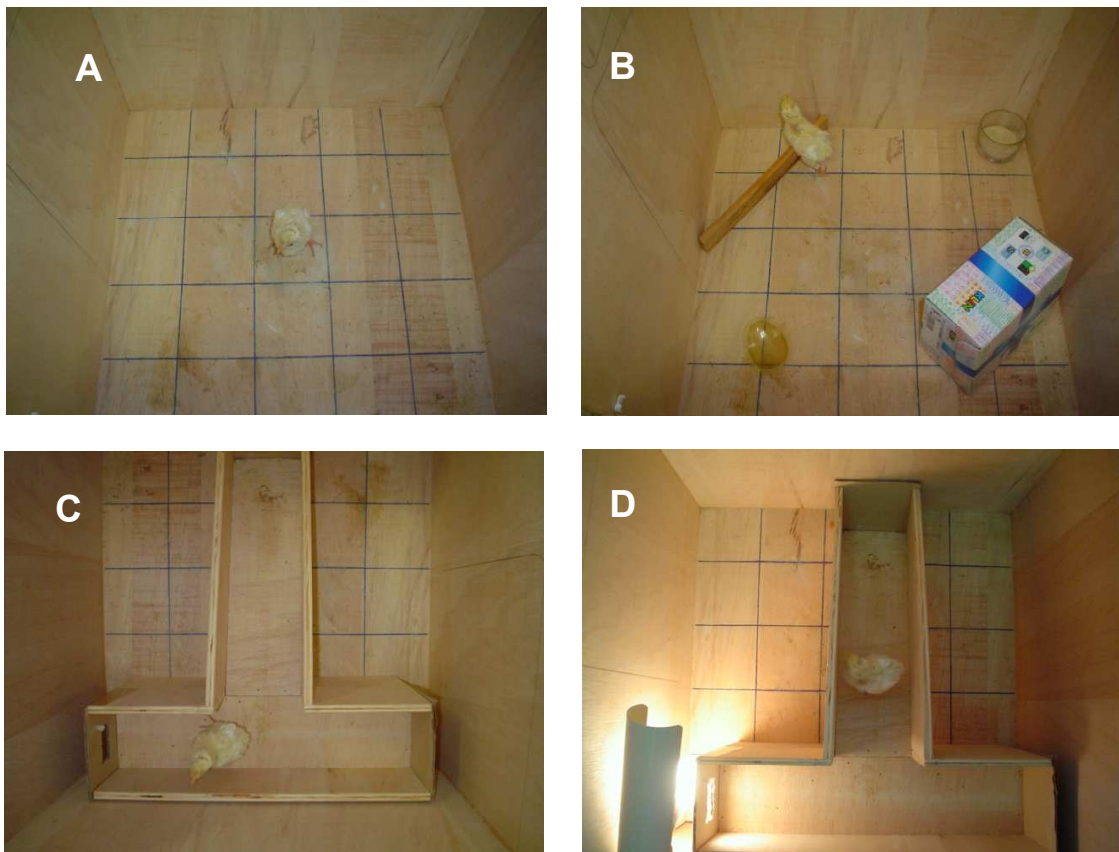


Figura 9 – Testes comportamentais realizados nos grupos experimentais de *Gallus domesticus* em D5 e D6. A - Campo Aberto Padrão. B - Campo Aberto com estímulos. C - Labirinto em T. D - Labirinto em T com estímulo luminoso.

3.3.3 Análise quantitativa do comportamento

Após a observação das imagens e registro dos comportamentos em planilhas, as médias das frequências de ocorrência de cada categoria para cada grupo experimental foram utilizadas para as comparações e análises estatísticas, através de sumário estatístico (software Statistica®- Versão 6.0). Para verificar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos, foi utilizado o teste de análise de variância de

uma via e teste *post-hoc* de Duncan. Os dados referentes aos testes comportamentais no campo aberto foram quantificados em número absoluto de ocorrências e frequência relativa, sendo os resultados analisados através da ANOVA para medidas repetidas e teste de Duncan quando necessário.

3.4 Estudo histológico

Em D8, após a conclusão dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com vapor de éter durante 6 minutos e submetidos à perfusão intracardíaca com aproximadamente 400ml de solução Carnoy-sulfeto, com auxílio de uma bomba de perfusão que permite uma corrente contínua de líquido sob uma pressão constante de aproximadamente 120 a 140mm de Hg. Após o sacrifício dos animais, o isolamento e a preparação dos tecidos para fixação foram realizados de maneira rápida para evitar modificação das características das estruturas.

Procedeu-se à retirada do encéfalo da caixa craniana de acordo com descrito por Onishi (1999). Em seguida, o encéfalo foi seccionado sagitalmente, fixado com imersão total em solução Carnoy-sulfeto por 45 horas e mantido em álcool absoluto durante 48 horas (Santos, 1999). O material fixado foi preparado para microscopia de luz de acordo com as seguintes etapas:

- a) Desidratação: Manter a peça em álcool absoluto por 1 hora, efetuando-se uma troca do álcool durante esse período;
- b) Diafanização: Imergir em xilol até a peça tornar-se translúcida (aproximadamente 90 minutos), efetuando-se uma troca durante esse período;
- c) Inclusão: Mergulhar a peça em parafina a 57°C por três vezes, cada banho com duração de 30 minutos. Após o último banho (inclusão definitiva), é importante orientar a peça dentro do molde de alumínio de modo que a região de início do seccionamento fique voltada para baixo e que o material fique centralizado no molde;
- d) Emblocamento: Retirar os recipientes da estufa e mantê-los em temperatura ambiente para que a peça se solidifique e seja retirada do molde. O bloco é aparado e acoplado ao micrótomo rotativo.

- e) Montagem das lâminas: As peças foram seccionadas em micrótomo rotativo em secções de 8µm. As secções foram distendidas em banho-maria (37°C) antes de serem posicionadas sobre as lâminas, as quais foram previamente gelatinizadas (5g de gelatina em um litro de água). As lâminas montadas permaneceram abrigadas até a realização das técnicas empregadas.
- f) Desparafinização: efetuada em xilol, seguido de álcool/xilol, hidratação em álcool – em seqüência decrescente, de álcool absoluto até álcool 70% – e em água destilada para prosseguimento dos processos de coloração.

As técnicas de coloração utilizadas no presente estudo foram as seguintes:

- a) Hematoxilina e Eosina (BEÇAK; PAULET, 1976) – Esta técnica básica de coloração foi empregada como controle histológico. As lâminas foram coradas com hematoxilina (3 minutos) e lavadas em água de torneira. Depois imersas em eosina (1 minuto), seguindo-se a desidratação e montagem das lâminas com bálsamo do Canadá.
- b) Histoquímica de TIMM (DANSCHER, 1981; 1984) – Utilizada para visualização do acetato de chumbo nas secções histológicas. Após a desparafinização, as lâminas permaneceram de 20 a 30 minutos na solução de desenvolvimento físico (59,7% goma arábica, 10% solução tampão citrato de sódio, 29,8% solução hidroquinona e 0,5% solução nitrato de prata). Posteriormente as lâminas foram lavadas várias vezes em água de torneira para retirar o excesso de prata e então submetidas a contracoloração com hematoxilina (3 minutos). Seguiu-se a desidratação e montagem das lâminas com bálsamo do Canadá.
- c) Violeta de Cresila (ONISHI, 1999) – É uma das técnicas mais utilizadas para investigação do sistema nervoso por possibilitar a evidenciação da substância de Nissl, material granular constituído por RNA ribossomal, presente nas células nervosas. Coloração: 30 minutos de imersão no corante violeta de cresila, 3 minutos em água destilada, desidratação e montagem com bálsamo do Canadá.
- d) Coloração Hoechst 33258 (VERMA; BABU, 1995) – Coloração para visualização de células apoptóticas. As lâminas foram coradas durante 10

minutos em Hoechst 33258 (Sigma) na concentração de 0,5 µg/ml, diluído em tampão Mc Ilvaine (0,4M de fosfato de sódio e 0,1M de ácido cítrico, pH 5,5). Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em água destilada e montadas com geléia de glicerol (0,15g de gelatina: 1ml água destilada: 1ml de glicerina).

3.5 Análise das lâminas

As lâminas contendo os cortes sagitais do encéfalo de *Gallus domesticus* em D8, confeccionadas com as diferentes técnicas, foram analisados ao microscópio de luz (100X, 400X e 1000X). Em todas as análises a atenção esteve voltada para o cerebelo, e os cortes que melhor caracterizavam as estruturas foram fotografados.

3.5.1 Determinação da deposição do acetato de chumbo no córtex cerebelar.

O local padronizado para a análise foi a segunda folha cerebelar de cada corte sagital observado. Para uma melhor caracterização, além das fotografias, foram confeccionados esquemas na câmara clara (figura 10) para mostrar a intensidade da deposição nas diferentes camadas do córtex cerebelar em cada grupo analisado, de acordo com a seguinte legenda: fraca (+), moderada (++) e intensa (+++).

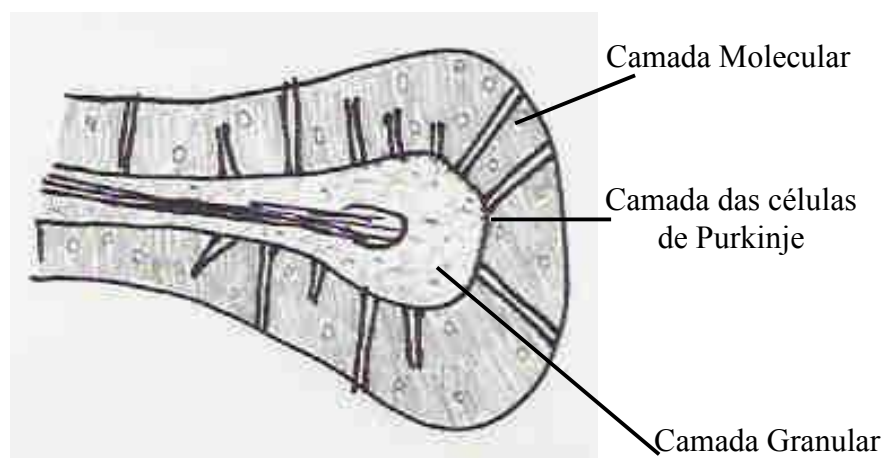


Figura 10 – Esquema confeccionado em câmara clara (125X) da segunda folha cerebelar, mostrando as camadas do córtex cerebelar, para caracterização dos locais de deposição do acetato de chumbo.

3.5.2 Estereologia dos cortes histológicos

Utilizando a Graticula de Weibel (Figura 11) acoplada ao microscópio de luz (400x), realizou-se a contagem dos tipos celulares presentes no cerebelo, no córtex as células de Purkinje e na substância branca os neurônios. A contagem foi realizada com as lâminas coradas com Violeta de Cresila. Em cada corte foram contados cinco campos visuais aleatórios, e em cada campo visual contaram-se 42 pontos, perfazendo nos cinco campos um total de 210 células por corte, o que corresponde a 100% dos pontos contados. Esses pontos podem conter o tipo celular em questão, um outro tipo celular ou nenhum tipo celular. Ao final da contagem obteve-se o número total de cada tipo celular em cada corte. Essa contagem foi realizada em cinco lâminas de cada grupo. O número total de cada grupo foi comparado com ANOVA, seguida de teste de Duncan.

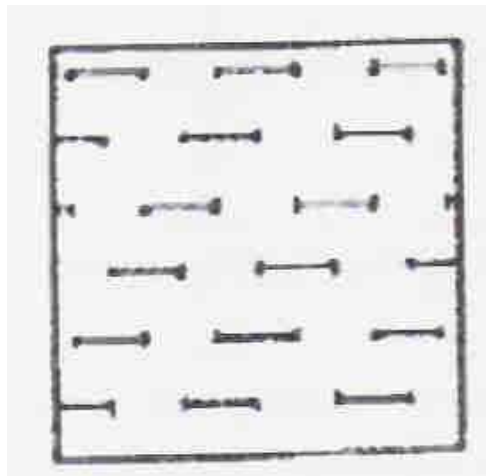


Figura 11 – Graticula de Weibel este instrumento acoplado ao microscópio óptico foi utilizado para a contagem de células. (Mandarim-de-Lacerda, 1999)

3.5.3 Contagem manual de células apoptóticas na camada molecular do córtex cerebelar

Para a contagem das células apoptóticas coradas com o Hoechst 33258, as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (400X) e procedeu-se à contagem manual em campos aleatórios das células que apresentavam características de apoptose – como cromatina condensada, com redução do tamanho do núcleo e fragmentação nuclear. Esse procedimento não foi realizado na camada granular devido ao grande número de células presentes nessa camada, tornando a contagem inviável com o uso da técnica utilizada. A contagem foi realizada em cinco campos aleatórios em cinco lâminas de cada um dos quatro grupos experimentais, sendo este resultado expresso em porcentagem. A diferença no número total de células apoptóticas em cada grupo foi analisada através de ANOVA e teste de Duncan.

4 RESULTADOS

Neste estudo indivíduos da espécie *Gallus domesticus* (n=24) foram acompanhados em ambiente experimental durante a primeira semana de vida, com registro do ganho de peso e do repertório comportamental, além da realização de testes de comportamento em campo aberto e no labirinto em "T". O cerebelo desses indivíduos foi estudado histologicamente a fim de visualizar a deposição do acetato de chumbo no tecido nervoso e de verificar alterações morfológicas resultantes da administração *in ovo* do metal durante o período embrionário (E5).

A observação da morfologia externa dos pintos ao nascer revelou que em todos os grupos experimentais pelo menos um pinto nasceu com sangramento na região de comunicação do intestino com a vesícula vitelínica, ou seja, não ocorreu antes do processo de eclosão a completa reabsorção desse anexo e incorporação à cavidade corporal. Um animal de GA1 apresentou leve prolapso retal. Em todos os grupos, exceto em GC1, ocorreu um caso de deformidade em um ou em ambos membros inferiores, que mostravam-se com coloração alterada, artelhos flexionados e/ou aparente luxação da articulação do quadril. Esses animais apresentavam dificuldades para manter-se de pé e locomover-se, principalmente nos primeiros dias.

4.1 Peso dos Indivíduos

Os indivíduos foram pesados diariamente e o peso médio de cada grupo experimental relativos à primeira semana de vida está representado na tabela 1. A análise das informações apresentadas nessa tabela mostra que os indivíduos do grupo-controle fechado (GC1) tiveram o maior peso ao nascer (D1), assim como em todos os dias analisados. Ou seja, ocorreu ganho de peso em todos os dias. O peso do grupo-controle aberto (GC2) diminuiu em D2 em relação com o peso ao nascer, porém em D3 ocorreu uma recuperação, e a partir de D4 ocorreu aumento diário do peso corporal.

Os indivíduos expostos a 18,75 µg de acetato de chumbo (GA1) perderam peso em D2 e D3, em D4 tiveram uma recuperação, mas apenas em D5 ultrapassaram o valor de D1, sendo este o grupo que apresentou os menores

valores de peso ao longo do experimento. O peso dos indivíduos expostos a 37,5 µg de acetato de chumbo (GA2) diminuiu em D2, porém superou o valor de D1 já em D3 e seguiu com ganho de peso diário até D7.

O peso dos indivíduos em D1 e D2 não diferiu significativamente entre os grupos. Já em D3 o peso do grupo-controle fechado (GC1) foi significativamente maior do que o dos outros grupos GC2 ($p < 0,05$), GA1 e GA2 ($p < 0,01$). O peso de GC1 em D4 foi significativamente maior do que o dos grupos GC2 ($p < 0,05$) e GA1 ($p < 0,01$). Em D5 o peso dos indivíduos de GC1 foi maior do que de GA1 ($p < 0,01$). Nos demais dias de vida (D6 e D7), a diferença não foi estatisticamente significativa.

Na figura 12 podemos visualizar que o peso médio de GC2 e GA2 se mostrou bastante semelhante no decorrer dos dias, porém em D7 o grupo GA2 apresentou valores muito próximos ao GC1. Percebe-se ainda que, apesar dos valores reduzidos de GA1, após a recuperação em D5 seus valores em D6 e D7 ficaram muito próximos aos valores de GC2.

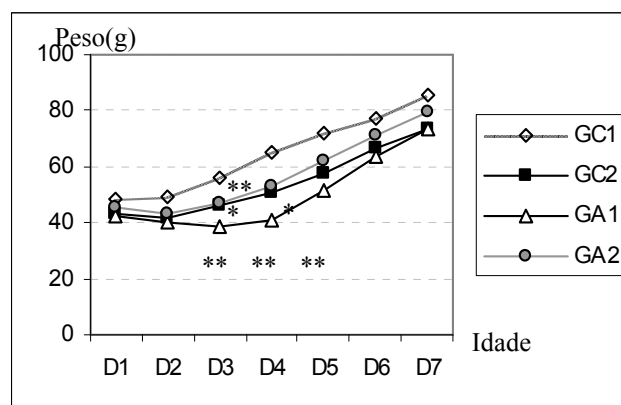


Figura 12 – Ganho de peso (g) de *Gallus domesticus* do nascimento até D7 nos grupos experimentais. Resultados são expressos em média, n=6 em cada grupo, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação a GC1.

Tabela 1: Peso médio (g) dos grupos experimentais de *Gallus Domesticus* em cada dia de vida (D1 a D7).

Grupos Experimentais	Dias de vida						
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Grupo-controle Fechado (GC1)	48,25(±1,79)	48,98(±2,5)	56,10(±4,58)	64,97(±6,54)	72,12(±7,58)	77,33(±7,98)	85,72(±8,87)
Grupo-controle Aberto (GC2)	43,45(±1,87)	41,70(±2,23)	45,95(±2,37)*	50,95(±3,75)*	57,92(±3,36)	66,96(±3,92)	73,56(±5,3)
Grupo acetato de chumbo – 18,75(GA1)	42,78(±2)	40,49(±1,74)	38,75(±1,58)*	41,90(±1,52)*	51,35(±1,53)*	63,48(±1,86)	73,45(±2,37)
Grupo acetato de chumbo – 37,5(GA2)	45,53(±2,52)	43,50(±2,6)	47,15(±0,95)*	53,36(±1,73)	61,96(±4,78)	71,27(±8,11)	79,24(±11,29)

Dados expressos como média ± erro padrão médio, n=6 por grupo. *=p<0,05, em relação a GC1.

4.2 Repertório Comportamental

A observação diária do repertório comportamental dos indivíduos por cinco minutos, em ambiente experimental – a caixa ninho – possibilitou-nos registrar a frequência dos diversos comportamentos realizados pelos indivíduos, agrupados em oito categorias, conforme descrito na metodologia (Figura 8). A frequência média da ocorrência dos comportamentos nos grupos experimentais está representado na Tabela 2, onde é mostrado que o grupo-controle fechado (GC1) apresentou valores elevados nas categorias movimentos cefálicos, de locomoção e interação social, e as menores médias nas categorias inatividade e movimentos anômalos.

Os valores do grupo-controle aberto (GC2) foram os maiores registrados para as categorias movimentos de asas e de locomoção, interação social e bicar. No grupo exposto ao acetato de chumbo na dose de 18,75 μg (GA1), os valores de movimentos cefálicos, de asa e de locomoção, assim como de interação social foram os mais baixos. A média de inatividade foi a maior observada entre os grupos (Tabela 2).

Os indivíduos do grupo exposto a 37,5 μg de acetato de chumbo (GA2) apresentaram o maior valor para movimentos anômalos e nas outras categorias seus valores se aproximavam ora dos grupos-controle (GC1 e GC2), ora do outro grupo exposto ao chumbo (GA1) (Tabela 2).

A análise estatística (ANOVA) demonstrou diferença significativa entre as médias da categoria movimentos cefálicos dos grupos GC2 e GA1 ($p < 0,05$) e GA2 ($p < 0,05$) em relação ao GC1. Nas categorias movimentos de asas e de locomoção, GA1 apresentou médias estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) aos valores de GC2 (Figura 13).

Comparando as informações da tabela 2 e figura 13, notamos que, nos grupos-controle (GC1 e CG2), a soma das médias das categorias ativas (movimentos cefálicos, movimentos de asa, movimentos de locomoção e interação social) são mais altas e a das categorias inatividade e movimentos anômalos são mais baixas do que nos grupos expostos ao metal (GA1 e GA2). As categorias bicar e auto-limpeza não se mostraram elucidativas, pois tiveram ocorrência similar entre os grupos experimentais.

Tabela 2 – Categorias do repertório comportamental em *Gallus domesticus* registradas nos grupos experimentais durante os seis dias observados (D2 a D7).

Categorias do Repertório Comportamental	Grupos Experimentais			
	GC1	GC2	GA1	GA2
Movimentos Cefálicos	525,83(±49,09)	329,83(±67,14)*	319,5(±42,45)*	346,67(±65,13)*
Movimentos de Asas	30,67(±6,32)	53(±14,38)	17,67(±4,15)#	32,67(±7,31)
Movimentos de Locomoção	150,83(±18,14)	165,33(±20,48)	93(±12,44)#	144,50(±24,26)
Movimentos Anômalos	2,33(±0,99)	5,83(±3,18)	5,5(±2,35)	11,83(±8,46)
Inatividade	5,5(±1,38)	10(±2,88)	13,67(±4,14)	12,17(±4,69)
Bicar	33,17(±16,81)	44,17(±17,61)	36,83(±21,97)	31,67(±13,35)
Auto-limpeza	18,83(±1,99)	20,67(±3,89)	22(±3,78)	14,5(±3,49)
Interação Social	99,17(±9,75)	109,33(±29,47)	75(±5,38)	87,5(±9,36)

Dados expressos como média ± erro padrão médio, n=6 por grupo. * = p < 0,05, em relação a GC1 e # = p < 0,05, em relação a GC2.

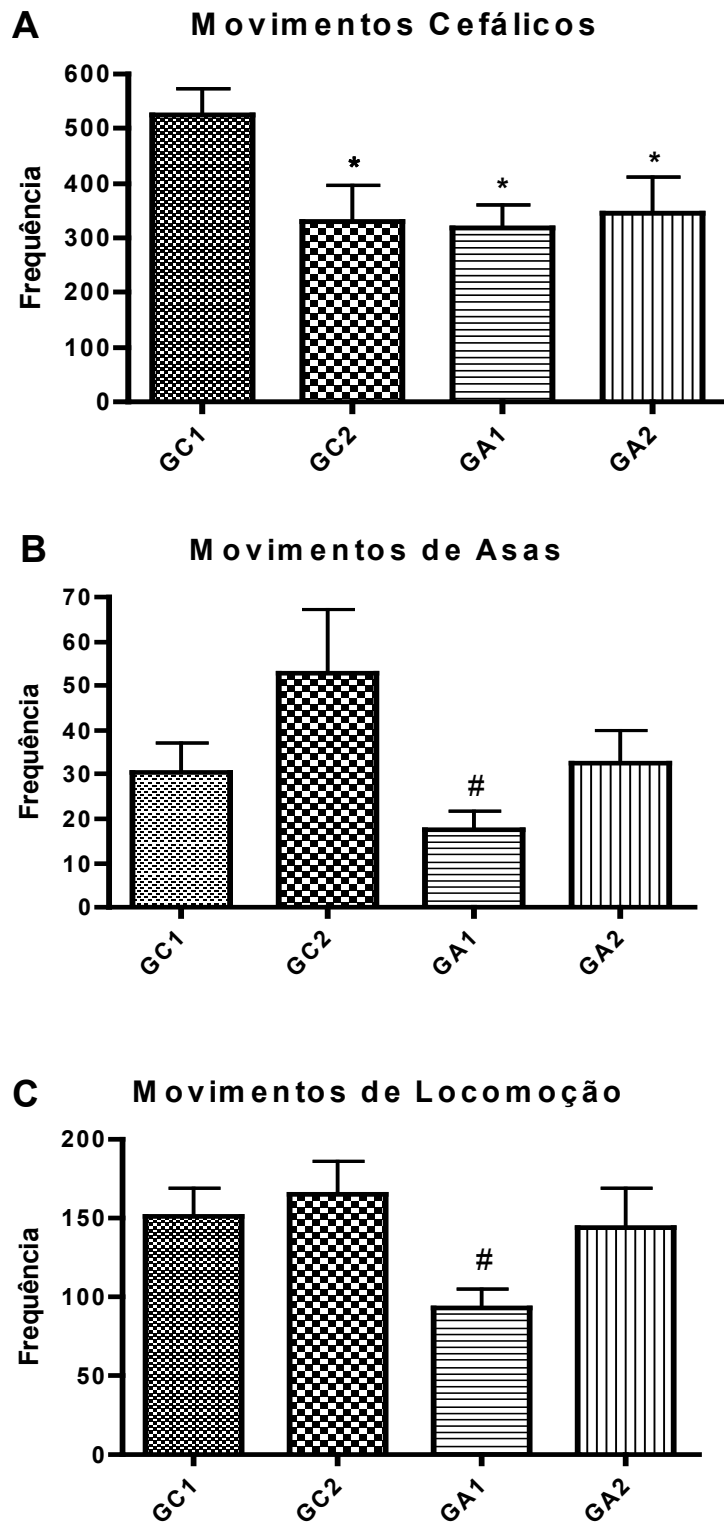


Figura 13 – Categorias de movimentos cefálicos (A), movimentos de asa (B) e locomoção (C) nos grupos experimentais de *Gallus domesticus*. Resultados expressos em média de ocorrência (erro padrão médio), n=6 em cada grupo, *p<0,05 em relação a GC1, # p<0,05 em relação a GC2.

4.3 Testes comportamentais

Os testes no campo aberto foram realizados no quinto dia de vida e repetidos no sexto dia. Os dados referentes a cada um dos testes encontram-se representados através de tabelas e figuras. No sexto dia foram realizados os testes de comportamento de alternância espontânea no labirinto em T, com e sem estímulo luminoso.

4.3.1 Comportamento Exploratório

a) Campo Aberto Padrão (Tabela 3)

Em D5 o tempo para os pintos deixarem o quadrado central (latência) e iniciar a exploração do aparelho foi menor nos indivíduos do GC1 do que nos demais grupos. O número de cruzamento foi inferior apenas ao GC2 e apresentou os maiores índices de movimentos cefálicos e de locomoção.

O grupo-controle aberto (GC2) apresentou índices elevados para cruzamento e movimentos cefálicos, a segunda menor latência, e o menor índice de defecação.

Em GA1 a latência foi a maior entre os grupos, com menores índices de cruzamento e movimentos de asas e de locomoção. Para GA2 os índices de movimentos cefálicos foram os menores, porém, movimentos anômalos e bicar foram os mais elevados.

No segundo dia de teste (D6) o GC1 obteve índices elevados de movimentos cefálicos e de locomoção. Os indivíduos de GC2 apresentaram a menor latência e maiores médias de cruzamento, movimentos cefálicos, de asas (juntamente com GA2), de locomoção e bicar. Em GA1 a latência e o período de inatividade foram os maiores, e o índice de movimentos de asas foi menor. GA2 apresentou os menores índices de cruzamentos, movimentos cefálicos e de locomoção, e maiores índices de movimentos de asas e anômalos.

Quando comparamos as categorias observadas nos dois dias em cada grupo, percebemos que a latência diminuiu em todos os grupos, e os movimentos de asas, inatividade e bicar aumentaram em todos os grupos. O número de bolos fecais eliminados manteve-se bastante semelhante, entre os grupos e entre os dias; em D6

houve redução para todos os grupos, com exceção de GA1. Em D5 a categoria movimentos anômalos só foi registrada em GA2, porém em D6 foi registrada, mesmo com índices bastante reduzidos, em todos os grupos, exceto em GC1.

A análise das categorias observadas no CA-A em D5 e D6, através da ANOVA para medidas repetidas, mostrou o efeito do segundo dia de teste para latência ($p < 0,01$), já que todos os grupos experimentais analisados deixaram o quadrado central num tempo significativamente reduzido. Na categoria cruzamento houve efeito da sessão ($p < 0,01$) e efeito do tratamento para GA2 ($p < 0,01$), que apresentou número de cruzamento menor que o de GC2. Entre GC1 e GC2 também ocorreu diferença estatística, onde os indivíduos do controle fechado apresentaram número reduzido de cruzamentos ($p < 0,05$). Os resultados mostram que a categoria movimentos de asas apresentou tendência para efeito da sessão ($p = 0,059$), já que todos os grupos demonstraram um aumento desse número em D6. Na categoria bicar houve efeito da sessão ($p < 0,05$), na qual todos os grupos apresentaram elevação na frequência desse comportamento.

b) Campo Aberto após imobilização (Tabela 4)

No quinto dia, na segunda exposição ao aparelho de campo aberto, após um período de imobilização, GC1 obteve os maiores índices de movimentos cefálicos, de asa e de locomoção e os menores de inatividade. Os indivíduos de GC2 apresentaram a menor latência, maiores índices de cruzamento, bicar e auto-limpeza, e foi o único grupo que realizou movimentos anômalos. Para GA1 a latência foi a maior observada, com índices baixos de cruzamento e movimento de asa, e maior média de inatividade. GA2 apresentou o menor índice de movimentos cefálicos.

Em D6, o grupo-controle fechado (GC1) apresentou a maior frequência de movimentos cefálicos e de locomoção, enquanto GC2 obteve as maiores médias de cruzamento e bicar. Nos grupos expostos ao chumbo, GA1 obteve a maior latência e inatividade e menor média de movimentos de asas. Já GA2, mesmo apresentando a menor latência e maior média de movimentos de asa, mostrou os menores índices de cruzamento e movimentos cefálicos.

Tabela 3 – Categorias comportamentais observadas em *Gallus domesticus* no Campo Aberto Padrão A nos grupos experimentais analisados em D5 e D6

Categorias Comportamentais	GC1		GC2		GA1		GA2	
	D5	D6	D5	D6	D5	D6	D5	D6
Latência (++)	77,33(±26,23)	41(±15,35)	103,33(±42,74)	10,67(±1,84)	193,3(±51,19)	83(±47,75)	127,2(±52,25)	31,17(±7,92)
Cruzamentos (++)	28,33(±10,15)	26,33(±7,36)#	29,67(±13,18)	80,5(±9,28)	17,33(±10,91)	50,17(±15,35)	19,17(±9,31)	18,17(±6,24) ##
Movimentos Cefálicos	181,33(±12,27)	144,5(±12,38)	152,83(±21,34)	157,67(±32,27)	156,67(±18,19)	134,33(±28,71)	108,67(±7,54)	113,33(±12,78)
Movimentos de Asas	2,33(±1,05)	3,17(±2,10)	1,5(±1,02)	9,67(±6,55)	0,17(±0,17)	2,5(±1,71)	0,17(±3,27)	9,67(±8,89)
Movimentos de Locomoção	2,33(±1,31)	3,17(±2,10)	1(±0,63)	4(±1,86)	0,5(±0,34)	2,67(±1,36)	1,67(±1,31)	1(±0,68)
Movimentos Anômalos	0	0	0	0,5(±0,34)	0	0,5(±0,34)	0,5(±0,5)	2(±2)
Inatividade	0	0,33(±0,33)	0,33(±0,21)	0,5(±0,5)	1(±0,68)	2,33(±1,5)	0,17(±0,17)	0,33(±0,33)
Bicar (+)	1,67(±1,17)	6(±2,69)	0,5(±0,34)	34,17(±21,31)	1(±0,82)	6,17(±4,63)	3,67(±2,44)	9,83(±5,87)
Auto-limpeza	0,33(±0,33)	0,17(±0,17)	0	0	0	0,67(±0,42)	0,67(±0,33)	0,83(±0,83)
Defecar	1,33(±0,21)	0,83(±0,17)	0,67(±0,21)	0,5(±0,22)	1,17(±0,17)	1,33(±0,49)	1,17(±0,48)	0,83(±0,17)

Dados expressos como média ± erro padrão médio, n=6 por grupo. Efeito do tratamento: # = p < 0,05, em relação a GC2, ## = p < 0,01 em relação a GC2. Efeito da sessão += p < 0,05 e +++ = p < 0,01.

A comparação das categorias entre os dois dias do teste mostra que a latência diminuiu e o cruzamento aumentou em todos os grupos, os movimentos de asas aumentaram nos três grupos, mantendo-se em GC1, a categoria bicar aumentou em todos, com exceção de GC2, e o índice de defecação aumentou apenas nos controles.

A ANOVA para medidas repetidas não revelou efeito da sessão para nenhuma categoria observada. Entretanto, mostrou haver efeito do tratamento para as categorias latência – nos indivíduos de GA1 ($p < 0,05$), quando comparados aos grupos-controle, cruzamento – para os grupos GA1 e GA2 em relação a GC2 e movimentos cefálicos – de GA2 comparado a GC1.

c) Campo Aberto com estímulos (Figura 14 e 15)

Não houve diferença significativa entre os grupos no tempo total de exploração dos objetos nem na latência. Porém, ao analisarmos a figura 14, percebemos que os indivíduos de GC2, nos dois dias (D5 e D6), deixaram o quadrado central num tempo inferior aos demais grupos e passaram mais tempo explorando os objetos disponibilizados em D5.

A ANOVA para medidas repetidas revelou tendência para efeito da sessão na latência ($p = 0,063$) e nenhum efeito no tempo total de exploração dos objetos. Em relação ao tempo de contato com o estímulo caixa, houve efeito da sessão ($p < 0,01$), e efeito do tratamento em GC2 ($p < 0,05$), GA1 ($p < 0,01$) e GA2 ($p < 0,05$) quando comparados a GC1 (Figura 15). No tempo de contato com o estímulo pote de plástico transparente, que diminuiu, também ocorreu efeito da sessão ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Categorias comportamentais observadas em *Gallus domesticus* no Campo Aberto-B nos grupos experimentais analisados em D5 e D6

Categorias Comportamentais	Grupos Experimentais							
	GC1		GC2		GA1		GA2	
	D5	D6	D5	D6	D5	D6	D5	D6
Latência	28,67(±15,2)	20,5(±14,32)	14(±3,57)	10,5(±8,32)	95,17(±45,26)*#	85,5(±53,85)	76,67(±45,42)	8,83(±3,44)
Cruzamentos	32,33(±7,98)	33,5(±9,54)	46,83(±7,54)	67,33(±18,99)	22(±9,8)#	35(±12,79)	19,67(±11,37)#	26,67(±12,06)
Movimentos Cefálicos	175,5(±23,73)	152,33(±17,18)	129,67(±12,56)	148,67(±35,65)	108,17(±22,14)	108,5(±30,24)	106,33(±23,64)*	86(±9,97)
Movimentos de Asas	4,67(±2,55)	4,67(±3,28)	2,83(±1,68)	3,67(±1,33)	0,17(±0,17)	0,67(±0,49)	5,67(±4,91)	9,67(±8,89)
Movimentos de Locomoção	4,5(±2,8)	3,83(±3,44)	1,83(±0,75)	2,17(±1,05)	1,83(±1,33)	2,83(±1,6)	1,33(±1,14)	1(±0,52)
Movimentos Anômalos	0	0,5(±0,5)	0,33(±0,33)	0	0	0	0	1,17(±1,17)
Inatividade	0,17(±0,17)	0,33(±0,33)	0,33(±0,33)	0	2,17(±1,08)	1,83(±1,08)	0,5(±0,22)	1,5(±0,72)
Bicar	4,33(±2,51)	8,83(±3,3)	28(±15,66)	22,5(±11,48)	2(±1,48)	5,33(±2,94)	6,5(±3,76)	11,67(±8,19)
Auto-limpeza	0,17(±0,17)	1,33(±0,71)	1,5(±1,31)	0,17(±0,17)	0,33(±0,33)	0,17(±0,17)	0,33(±0,33)	2(±1,44)
Defecar	0,5(±0,22)	0,83(±0,17)	0,33(±0,21)	0,67(±0,21)	0,67(±0,21)	0,33(±0,33)	0,83(±0,31)	0,83(±0,31)

Dados expressos como média ± erro padrão médio, n=6 por grupo. Efeito do tratamento: * = p < 0,05, em relação a GC1, # = p < 0,05, em relação a GC2.

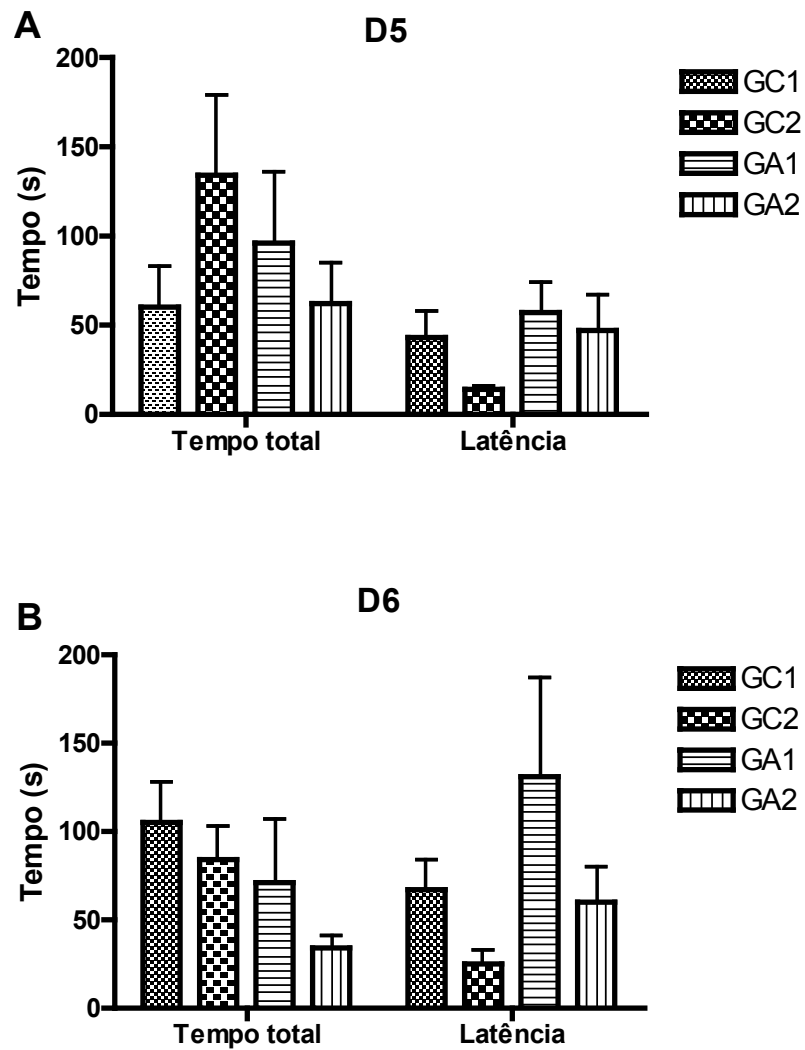
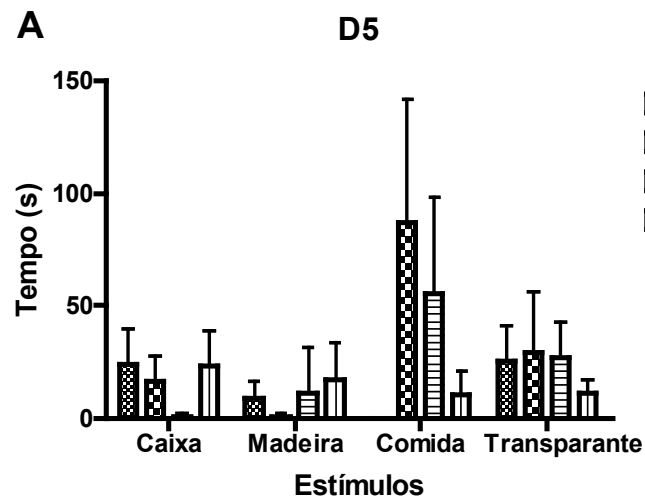


Figura 14– Tempo total de exploração dos objetos e da latência para deixar o quadrado central dos grupos experimentais de *Gallus domesticus* em D5 (A) e D6 (B). Dados expressos em média (\pm erro padrão), $n=6$ por grupo.



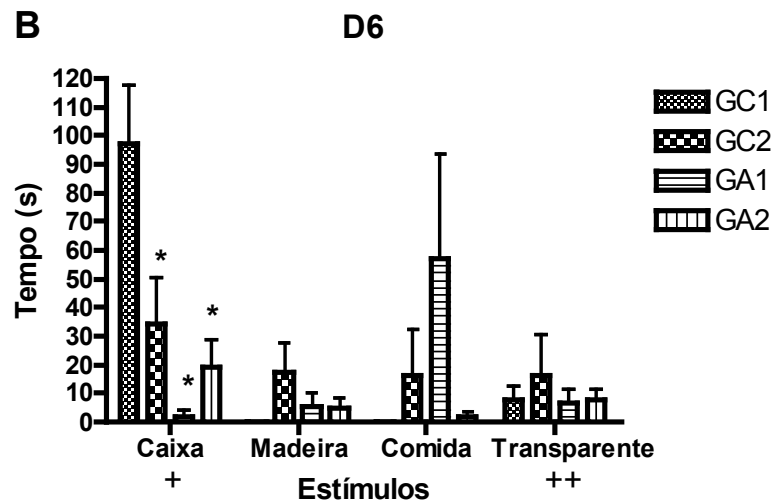


Figura 15 – Tempo total de exploração dos estímulos separadamente nos grupos experimentais de *Gallus domesticus* em D5 (A) e D6 (B). Dados expressos em média (\pm erro padrão), $n=6$ por grupo. Efeito do tratamento $*=p<0,05$, em relação a GC1. Efeito da sessão: $+=p<0,05$ e $++=p<0,01$.

d) Campo Aberto com plataforma central (Figura 16)

Os indivíduos de GC1 apresentaram o maior tempo para atingir a plataforma em ambos os dias. Os indivíduos de GC2 apresentaram o menor tempo, porém não ocorreu diferença estatística entre os grupos. A ANOVA para medidas repetidas não demonstrou efeito nem do tratamento nem da sessão entre os grupos experimentais na variável tempo necessário para atingir a plataforma central.

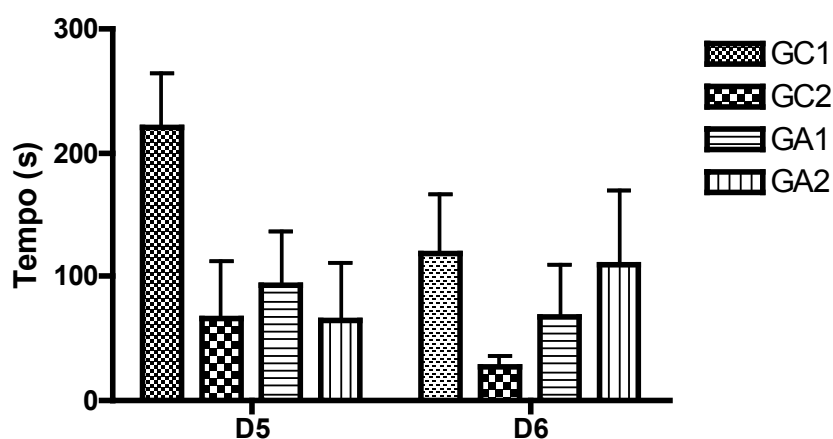


Figura 16 – Tempo necessário para atingir a plataforma central com comida nos grupos experimentais de *Gallus domesticus* em D5 e D6. Dados expressos em média (\pm erro padrão), $n=6$ por grupo.

4.3.2 Comportamento de alternância espontânea em D6

a) Labirinto em T

Todos os indivíduos do grupo-controle fechado (GC1) alternaram o braço menor do labirinto em T escolhido primeiramente, com uma média de 3,2 tentativas e tempo médio de 186,5 segundos. No grupo-controle aberto (GC2) 66,7% alternaram o lado, com uma média de 2,2 tentativas em 48,2 segundos. Os demais indivíduos (33,3%) não entraram em nenhum braço no tempo observado (300 segundos).

Nos grupos tratados com o acetato de chumbo, 50% dos integrantes do GA1 (18,75 μ g) apresentaram o comportamento de alternância espontânea com 2,3 tentativas em 112,6 segundos; 16,7% realizaram as 5 tentativas sem explorar o braço oposto e 33,3 não ultrapassaram o braço maior. Dos animais tratados com 37,5 μ g (GA2), 83,3% exploraram ambos os lados com 2,2 tentativas em 73,8 segundos e 16,7% dos indivíduos não deixaram o braço principal.

Observamos que 100% de GC1 apresentaram o comportamento de alternância espontânea, porém o fizeram em um tempo total maior do que o dos outros grupos e com uma maior média de tentativas. Na figura 17 foi representado o tempo necessário para alternar o braço nos indivíduos dos quatro grupos experimentais que apresentaram o comportamento de alternância espontânea

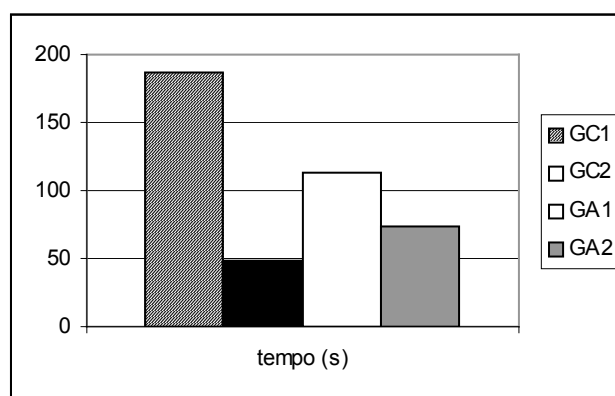


Figura 17 – Tempo médio necessário para alternar o braço no labirinto em T nos indivíduos que apresentaram o comportamento de alternância espontânea nos grupos experimentais em D6.

b) Labirinto em T, com estímulo luminoso

Neste teste a maioria dos grupos mostrou preferência pelo lado do estímulo luminoso, o que refletiu no número reduzido de animais que explorou os dois braços

do aparelho e no aumento do número de tentativas para alternar o lado onde estava o estímulo luminoso. A luz na extremidade de um dos braços, que serviu como estímulo reforçador, fez com que, nessa segunda etapa do teste, apenas um indivíduo (de GA2) deixasse de explorar pelo menos um dos braços.

Para GC1 a média de tentativas foi 3,2 em 88,5 segundos nos 66,7% que exploraram os dois braços; já 33,3% exploraram apenas o braço do estímulo nas 5 tentativas, com tempo médio de apenas 26,5 segundos.

No grupo GC2, 33,3% dos indivíduos levaram 286 segundos para alternar o braço em 4 tentativas, e 66,7% não alternaram o lado, levando em média 116 segundos em suas visitas ao braço com o estímulo luminoso.

O grupo GA1 apresentou a mesma percentagem de GC2, entretanto os que alternaram o fizeram numa média de 128,5 segundo em 3,5 tentativas, e os que não alternaram alcançaram o braço escolhido numa média de 70,5 segundos.

Os indivíduos de GA2 alternaram (33,3%) em 69 segundos em 2,5 tentativas. Metade dos indivíduos não alternaram, levando 68,3 segundos nas 5 visitas ao braço com o estímulo luminoso e 16,7% não entrou em nenhum braço.

Nesse teste os indivíduos de GC1 continuaram tendo a maior percentagem entre os que alternaram (66,7% contra 33,3% em todos os outros grupos). O tempo gasto nas tentativas foi menor apenas do que em GA1, e a média de tentativas foi superior apenas à de GA2. Na figura 18 estão representados os tempos gastos pelos indivíduos dos quatro grupos experimentais que apresentaram o comportamento de alternância espontânea.

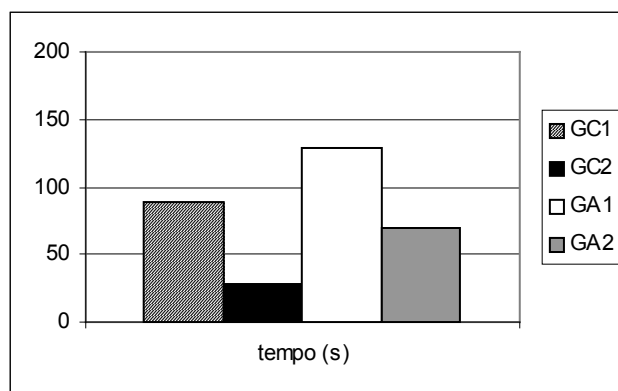


Figura 18 – Tempo médio necessário para alternar o braço no labirinto em T nos indivíduos que apresentaram o comportamento de alternância espontânea nos grupos experimentais em D6.

4.4 Resultados Histológicos

A observação das lâminas coradas com hematoxilina e eosina nos apresenta um panorama geral da organização das camadas celulares (Figura 19), porém não possibilita verificar alterações ou irregularidades que possam ter sido provocadas pela exposição embrionária ao acetato de chumbo. A figura 20A mostra a integridade dos tecidos e permite reconhecer as camadas cerebelares, com corpos celulares de diferentes formas e tamanhos. Nos indivíduos expostos ao metal (Figura 20B e 20 C), notamos que o reconhecimento da constituição de cada camada não é tão perceptível quanto nos controles.

A análise das lâminas coradas com violeta de cresila em ambos os grupos-controle permitiu o reconhecimento dos tipos celulares com nitidez, já que as células de Purkinje apresentavam citoplasma regularmente distribuído, substância de Nissl granular característica, núcleo e nucléolo bem evidentes, características que podem ser notadas na Figura 21A, que representa um indivíduo do grupo-controle fechado. Nos grupos expostos ao chumbo, nas duas doses, percebemos uma maior impregnação da coloração nas diferentes camadas e os prolongamentos celulares distribuídos de forma irregular. Os cortes mostram, quando comparadas aos dos grupos-controle, uma irregularidade na organização das camadas celulares do córtex do cerebelo, onde podemos perceber uma maior quantidade de células de Purkinje (Figura 21B e 21C), como foi demonstrado também através da contagem desse tipo celular pela estereologia (Tabela 6). Com a mesma técnica foram analisados os neurônios dos núcleos do cerebelo, que evidenciavam corpo celular repleto de grânulos de substância de Nissl, conhecido pelo nome de substância tigróide, em todos os grupos experimentais, aspecto esse que pode ser visualizado na figura 22 A (GC1) e 22 B (GC2). Em apenas um indivíduo de GA2 pode ser observada modificação na distribuição da substância de Nissl, que se apresentou menos condensada e mais difusa no citoplasma dos neurônios (Figura 22C). Nos outros indivíduos do grupo esses neurônios apresentaram-se de maneira semelhante ao observado em GA1. O número desses neurônios mostrou-se aumentado nos grupos expostos ao chumbo, o que foi confirmado através da estereologia realizada (Tabela 7).

A análise das lâminas submetidas à técnica da autometalografia de Timm demonstrou que o acetato de chumbo apresenta-se depositado nas células e tecidos nos grupos que o receberam, com diferenças quanto à intensidade e locais de impregnação (Figura 23A e 23B). Os animais de ambos os grupos-controle não apresentaram marcação para o acetato de chumbo, como evidenciado pela figura 24, referente ao grupo-controle fechado (GC1).

A morte por apoptose nos grupos experimentais foi analisado pela observação dos neurônios com marcação nuclear Hoescht 33258 sob o microscópio de fluorescência. A observação das lâminas em pequeno aumento (200X) nos permite evidenciar os núcleos das células das diversas camadas (Figura 25A, B e C). Em imersão foi possível verificar que em todos os grupos a maioria das células observadas possuíam núcleos de tamanhos normais com cromatina normal (Figura 26A, B e C e Figura 27A, B, C, D e E). Em contraste, as células apoptóticas, em maior número nos grupos expostos ao chumbo, mostravam cromatina condensada e fragmentação nuclear com redução do tamanho do núcleo. Algumas dessas células estão destacadas na figura 27C, 27D e 27E.

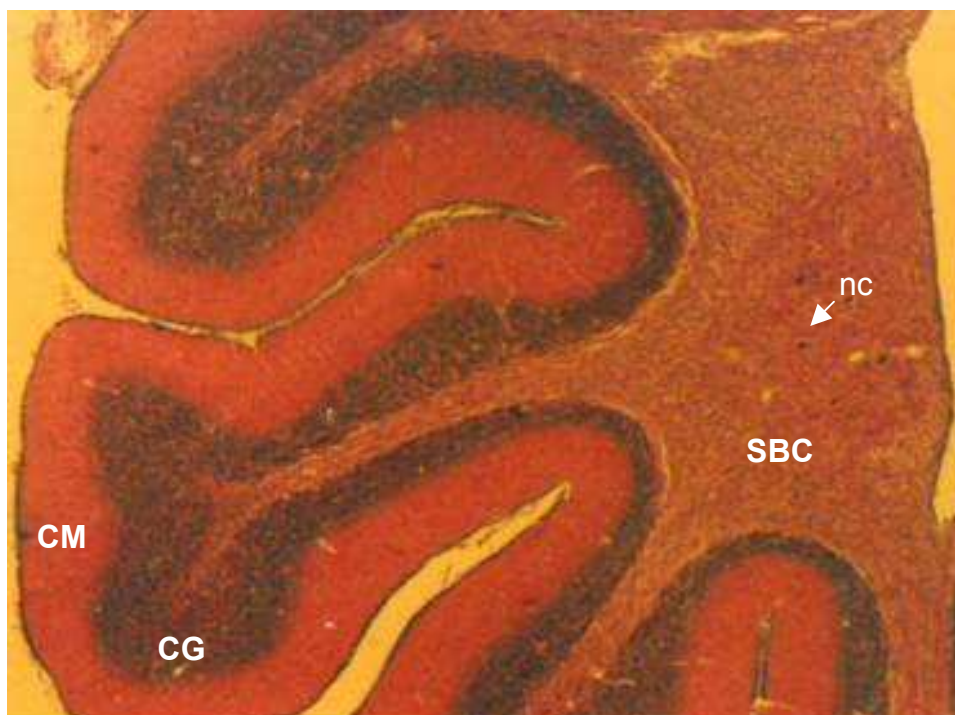


Figura 19 – Vista geral de parte do cerebelo de *Gallus domesticus* (GC2), sendo reconhecidas as camadas molecular (CM) e granular (CG) do córtex cerebelar e a substância branca do cerebelo (MC), onde se encontram os núcleos cerebelares (nc). Hematoxilina e eosina (100X).

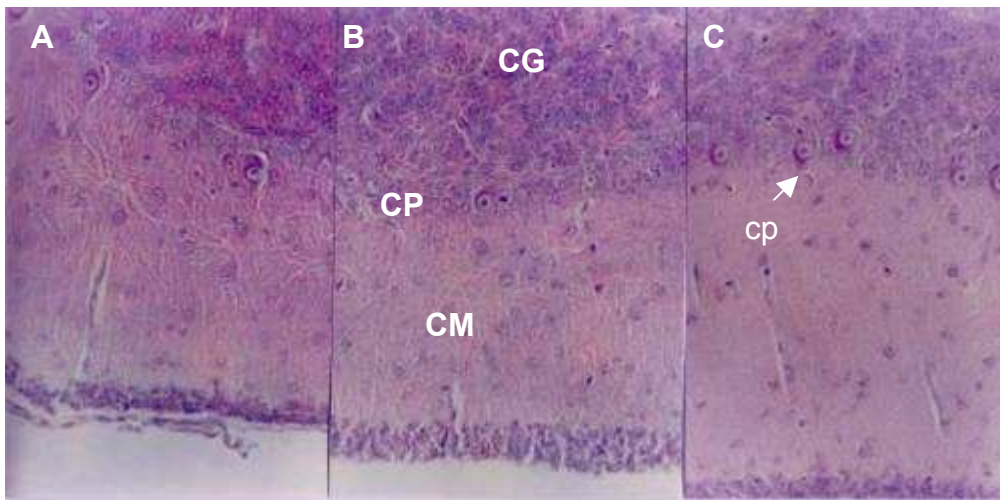


Figura 20 – Camadas do córtex cerebelar de *Gallus domesticus* em D8 dos grupos experimentais. Camadas molecular (CM) e granular (CG) do córtex cerebelar (CC) e células de Purkinje (cp) A- GC1, B- GA1, C- GA2. Hematoxilina e eosina (400X).

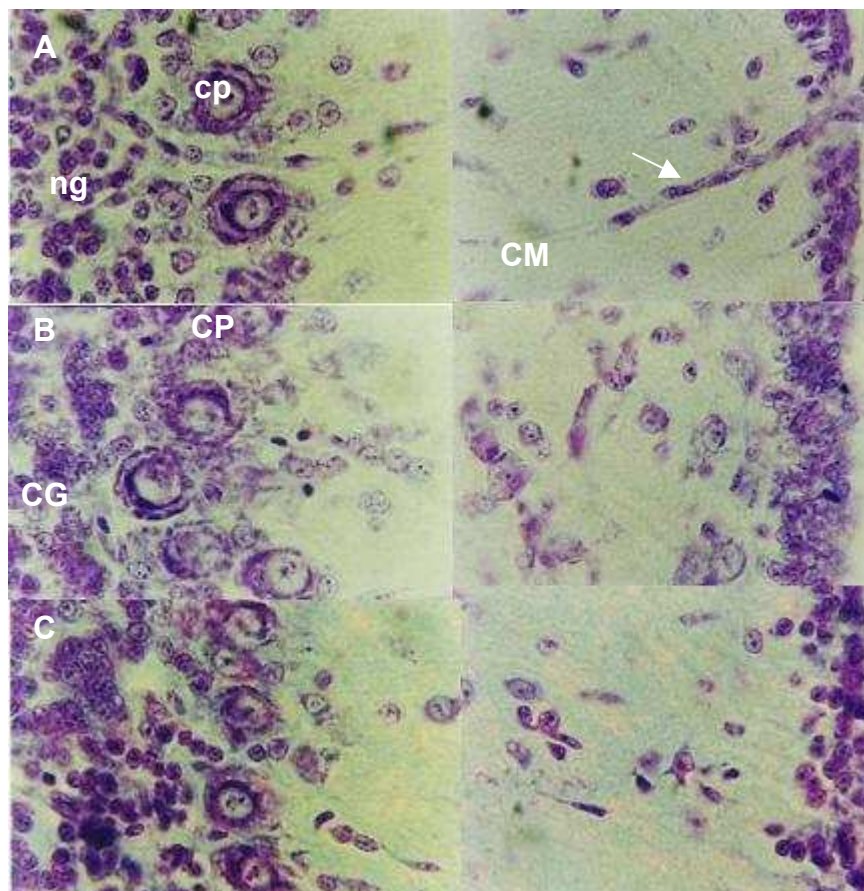


Figura 21 – Córtex cerebelar de *Gallus domesticus* em D8 dos grupos experimentais, destacando as camadas moleculares (CM), de Purkinje (CP) e granular (CG), além dos diferentes tipos celulares presentes (células de Purkinje- cp e neurônios granulares- ng). A seta branca indica a presença de vaso sanguíneo. A- GC1, B- GA1, C-GA2. Violeta de cresila (1000X).

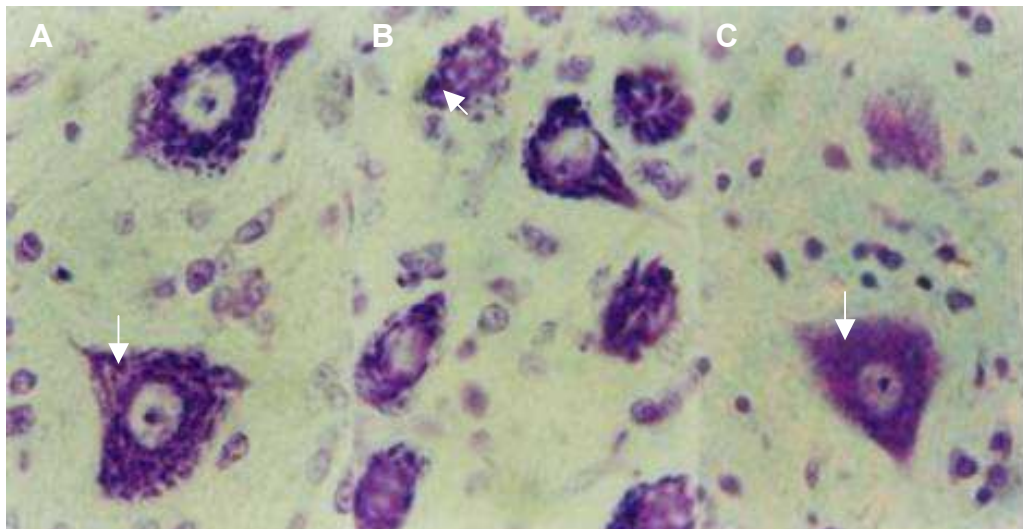


Figura 22 – Neurônios dos núcleos cerebelares de *Gallus domesticus* em D8 dos grupos experimentais. As setas brancas indicam a substância de Nissl. A- GC1, B- GA1, C-GA2. Violeta de cresila (1000X).

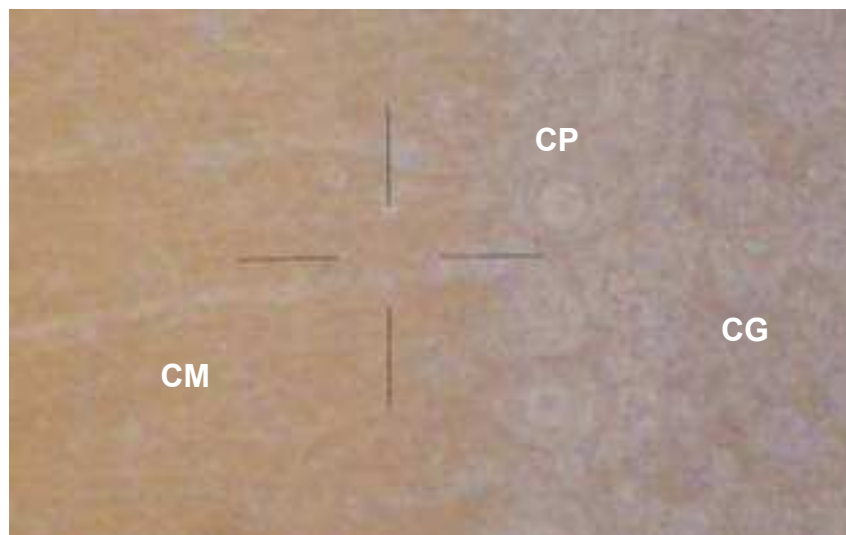


Figura 23 – Secção sagital do cerebelo de *Gallus domesticus* (GC1) em D8, percebe-se as camadas moleculares (CM), de Purkinje (CP) e granular (CG), pouco impregnadas pela técnica. Técnica TIMM contracoloração Hematoxilina. (400X).

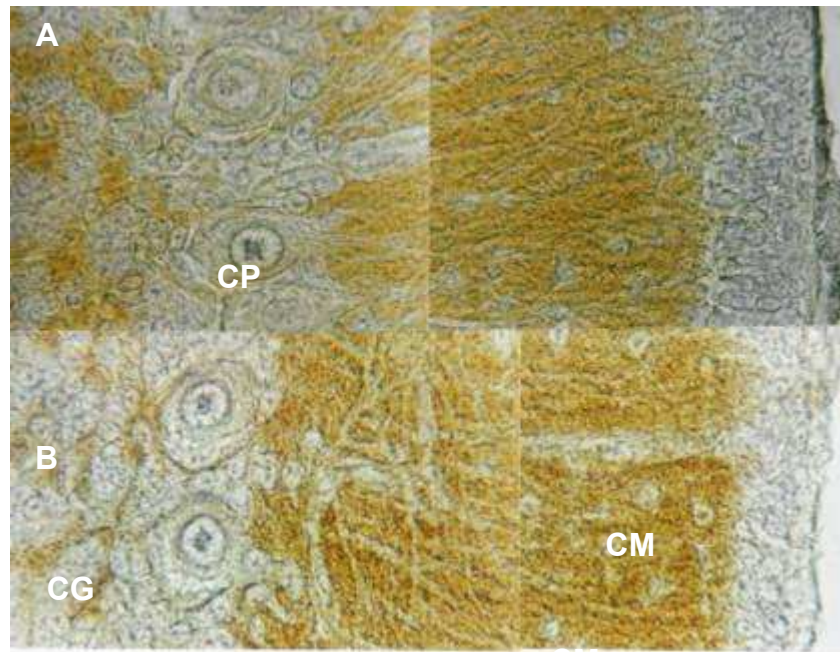


Figura 24 – Secção sagital do cerebelo de *Gallus domesticus* em D8, expostos ao chumbo em E5. Destacando as camadas moleculares (CM), de Purkinje (CP) e granular (CG), A- GA1- 18,75 μ g de acetato de chumbo. B- GA2- 37,5 μ g de acetato de chumbo. Técnica TIMM, (400X).

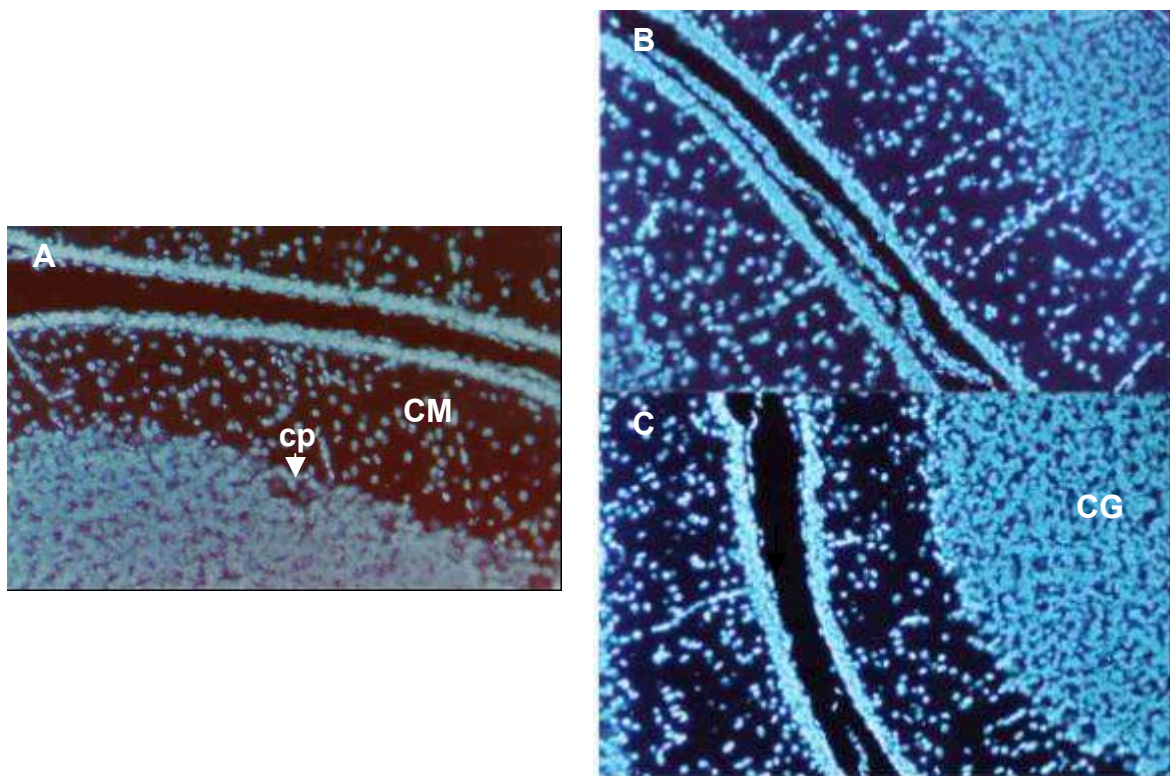


Figura 25 – Camadas do córtex de *Gallus domesticus* em D8 dos grupos experimentais, destacando as camadas moleculares (CM) e granular (CG), além das células de Purkinje (cp). A- GC1, B- GA1, C-GA2. Hoescht (1000X).

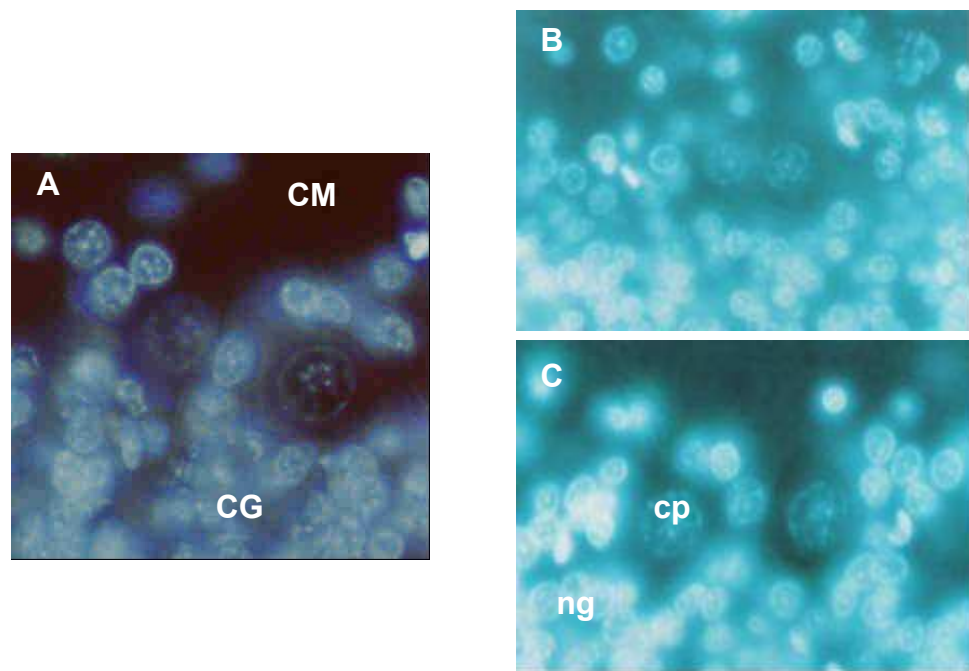


Figura 26 – Detalhe das camadas do córtex cerebelar de *Gallus domesticus* em D8 dos grupos experimentais, destacando as camadas moleculares (CM) e granular (CG), além das células de Purkinje (cp) e neurônios granulares (ng). A- GC1, B- GA1, C-GA2. Hoescht (1000X).

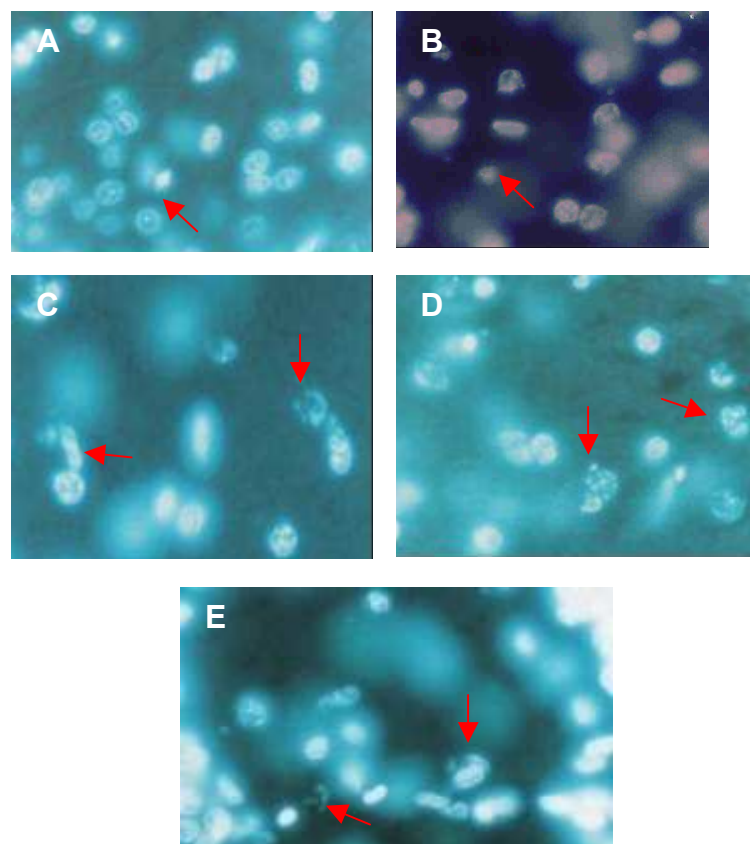


Figura 27 – Camada molecular do córtex cerebelar de *Gallus domesticus* em D8 dos grupos experimentais. As setas vermelhas indicam células em diferentes estágios de apoptose. A- GC1, B- GC2, C-GA1, De E-GA2. Hoescht (1000X).

4.4.1 Locais de deposição do acetato de chumbo no córtex do cerebelo

Nos indivíduos tratados com 18,75 μg de $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ (GA1), pode-se observar marcação para o metal nas três camadas corticais do cerebelo. A impregnação foi mais pronunciada na camada molecular, representativa também na camada granular e mais discreta nas células que constituem a camada de Purkinje, como pode ser observado na figura 23A, que ilustra a deposição de acetato de chumbo nas camadas corticais de um indivíduo desse grupo.

No grupo tratado com 37,5 μg de $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ (GA2), o metal também está presente nas três camadas corticais, evidenciando-se marcação mais difusa, bastante intensa na camada molecular, e moderada ou leve nas outras camadas, como pode ser observado na Figura 23B, registro da impregnação do metal nas camadas corticais cerebelares em indivíduo GA2.

Baseados nos esquemas confeccionados com o auxílio da câmara clara (Figura 10), os esquemas da figura 28 comparam a intensidade de deposição do acetato de chumbo nas três camadas do córtex cerebelar nos quatro grupos analisados. Nos indivíduos tratados, a camada molecular mostrou marcação intensa em todos os cortes analisados. A camada das células de Purkinje de GA1, na grande maioria dos cortes (80%), não se apresentou marcada com o metal, e em 20% deles essa marcação foi fraca – para GA2 metade dos cortes não mostrou marcação e na outra metade a marcação foi fraca. A camada mais interna, a granular, foi a que mostrou maior diversidade de intensidade de impregnação (Figura 24, 28 e Tabela 5): em GA1 observaram-se os três padrões (40% intensa, 40% fraca e 20% moderada) e GA2 mostrou marcação moderada (83%) e fraca (17 %) dos cortes.

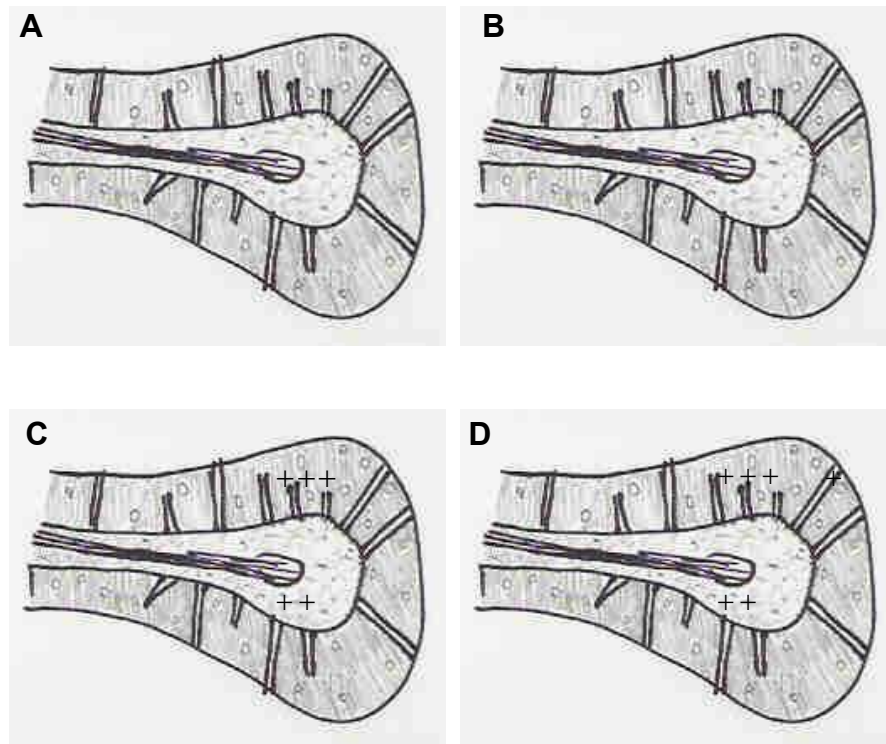


Figura 28 – Desenhos esquemáticos na câmara clara (125X) indicando a deposição de acetato de chumbo nas camadas corticais do cerebelo de *Gallus domesticus*. Onde (+++) indica deposição intensa, (++) deposição moderada e (+) deposição fraca. A- GC1, B- GC2, C- GA1, D-GA2.

Tabela 5 – Impregnação do Acetato de chumbo pela Autometalografia de Timm nas três camadas do córtex cerebelar de *Gallus domesticus*.

Locais de Análise	Grupos Experimentais			
	GC1	GC2	GA1	GA2
Camadas do Córtex Cerebelar				
Camada Molecular	Ausente	Ausente	Intensa 100%	Intensa 100%
			Intensa 40%	
	Ausente	Ausente	Moderada 20%	Moderada 83%
Camada granular			Fraca 40%	Fraca 17%
			Fraca 20%	Fraca 50%
Camada das células de Purkinje	Ausente	Ausente	Ausente 80%	Ausente 50%

Dados expressos como porcentagem da análise de cinco campos em cinco lâminas de cada grupo experimental.

4.4.2 Estereologia dos tipos celulares no cerebelo

Seguindo-se a metodologia previamente descrita, procedeu-se à contagem dos tipos celulares para realizar uma comparação morfológica entre os indivíduos-controle e aqueles expostos ao acetato de chumbo.

4.4.2.1 *Células de Purkinje no córtex cerebelar*

Com o uso da gráticula de Weibel foi possível registrar a média e a porcentagem de células de Purkinje e de outros tipos celulares presentes nas três camadas corticais (outros neurônios e células da glia). Devido à organização morfológica do cerebelo, com suas folhas, alguns campos da gráticula caem fora do córtex cerebelar e esses pontos foram registrados como ausência de célula no ponto observado.

Em GC1 a porcentagem de células de Purkinje foi menor que nos demais grupos (GC2/ GA1 $p < 0,05$ e GA2 $p < 0,01$) e a de pontos com ausência de células foi a maior. A diferença entre os outros tipos celulares e ausência de células não foi estatisticamente diferente entre os grupos.

Tabela 6– Estereologia das células de Purkinje de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais.

Grupos Experimentais	Células de Purkinje		Outros neurônios e células da glia		Ausência de células	
	Média	%	Média	%	Média	%
GC1	19($\pm 0,84$)	9,1	150,2($\pm 4,33$)	71,5	40,8($\pm 10,23$)	19,4
GC2	23($\pm 0,84$)**	11	151,8($\pm 5,09$)	72,3	35,2($\pm 11,09$)	16,7
GA1	22,8($\pm 0,86$)**	10,8	152,4($\pm 2,73$)	72,6	34,8($\pm 7,33$)	16,6
GA2	23,6($\pm 0,68$)**	11,2	148,4($\pm 1,96$)	70,7	38($\pm 4,74$)	18,1

Dados expressos como média \pm erro padrão médio e porcentagem da análise de cinco campos em cinco lâminas de cada grupo experimental. **= $p < 0,01$, em relação a GC1.

4.4.2.2 Neurônios dos núcleos do cerebelo

A quantidade de neurônios nos campos observados na substância branca cerebelar foi significativamente menor nos indivíduos de GC1 ($p < 0,01$) do que nos demais grupos, e também houve aumento no número de campos da gráficula onde não foram observadas células.

Tabela 7 – Estereologia dos neurônios dos núcleos do cerebelo dos grupos-controle e dos grupos expostos ao acetato de chumbo.

Grupos Experimentais	Neurônios		Outros neurônios e células da glia		Ausência de células	
	Média	%	Média	%	Média	%
GC1	17,4($\pm 0,4$)	8,3	111,6($\pm 4,58$)	53,1	81($\pm 4,3$)	38,6
GC2	22,8($\pm 1,62$)**	10,9	108,4($\pm 5,64$)	51,6	78,8($\pm 5,23$)	37,5
GA1	25,8($\pm 1,24$)**	12,3	111,4($\pm 6,72$)	53,1	72,6($\pm 6,29$)	34,6
GA2	26,8($\pm 1,5$)**	12,8	114($\pm 5,07$)	54,3	69,2($\pm 6,35$)	32,9

Dados expressos como média \pm erro padrão médio e porcentagem da análise de cinco campos em cinco lâminas de cada grupo experimental. **= $p < 0,01$, em relação a GC1.

4.4.3 Contagem das Células Apoptóticas na Camada Molecular.

A contagem das células apoptóticas na camada molecular do córtex cerebelar em campos aleatórios revelou uma menor quantidade de células apoptóticas nos indivíduos dos grupos-controle e um incremento de apoptose nos grupos expostos, que apresentaram maior quantidade de células com fragmentação nuclear, cromatina condensada e redução do tamanho do núcleo. Em GA2 a quantidade de células apoptóticas foi maior que em GC1 ($p < 0,01$) e GC2 ($p < 0,05$) e em GA1 foi significativamente maior do que em GC1 ($p < 0,01$).

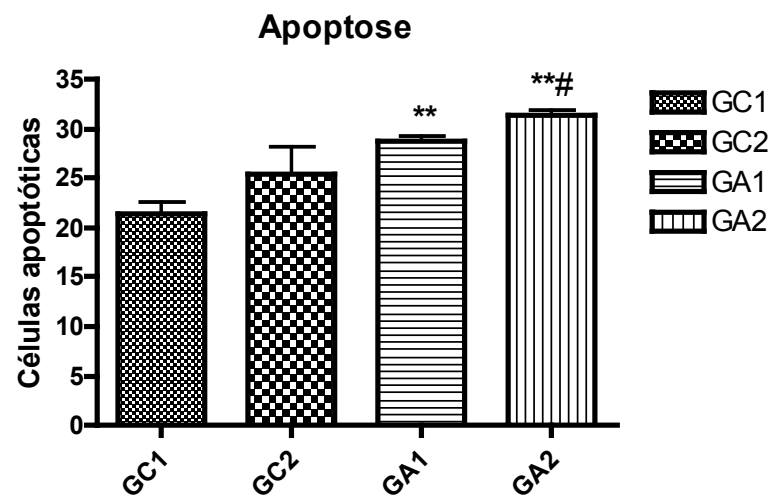


Figura 29– Quantidade média de células apoptóticas na camada molecular do córtex cerebelar de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais analisados. Dados expressos em média, n=6 por grupo, **=p<0,01, em relação a GC1 e #=p<0,05, em relação a GC2.

5 DISCUSSÃO

Desde tempos remotos, quando a espécie humana começou a fazer uso das técnicas de metalurgia, a produção de metais pesados aumentou significativamente, e seus efeitos tóxicos vêm causando problemas tanto para seres humanos como para o meio ambiente. Esses metais, resultantes da industrialização e urbanização, afetam a qualidade das águas e solos e conseqüentemente da vida das espécies animais e vegetais. O chumbo é uma toxina letal comprovadamente carcinogênica, teratogênica e tóxica para os diversos sistemas orgânicos (EPA, 2001). Animais submetidos experimentalmente ao chumbo têm exibido sensibilidade de toxicidade ao metal, similar à de crianças a ele expostas, manifestando inclusive alterações de comportamento (LASLEY; GILBERT, 2000).

O desenvolvimento normal do sistema nervoso resulta da concomitante e coordenada ocorrência dos processos de proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, gliogênese, mielinização e apoptose. Fatores intrínsecos ou extrínsecos, de natureza diversa, podem interferir nesses processos, afetando irreversivelmente a estrutura e a função do sistema nervoso (BARONE et al., 2000).

O incremento do peso de indivíduos expostos ao chumbo vem sendo utilizado como um parâmetro de comparação dos índices de toxicidade e vulnerabilidade induzidos pelo metal (CORREA et al., 2004). Nossos resultados em relação ao ganho de peso corporal mostraram que tanto a manipulação dos ovos de *Gallus domesticus* (GC2) quanto a exposição embrionária ao acetato de chumbo nas doses utilizadas (GA1 e GA2) alterou o peso dos indivíduos, evidenciando que, diferentes fatores podem agir provocando nos embriões a mesma alteração. Desta maneira, torna-se complexo definir qual o fator ou fatores, intrínsecos ou extrínsecos, responsável por tal alteração. O peso ao nascer não diferiu entre os grupos, o que pode estar relacionado ao fato de que o tamanho e o peso médio de todos os ovos utilizados no estudo era similar e que, ao longo dos 21 dias de incubação, as reservas nutricionais e energéticas da vesícula vitelínica viabilizaram o crescimento

dos pintos. Já no segundo dia de vida os grupos que sofreram alguma interferência externa apresentaram redução de peso. Essa redução pode estar relacionada ao fato de que os pintos não costumam comer nos primeiros dias de vida (GONZALEZ, 1994), razão pela qual o alimento foi ofertado apenas em D2, após ter sido efetuada a pesagem dos indivíduos. Essa redução inicial do peso é notada em outras espécies, como em humanos, já que os bebês costumam ter uma diminuição do peso nos primeiros dias de vida. A partir de D3 os grupos foram recuperando gradativamente o peso, e ao final do estudo (D6 e D7) esse parâmetro apresentou-se equivalente entre os grupos, apesar de GA1 ter demorado mais tempo para recuperar o peso e seus indivíduos apresentarem menor peso que os demais em todos os dias. Os estudos realizados por Sanín e colaboradores (2001), em bebês alimentados com leite materno e com índices elevados de chumbo no sangue ($10\mu\text{g}/\text{dL}$), revelaram que a exposição pós-natal ao chumbo reduz em 16% o ganho de peso no primeiro mês de vida. Mello e colaboradores (1998) não verificaram diferença no ganho de peso corporal de ratos expostos ao chumbo no período pré-natal e analisados no primeiro mês de vida. Entretanto, Antonio e Leret (2000) relatam que o peso ao nascer de ratos cujas mães foram expostas ao chumbo não diferiu dos controles, porém de D6 a D12 o peso dos controles foi significativamente maior. Em ratos expostos ao chumbo no período pós-natal, Nehru e Sidhu (2001) mostram que houve redução duradoura do peso corporal, ainda notada oito semanas depois da exposição. Em diversas linhagens de camundongos adultos injetados com acetato de chumbo de forma aguda e intensiva, ocorreu redução do peso até uma semana depois da exposição (CORREA et al., 2004). De maneira geral, os experimentos mostram que o chumbo compromete em algum momento o ganho de peso pós-natal e, conseqüentemente, o crescimento dos indivíduos. Contudo, acreditamos que as informações relativas ao peso corporal de indivíduos expostos ao chumbo não devam ser analisadas isoladamente e sim em conjunto com outros parâmetros, como suas características morfológicas e comportamentais.

Estudos em laboratório e no ambiente natural vêm descrevendo os efeitos que a intoxicação pelo chumbo provoca em aves marinhas, tendo sido constatado que baixos níveis desse metal afetam o crescimento, locomoção, equilíbrio, termorregulação e alimentação (BURGER; GOCHFELD, 1995; 2000). Além disso, em estudos moleculares foi constatado que o chumbo altera a expressão das

moléculas de adesão celular (CAM's), as quais têm papel fundamental na formação e maturação dos neurônios no SN em desenvolvimento (DEY et al., 1999; 2000).

Ferguson e Bowman (1990) demonstraram déficit de habituação no campo aberto em macacos tratados com chumbo, evidenciado pelo aumento da duração de atividade e exploração do ambiente e maior latência para entrar no campo aberto. Ratos expostos ao chumbo no período perinatal (pré e pós-natal), assim como os expostos no início do período pós-natal, apresentaram déficit no comportamento exploratório e na atividade motora (REDDY et al., 2003; LUTHMAN et al., 1992) e tiveram sua locomoção e funções cognitivas afetadas, com melhora após um período de recuperação (NEHRU; SIDHU, 2001). Resultado semelhante foi relatado por Correa e colaboradores (2004) onde 48 horas após a administração do chumbo, camundongos Swiss apresentaram redução da locomoção espontânea, porém sete dias após a injeção a locomoção teve recuperação.

Heiblum e colaboradores (1998) realizaram estudo sobre as respostas da galinha doméstica no campo aberto na primeira semana de vida. Comparando indivíduos-controle com indivíduos que haviam sido expostos a um fator estressante (confinamento em local pequeno com água), perceberam que a latência diminuiu no decorrer da semana nos indivíduos-controle, enquanto nos indivíduos submetidos ao estresse a menor latência ocorreu em D1. Em relação ao número de cruzamentos, os indivíduos-controle não mostraram alteração durante os dias da primeira semana, e os estressados tiveram aumento de cruzamentos a partir de D2, retornando ao valor de D1 apenas em D7 (HEIBLUM et al., 1998).

Em nosso estudo, a observação das respostas comportamentais realizadas pelos indivíduos dos grupos experimentais nos testes de campo aberto padrão e após um período de imobilização mostrou que, de maneira geral, os indivíduos dos grupos-controle (GC1 e GC2) apresentaram período de latência menor e índices maiores nas categorias ativas, como cruzamentos, movimentos cefálicos, de asa e de locomoção; também apresentaram índices menores nas categorias inatividade e movimentos anômalos, quando comparados aos indivíduos dos grupos expostos ao chumbo. Os indivíduos expostos a menor dose de acetato de chumbo (18,75µg) mostraram-se mais comprometidos que os expostos a maior dose (37,5µg), já que os valores deste último grupo se aproximaram mais dos valores dos grupos-controle. Como a ambulação (andar, correr, saltar), mensurada através da contagem do

número de cruzamento de setores realizado pelo animal, pode ser considerada tanto locomoção e atividade quanto exploração do ambiente (Nahas, 1999), constatamos que os indicadores de ambulação utilizados em nossos experimentos demonstraram que os indivíduos dos grupos expostos ao metal apresentaram menor atividade locomotora geral e menor atividade exploratória.

A exposição de embriões de *Gallus domesticus* ao carbamato (FARAGE-ELAWAR, 1990) no quinto e décimo quinto dia embrionários igualmente afetou a locomoção, o que foi percebido até o D47, mostrando alterações de longa duração. Estudos do mesmo grupo com o “carbaril” e “aldicrab” em embriões e indivíduos jovens demonstram alterações persistentes na locomoção (FARAGE-ELAWAR, 1988; 1989, FARAGE-ELAWAR; BLAKER, 1992).

Em codornas tratadas com testosterona *in ovo* e testadas no campo aberto no terceiro e sétimo dias de vida, Daisley e colaboradores (2004) relataram que o número de cruzamentos em D3 foi maior que em D7 e que a latência para deixar o quadrado central foi maior nos indivíduos expostos. A categoria cruzamento, que também foi mensurada, não foi diferente entre os grupos. Os mesmos indivíduos foram testados, a partir de D10, em relação a novos objetos, e percebeu-se o efeito do tratamento na latência para sair do quadrado central, porém os indivíduos expostos iniciaram a exploração antes dos controles, e os pintos reagiram diferentemente em relação aos três novos objetos apresentados (DAISLEY et al., 2004). Em nosso experimento, o chumbo demonstrou efeito contrário ao da testosterona, já que os grupos expostos ao metal apresentaram aumento da latência. Entretanto, em relação ao tempo de contato com os diferentes estímulos, percebemos que, igualmente ao citado no estudo anterior, os indivíduos exploraram os quatro estímulos de maneira diferenciada, e que os grupos-controle estiveram em contato com os estímulos por mais tempo que os grupos tratados.

No teste CA-D, o maior tempo despendido pelos indivíduos de GC1 para alcançar a plataforma central com comida pode estar relacionado ao fato de os animais apresentarem-se saciados e não se sentirem atraídos pelo estímulo “comida”, permanecendo assim mais tempo explorando o aparelho antes de subir na plataforma. Notamos no teste anterior (CA-C) que esse grupo obteve os menores índices de contato com o estímulo comedouro.

O comportamento de alternar espontâneo vem sendo utilizado com diversas finalidades em estudos de comportamento (YADIN et al., 1999, KIM et al., 2004). Em ratos injetados com quimpirole percebeu-se diminuição do comportamento de alternância espontânea, pois os animais sensibilizados se dirigiram ao mesmo braço em todas as tentativas consecutivas, enquanto os animais-controle entraram no segundo braço do labirinto em T nas segunda ou terceira tentativas (EINAT; SZECHTMAN, 1995), enquanto ratos tratados com ephrin-A5-IgC mostraram índices elevados do comportamento de alternância espontânea quando comparados aos controles (GERLAI, 2001). Estudos de Mello e colaboradores (1998) mostraram uma maior percentagem de animais que não apresentaram o comportamento de alternância espontânea no grupo de ratos expostos ao chumbo no período pré-natal. Embora o tempo para apresentar o comportamento de alternância espontânea tenha sido menor nos indivíduos GC2, nosso experimento não demonstrou diferenças quanto à porcentagem de animais que apresentaram tal comportamento entre os grupos experimentais, sugerindo que o chumbo parece não afetar esse comportamento nos pintos expostos ao chumbo nas doses utilizadas. Em pintos de dois dias de idade, Marín e colaboradores (1997) demonstraram que o tratamento com baixas doses de diazepam melhorou a performance no labirinto em T, pois a droga ansiolítica reduz o medo associado a novos ambientes, porém não altera os comportamentos no campo aberto. Doses maiores da droga reduziram o cruzamento e aumentaram a latência, demonstrando um efeito ansiolítico do diazepam (MARIN et al., 1997). Tal experimento é um indicativo de que o teste realizado no labirinto em T percebe interferências no medo, já que os indivíduos expostos à droga ansiolítica apresentaram mais vezes o comportamento de alternância espontânea, sugerindo que o chumbo possivelmente não atua no processo neurocomportamental do medo, já que não encontramos diferenças entre os grupos no comportamento de alternância espontânea.

O cerebelo parece modular os níveis de atividade geral, pois danos de diversas causas no cerebelo em desenvolvimento podem resultar em problemas relacionados à coordenação motora (BORTOLAZZI et al., 1999). A intoxicação por diversas substâncias como etanol (LIGHT et al., 2001), mercúrio (DEY et al., 1999) e chumbo (ANTONIO; LERET, 2000) comprovadamente alteram diversos processos bioquímicos e moleculares relativos ao cerebelo. Essa interferência se reflete na

morfologia e/ou fisiologia desse órgão e no comportamento dos indivíduos expostos a tais substâncias (LERET et al., 2003).

A organização bem definida do córtex cerebelar numa rede de fibras paralelas, com o arranjo espacial das células de Purkinje dispostas em intervalos regulares, está diretamente relacionada às funções desempenhadas pelo cerebelo (BUTLER; HODOS, 1996). A diminuição do espaço entre as células de Purkinje, visualizada nas técnicas histológicas empregadas e comprovada pelo aumento da quantidade dessas células na contagem estereológica nos grupos expostos ao chumbo, comprova a interferência desse metal na organização morfológica do cerebelo em desenvolvimento, conseqüentemente alterando sua fisiologia e o comportamento dos pintos. As células granulares do cerebelo são provavelmente a população celular mais densamente concentrada. Devido a grande densidade celular característico e à conseqüente coloração escura e evidente do corpo das células granulares, as regiões da camada granular onde se encontram os dendritos parecem pequenas ilhas de tecido não corado – denominadas glomérulos – quando submetidas a técnicas de coloração, como violeta de cresila (BUTLER; HODOS, 1996). Nos indivíduos dos grupos-controle apresentaram-se as características acima descritas, porém nos grupos expostos ao chumbo percebemos uma alteração da distribuição dos neurônios granulares, que se mostraram bastantes sobrepostos. Em nosso estudo a observação das lâminas nas diferentes colorações, bem como as análises quantitativas dos tipos celulares no cerebelo sugerem que a exposição ao chumbo alterou a distribuição das células nas diferentes camadas do cerebelo assim como a disposição e o espaçamento entre elas.

Alterações na morfologia das células nervosas provocadas pelo chumbo foram descritas no cerebelo e hipocampo. Patrick e Anderson (2000) observaram alteração nos dendritos das células de Purkinje do cerebelo de gatos expostos ao chumbo no período pós-natal. Estudos de microscopia eletrônica do hipocampo de ratos expostos ao chumbo da primeira semana de vida até o terceiro mês (SELVIN-TESTA, 1991) evidenciaram modificações ultraestruturais, como contorno irregular e citoplasma escuro e condensado nos neurônios não piramidais das células granulares e cesta e, ao mesmo tempo, os astrócitos mostraram incremento de gliofilamentos. As alterações histológicas não foram acompanhadas por sinais externos de toxicidade e não podem ser atribuídas a desnutrição, já que o

desenvolvimento e o ganho de peso dos animais tratados foram similares aos dos respectivos controles. Esses achados sugerem que a atividade funcional desses neurônios pode ter sido modificada pelas alterações observadas, que parecem ser um substrato morfológico para os déficits neurofisiológicos súbitos de ratos cronicamente expostos a baixas concentrações de chumbo. O experimento acima, com exposição pós-natal em ratos, poderia ser realizado em pintos expostos no período embrionário, pois algumas populações celulares do SN de mamíferos só se formam ou completam seu desenvolvimento no período pós-natal, como é o caso do hipocampo e cerebelo. Porém, nas aves, o cerebelo já está praticamente maduro ao nascer, e a exposição embrionária provavelmente poderia causar todas essas mudanças morfológicas percebidas ao microscópio eletrônico, as quais demonstram interferência nos contatos sinápticos e na interação neurônio-glia, ou seja, alterações na fisiologia, que podem vir a repercutir no comportamento característico dos pintos jovens e adultos.

Durante o desenvolvimento fetal ou embrionário dos vertebrados, muitas populações de células nervosas sofrem um período de morte celular natural, durante o qual de 40% a 70% dos neurônios pós-mitóticos degeneram e morrem. A morte celular neuronal parece servir a várias funções adaptativas, incluindo: remover neurônios redundantes ou neurônios com funções transientes, estabelecer a circuitaria neuronal, o modelamento morfogenético, eliminar fenótipos celulares aberrantes, oportunizar o surgimento de neurônios na região-específica (OPPENHEIM, 1991). A apoptose é uma forma morfológica específica de morte celular observada em alguns neurônios durante o desenvolvimento e na vida adulta após lesão ou dano metabólico (HOUENOU; OPPENHEIM, 1994).

Em estudo sobre a ocorrência natural de morte neuronal durante o desenvolvimento da oliva inferior em embriões de *Gallus domesticus*, López-Román e Armengol (1996) encontraram um reduzido número de células apoptóticas em E14, um aumento considerável entre E16 e E20 e poucas ou nenhuma célula apoptótica na oliva inferior do pinto recém-eclodido, demonstrando que a apoptose é um processo normal. Tal processo, inerente a qualquer tecido, é um componente fundamental do desenvolvimento embrionário e da homeostase no adulto (YAGINUMA et al., 2001). Simonati e colaboradores (1997) relatam que a exposição a agentes tóxicos nos períodos críticos do desenvolvimento pode modificar o

equilíbrio dos sinais neurotróficos que regulam a apoptose, causando aumento ou diminuição de número de células em determinadas regiões do sistema nervoso. Experimentos com cultura primária de neurônios de telencéfalo de *Gallus domesticus* em E7 demonstraram que o número de células apoptóticas aumentou para 60% com o tratamento com estaurosporina, comparados aos 15% presentes nos controles (AHLEMEYER; KRIEGLSTEIN, 1998), e para 30% com privação do soro, comparados aos 9% nos controles (AHLEMEYER et al., 1999). A neurotoxicidade do acetato de chumbo foi referida por Niu e colaboradores (2002), como repercutindo no sistema nervoso como um todo, podendo induzir apoptose em células cerebrais de ratos. Chen et al (2004b) expuseram cultura primária de neurônios hipocampais de embriões de ratos ao chumbo e perceberam que os prejuízos causados pelo chumbo estão em parte relacionados com a apoptose induzida pelo metal. Sharifi e colaboradores (2002) verificaram que o chumbo induz a apoptose em hipocampo de ratos de maneira idade dependente, observando que os indivíduos mais jovens apresentavam células apoptóticas em maior quantidade tanto nos animais-controle quanto nos tratados. Estudos realizados com embriões de *Gallus domesticus* expostos ao acetato de chumbo relatam resultados similares, pois as duas concentrações utilizadas, 150 μ g e 450 μ g, induziram apoptose quando injetados em E3, porém o mesmo não ocorreu nos embriões tratados em E5 (SCHATZ, 2003). Nossos dados sugerem que a exposição ao acetato de chumbo no quinto dia embrionário de *Gallus domesticus* induz a apoptose, e que ela ocorre de maneira dose dependente. Nos grupos expostos ao metal, o índice de neurônios em apoptose na camada molecular do cerebelo foi maior do que nos grupos-controle, e na dose de 37,5 μ g o número de neurônios apresentando núcleo segmentado ou fragmentado em vários estágios de degeneração, característico de células apoptóticas, foi maior do que na dose 18,75 μ g. O efeito dose dependente do zinco foi relatado em pesquisas realizadas por Manev e colaboradores (1997) em culturas de neurônios granulares cerebelares expostos durante 15 a 30 minutos a diversas concentrações de zinco (100 a 500 μ M), demonstrando que 6 horas após a exposição à maior concentração houve um aumento no número de células com sinais de danos no DNA, indicativo de apoptose.

Abdel-Rahman e colaboradores (2002) verificaram que a exposição aguda de ratos ao organofosforado sarin, que, como o chumbo, aumenta a permeabilidade da

barreira hematoencefálica, induz alterações neuropatológicas, inclusive no cerebelo, pois a observação das camadas corticais cerebelares coradas com HE evidenciaram um grande número de neurônios de Purkinje em degeneração. Srivastava e Vernadakis (1995), analisando culturas de células granulares do cerebelo de embriões de galinha que foram expostos ao etanol, perceberam que essa substância retarda a diferenciação, atrasando a maturação e acelerando a morte neuronal normal. A observação do cerebelo de ratos expostos ao chumbo para evidenciação da acetilcolinesterase demonstrou diminuição considerável do número de células da camada granular (REDDY et al., 2003).

A respeito dos locais onde o chumbo preferencialmente se deposita no SNC, Rehman (1984) verificou que, em ratos, a exposição ao acetato de chumbo provocava uma impregnação em todas as regiões do encéfalo, com uma marcação acentuada na medula e cerebelo. Estudos do encéfalo de ratos expostos a baixos níveis de chumbo no período embrionário por Villeda-Hernandez e colaboradores (2001) indicaram que o chumbo permaneceu altamente concentrado em todas as áreas examinadas (córtex, estriado, tálamo, hipocampo e cerebelo), apresentando pequenas diferenças regionais. Os autores comentam que os estudos sobre a localização do chumbo no SNC foram insuficientemente refinados para determinar se a exposição ao chumbo resulta em acumulação específica dentro de uma região definida ou em tipos celulares. Como o chumbo em pequenas doses afeta a função da barreira hematoencefálica, torna-se difícil precisar se a distribuição do chumbo dentro do SNC reflete a vascularização relativa das diferentes regiões ou retenção específica do órgão em si. Entretanto, estudos com culturas de células gliais de rato (LEGARE et al., 1998; GARBER; HEIMAN, 2002) mostram que o chumbo parece se acumular preferencialmente nesse tipo celular no SNC. Estudos prévios de nosso laboratório com embriões de *Gallus domesticus* expostos ao chumbo confirmam essa preferência, já que no telencéfalo o metal se impregnou entre as células gliais corticais (CARVALHO, 2002), e na medula as regiões de maior intensidade de impregnação pelo acetato de chumbo foram nas células endimárias que revestem o canal medular e nas células gliais das camadas do manto e marginal (SCHATZ, 2003). No cerebelo pode-se perceber que os locais de intensa impregnação do acetato de chumbo correspondiam aos locais com poucos corpos celulares e rico em fibras nervosas e nas células gliais das camadas do córtex cerebelar, já que pouco

se evidenciou do metal nos corpos dos neurônios granulares e de Purkinje. A grande deposição do metal pode estar relacionada ao fato de que, em aves, a barreira hematoencefálica torna-se efetiva apenas no 10º dia de incubação (RISAU; WOLBURG, 1990). Como a aplicação de acetato de chumbo na vesícula vitelínica de nossos embriões ocorreu no 5º dia, ou seja, cinco dias antes da efetivação deste processo, no momento da exposição os embriões apresentavam uma proteção hematoencefálica deficiente, o que permitiu facilmente a passagem do metal para dentro do SNC.

Nossos resultados demonstraram que *Gallus domesticus*, nos estágios precoces de desenvolvimento embrionário, são suscetíveis à exposição ao acetato de chumbo, sugerindo que a administração *in ovo* de agentes externos nessa espécie é um modelo biológico adequado e efetivo para determinar o efeito da toxicidade de metais, agentes químicos e biológicos no processo da embriogênese em um período de curta duração. O acetato de chumbo, nas doses utilizadas, provou ser capaz de alterar o desenvolvimento embrionário normal – interferindo nos mecanismos de morfogênese do cerebelo e no comportamento normal da espécie, podendo ser caracterizado como um agente teratogênico multipotente. Nossos resultados alertam para a necessidade de haver uma maior conscientização a respeito do uso e da liberação desse metal no meio ambiente.

É necessário salientar que o modelo biológico utilizado é muito sensível, sujeito a erros no desenvolvimento, e que o modo pelo qual o ovo é transportado até o laboratório, o seu manuseio, incluindo a abertura da casca e as condições da incubadora, são situações que podem causar alterações em todo o processo de desenvolvimento. Um grande esforço foi efetuado na tentativa de neutralizar essas variáveis, principiando pela obtenção dos ovos em uma empresa com elevado controle de qualidade (Macedo, Koerich/SA). Porém algumas peculiaridades encontradas ao final da análise dos resultados podem ser explicadas através da variabilidade individual intraespecífica.

O estudo histológico do cerebelo dos embriões logo após a exposição ao chumbo, nas mesmas doses utilizadas ou não, bem como a utilização de outras técnicas capazes de verificar a apoptose em todas as camadas do cerebelo nos embriões e indivíduos jovens contribuiriam para elucidar as alterações morfológicas encontradas. Os dados referentes ao comportamento poderiam ser comparados aos efeitos em outros dias ou aos de outras substâncias administradas nos embriões de *Gallus domesticus*.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, A.; SHETTY, K.; ABOU-DONIA, M. B. Acute exposure to sarin increases blood brain barrier permeability and induces neuropathological changes in the rat brain: dose-response relationships. **Neuroscience** 113 (1):721-741, 2002.

ADHAMI, M., HUSAIN, R. & SETH, P. K. Influence of iron and lead treatment on behavior and cerebellar and hippocampal polyamine levels in neonatal rats. **Neurochemical Research**, 21 (8): 915-922, 1996.

AHLEMEYER, B., KRIEGLSTEIN, J. Retinoic acid reduces staurosporine-induced apoptotic damage in chick embryo neurons by suppressing reactive oxygen species production. **Neuroscience Letters**, 246: 93-96, 1998.

AHLEMEYER, B., GLASER, A., SCHAPER, C., SEMKOVAI, K. J. The 5-HT_{1A} receptor agonist BayX3702 inhibits apoptosis induced by serum deprivation in cultured neurons. **European Journal of Pharmacology**, 370: 211-216, 1999.

AKHONDZADEH, S. Hippocampal synaptic plasticity and cognition. **Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics**, 24: 241-248, 1999.

ALFANO, D.P. & PETIT, T. L. Behavioral effects of postnatal lead exposure. Possible relationship to hippocampal dysfunction. **Behavioral and Neural Biology**, 32: 319-333, 1981.

AL-SALEH, I.A.S. The biochemical and clinical consequences of lead poisoning. **Medical Research Review**, 14: 415-486, 1994.

ALTMANN, L., SVEINSSON, K. & WIEGAND, H. Long-term potentiation in rat hippocampal slices is impaired following acute lead perfusion. **Neuroscience Letters**, 128: 109-112, 1991.

ALTMANN, L., WEINSBERG, F., SVEINSSON, K., LILIENTHAL, H., WIEGAND, H. & WINNEKE, G. Impairment of long term potentiation and learning following chronic lead exposure. **Toxicology Letters**, 66: 105-112, 1993.

ANTONIO, M. T., LÓPEZ, N., LERET, M. L. Pb and Cd poisoning during development alters cerebellar and striatal function in rats. **Toxicology**, 176(1-2);59-66, 2002.

ANTONIO, M. T., LERET, M. L. Study of the neurochemical alterations produced in discrete brain areas by perinatal low-level lead exposure. **Life Sciences**, 67:635-642, 2000.

ANWER, J. ALI, S., MEHOTRA, N. K. Antagonistic effect of zinc in lead treated developing chick embryos. **Drug Chemical Toxicology**, 11 (1): 85-95, 1988.

AREY, L. B. **Developmental Anatomy: a text book and laboratory manula of embriology**. Philadelphia: W.B. Saunders company. 1974. 695p.

BARONE, S., DAS, K.P., LASSITER, T.L., WHITE, L. D. Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods. **Neurotoxicology**, 21: 15-36. 2000.

BARRET, J. & LIVESEY, P.J. Low level lead effects on activity under varying stress conditions in the developing rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 22: 107-118, 1985.

BEÇAK, W. & PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976.

BERGER, A. J. **Bird Study: systematics**. New York: Dover, 1971. 104p

BORTOLAZZI, A. A., DUFFARD, R. O., DUFFARD, A. M. E. **Behavioral Alterations Induced in Rats by a Pre- and Postnatal Exposure to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid**. *Neurotoxicology and Teratology* , 21(4): 451-465, 1999.

BRESSLER, J., KIM, K., CHAKRABORNI, T. & GOLDSTEIN, G. Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. **Neurochemical Research**, 4: 595-600, 1999.

BURGER J., GOCHFELD M. Effects of varying temporal exposure to lead on behavioral development in herring gull (*Larus argentatus*) chicks. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 52(3):601-608,1995.

BURGER J., GOCHFELD M. Effects of lead on birds (Laridae): a review of laboratory and field studies. **Journal Toxicology Environmental Health Critical Reviews**. 2000;3(2):59-78.

BUTLER, A. B., HODOS, W. **Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaptation**. New York: Wiley-Liss, 1996. 10ed. 514p.

CARVALHO, M.S.L. **Efeitos do Acetato de Chumbo no desenvolvimento de embriões de gallus domesticus, com ênfase na Morfologia e organização das células Microgliais do telencéfalo**. 2002. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CHEN J., ZHU, W. G., CHEN, Q. S., LU, L., CHEN, X. M. [Studies on the effects of lead on the growth and differentiation of hippocampal neural cells as well as the expression of Oct-2]. **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi**, 38(3):151-154, 2004a. Abstract.

CHEN J., ZHU, W. G., CHEN, Q. S., LU, L.. [Effects of lead on the Brn-3a expression and the apoptosis in hippocampus neurons]. **Wei Sheng Yan Jiu**, 33(2):134-139. 2004b. Abstract.

COLE, G. J., LEE, J. Immunocytochemical localization of a novel glial intermediate filament protein. **Developmental Brain Research**, 101(1-2): 225-238, 1997.

CORREA, M., ROIG-NAVARRO, A. F. and ARAGON C. M. G. Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. **Life Sciences**, 74 (16): 2009-2021, 2004.

DAISLEY, J. N., BROMUNDT, V., MÖSTL, E., KOTRSCAL, K. Enhanced yolk testosterone influences behavioral phenotype independent of sex in japanese quail chicks *Coturnix japonica*. **Hormones and Behavior**, XX:XX-XX, 2004. Article in press, Available on-line.

DANSCHER, G. Histochemical demonstration of heavy metals: A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. **Histochemistry**, 71: 1-16, 1981.

DANSCHER, G. Autometallography: A new technique for light microscopy visualization of metals in biological tissue (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). **Histochemistry**, 81: 331-335, 1984.

DEARTH, R. K., HINEY, J. K., SRIVASTAVA, V., BURDICK, S. B., BRATTON, G. R., DEES, W. L. Effects of lead (Pb) exposure during gestation and lactation on female pubertal development in the rat. **Reproductive Toxicology**, 16: 343-352, 2002.

DEY, P. M.; GOCHFELD, M. & REUHL, K. R. Developmental methylmercury administration alters cerebellar PSA–NCAM expression and Golgi sialyltransferase activity. **Brain Research**, 845(2): 139-151, 1999.

DEY, P. M.; BURGER, J.; GOCHFELD, M. & REUHL, K. R. Developmental lead exposure disturbs expression of synaptic neural cell adhesion molecules in herring gull brains. **Toxicology** 146: 137-147, 2000.

DIAS, P.F. **Estudo da ação de fatores físicos e químicos sobre a morfogênese de embriões de *Gallus gallus domesticus*, com ênfase no desenvolvimento do sistema nervoso central**. 1996. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DIAS, P.F., MÜLLER, Y.M.R. Ação da insulina na morfogênese de embriões de *Gallus gallus domesticus*. **Revista Brasileira de Biologia**, 59 (2): 343-350, 1999.

EINAT, H., & SZECHTMAN, H. Perseveration without hyperlocomotion in a spontaneous alteration task in rats sensitized to the dopamine agonist quinpirole. **Physiology and Behavior**, 57:55-59, 1995.

EL-SOKKARY, G. H., KAMEL, E. S., REITER, R. J. Prophylactic effect of melatonin in reducing lead-induced neurotoxicity in the rat. **Cellular & Molecular Biology Letters**. 8 (2003), 461-470.

FAGUNDES, A. J. F. **Descrição, definição e registro de comportamento**. 12ed. São Paulo: Edicon, 1998. 126p.

FARAGE-ELAWAR M. Toxicity of aldicarb in young chicks. **Neurotoxicology and teratology**. 1988;10(6):549-554.

FARAGE-ELAWAR M. Enzyme and behavioral changes in young chicks as a result of carbaryl treatment . **Journal Toxicology Environ. Health**. 1989;26(1):119-131.

FARAGE-ELAWAR M. Effects of in ovo injection of carbamates on chick embryo hatchability, esterase enzyme activity and locomotion of chicks. **Journal Applied Toxicology**, 1990;10(3):197-201.

FARAGE-ELAWAR M., BLAKER, W. D. Chick embryo exposure to carbamates alters neurochemical parameters and behavior . **Journal Applied Toxicology**, 1992;12(6):421-426.

FERGUNSON, S. A. & BOWMAN, R. E. Effects of postnatal lead exposure on open field behavior in monkeys. **Neurotoxicology and Teratology**, 12:91-97, 1990.

FINKELSTEIN, Y., MARKOWITZ, M. E., ROSEU, J. F. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. **Brain Research Reviews**, 27:168-176, 1998.

GARBER, M. M. & HEIMAN, A. S. The in vitro effects of Pb acetate on NO production by C6 glial cells. **Toxicology in Vitro**, 16 (5): 499-508, 2002

GARCIA, S. M. L.; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia**. Porto Alegre: Artmed, 2ed. 2001.

GERLAI, R. Eph receptors and neural plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**, 2(3): 205-209, 2001.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. Massachusetts: Sinauer, 2001. 749p.

GILBERT, M. E., MACK C. M. & LASLEY, S. M. Chronic developmental lead exposure increases threshold for long-term potentiation in the rat dentate gyrus *in vivo*. **Brain Research**, 736: 125-134, 1996.

GONZALES, E. Embriologia e Desenvolvimento Embrionário. In: APINCO. **Manejo da Incubação**. São Paulo, 1994.

GOULART, E. C., PEREIRA, C.A., GARCIA R. C., GIACOMELLI M. B. & RODRIGUES A. L. Effects of lead and/or zinc exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinatase and negative geotaxis of suckling rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34(6):785-90, 2001.

GUILARTE, T. R., MICELI, R.C. & JETT, D.A. Neurochemical aspects of hippocampal and cortical Pb²⁺ neurotoxicity. **Neurotoxicology**, 15:459-466, 1994.

HAMBURGER, V., HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, 88: 49-92, 1951.

HASKELL, M. J., FORKMAN, B., WADDINGTON, D. An investigation into the occurrence of SAB in the domestic hen. **Behavioural Processes**, 43:43-51, 1998

HEATON, M. B., BRADLEY, D. M. Ethanol influences on the chick embryo spinal cord motor system: analyses of motoneuron cell death, motility, and target trophic factor activity and in vitro analyses of neurotoxicity and trophic factor neuroprotection. **Journal of Neurobiology**, 26 (1), 1995.

HEIBLUM, R., AIZENSTEIN, O., GVARYAHU, G., VOET, H., ROBINZON, B., SNAPIR, N. Tonic immobility and open field responses in domestic fowl chicks during the first week of life. **Applied Animal Behaviour Science**, 60:347-357, 1998.

HOUILLON, C. **Embriologia**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1972. p. 63-80.

HOUENOU, L. J., OPPENHEIM, R. W. Motoneuron death during developmental, following injury and in neurological disease. **The Neuroscience**, 6: 283-289, 1994.

HUGHES, R. N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 28:497-505, 2004.

IGNÁCIO, A.R.A. **Estudo do prosencéfalo e de células microgliciais durante o desenvolvimento embrionário de Gallus gallus domesticus**. 1998. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

JACOBSON, M. **Developmental Neurobiology**. New York: Plenum Press. 1991. 782p.

JOHNSTON, M. V. & GOLDSTEIN, G. W. Selective vulnerability of the developing brain to lead. **Current Opinion in Neurology**, 11 (6):689-693, 1988.

JONES, R. B., MILLS, A. D. & FAURE, J-M. Genetic and experiential manipulation of fear-related behavior in japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*). **Journal of Comparative Psychology**, 105 (1): 15-24, 1991.

KIM, H.K.; KIM, M; KIM, S.; KIM, M.; CHUNG, J.H. Effects of green tea polyphenol on cognitive and acetylcholinesterase activities. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 68(9), 1977-1979, 2004.

LASLEY, S. M., GILBERT, M. E. Glutamatergic components underlying lead-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity. **Neurotoxicology**, 2000 Dec;21(6):1057-68.

LEGARE, M. E., BARHOUMI, R., HEBERT, E., BRATTON, G. R., BURGHARDT, R. C., TIFFANY-CASTIGLIONI, E. Analysis of Pb 2+ entry into cultured astroglia. **Toxicological Sciences**, 46: 90-1000, 1998.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2001. 698pp

LERET, M. L., SAN MILLÁN, J. A., ANTONIO, M. T. Perinatal exposure to Pb and Cd affects anxiety-like behaviour. **Toxicology**, 186(2003);125-130.

LIGHT, K. E., BROWN, D. P., NEWTON, B. W., BELCHER, S. M. and KANE, C. J. M. Ethanol-induced alterations of neurotrophin receptor expression on Purkinje cells in the neonatal rat cerebellum. **Brain Research**, 924(1): 71-81, 2001.

LOCEY, B.J., FURST, A. & RADDING, S. B. Lead. In: WEXLER, P. **Encyclopedia of Toxicology**. San Diego: Academic; 230-233. 1998.

LÓPEZ-ROMÁN, A. & ARMENGOL, J. A. Naturally occurring neuronal death during the development of the inferior olive in chick. **Neuroscience Research**, 26, 171-179, 1996.

LUTHMAN, J., OSKARSSON, A., OLSON, L. & HOFFER, B. Postnatal lead exposure affects motor skills and exploratory behavior in rats. **Environmental Research**, 58: 236-252, 1992.

MAGALDI, M.A. Construcciones manejo y alimentación. In: **Producción de Aves**. Ed. Cathebra, Argentina. 259-278. 1974.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. What is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The exemple of the stereology. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, 16 (2): 131-139, 1999.

MANEV, H., KHARLAMOV, E., MASON, P. R., CAGNOLI, C. M. Characterization of zinc-induced neuronal death in primary cultures of rat cerebellar granule cells. **Experimental Neurology**, 146:171-178, 1997

MARIN, R. H., MARTIJENA, I. D., ARCE, A. Effect of diazepam and A β -carboline on open-field and T-maze behaviors in 2-day-old chicks. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 58(4): 915-921, 1997.

MAZLIAH, J., BARRON, S., BENTAL, E., ROGOWSKI, Z., COLEMAN, R. & SILBERMANN, M. The effects of long-term lead intoxication on the nervous system of the chicken. **Neuroscience Letter**, 101(3): 253-257, 1989.

MEERLO, P., HORVATH, K. M., NAGY, G. M., BOHUS, B., KOOLHAAS, J. M. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. **Journal of Neuroendocrinology**, 11: 925-933, 1999.

MELLO, C. F., KRAEMER, C. K., FILIPPIN, A., MORSCH, V.M., RODRIGUES, A. L. S. & RUBIN M. A. Effect of lead on neurobehavioral development of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 31: 943-950, 1998.

MOREIRA, E. G., VASSILIEFF, I., VASSILIEFF, V. S. Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. **Neurotoxicology and Teratology**, 23: 489-498, 2001.

MOORE, K.L. & PERSAUD, T.V.N. 2004. **Embriologia Clínica**. Ed. Elsevier, Rio de Janeiro. 7^a Edição. 609p.

NAHAS, T. R. O Teste de campo aberto. In: XAVIER, G. F. **Técnicas para o estudo do Sistema Nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999.

NARBAITZ, R., MARINO, I., SARKAR, K. Lead-induced early lesions in the brain of the chick embryo. **Teratology**, 32:389-396, 1985.

NEHRU B., SIDHU P. Behavior and neurotoxic consequences of lead on rat brain followed by recovery. **Biol Trace Elem Res**, 2001;84(1-3):113-21

NIU, Y., ZHANG. R., CHENG. Y., SUN, X., TIAN, J. [Effect of lead acetate on the apoptosis and the expression of bcl-2 and bax genes in rat brain cells]. **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi**, 36 (1): 30-33, 2002. Abstract.

O'KEEFE & J. NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford: Oxford University Press, 1978. 570p.

ONISHI, B. K. A. Coloração de Nissl por Violeta de Cresila. In: XAVIER, G. F. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999.

OPPENHEIM, R. W. Cell death during development of nervous system. **Annual Review Neuroscience**, 14: 453-501, 1991.

PATRICK, G. W., ANDERSON, W. J. Dendritic alteration of cerebellar Purkinje neurons in postnatally lead-exposure kittens. **Developmental Neuroscience**, 22:320-328, 2000.

REDDY, G. R., BASHA, Md. R., DEVI, C. B., SURESH, A., BAKER, J. L., SHAFEEK, A., HEINZ, J., CHETTY, C. S. Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 21(6):347-352, 2003

REHMAN, U.S. Lead-induced regional lipid peroxidation in brain. **Toxicology Letters**. 21: 333-337, 1984.

RIES, L. G. K. **Efeitos de lesão no sistema nervoso central de embriões de Gallus gallus domesticus**. 1998 107p. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RISAU, W., WOLBURG, H. Development of the blood-brain barrier. **Trends in Neurosciency**, 13:174-178, 1990.

RIVERO, L. B. D., DALLANHOL, S., MÜLLER, Y. M. R. Observação do repertório comportamental de *Gallus domesticus* submetidos ao acetato de chumbo. Resumo aceito no Evento Avanços em Neurociências, apresentado como pôster em novembro, Fpolis-UFSC, 2003.

RIVERO, L. B. D., CARVALHO, S., DALLANHOL, S., MÜLLER, Y. M. R. Repertório comportamental de *Gallus domesticus* submetidos ao acetato de chumbo. Resumo aceito no Evento Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – Fesbe, apresentado como pôster em 25 a 28 de agosto, Águas de Lindóia, SP, Brasil, 2004.

RODRIGUES, A. L. S., RUBIN M. A., SOUZA, D. O. & MELLO, C. F. Lead exposure and latent learning ability of adult female rats. **Behavioral and Neural Biology**, 60: 274-279, 1993.

ROMBOLI, I., MORI, B., SALAMI, A. & FEDELI-AVANZI, C. Storage Condition and Hatchability in Muscovy Duck Eggs. Proceedings and Abstracts. **Finnish Branch of the World's Poultry Science Associated**, 1984, 218-219.

ROTHEMBERG, S. J., MANOLO, M., JIANG, J., KHAN, F., CUELLAR, R., REYES, S., SANCHES, M., REYNOSO, B., AGUILAR, A., DIAS, M., ACOSTA, S., JAUREGUI, M., JOHNSON, C. Maternal blood lead level during pregnancy in South Central Los Angeles. **Archives Environmental Health**, 54 (3): 151-7. 1999.

SANES, J.R. On the Republication of the Hamburger-Hamilton Stage Series. **Developmental Dynamics** 195: 229-230. 1992.

SANÍN, L. H.; GONZÁLEZ-COSSÍO, T.; ROMIEU, I.; PETERSON, K. E.; RUÍZ, S.; PALAZUELOS, E.; HERNÁNDEZ-AVILA, M.; HU, H. Effect of maternal lead burden on infant weight gain at one month of age among breastfed infants. **Pediatrics**, 2001; 107, 1016-1023.

SANTOS, A. M. G. dos. Histoquímica de metais pesados. Coloração de Timm. In: XAVIER, G. F. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999.

SCHATZ, J.C. **Caracterização morfológica de embriões de gallus domesticus, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula**. 2003. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHOENWOLF, G. C. The avian embryo: a model for descriptive and experimental embryology. In: MOODY, S. A. **Cell lineage and fate determination**. San Diego: Academic Press, 1999. 644p.

SELVIN-TESTA, A. Chronic lead exposure induces alterations on local circuit neurons. **Microscopic Electronic Biology Celular**;15(1):25-39, 1991

SHARIFI, A. M., BANIASADI, S., JORJANI, M., RAHIMI, F., BAKHSHAYESH, M. Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo. **Neuroscience Letters**, 329 (1): 45-48, 2002.

SIMONATI, A., ROSSO, T., RIZZUTO, N. DNA fragmentation in normal development of the human central nervous system: a morphological study during corticogenesis. **Neuropathology and Applied Neurobiology**. 23: 203-211, 1997.

SRIVASTAVA, N. & VERNADAKIS, A. Maturation of cerebellar granule cells is delayed in cultures derived from ethanol-treated chick embryo: survival and proliferation studies. **International Journal of Development and Neuroscience**, 13 (6): 529-537, 1995.

<<http://www.thalamus.wustl.edu/course/cerebell.html>> por Diana Weedman Molavi. Acesso em 25 ago. 2004.

U.S. EPA Environmental Protection Agency. **Alternative technologies for surface finishing: clear technologies for printed wiring board manufacturers**. 2001. Disponível em <http://www.epa.gov/dfe/pubs/pwb/tech_rep/Surface_Finishing.pdf> Acesso em 23 jul. 2004.

VERMA, R. S., BABU, A. **Human chromosomes: principles and techniques**, 2ed. New-York: McGraw-Hill, 1995.

VILLEDA-HERNANDEZ, J., BARROSO-MOGUEL, R., MENDEZ-ARMENTA M., NAVA-RUIZ C., HUERTA-ROMERO R. AND RIOS C. Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. **Brain Research Bulletin**, 55: 247-251, 2001.

VODELA, J. K.; LENZ, S. D.; RENDEN, J. A.; MCELHENNEY, W. H. & KEMPPAINEN, B. W. Drinking water contaminants (arsenic, cadmium, lead, benzene and trichloroethylene). 2. Effects on reproductive performance, egg quality, and embryo toxicity in broiler breeders. **Poultry Science**, 76: 1493-1500, 1997.

WALKER, R. F., GUERREIRO, F. J., TOSCANO, T. V. & WEIDEMAN, C. A. Relative cerebellar weight: a potential indicator of developmental neurotoxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, 11: 251-255, 1989.

WEBSTER, A. B. & HURNIK, J. F. Open-field assessment of behavioral phenotype within genetic stocks of the White Leghorn chicken. **Applied Animal Behaviour Science**, 27: 115-126, 1990.

WOLPERT, L. et al. **Principles of development**. NY: Oxford University Press. 1998.

YADIN, E., FRIDMAN, E. & BRIDGER, W. H. Spontaneous alternation behavior: an model for obsessive-compulsive disorder? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 40: 311-315, 1991.

YAGINUMA H., SHIRAIWA, N., SHIMADA, T., NISHIYAMA, K., HONG, J., WANG, S., MOMOI, T., UCHIYAMA, Y., OPPENHEIM, R. W. Caspase activity is involved in, but is dispensable for early motoneuron death in chick embryo cervical spinal cord. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 18: 168-182, 2001.

ZAREMBSKI, P. M., GRIFFITHS, P. D., WALKER, J., GOODALL, H. B. Lead in neonates and mothers. **Clinica Chimica Acta**, 134:35-49, 1983.