

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

EFEITOS NEUROTÓXICOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL
AO METILMERCÚRIO EM *Gallus domesticus*

MÁRCIA CRISTINA DE CARVALHO

FLORIANÓPOLIS, ABRIL DE 2007.
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

EFEITOS NEUROTÓXICOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL
AO METILMERCÚRIO EM *Gallus domesticus*

MÁRCIA CRISTINA DE CARVALHO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção de Grau de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Rauh Müller.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Farina.

FLORIANÓPOLIS, ABRIL DE 2007.

*Aprender é descobrir o que já se sabe.
Praticar é demonstrar o que se sabe.
Ensinar é lembrar aos outros que
eles sabem tanto quanto você.
Todos são alunos, praticantes, professores.*

Richard Bach

Aos Meus Pais, Nicolau e Maria de Lourdes, pelo exemplo, amor, carinho, dedicação e pelos valores instituídos durante minha educação, os quais foram muito importantes e serviram como incentivo para alcançar mais este objetivo.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Dr^a Yara Maria Rauh Müller, por possibilitar a realização desta importante etapa na minha formação, pelo aprendizado, experiência, conhecimentos, orientações, exemplo profissional e pessoal.

Ao Professor Dr. Marcelo Farina, pelas orientações, por seu entusiasmo, brilhante sabedoria e garra.

À Professora Evelise, grande amiga, pela colaboração, companheirismo, incentivo, ajuda e escuta.

À Lilianna, pelo incentivo e por me mostrar como funcionava um laboratório de pesquisa.

Ao Dib e a Patrícia, pelo companheirismo e por solucionar muitas dúvidas na realização dos experimentos.

À Karoline e Lízia, pelo companheirismo, amizade, troca de conhecimentos, convivência e alegria.

À Heloisa, pela ajuda nas filmagens e testes, por seu entusiasmo, apoio e amizade.

À Francielle, Kauê e Evandro, pelo carinho e incentivo.

Ao Nivaldo, por sua constante dedicação e alegria com que sempre me atendeu.

Aos meus colegas de trabalho na FURB e ETS de Blumenau, pela compreensão e incentivo.

A todos os meus amigos pelo interesse, apoio e compreensão de meu afastamento.

À empresa de Frangos Macedo pela doação do material biológico para este estudo.

Principalmente aos meus pais, minhas irmãs Tibúrcia, Ana, Stella, meu irmão Marcos e meu primo Márcio, por todo amor, carinho, dedicação e pela história de vida que compartilhamos.

A Deus sempre.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÃO.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Modelo Animal Experimental.....	12
3.2 Grupos Experimentais	13
3.3 Procedimentos com os Pintos Jovens.....	17
3.3.1 Sexagem e Análises da Morfologia Externa e Peso Corporal.....	17
3.3.2 Análise do Comportamento.....	18
3.3.3 Testes Comportamentais.....	20
3.4 Procedimentos Histológicos.....	24
3.4.1 Verificação da Deposição do Metilmercúrio.....	26
3.4.2 Morfometria do Tecido Cerebelar.....	27
3.5 Determinações Bioquímicas.....	27

3.6 Análise Estatística.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1 Sobrevivência dos Embriões e Pintos.....	30
4.2 Análise da Morfologia Externa dos Pintos	31
4.3 Análise do Peso Corporal, Encefálico e Cerebelar	33
4.4 Análise do Repertório Comportamental	34
4.5 Análise dos Testes Comportamentais	43
4.5.1 Comportamento Exploratório em Campo Aberto.....	43
4.5.2 Comportamento de Alternância Espontânea	48
4.6 Caracterização Histológica do Encéfalo: Mesencéfalo e Cerebelo	50
4.6.1 Análise dos Locais de Deposição do Metilmercúrio	51
4.6.2 Morfometria do Córtex Cerebelar	55
4.7 Resultados Bioquímicos	57
4.7.1 Níveis de Glutathiona (GSH)	57
4.7.2 Atividade da Enzima Glutathiona Redutase (GR)	58
4.7.3 Atividade da Enzima Glutathiona Peroxidase (GPx)	59
5. DISCUSSÃO	60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

A. Figuras

Figura 1 - Desenho esquemático do embrião de galinha doméstica no 4 ^o dia embrionário.....	07
Figura 2 - Desenho esquemático do cerebelo e mesencéfalo.....	09
Figura 3 - Esquema do ovo e do embrião de <i>Gallus domesticus</i>	12
Figura 4 - Desenho esquemático dos procedimentos de abertura do ovo.....	14
Figura 5 - Vista lateral do embrião de <i>Gallus domesticus</i>	16
Figura 6 - Caixa-ninho para acomodação dos pintos de <i>Gallus domesticus</i>	18
Figura 7 - Modelos de campo aberto utilizados para estudo de <i>Gallus domesticus</i>	22
Figura 8 - Modelos de labirinto em “T” utilizados para estudo de <i>Gallus domesticus</i>	23
Figura 9 - Esquema utilizado para caracterização dos locais de deposição do metilmercúrio.....	26
Figura 10 - Registro da sobrevivência dos embriões e pintos de <i>Gallus domesticus</i>	31
Figura 11 - Morfologia externa de <i>Gallus domesticus</i> no DPN1.....	32
Figura 12 - Avaliação do peso corporal dos pintos de <i>Gallus domesticus</i>	33
Figura 13 - Avaliação do peso do encéfalo e do cerebelo dos pintos de <i>Gallus domesticus</i>	34

Figura 14 - Freqüência de movimentos de cabeça e pescoço.....	37
Figura 15 - Freqüência de movimentos exploratórios.....	38
Figura 16 - Freqüência dos comportamentos de interação social.....	39
Figura 17 - Freqüência dos comportamentos de autolimpeza.....	40
Figura 18 - Freqüência de movimentos de asas.....	41
Figura 19 - Freqüência de inatividade.....	42
Figura 20 - Freqüência de movimentos anômalos.....	43
Figura 21 -Tempo de latência em campo aberto com estímulo.....	46
Figura 22 - Secções sagitais do mesencéfalo e cerebelo de <i>Gallus domesticus</i> . HE e violeta de cresila.....	52
Figura 23 - Secções sagitais do mesencéfalo, região cortical e medular do cerebelo de <i>Gallus domesticus</i> . Autometalografia de Timm.....	53
Figura 24 - Esquemas indicando a deposição de metilmercúrio no mesencéfalo e cerebelo em <i>Gallus domesticus</i>	54
Figura 25 - Secções sagitais das camadas do córtex cerebelar de <i>Gallus domesticus</i> . Violeta de Cresila.....	56
Figura 26 - Secções sagitais da camada de células de Purkinje de <i>Gallus domesticus</i> . Violeta de Cresila.....	56
Figura 27 - Níveis de glutatona cerebelar e encefálica em <i>Gallus domesticus</i>	58
Figura 28 - Atividade da glutatona redutase cerebelar e encefálica em <i>Gallus domesticus</i>	58
Figura 29 - Atividade da glutatona peroxidase cerebelar e encefálica em <i>Gallus domesticus</i>	59

B. Tabelas

Tabela 1 - Frequência absoluta dos comportamentos de <i>Gallus domesticus</i> do 1 ^o ao 5 ^o dia pós-natal.....	35
Tabela 2 - Frequência média dos comportamentos de <i>Gallus domesticus</i> 1 ^o ao 5 ^o dia pós-natal.....	36
Tabela 3 - Categorias comportamentais observadas no campo aberto padrão.....	44
Tabela 4 - Categorias comportamentais observadas no campo aberto com imobilização prévia.....	45
Tabela 5 - Campo aberto com estímulo em plataforma elevada.....	47
Tabela 6 - Alternância espontânea no labirinto em “T”.....	48
Tabela 7 - Alternância espontânea no labirinto em “T” com estímulo luminoso.....	49
Tabela 8 - Impregnação do Metilmercúrio no mesencéfalo e no cerebelo de pintos de <i>Gallus domesticus</i>	54
Tabela 9 - Morfometria das camadas corticais do cerebelo de <i>Gallus domesticus</i>	55
Tabela 10 - Caracterização da camada das células de Purkinje do cerebelo de <i>Gallus domesticus</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC	Aqueduto cerebral
AV	Artéria vitelínica
BI	Bulbo
Cd	Cauda
CG	Camada granular
CH ₃ Hg	Metilmercúrio
CI	Colículo inferior
CM	Camada molecular
Co	Coração
Cr	Cerebelo
CP	Células de Purkinje
CS	Colículo superior
Di	Diencéfalo
DPN0	Dia da eclosão
DPN1	Primeiro dia pós-natal
DPN2	Segundo dia pós-natal
DPN3	Terceiro dia pós-natal
DPN4	Quarto dia pós-natal

DPN5	Quinto dia pós-natal
DPN1 - 5	Primeiro ao quinto dia pós-natal
E3	Terceiro dia embrionário
E5	Quinto dia embrionário
E8	Oitavo dia embrionário
E8 -14	Oitavo ao décimo quarto dia embrionário
E15 - 21	Décimo quinto ao vigésimo primeiro dia embrionário
GPx	Enzima glutaciona peroxidase
GR	Enzima glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSSG	Glutaciona oxidada
HE	Hematoxilina e eosina
HH	Estágio embrionário postulado por Hamburger & Hamilton
MDA	Malondialdeído
ME	Medula espinal
MeHg	Metilmercúrio
MI	Broto do membro inferior
MS	Broto do membro superior
Mt	Metencéfalo
Ms	Mesencéfalo
PC	Pedúnculo cerebral

Pr	Prosencéfalo
Pt	Ponte
QV	IV ventrículo
Rb	Rombencéfalo
RM	Região medular
SB	Substância branca
So	Somitos
SN	Sistema nervoso
SNC	Sistema nervoso central
SV	Saco vitelínico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico
t-BOOH	Peróxido tert-butila
Te	Telencéfalo
Tg	Tegmento
TV	III ventrículo
VLD	Ventrículo lateral direito
VLE	Ventrículo lateral esquerdo
VO	Vesícula óptica

RESUMO

Neste estudo foram investigados os efeitos da exposição ao metilmercúrio administrado *in ovo* de *Gallus domesticus* no E5, sobre parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos do sistema nervoso central. Foram utilizados embriões, divididos igualmente em dois grupos experimentais, grupo tratado com metilmercúrio (0,1 µg diluídos em 0,05 ml de solução salina) e grupo controle. Os embriões e pintos foram acompanhados em ambiente experimental desde o E5 até DPN5. Foi analisada a sobrevivência dos embriões e pintos, bem como os erros de desenvolvimento dos neonatos. Desde a eclosão ao DPN5 foram registrados o ganho de peso, o repertório comportamental, além da realização de testes comportamentais em campo aberto e no labirinto em "T" no DPN1 e DPN5. O mesencéfalo e o cerebelo dos pintos foram estudados através de técnicas de microscopia de luz, para a descrição da morfologia, da deposição do metilmercúrio e da morfometria da camada de Purkinje. O grupo tratado com metilmercúrio apresentou menor peso em todos os dias de observação, no repertório comportamental se evidenciou menor frequência dos movimentos exploratórios e maior frequência da inatividade e movimentos anômalos. Os testes realizados no campo aberto mostraram que os pintos expostos ao metilmercúrio apresentaram menor atividade exploratória. Em relação ao comportamento de alternância espontânea realizada no labirinto em T, percebeu-se que o grupo tratado apresentou maior tempo de latência e um menor número de pintos realizou a tarefa. A análise histológica revelou alterações na morfologia dos neurônios do tegmento no mesencéfalo, nas regiões cortical e medular do cerebelo, onde também se observou a deposição do metal. A análise bioquímica revelou o aumento significativo nos níveis de glutathione no encéfalo e cerebelo dos pintos do grupo tratado com metilmercúrio, bem como na atividade das enzimas glutathione redutase em ambas as estruturas e glutathione peroxidase no encéfalo. Nossos resultados mostraram que *Gallus domesticus*, são suscetíveis à exposição *in ovo* ao metilmercúrio, o qual é capaz de alterar o desenvolvimento normal, interferindo na organização morfológica/estrutural e bioquímica do mesencéfalo e cerebelo, bem como no comportamento normal da espécie.

Palavras-chave: Metilmercúrio, *Gallus domesticus*, cerebelo, mesencéfalo, comportamento, morfologia, glutathione.

ABSTRACT

In this study the effects of the exposition to the methylmercury administered in egg of *Gallus domesticus* in the E5, on behavioral, morphological and biochemical parameters of the central nervous system were investigated. Embryos were divided equally in two experimental groups, the methylmercury treated group (0, 1 µg diluted in 0, 05 ml of saline solution) and the control group. The embryos and young chickens were monitored in experimental environment since the E5 until DPN5. The embryos and young chickens survival was analyzed, as well as the developmental disorders of the neonates. Since the hatched until DPN5 were registered the weight gain, the behavioral repertoire, beyond the accomplishment of behaviors tests in open field and in T- maze in DPN1 and DPN5. The mesencephalon and the cerebellum of the young chickens were studied with light microscopy techniques, for the description of the morphology, methylmercury deposition and the Purkinje layer morphometry. The methylmercury treated group presented minor weight in every observation days. The behavioral repertoire revealed minor frequency of the exploratory movements and greater frequency of the inactivity and anomalous movements. The tests in open field showed that the young chickens exposed to the methylmercury presented minor exploratory activity. Regarding the behavior in spontaneous alternation in T-maze it was observed that the treated group presented greater time latency and a minor number of young chickens performed the task. The histological analysis showed alterations in the morphology of the neurons in mesencephalon tegmento, in the cortical and medullar cerebellum regions, which also the metal deposition was observed. The biochemistry analysis disclosed to the significant increase in the levels of glutathione in encephalon and cerebellum of the young chickens of the methylmercury treated group, as well as in the activity of enzymes glutathione reductase in both the structures and glutathione peroxidase in encephalon. Our results showed that *Gallus domesticus* are susceptible to the in egg exposition to methylmercury, which is capable to modify the normal development, intervening in the morphological/structural organization and biochemistry of mesencephalon and cerebellum, as well as in the normal behavior of the species.

Keywords: Methylmercury, *Gallus domesticus*, cerebellum, mesencephalon, behavior, morphology, glutathione.

1. INTRODUÇÃO

A presença na natureza de substâncias tóxicas como o mercúrio é uma das questões contemporâneas que merece atenção, devido os graves prejuízos causados aos organismos vivos e ao meio ambiente (GOCHFELD, 2003).

O mercúrio é encontrado no meio ambiente na forma elementar (Hg^0), ou iônica como Hg^{1+} ou Hg^{2+} , de sais de mercúrio inorgânico e de mercúrio orgânico (LIN & PEHKONEN, 1999). A principal fonte natural deste metal é a desgaseificação da crosta terrestre, e, como fonte antropogênica, destacam-se entre outras, as queimadas, vacinas, alguns tipos de termômetros e tintas, produção de ouro, queima de combustíveis fósseis, incineração de resíduos urbanos e hospitalares, equipamentos elétricos e eletrônicos, pesticidas e fungicidas (CLARKSON, 1997; BISINOTI & JARDIM, 2004).

O metabolismo e a toxicidade do mercúrio são basicamente dependentes da sua forma química. As inorgânicas são liberadas no meio ambiente, podendo ser biotransformadas em metilmercúrio (CH_3Hg), através das algas e bactérias,

apresentando capacidade de bioacumulação na cadeia alimentar aquática, razão de preocupação da emissão do mercúrio no ambiente (CLARKSON *et al.*, 2003).

A principal forma de exposição humana ao metilmercúrio (MeHg) é através da dieta alimentar, principalmente pelo consumo de peixes, frutos do mar e derivados. Apesar de não apresentar função estrutural e nutricional, esse metal pesado é absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal e ao atingir a corrente sanguínea é distribuído, em cerca de 30 horas, a todos os tecidos. No organismo, o metilmercúrio forma um complexo molecular intracelular, devido à afinidade com o composto sulfidril (SH) presente principalmente no aminoácido cisteína. Apresenta meia-vida de 70-80 dias, sendo metabolizado em mercúrio inorgânico e sua eliminação ocorre principalmente através do trato urinário e digestório e ainda via leite materno (CLARKSON, 2002; BISINOTI & JARDIM, 2004). Cerca de 5% do metilmercúrio que não foi eliminado é acumulado na corrente sanguínea, 10% estão distribuídos no sistema nervoso (CLARKSON, 2002), podendo acumular-se também em outros órgãos como rins e fígado (BAATRUP & DANSCHER, 1987). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990), em estudos populacionais, um dos indicadores da exposição crônica do acúmulo do metilmercúrio é através da análise de cabelos e unhas.

O acúmulo do metilmercúrio no sistema nervoso promove danos neurológicos tanto em humanos quanto em animais (CLARKSON *et al.*, 2003). Estudos evidenciam a neurotoxicidade deste metal através de alterações celulares e teciduais (WAKABAYASHI, *et al.*, 1995; SAKAMOTO, *et al.*, 2002; BERTOSSI *et al.*, 2004), do estresse oxidativo (Ou *et al.*, 1999; GARG & CHANG, 2005), do desequilíbrio da homeostasia do cálcio intracelular (ASCHNER, 1998; SIROIS & ATCHISON, 2000; EDWARDS *et al.*, 2005), da alteração da homeostasia do

glutamato (ASCHNER, *et al.*, 2000; DANBOLT, 2001; FARINA *et al.*, 2003a, b), bem como de mudanças comportamentais em animais (KIM, *et al.*, 2000; DORÉ, *et al.*, 2001; GOULET, *et al.*, 2003) e em humanos (GRANDJEAN, *et al.*, 1997; DAVIDSON, *et al.*, 2004).

Estudos *in vitro* têm mostrado que a glutathiona endógena (GSH), principal composto sulfidril intracelular, é responsável pela proteção dos efeitos neurotóxicos do metilmercúrio (SHANKER *et al.*, 2004). FARINA e colaboradores (2005a) em estudo com camundongos após exposição oral ao metilmercúrio, observaram alterações das atividades das enzimas glutathiona redutase (GR) e glutathiona peroxidase (GPx), envolvidas no metabolismo da GSH, no córtex cerebral e cerebelar.

O sistema nervoso é sensível ao metilmercúrio, principalmente durante o período pré-natal e pós-natal inicial, devido à aceleração na síntese de RNA, DNA e mielina (GOTLIEBB *et al.*, 1977; CHANG, 1977) e intensa gliogênese, sendo os astrócitos o tipo celular que mais acumula metilmercúrio (ASCHNER, 1996; 1998; 2000). No estudo de BERTOSSI e colaboradores (2004) com embriões de galinha doméstica, a exposição ao metilmercúrio acarretou a ausência perivascular de astrócitos, levando a um atraso na maturação dos microvasos cerebelares, comprometendo assim a barreira hematoencefálica.

A severidade dos danos envolvidos na neurotoxicidade do metilmercúrio está relacionada a várias condições como o tempo de exposição, a dosagem empregada, a espécie animal e o período de exposição (pré e/ou pós-natal) (WAKABAYASHI, *et al.*, 1995; KAKITA *et al.*, 2000a,b; DORÉ *et al.*, 2001; BERTOSSI *et al.*, 2004).

Em estudos de lesões decorrentes da ação do metilmercúrio no SNC em ratos neonatos, jovens e adultos, WAKABAYASHI e colaboradores (1995), observaram lesões com diferentes padrões e em diferentes regiões, como no córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, núcleo vermelho e medula espinal. Neuropatologias relacionadas à exposição ao metilmercúrio, têm sido descritas em humanos (WHO, 1990; GRANDJEAN, *et al.*, 1997; CHANG & GUO, 1998; GUALLAR *et al.*, 2002; DAVIDSON *et al.*, 2004; AUGER, *et al.*, 2005) e em animais de laboratórios (SAKAMOTO *et al.*, 1993; SCHIONNING & DANSCHER, 1999; KIM *et al.*, 2000; DORÉ *et al.*, 2001; DIETRICH *et al.*, 2005).

Os danos neurocomportamentais provocados pela exposição de animais ao metilmercúrio, geralmente são verificados submetendo-os as tarefas para avaliação da atividade locomotora, coordenação motora, comportamento exploratório, aprendizagem e memória, (KIM *et al.*, 2000; DORÉ *et al.*, 2001; SAKAMOTO *et al.*, 2002; DIETRICH, *et al.*, 2005; STRINGARI, *et al.*, 2006; FRANCO *et al.*, 2006 a, b). Esses estudos revelaram que o comportamento realizado pelos animais depende, além das condições relacionadas à neurotoxicidade, do tipo de tarefa comportamental estudada e da idade do animal quando submetido ao estudo comportamental.

De acordo com KIM e colaboradores (2000), a análise do comportamento pode ser realizada através de dois ambientes diferentes: um ambiente familiar, a caixa-ninho, que permite a expressão do comportamento espontâneo em ambiente natural, e, um ambiente não familiar, o campo aberto, onde a expressão do comportamento ocorre num ambiente novo, que reflete na exploração do ambiente e nas emoções relacionadas principalmente ao medo e estresse. O teste de campo aberto vem sendo aplicado em vários modelos animais, como em

codornas (JONES *et al.*, 1991), macacos (FERGUNSON & BOWMAN, 1990), ratos (RODRIGUES *et al.*, 1996) e camundongos (MANTOVANI *et al.*, 1999; FRANCO *et al.*, 2006 a, b).

O alternar espontâneo em labirinto em “T” tem sido utilizado para avaliar a aprendizagem e memória espacial e de acordo com DORÉ e colaboradores (2001), camundongos expostos ao metilmercúrio durante o período pré-natal necessitaram de mais tempo para alternar o braço no labirinto em “T” do que os animais do grupo controle, mostrando prejuízo na memória e na aprendizagem espacial destes animais.

Os estudos referentes ao metilmercúrio em sua grande maioria são relacionados com a sua ingestão, principalmente em fêmeas prenhas e lactentes roedores (SAKAMOTO *et al.*, 1993; MANFROI *et al.*, 2004). Tais estudos objetivam mimetizar a exposição humana, na qual gestantes expostas ambientalmente e/ou através da dieta ao metilmercúrio podem transferir este composto à prole via transplacentar ou lactacional.

Estudos comportamentais em laboratório e em ambiente natural dos efeitos da intoxicação em baixos níveis de chumbo em aves marinhas de BURGER & GOCHFELD (1994; 1995; 2000) foram utilizados como parâmetro no repertório comportamental dos animais utilizados em nossa pesquisa, visto serem escassos os registros de pesquisas da ação do metilmercúrio em embriões de galinha. Este modelo animal tem a vantagem de maior detalhamento e precisão a respeito das doses envolvidas na experimentação, o que não ocorre quando a droga é ingerida pelos animais. Por outro lado, a observação *in ovo* também possibilita correlações com o circuito do metilmercúrio em gestações humanas.

A neurotoxicidade do metilmercúrio pode ser avaliada precocemente, durante o desenvolvimento embrionário do sistema nervoso, a partir do surgimento da placa neural. Nos embriões de *Gallus domesticus*, esta estrutura é evidente com 19 horas de incubação e com 26 horas é reconhecida a organização básica do tubo neural (AREY, 1974). Com 27- 28 horas de incubação, a porção anterior do tubo neural começa a se dilatar para formar o encéfalo e a porção posterior dará origem à medula espinal. Neste estágio de desenvolvimento, a porção anterior do tubo neural apresenta alargamentos nas paredes ventral e lateral, constituindo as vesículas encefálicas primordiais: o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo, observadas nos embriões de 33 - 38 horas de incubação. A condição de três vesículas é transitória, e com 96 horas de incubação, o prosencéfalo dá origem às vesículas telencefálicas e ao diencéfalo e o rombencéfalo origina o metencéfalo e o mielencéfalo (Figura 1A e 1B).

No quinto dia, as cinco vesículas encefálicas apresentam-se bem discerníveis e internamente são constituídas por uma cavidade central e por três camadas celulares (ventricular, do manto e marginal) (JACOBSON, 1991; GILBERT, 2001).

Com o subsequente desenvolvimento do embrião, as vesículas telencefálicas corresponderão aos hemisférios cerebrais e os ventrículos laterais (SCHOENWOLF, 1999). O diencéfalo estruturará o hipotálamo, tálamo, subtálamo, epitálamo e terceiro ventrículo. O mesencéfalo apresenta espessamento das paredes dorsal e ventral, porém não mostra especializações. O metencéfalo corresponderá ao cerebelo e à ponte. O mielencéfalo estruturará o

bulbo, e, para trás do mielencéfalo, o tubo neural continua cilíndrico, transformando-se gradativamente na medula espinal (Figura 1C) (LENT, 2001).

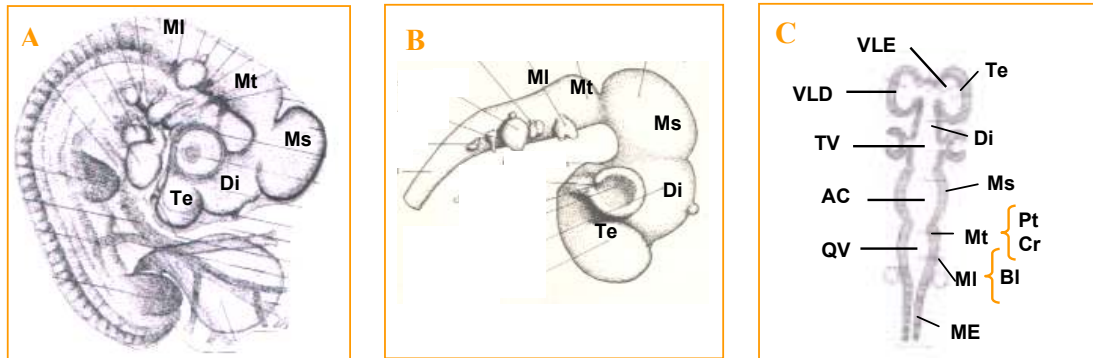


Figura 1 - Desenhos esquemáticos do embrião de galinha doméstica com 96 horas de incubação, destacando a organização das vesículas encefálicas. (A) Vista total lateral do embrião. (B) Vista lateral do encéfalo dissecado. (C) Esquema do encéfalo em vista frontal. Te = Telencéfalo, Di = Diencefalo, Ms = Mesencéfalo, Mt = Metencéfalo, MI = Mielencéfalo, AC = Aqueduto cerebral, Pt = Ponte, Cr = Cerebelo, BI = Bulbo, ME = Medula espinal, VLE = Ventriculo lateral esquerdo, VLD = Ventriculo lateral direito, TV = III ventriculo, QV = IV ventriculo (Modificado de PATTEN, 1951).

Nos estudos da neurotoxicidade do metilmercúrio, das estruturas do sistema nervoso central acima descrito, normalmente são avaliados o córtex motor, o córtex visual, o cerebelo, o hipocampo e a medula espinal (WAKABAYASHI, *et al.*, 1995; SAKAMOTO *et al.*, 1998; PEDERSEN *et al.*, 1999; BERTOSSI *et al.*, 2004). Isto se deve ao fato, dessas estruturas serem os principais alvos relacionados nas epidemias como as ocorridas em Minimata (1953-1965) e Niigata (1964-1965) (HARADA, 1978; WHO, 1990), acarretando danos motores e visuais observados clinicamente.

No presente estudo optamos pela abordagem do cerebelo, por ser um órgão alvo da ação do metilmercúrio normalmente analisado e estar relacionado à locomoção e coordenação motora; e do mesencéfalo, que embora sendo uma estrutura próxima e que se relaciona ao cerebelo, pouco tem sido explorado, bem

como, pelo fato de apresentar-se bastante evidenciado nos embriões de *Gallus domesticus* desde a formação das vesículas encefálicas primordiais e estar relacionado à função visual e auditiva.

No mesencéfalo a intensa proliferação e migração de neuroblastos e glioblastos, promovem o aumento da espessura das paredes (Figura 2A), estreitando sua cavidade, originando o aqueduto cerebral. Assim, na parede dorsal (teto) do mesencéfalo encontra-se o par de colículo superior que constitui o centro cerebral de reflexos visuais, e o par de colículo inferior que é o centro de reflexos auditivos. A parede ventral (assoalho) torna-se espessa originando os dois pedúnculos cerebrais, que por sua vez se dividem em uma região dorsal, o tegmento e a outra ventral, a principal rota de fibras dos tratos que conectam os hemisférios cerebrais com a parte posterior do cérebro e a medula espinal, denominada base do pedúnculo (Figura 2B) (BALINSKY, 1981).

No cerebelo as três camadas celulares (Figura 2C), através de proliferação e migração celular, vão constituir o córtex cerebelar (camada molecular, camada de células de Purkinje e camada granular) e região medular. O cerebelo é uma estrutura que se compacta e conseqüentemente apresenta circunvoluções típicas em cada espécie (FIGURA 2B) (JACOBSON, 1991; GILBERT, 2000). O estágio de desenvolvimento do cerebelo ao nascer está relacionado com a capacidade de locomoção e coordenação motora da espécie. Em aves, a análise do cerebelo após a eclosão, mostra que este se apresenta completamente desenvolvido e com capacidade de movimento coordenado (BUTLER & HODOS, 1996).

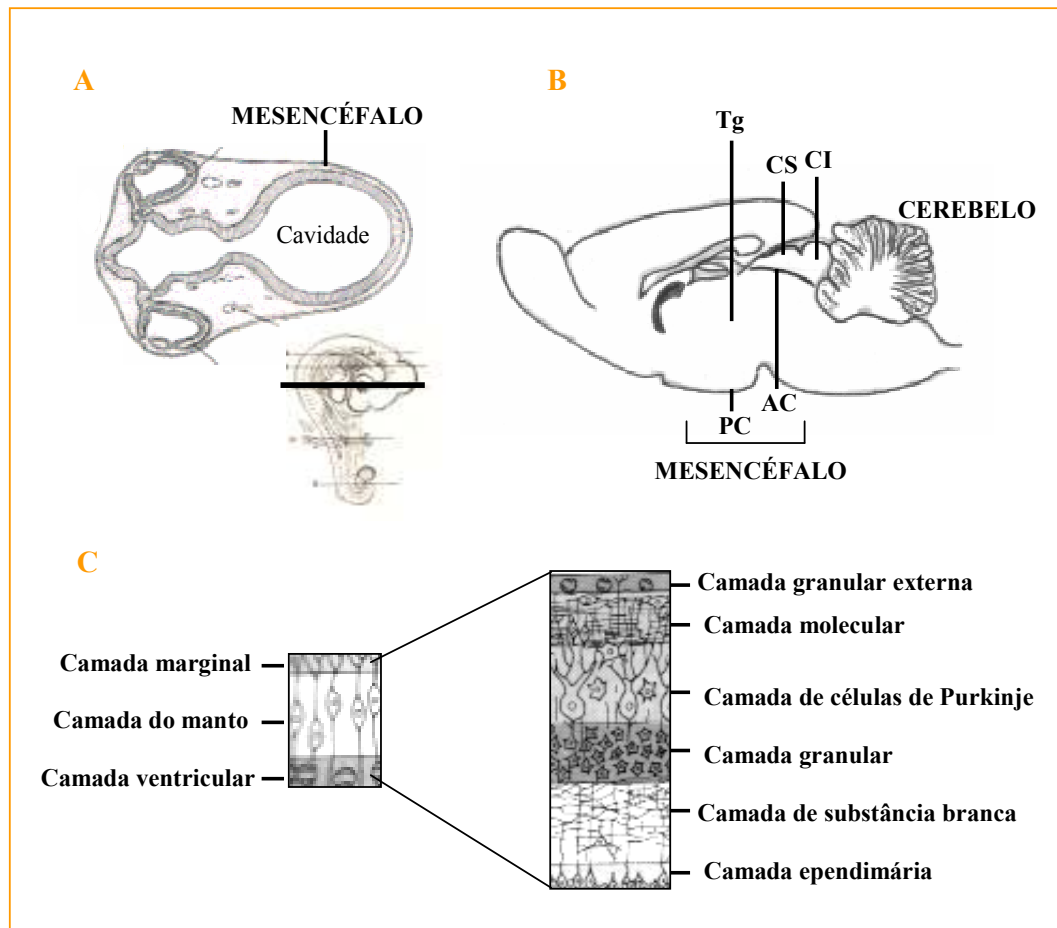


Figura 2 – Desenhos esquemáticos do cerebelo e do mesencéfalo. (A) Secção transversal das vesículas encefálicas do embrião de galinha com 72 horas de incubação (Modificado de PATTEN, 1951). (B) Secção sagital do encéfalo de ave no período pós-natal (Modificado de PIRLOT, 1976). (C) Esquema da organização das camadas do tubo neural (à esquerda) e sua diferenciação nas camadas do cerebelo (à direita) (Modificado de GILBERT, 2001). Tg = Tegmento, CS = Colículo superior, CI = Colículo Inferior, AC = Aqueduto cerebral, PC = Pedúnculo cerebral.

Na galinha doméstica, na primeira semana pós-natal, observa-se uma intensa atividade muscular e todos os sistemas orgânicos apresentam-se funcionais, exceto o sistema reprodutor, o que pode ser evidenciado em estudos como os de MARÍN e colaboradores (1997), que observaram o comportamento de pintos, no segundo dia pós-natal. Neste período os pintos apresentam um alto índice de metabolismo, o que promove um crescimento muito rápido e o aumento substancial do peso corporal (MAGALDI, 1974).

Pesquisas da ação do metilmercúrio em pintos jovens expostos ao metilmercúrio durante o período embrionário podem contribuir na elucidação dos danos provocados por este agente tóxico. Estudos relacionados aos efeitos neuromorfológicos de metais pesados como os desenvolvidos com acetato de chumbo durante a embriogênese (CARVALHO, 2002; SCHATZ, 2003; RIVERO, 2005; RIVERO, *et al.*, 2006) vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/BEG, utilizando a galinha doméstica como modelo animal. Tais estudos mostram que esse modelo experimental adapta-se muito bem às condições laboratoriais, permitindo acompanhar as transformações embrionárias, avaliar as características normais e as alterações provocadas pelos metais pesados.

Neste estudo submetemos embriões de galinha doméstica à injeção de metilmercúrio numa dosagem subletal acompanhando-os até a eclosão. Posteriormente através de análises comportamentais, estruturais e bioquímicas observamos se o metilmercúrio afetou e/ou comprometeu a sobrevivência, bem como os parâmetros estruturais e funcionais característicos da espécie.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Investigar os efeitos da exposição ao metilmercúrio no quinto dia embrionário em *Gallus domesticus* sobre variáveis funcionais/comportamentais e parâmetros morfológicos e bioquímicos do sistema nervoso central.

2.2 Objetivos Específicos:

- Analisar a sobrevivência dos embriões e pintos e caracterizar os erros de desenvolvimento nos neonatos;
- Avaliar o peso corporal desde a eclosão ao quinto dia pós-natal, bem como o peso encefálico e cerebelar no quinto dia pós-natal;
- Caracterizar o repertório comportamental do primeiro ao quinto dia pós-natal e os testes de campo aberto e alternância em labirinto em "T" no primeiro e no quinto dia pós-natal;
- Verificar a deposição do metilmercúrio no mesencéfalo e cerebelo, descrever a morfologia do mesencéfalo e cerebelo, bem como a morfometria da camada de Purkinje dos grupos experimentais no quinto dia pós-natal;
- Analisar os efeitos da exposição embrionária ao metilmercúrio, através de parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo em tecido cerebral e cerebelar no quinto dia pós-natal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo Animal Experimental

Neste estudo foram utilizados embriões e pintos da espécie *Gallus domesticus*, obtidos a partir da incubação de ovos fertilizados doados pela Empresa Macedo S/A - São José/SC. A amostra utilizada consiste de ovos homogêneos, de forma ovalada, coloração bege e peso médio de 67g.

Nas aves, a clivagem, a blastulação, a deposição do albúmen e das membranas da casca ocorrem no período da embriogênese inicial, que precede a postura do ovo (GILBERT, 2001) (Figura 3).

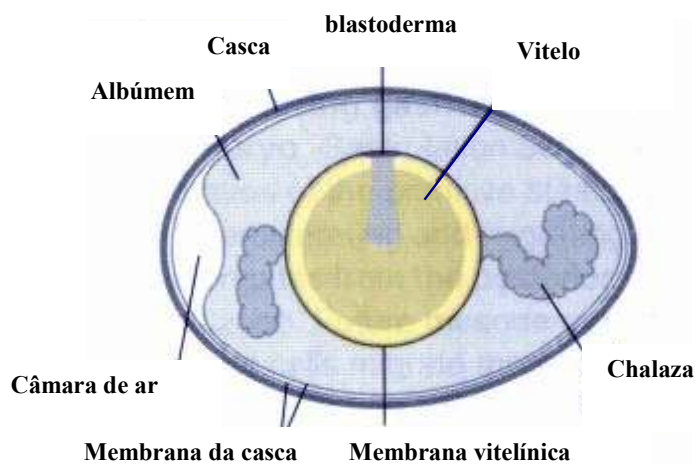


Figura 3 – Esquema do ovo e do embrião no estágio de blastoderma de *Gallus domesticus* (Modificado de WOLPERT *et al.*, 1998).

Após a postura a embriogênese terá continuidade em ambiente natural ou experimental se houver condições favoráveis, visto que a organização das estruturas embrionárias e conseqüentemente, o desenvolvimento do embrião dentro do ovo, são influenciados por características intrínsecas e extrínsecas, como condições e período de estocagem (MAGALDI, 1974; ROMBOLI *et al.*, 1984), temperatura (GONZALES, 1994; DIAS & MÜLLER, 1998), umidade da incubadora (GONZALES, 1994) e suprimento de oxigênio (MARQUES, 1986) que devem ser controladas durante toda a experimentação.

No presente estudo, utilizaram-se como procedimentos de incubação, ovos fertilizados ($n = 103$), higienizados com algodão, numerados, datados e pesados, e após, foram dispostos em posição horizontal na incubadora numa temperatura de 38°C e 65% de umidade atmosférica.

A embriogênese de *Gallus domesticus* foi caracterizada por HAMBURGER & HAMILTON (1951), em estágios (HH), relacionando a formação das estruturas com o respectivo tempo de desenvolvimento. Para a caracterização do desenvolvimento é usual considerar o período correspondente a cada 24 horas como dia embrionário (E), e após a eclosão como dia pós-natal (DPN).

Os procedimentos utilizados nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – UFSC, protocolo 254/CEUA e 23080/2003-15/UFSC.

3.2 Grupos experimentais

Os ovos fertilizados foram distribuídos em dois grupos: grupo tratado ($n = 84$) e grupo controle ($n = 19$). Do total de ovos incubados e eclodidos, mantiveram-se viáveis até o final dos experimentos (quinto dia pós-natal – DPN5) 14 pintos de cada grupo os quais foram considerados neste estudo:

- Grupo tratado - administração de 0,05 ml da solução de metilmercúrio (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dissolvido em salina), o equivalente a 0,1 μg por indivíduo;
- Grupo controle - sem intervenção (ovo intacto).

Ao atingir o estágio 20HH (70 - 72 horas) os ovos do grupo tratado foram retirados da incubadora na posição horizontal, e em ambiente asséptico, realizou-se um orifício na região da câmara de ar, utilizando-se um estilete de ponta rombóide, seguida de aspiração do albúmen (até 1,0 ml), com a finalidade de promover o descolamento da membrana interna na face mediana superior e conseqüentemente a descida do embrião. Na face superior do ovo, efetuou-se uma abertura com diâmetro aproximado de 1 cm, com auxílio de estilete de ponta fina e pinça, para observação do embrião e posteriormente administração do metilmercúrio, conforme mostram as Figuras 4A, 4B e 4C.



Figura 4 – (A) Desenho esquemático das aberturas no ovo na região da câmara de ar (→) e face superior (→). (B) Retirada do albúmem através da câmara de ar. (C) Detalhe da abertura na face superior do ovo.

O embrião no estágio 20 HH apresenta relativamente pouca vascularização extra-embriônica, o que permite a abertura do ovo sem prejuízo do desenvolvimento (Figura 5A). Uma vez analisada a viabilidade do embrião, a abertura foi vedada com fita adesiva plástica transparente e os ovos recolocados na incubadora na posição horizontal. No estágio 27 HH (E5), os ovos do grupo tratado foram retirados da estufa e após remoção da fita adesiva, foi injetada a solução de metilmercúrio, no saco vitelínico, próximo à artéria vitelínica, numa profundidade de até 1,0 mm com o auxílio de uma seringa e agulha hipodérmica ultrafina (8 mm x 0,30 mm) (TAKAMATSU & FUJITA, 1987). Neste estágio, as chances de eclosão e sobrevivência pós-eclosão são maiores devido à vascularização ser claramente visível e já serem reconhecíveis externamente as cinco vesículas encefálicas (DEWITT *et al.*, 2005) (Figura 5C).

Os ovos foram então, novamente selados com fita adesiva transparente e recolocados na incubadora, para prosseguimento do desenvolvimento embrionário. A sobrevivência e viabilidade dos embriões do grupo tratado com metilmercúrio foram analisadas *in vivo*, diariamente durante os 21 dias de incubação, levando-se em consideração as seguintes características:

- 1) Aspecto do saco vitelínico e da área vascular;
- 2) Vascularização extra e intra-embriônica;
- 3) Padrão de desenvolvimento das vesículas encefálicas, membros superiores e inferiores, botão caudal e estruturas faciais;
- 4) Contorno e pigmentação da vesícula óptica;
- 5) Movimentos do embrião;
- 6) Flexura cervical;
- 7) Batimento cardíaco.

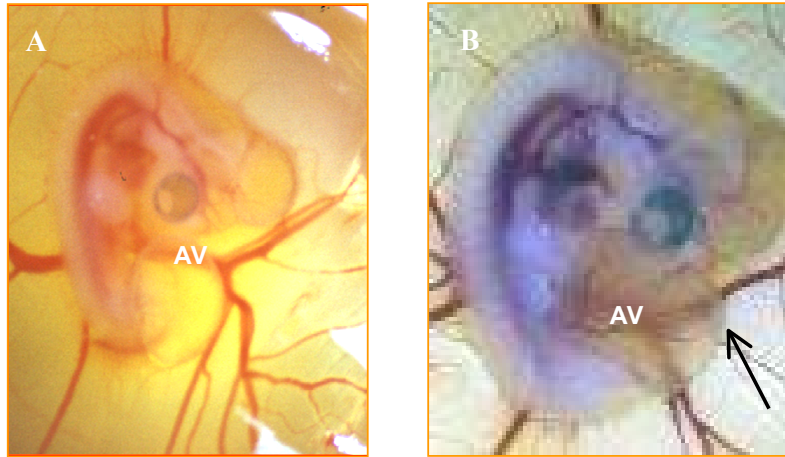


Figura 5 – Embriões de *Gallus domesticus* em vista lateral. (A e B) Fotografia *in ovo*. (A) Estágio 20 HH (momento de abertura do ovo). (B) Estágio 27 HH (momento da injeção). (→) Local de injeção da solução de metilmercúrio no saco vitelínico. AV= Artéria vitelínica.

Através da análise diária, os ovos que apresentaram interrupção do desenvolvimento embrionário foram removidos da incubadora. No grupo tratado, a sobrevivência dos embriões foi registrada diariamente e considerando que a droga foi administrada no quinto dia de incubação (E5), foi avaliada e registrada em períodos que correspondem a segunda semana de incubação (E8 - 14), na terceira semana de incubação (E15 - 21). No grupo controle, como o ovo permaneceu fechado durante toda a incubação, as perdas foram verificadas no dia previsto para eclosão (E21) realizando-se a abertura nos ovos intactos e estagiamento dos embriões (HH). Após a eclosão, ambos os grupos foram monitorados até DPN5 (DPN1 - 5).

3.3 Procedimentos com Pintos Jovens

3.3.1 Sexagem e Análises da Morfologia Externa e Peso Corporal

Logo após o nascimento (DPN0), foi verificado o sexo e realizadas as análises da morfologia externa e do peso corporal dos animais do grupo tratado e do grupo controle. A sexagem foi realizada verificando-se o padrão do comprimento das camadas das penas (canhão) das asas dos pintos recém eclodidos, onde os machos apresentam o mesmo comprimento e as fêmeas, comprimentos diferentes.

Na análise da morfologia externa, os pintos foram classificados de acordo com os seguintes critérios:

I - Padrão Normal:

- Características de desenvolvimento da espécie (tamanho; aspecto dos membros superiores, membros inferiores e estruturas faciais);
- Fechamento adequado da região torácica e abdominal;
- Vascularização subcutânea.

II - Alteração do Padrão Normal:

- Comprometimento de alguma das características anteriormente citadas.

O peso corporal dos pintos do grupo tratado e do grupo controle foi mensurado diariamente, desde o nascimento (DPN0) ao quinto dia pós-natal (DPN5), em balança digital (0,01 g), como parâmetro relevante da toxicidade do metilmercúrio no desenvolvimento desses animais.

3.3.2 Análise do Comportamento

Os animais foram mantidos em uma caixa-ninho de madeira (36x47x33cm) com capacidade para acompanhar simultaneamente até cinco pintos em condições de adequada oxigenação, onde permaneceram até o quinto dia pós-natal (DPN5). Durante todo o tempo foi ofertada ração supra-inicial para pintos e água *ad libidum*. Uma lâmpada incandescente de 40 Watts foi colocada a uma altura de 40 cm do chão da caixa-ninho para garantir a temperatura e claridade contínua do ambiente (Figura 6).



Figura 6 – Caixa-ninho para acomodação dos pintos de *Gallus domesticus* durante DPN1-5.

Os pintos dos grupos experimentais foram filmados do primeiro ao quinto dia pós-natal (DPN1 - 5), em fita VHS durante 10 minutos, na caixa-ninho, para análise qualitativa e quantitativa do comportamento. Baseados nos estudos com aves marinhas de BURGER & GOCHFELD (1994; 1995; 2000) e em estudos prévios realizados em nosso Laboratório sobre a caracterização do repertório comportamental de pintos na primeira semana de vida (RIVERO *et al.*, 2004), os comportamentos foram organizados em sete categorias (Quadro 1).

Quadro 1 – Descrição dos comportamentos integrantes das categorias comportamentais de pintos jovens, do primeiro ao quinto dia pós-natal (DPN1 - 5).

Categorias Comportamentais	Descrição
1. Movimentos de cabeça e pescoço	Virar, sacudir a cabeça e/ou esticar o pescoço.
2. Movimentos de asas	Abrir e/ou bater as asas.
3. Interação social	Contatos corporais e/ou bicar o outro.
4. Movimentos exploratórios	Bicar o chão e/ou parede, andar, correr, pular e/ou voar.
5. Autolimpeza	Bicar-se e/ou raspar o bico no chão.
6. Inatividade	Apoiar-se, sentar e/ou deitar.
7. Movimentos anômalos	Arrastar-se, cambalear e/ou cair.

As imagens foram analisadas por um observador e registradas por um anotador e efetuou-se o registro da frequência de cada categoria comportamental, para cada animal e para cada dia de filmagem (DPN1 - 5). Em seguida, calculou-se a média da frequência diária de cada categoria comportamental no grupo tratado com metilmercúrio e no grupo controle, durante os cinco dias de observação.

3.3.3 Testes Comportamentais

Individualmente, os pintos foram submetidos a testes de comportamento exploratório em campo aberto e de alternância em labirinto em “T”, em sessões de 5 minutos, no período matutino do DPN1 e do DPN5, para avaliação da atividade locomotora, exploratória e memória. A dose utilizada, o período de

exposição (pré e/ou pós-natal), a idade e a espécie animal estudada devem ser considerados em trabalhos relativos ao comportamento (BORNSCHEIN *et al.*, 1980; BURBACHER *et al.*, 1990; 2005).

1) Comportamento exploratório em campo aberto: Utilizado para medir a atividade exploratória (sendo a locomoção um dos parâmetros mais usados) e emocionalidade (o campo aberto *per se* é estressante) (KIM *et al.*, 2000; DORÉ *et al.*, 2001). Consiste numa caixa de madeira com frente de vidro (40 x 60 x 50 cm) e chão dividido em 25 quadrados iguais.

De acordo com NAHAS (1999), a atividade exploratória pode ser avaliada através da exposição do animal a alterações ambientais discretas e localizadas, introduzindo objetos novos no ambiente, onde o animal poderá exibir uma ampla variedade de respostas, como ataque, fuga, imobilização, manuseio e contato com o objeto. Nesse sentido realizamos quatro testes de campo aberto nos pintos dos grupos experimentais:

a) Teste de campo aberto padrão: Permitiu o registro do tempo de latência para sair do quadrado central, número de movimentos exploratórios (cruzamento e movimentos de cabeça e pescoço), quantidade de bolos fecais eliminados durante a tarefa e autolimpeza (Figura 7A).

b) Teste de campo aberto com imobilização prévia em caixa escura: No quadrado central do campo aberto, foi colocada uma redoma de plástico, com 10 cm de diâmetro, de cor preta sobre o pinto, de modo que este ficou preso num espaço escuro e limitado (ambiente estressante). Após 2 minutos, a redoma foi

retirada e registrou-se o comportamento do animal conforme descrito no item “a” (Figura 7B).

c) Campo aberto com estímulos: Em cada quadrante do campo aberto foram colocados objetos diferentes (vidro, plástico, madeira e papelão). O pinto foi colocado no quadrado central e registrou-se o tempo de latência para sair do quadrado e o tempo exploratório total dos objetos (Figura 7C).

d) Campo aberto com estímulo em plataforma elevada: No quadrante anterior esquerdo do campo aberto foi colocada uma plataforma (15 x 15 x 2 cm), sobre a qual foi colocado um estímulo atrativo (comida). O pinto foi colocado no quadrado central e registrou-se o tempo de latência para sair do quadrado, o número de tentativas do animal para alcançar o estímulo e o tempo despendido para atingí-lo (Figura 7D).



Figura 7 – Modelos de campo aberto utilizados para estudo de *Gallus domesticus* realizado no DPN1 e DPN5. (A) Campo aberto padrão. (B) Campo aberto com imobilização prévia em caixa escura. (C) Campo aberto com estímulos. (D) Campo aberto com estímulo em plataforma elevada.

2) Teste da alternância espontânea: Esta tarefa é usada para avaliar a aprendizagem e a memória espacial (MELLO *et al.*, 1998; DORÉ *et al.*, 2001). O labirinto em “T”, requer que o animal escolha o braço opositor ao primeiro braço anteriormente selecionado (DORÉ *et al.*, 2001). Realizado numa caixa de madeira com formato em “T”, com braços menores medindo 20 cm e braço maior 34 cm de comprimento, com inclinação de 20°. Tanto os braços menores como o braço maior mediam 8 cm de largura e 20 cm de altura. Foram realizados dois testes:

a) Teste do labirinto em “T” sem estímulo: O pinto foi colocado na extremidade do braço maior e registrou-se o tempo que este levou para entrar em um dos braços menores. Então, o pinto foi retirado do braço menor e recolocado

na extremidade do braço maior e novamente registrou-se o tempo que o mesmo levou para alcançar um dos braços menores. O teste foi suspenso assim que o pinto alternou o braço escolhido inicialmente ou quando se completaram os 5 minutos de teste. Foram registrados o número de tentativas e o tempo despendido para alternar espontaneamente os braços menores do labirinto em “T” (Figura 8).

b) Teste do labirinto em “T” com estímulo: Realizado conforme descrição do item anterior, na presença de um feixe luminoso no braço menor direito do labirinto em “T”, a fim de verificar o comportamento do pinto na presença da luz e avaliar sua acuidade visual (Figura 8).



Figura 8 – Modelo de labirinto em “T” utilizado para estudo de *Gallus domesticus* realizado no DPN1 e DPN5.

Encerrados os testes comportamentais (DPN5), tanto os pintos do grupo tratado com metilmercúrio, quanto os do grupo controle foram subdivididos em dois lotes, sendo um para os procedimentos histológicos e o outro para os procedimentos bioquímicos.

3.4 Procedimentos Histológicos

Pintos do grupo tratado ($n = 7$) e do grupo controle ($n = 7$) no DPN5 foram anestesiados com vapor de éter etílico por 06 minutos e submetidos à perfusão intracardíaca na primeira fase com uma solução salina e em seguida com uma solução fixadora de Carnoy-sulfeto. O encéfalo foi retirado da caixa craniana, dissecado, pesado, seccionado sagitalmente, mantido em solução Carnoy-sulfeto por 45 horas, e após, em álcool absoluto por 48 horas (SANTOS, 1999). Os encéfalos foram preparados para a microscopia de luz de acordo com as seguintes etapas:

1. Desidratação: Em álcool absoluto por 01 hora efetuando-se uma troca, foi gotejado xilol até obtenção de álcool-xilol (50%) por 20 minutos.
2. Diafanização: Imersão em xilol até tornarem-se translúcidos.
3. Inclusão e Emblocamento: Imersão em parafina a 57°C por três vezes (30 minutos cada). Após solidificação em temperatura ambiente, os blocos de parafina foram removidos dos moldes, aparados e acoplados ao micrótomo rotativo.
4. Montagem das Lâminas: Os blocos foram seccionados (6 μ m), os cortes distendidos em banho-maria (37°C), colocados sobre lâminas e mantidos em local apropriado para secagem.

5. Desparafinização: Em xilol, seguido de xilol/álcool, hidratados em álcool (seqüência decrescente de álcool absoluto até álcool 70%) e em água destilada.

6. Coloração: Foram utilizadas as seguintes técnicas:

a) Hematoxilina - Eosina (BEÇAK & PAULET, 1976) - Foi empregada como controle histológico. As lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris (3 minutos) e lavadas em água de torneira. Após, imersas em eosina aquosa a 0,5% (1 minuto).

b) Violeta de Cresila (ONISHI, 1999) - As lâminas permaneceram imersas por 15 minutos em violeta de cresila e posteriormente foram lavadas em água destilada (3 minutos). Esta técnica evidencia o citoplasma de neurônios, destacando os corpúsculos de Nissl, compostos basicamente por RNA. Desta maneira, tal coloração serve como indicador da viabilidade neuronal, pois, na ocorrência de lesões esses corpúsculos podem desaparecer (cromatólise) (SCORZA *et al.*, 2005).

c) Timm (PEDERSEN *et al.*, 1999) - Foi utilizada para análise da deposição do metilmercúrio no tecido nervoso. As fatias montadas em lâminas permaneceram por 90 minutos na solução de desenvolvimento físico (goma arábica, tampão citrato de potássio, hidroquinona e lactato de prata), posteriormente foram lavadas em água de torneira e contracoradas com hematoxilina de Harris (1 minuto).

7. Desidratação e Montagem das Lâminas: Realizada em série etanólica crescente (70 até 100%), álcool-xilol e xilol, e após, montadas com bálsamo do Canadá.

8. Análise das lâminas: Os cortes sagitais do encéfalo nas diferentes técnicas foram analisados ao microscópio de luz (100X, 400X e 1000X) e a partir desta análise foram realizados esquemas e fotografias.

Neste estudo, a investigação microscópica dos efeitos do metilmercúrio foi realizada em duas regiões do encéfalo: o mesencéfalo e o cerebelo. A descrição morfológica foi organizada de acordo com as características apresentadas no citoplasma, núcleo, nucléolo e substância de Nissl dos neurônios.

3.4.1 Verificação da Deposição do Metilmercúrio

Nesta análise a deposição do metilmercúrio foi realizada no mesencéfalo, na região de tegmento (com presença de corpos neuronais e glia); e no cerebelo, na região cortical (quarta e a quinta folha) e também na região medular.

Foram realizadas fotografias e confeccionados esquemas em câmara clara (Figuras 9A e 9B) para representar a intensidade da deposição nos locais padronizados, seguindo a legenda fraca (+), moderada (++) e intensa (+++).

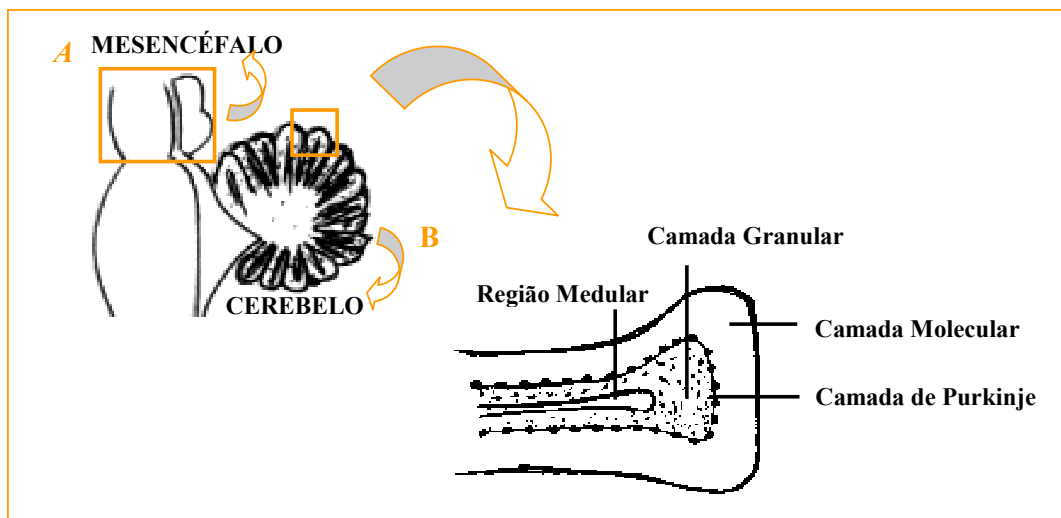


Figura 9 – Esquema utilizado para caracterização dos locais de deposição do metilmercúrio. (A) Tronco encefálico e cerebelo de ave. (B) Detalhe de corte sagital da quinta folha do cerebelo evidenciando as camadas corticais e região medular.

3.4.2 Morfometria do Tecido Cerebelar

O foco desta análise foi o cerebelo devido sua arquitetura tecidual ser basicamente a mesma em todas as folhas e apresentar camadas corticais distintas. A morfometria foi realizada com auxílio da ocular micrométrica em aumentos de 100X e 1000X, em lâminas coradas com Violeta de Cresila, num total de 10 folhas cerebelares por grupo experimental. A camada das células de Purkinje foi mensurada quanto ao diâmetro do corpo e do núcleo, bem como a distância entre as células.

3.5 Determinações Bioquímicas

Pintos do grupo tratado ($n = 7$) e do grupo controle ($n = 7$) foram decapitados no DPN5. O encéfalo e o cerebelo foram separadamente removidos, dissecados e pesados. As amostras utilizadas nas análises bioquímicas foram preparadas de acordo com a descrição a seguir:

1. Preparação do Extrato de Tecido: o cerebelo e o encéfalo foram brevemente isolados e homogeneizados em tampão HEPES 20 mM pH 7,4. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 20.000 x g por 30 minutos em centrífuga refrigerada (4° C), e o sobrenadante obtido (S1) foi conservado a - 80° C para posterior dosagem das atividades enzimáticas.

2. Atividades Enzimáticas (as amostras foram isoladas e processadas como descrito anteriormente):

a) Glutathione Redutase (GR): Ao utilizar o substrato GSSG a enzima leva ao consumo de NADPH, que foi acompanhado em 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ n M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (CALBERG & MANNERVIK, 1985).

b) Glutathione Peroxidase (GPx): Acompanhada indiretamente pelo desaparecimento do NADPH. A enzima ao utilizar GSH para degradar um peróxido orgânico como o peróxido de tert-butila (t-BOOH), gera glutathione oxidada (GSSG), que por sua vez é reduzida pela glutathione redutase com consumo de NADPH. Este consumo de NADPH é acompanhado em espectrofotômetro (340 nm), de forma similar à determinação de GR (WENDEL, 1981; FLOHÉ & GÜNZLER, 1984).

c) Determinação dos níveis de glutathione: 95% ou mais dos tióis não-protéicos é glutathione. Assim, os níveis de glutathione foram determinados como tióis não-protéicos pelo método de ELLMAN (1959). Em resumo, 100 μl do sobrenadante tecidual (S1) foram adicionados a 100 μl de uma solução de ácido tricloroacético 10%. Após centrifugação a 7.000 x g por 5 minutos em centrifuga refrigerada (4° C), o sobrenadante ácido foi neutralizado até pH 7,0 com uma solução de Na OH 1 M e os tióis de fonte não-protéica foram determinados através do método de Ellman, utilizando o ácido 55'-ditiobis-(2-nitrobenzóico).

3.6 Análise Estatística

Os dados de peso (corporal, encefálico e cerebelar), comportamental (exceto os testes de alternar espontâneo em labirinto em “T”), morfométrico e bioquímico foram analisados através de sumário estatístico (software Statistica®). Para verificar a existência de diferenças significativas entre os grupos, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, precedida dos testes de homogeneidade e distribuição normal das amostragens (ZAR, 1999). Também os dados referentes ao peso corporal e comportamental foram analisados através da ANOVA utilizando Duncan nas repetições. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

O grupo de *Gallus domesticus* exposto ao metilmercúrio e o grupo controle foram acompanhados em ambiente experimental (incubadora e caixa-ninho), com registro da sobrevivência (embriões e pintos) e peso (DPN0 ao DPN5), morfologia externa (DPN0), repertório (DPN1 ao DPN5) e testes comportamentais em campo aberto e no labirinto em “T” (DPN1 e DPN5), bem como, estudos histológicos e bioquímicos (DPN5).

4.1 Sobrevivência dos embriões e pintos

A sobrevivência dos embriões no grupo tratado com metilmercúrio (E5 ao E21) correspondeu a 21,42% (18 embriões), sendo que as mortes ocorreram a partir de E8, principalmente no período entre E15 - 21. Já após a eclosão, a sobrevivência (DPN1 ao DPN5), correspondeu a 16,66% (14 pintos). No grupo controle, a sobrevivência dos embriões foi de 73,68% (14 embriões), sendo que

as interrupções do desenvolvimento ocorreram exclusivamente no período E15 - 21, os pintos que eclodiram 73,68% (14 pintos) sobreviveram (Figura 10).

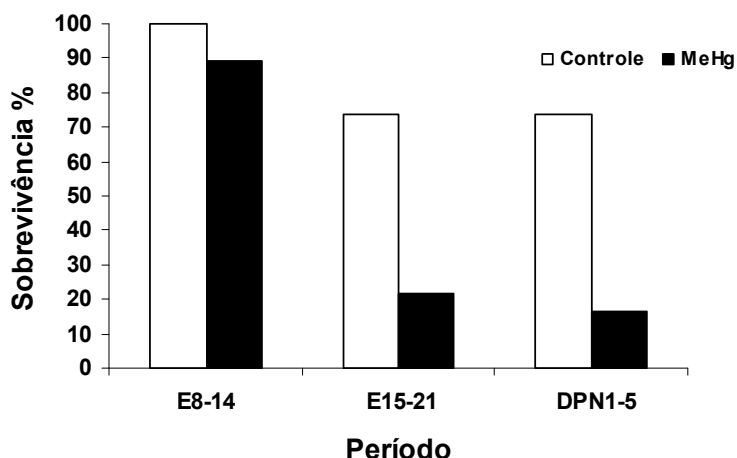


Figura 10 – Registro da sobrevivência dos embriões e pintos de *Gallus domesticus* dos grupos tratado com metilmercúrio e controle.

Dos pintos que eclodiram 50% eram do sexo masculino e 50% do sexo feminino nos dois grupos experimentais. Neste trabalho as informações relativas à sexagem foram consideradas apenas na análise da morfologia externa dos animais.

4.2 Análise da Morfologia Externa dos Pintos

A morfologia externa dos pintos ao nascer revelou que dos 18 animais que eclodiram no grupo tratado com metilmercúrio, 2 pintos (1 macho e 1 fêmea) não apresentaram morfologia normal e morreram no DPN3. O erro consistia do fechamento incompleto da parede ventral do corpo, com presença de uma

estrutura sacular protuberante e vascularizada, medindo cerca de 1,5 cm de comprimento e 0,6 cm de diâmetro (Figura 11B e 11C). Dois pintos (fêmeas), além dessa anomalia, também apresentaram alterações nos membros inferiores (Figura 11B) e morreram no DPN1. Pôde-se verificar que internamente todos os quatro pintos apresentavam vitelo na cavidade abdominal e alças intestinais aparentemente normais. Os demais pintos do grupo exposto ao metilmercúrio ($n = 14$) e todos os pintos do grupo controle ($n = 14$) apresentaram padrão morfológico externo normal (Figura 11A), foram acompanhados e analisados até o final do experimento.

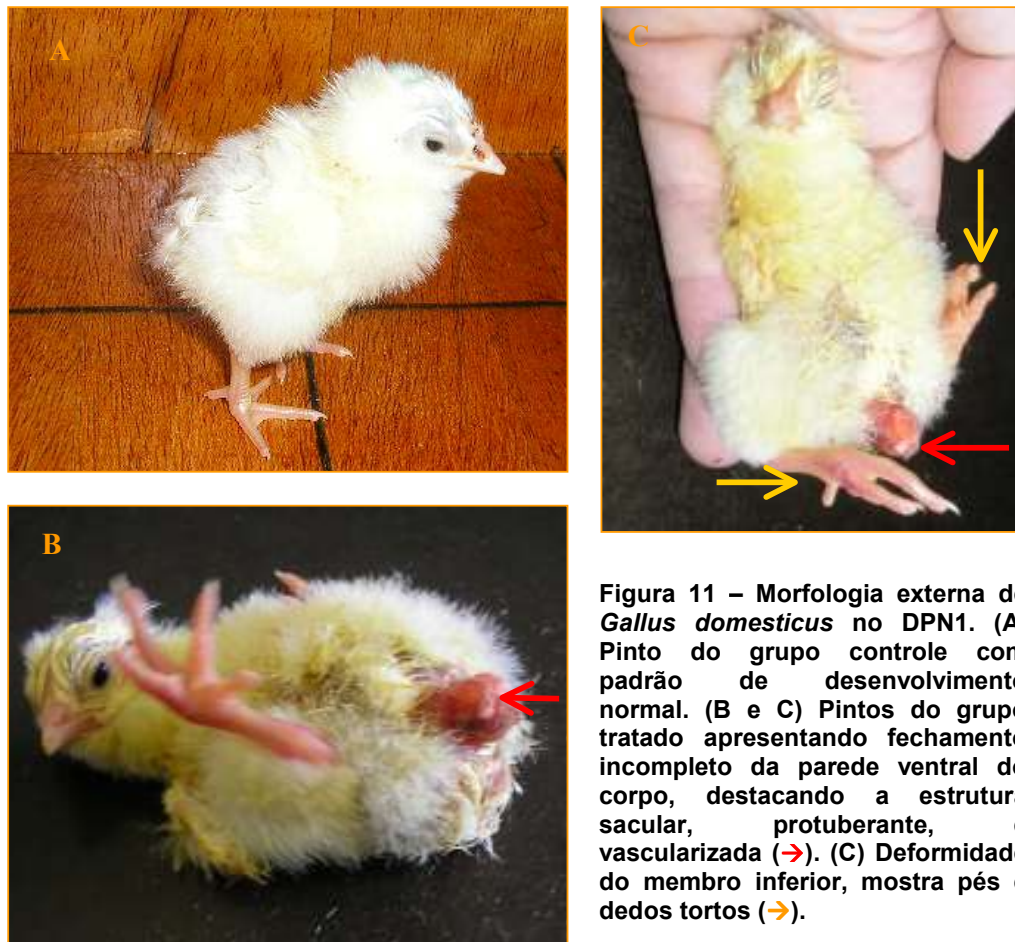


Figura 11 – Morfologia externa de *Gallus domesticus* no DPN1. (A) Pingo do grupo controle com padrão de desenvolvimento normal. (B e C) Pintos do grupo tratado apresentando fechamento incompleto da parede ventral do corpo, destacando a estrutura sacular, protuberante, e vascularizada (→). (C) Deformidade do membro inferior, mostra pés e dedos tortos (→).

4.3 Análise do Peso Corporal, Encefálico e Cerebelar.

A Figura 12 mostra que a média do peso corporal dos pintos do grupo tratado com metilmercúrio foi inferior ao grupo controle em todos os dias analisados, com diferença significativa. Pode-se observar uma diminuição no peso médio no DPN1 dos pintos do grupo tratado e o grupo controle apresentou ganho de peso durante o mesmo. A ANOVA para medidas repetidas mostrou diferença significativa apenas no grupo controle, quando comparados o peso ao nascer (DPN0) com o peso no quinto dia pós-natal (DPN5).

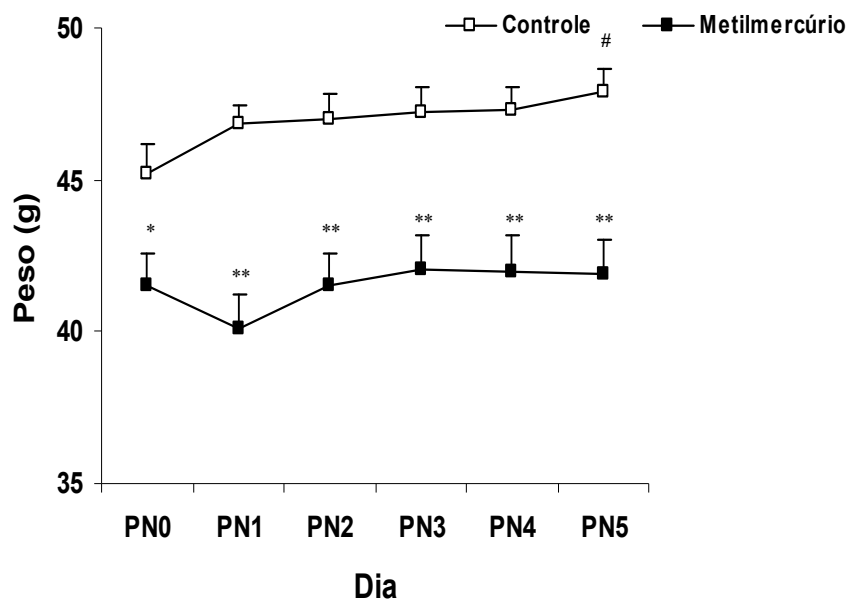


Figura 12 – Avaliação do peso corporal dos pintos de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais durante DPN0-5. Resultados expressos em média \pm erro padrão médio. $n = 14$ em cada grupo experimental. (*) Diferença significativa $P < 0,05$ entre os grupos experimentais, (**) diferença significativa $P < 0,01$ entre os grupos experimentais no mesmo dia de avaliação. ANOVA para medidas repetidas, diferença significativa no grupo controle: (#) $P < 0,05$ com o DPN0.

Quanto aos pesos dos encéfalos e dos cerebelos (isoladamente) não houve diferenças significativas entre os dois grupos experimentais (Figura 13).

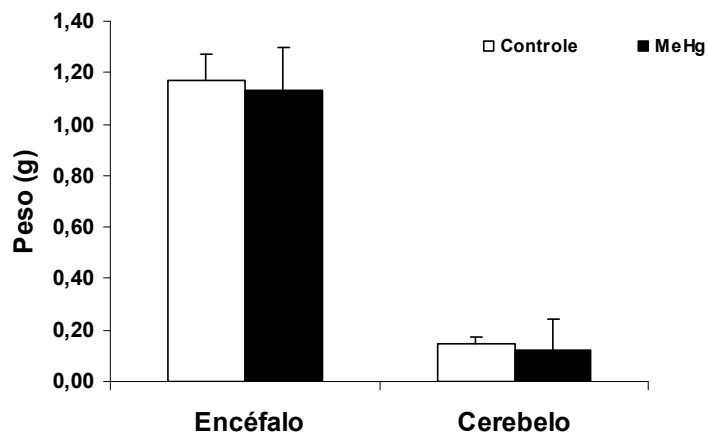


Figura 13 – Avaliação do peso úmido do encéfalo e do cerebello dos pintos de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais durante DPN5. Resultados expressos em média \pm erro padrão médio. $n = 14$ para o peso do encéfalo e $n = 7$ para o peso do cerebello, em cada grupo experimental. Sem diferença significativa entre os grupos experimentais.

4.4 Análise do Repertório Comportamental

O registro do comportamento do primeiro ao quinto dia pós-natal (DPN1 - 5) possibilitou o reconhecimento das sete categorias comportamentais (Tabela 1), onde as mais freqüentes (95,59%) foram os movimentos de cabeça e pescoço, movimentos exploratórios e de interação social.

Tabela 1 - Frequência absoluta dos comportamentos nos grupos experimentais de *Gallus domesticus* do primeiro ao quinto dia pós-natal (DPN1 - 5), bem como porcentagem total, referente ao somatório dos grupos controle e tratado em cada categoria.

Categorias Comportamentais	DPN1 - 5		
	Grupo Controle	Grupo Tratado	Porcentagem total %
a) Movimentos de cabeça e pescoço	8574	10583	46,21
b) Movimentos exploratórios	10075	6743	40,57
c) Interação social	1567	2065	8,81
d) Autolimpeza	216	407	1,50
e) Movimentos de asas	192	333	1,27
f) Inatividade	136	283	1,01
g) Movimentos anômalos	09	251	0,63
		Total	100

***n* = 14 por grupo experimental.**

A análise das médias das frequências dos comportamentos do primeiro ao quinto dia pós-natal (DPN1 - 5), revelou que os movimentos exploratórios, movimentos de asas, inatividade e movimentos anômalos foram significativamente diferentes entre os grupos experimentais (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência média dos comportamentos nos grupos experimentais de *Gallus domesticus* durante DPN1 - 5.

Categorias Comportamentais	DPN1 - 5	
	Grupo controle	Grupo tratado
a) Movimentos de cabeça e pescoço	122,49 (±11,35)	151,19(±12,90)
b) Movimentos exploratórios	143,93 (±7,16)	96,33 (±10,46) **
c) Interação social	22,39 (±2,31)	29,50 (±3,60)
d) Autolimpeza	3,09 (±0,66)	5,81 (±1,59)
e) Movimentos de asas	2,74 (±0,56)	4,76 (±1,11) *
f) Inatividade	1,94 (±0,39)	4,04 (±0,78) *
g) Movimentos anômalos	0,13 (±0,07)	3,59 (±0,75) **

Valores expressos como média \pm erro padrão médio. $n = 14$ por grupo experimental. Diferença significativa: (*) $P < 0,05$ e (**) $P < 0,01$ entre os grupos experimentais.

a) Movimentos de Cabeça e Pescoço

A Figura 14 mostra um aumento do número de movimentos de cabeça e pescoço nos pintos do grupo tratado com metilmercúrio apenas no DPN1, com diferença significativa, quando comparado ao grupo controle. Também a análise de variância com medidas repetidas mostrou diferença significativa no grupo tratado no DPN1, em relação aos demais dias observados.

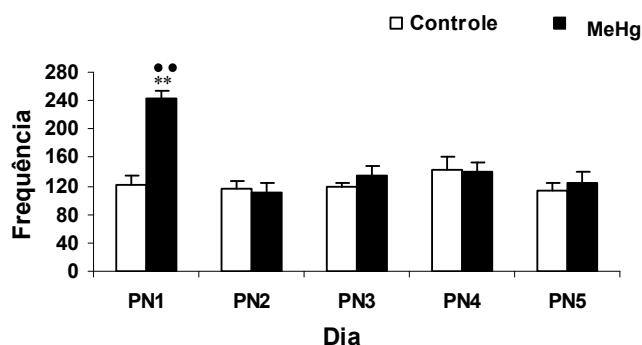


Figura 14 – Frequência dos movimentos de cabeça e pescoço de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais durante DPN1-5 ($n = 14$ por grupo experimental). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Diferença significativa: (**) $P < 0,01$ entre os grupos experimentais. ANOVA para medidas repetidas: diferença significativa no grupo tratado (●●) $P < 0,01$ com os demais dias observados.

b) Movimentos Exploratórios

O número de movimentos exploratórios foi menor no grupo tratado com metilmercúrio quando comparado ao grupo controle, com diferença significativa em todos os dias analisados (Figura 15). Além disso, a análise de variância com medidas repetidas indicou um decréscimo neste movimento no DPN2 quando comparado ao DPN3, DPN4 e DPN5 no grupo tratado. No grupo controle, esta análise revelou que no DPN1 a frequência foi menor, quando comparado ao DPN4 e DPN5.

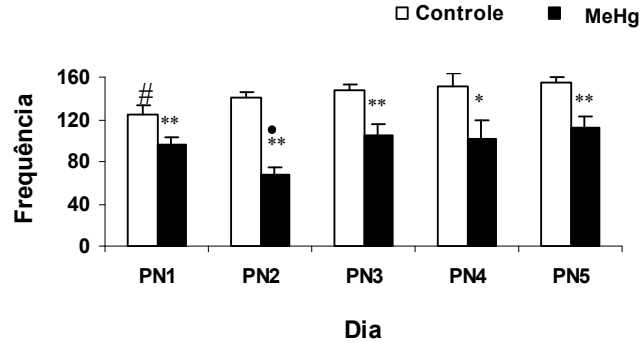


Figura 15 – Frequência dos movimentos exploratórios de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais durante DPN1-5 ($n = 14$ por grupo experimental). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Diferença significativa: (*) $P < 0,05$ e (**) $P < 0,01$ entre os grupos experimentais. ANOVA para medidas repetidas: diferença significativa no grupo tratado (•) $P < 0,05$ com o DPN3, DPN4 e DPN5; diferença significativa no grupo controle (#) $P < 0,05$ quando comparado com o DPN4 e DPN5.

c) Interação Social

A análise diária da frequência deste comportamento revelou que nos grupos experimentais o padrão de flutuação foi semelhante, com diferença significativa no DPN5. A ANOVA para medidas repetidas, no grupo tratado, mostrou diferença significativa no DPN1 em relação aos demais dias observados. No grupo controle além de mostrar diferença significativa no DPN1 em relação aos demais dias observados também houve diferença significativa entre o DPN4 e o DPN5.

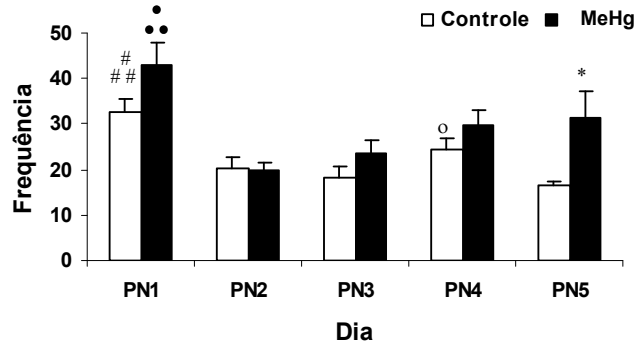


Figura 16 – Frequência dos comportamentos de interação social de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais durante DPN1-5 ($n = 14$ por grupo experimental). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Diferença significativa: (*) $P < 0,05$ entre os grupos experimentais. ANOVA para medidas repetidas: diferença significativa no grupo tratado (●) $P < 0,05$ com o DPN4 e DPN5, (●●) $P < 0,01$ com DPN2 e DPN3; diferença significativa no grupo controle: (#) $P < 0,05$ com o DPN4, (##) $P < 0,01$ com o DPN2, DPN3 e DPN5 e (o) $P < 0,05$ com o DPN5.

d) Autolimpeza

Na análise diária o grupo tratado apresentou maior frequência, sendo no DPN4 seu maior registro, com diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 17). A ANOVA para medidas repetidas mostrou diferença significativa no grupo tratado entre o DPN1 e o DPN4. Também no grupo controle, esta análise indicou que o DPN1 apresentou diferença significativa com o DPN2 e o DPN3, e no DPN4 em relação ao DPN3 e DPN5.

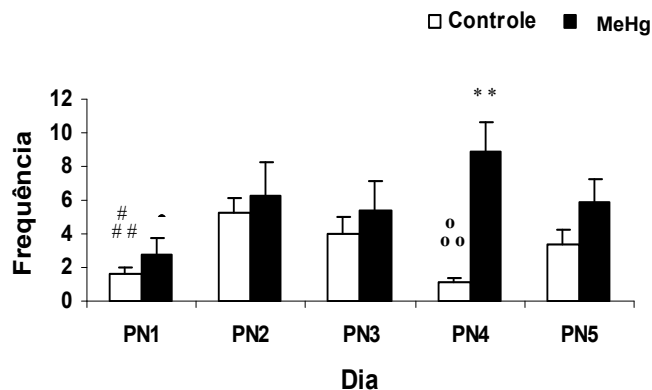


Figura 17 – Frequência dos comportamentos de autolimpeza de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais durante DPN1-5 ($n = 14$ por grupo experimental). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Diferença significativa: (**) $P < 0,01$ entre os grupos experimentais. ANOVA para medidas repetidas: diferença significativa no grupo tratado (•) $P < 0,05$ com o DPN4; diferença significativa no grupo controle (#) $P < 0,05$ com o DPN3, (##) $P < 0,01$ com o DPN2, (o) $P < 0,05$ com o DPN3 e DPN5 e (oo) $P < 0,01$ com o DPN2.

e) Movimentos de asas

Na análise diária desta categoria, pode-se observar no grupo tratado uma maior frequência, com diferença significativa entre os grupos experimentais no DPN1 e DPN4 (Figura 18). A ANOVA para medidas repetidas revelou que no grupo controle, houve diferença significativa entre o DPN2 e o DPN4.

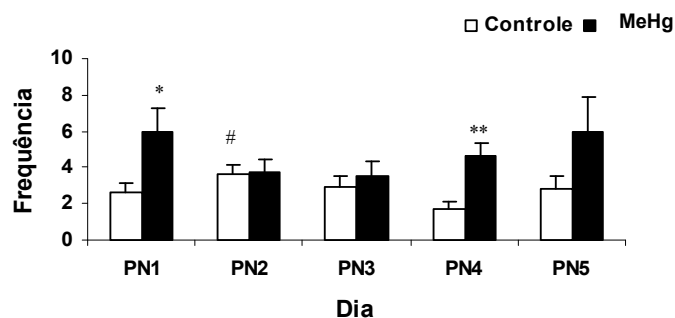


Figura 18 – Frequência dos movimentos de asas de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais durante DPN1-5 ($n = 14$ por grupo experimental). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Diferença significativa: (*) $P < 0,05$ e (**) $P < 0,01$ entre os grupos experimentais. ANOVA para medidas repetidas: diferença significativa no grupo controle (#) $P < 0,05$ com o DPN4.

f) Inatividade

O padrão de flutuação deste comportamento foi similar entre os grupos experimentais (Figura 19). Além disso, o grupo tratado apresentou menor frequência, com diferença significativa no DPN2, DPN3 e DPN5 em relação ao grupo controle. A análise de variância para medidas repetidas mostrou diferença significativa, no grupo tratado, entre o DPN1 e o DPN3, e no grupo controle, entre o DPN1 e os demais dias observados.

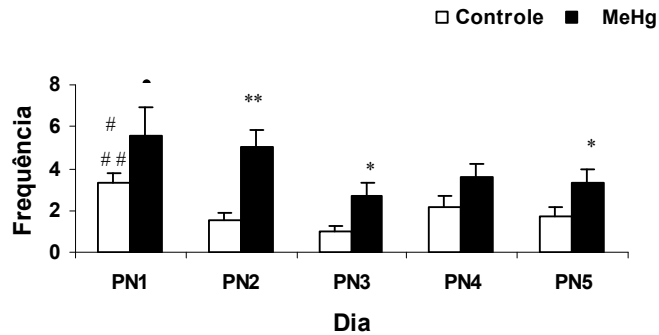


Figura 19 – Frequência dos comportamentos de inatividade de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais durante DPN1-5 ($n = 14$ por grupo experimental). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Diferença significativa: (*) $P < 0,05$ e (**) $P < 0,01$ entre os grupos experimentais. ANOVA para medidas repetidas: diferença significativa no grupo tratado (•) $P < 0,05$ com o DPN3; diferença significativa no grupo controle (#) $P < 0,05$ com o DPN4 e DPN5, (##) $P < 0,01$ com o DPN2 e DPN3.

g) Movimentos anômalos

Neste comportamento, o grupo tratado apresentou maior frequência, com diferença significativa, em relação ao grupo controle, em todos os dias analisados (Figura 20). O grupo controle apresentou diminuição desses movimentos, que deixaram de ocorrer no DPN4 e DPN5. Na análise de variância com medidas repetidas, o grupo tratado revelou que os movimentos anômalos no DPN1 foi muito elevado e diferiu significativamente dos demais dias. Além disso, a análise de medidas repetidas revelou que no grupo controle, o DPN1 foi significativamente diferente do DPN4 e DPN5.

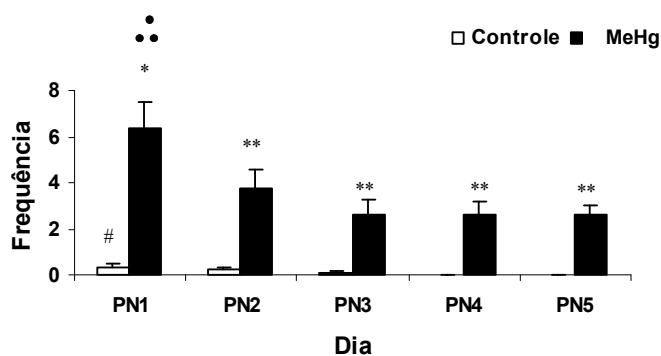


Figura 20 – Frequência dos movimentos anômalos nos grupos experimentais de *Gallus domesticus* durante DPN1-5 ($n = 14$ por grupo experimental). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Diferença significativa: (*) $P < 0,05$ e (**) $P < 0,01$ entre os grupos experimentais. ANOVA para medidas repetidas: diferença significativa no grupo tratado (●) $P < 0,05$ com o DPN2, (●●) $P < 0,01$ com o DPN3, DPN4 e DPN5; diferença significativa no grupo controle (#) $P < 0,05$ com o DPN4 e DPN5.

4.5 Análise dos Testes Comportamentais

Os testes individuais no campo aberto e labirinto em “T” foram realizados no primeiro dia de vida (DPN1) e repetidos no quinto dia (DPN5) nos dois grupos experimentais.

4.5.1 Comportamento Exploratório

a) Campo aberto padrão (Tabela 3)

Os pintos do grupo tratado com metilmercúrio apresentaram maior tempo de latência no DPN1, com diferença significativa, quando comparado ao grupo

controle. As demais categorias comportamentais (movimentos exploratórios, autolimpeza e bolo fecal) não apresentaram diferença significativa no DPN1. No DPN5 apenas os movimentos exploratórios apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais, sendo mais expressivos no grupo controle. A análise para medidas repetidas mostrou diminuição significativa no tempo de latência do grupo tratado, e no grupo controle, aumento significativo dos movimentos exploratórios e autolimpeza.

Tabela 3 – Categorias comportamentais de *Gallus domesticus* observadas no campo aberto padrão nos grupos experimentais no DPN1 e DPN5.

Categorias Comportamentais	Grupo Controle		Grupo Tratado	
	DPN1	DPN5	DPN1	DPN5
Latência (segundos)	49,71 (±10,87)	38,07 (±12,23)	107,21 (± 24,85) *	34,57 (±10,93) ##
Movimentos Exploratórios	118,79 (±10,39)	184,91 (±18,83) ##	125,64 (±16,25)	142,00 (±16,40) *
Autolimpeza	0,00 (±0,00)	0,71 (±0,37) #	0,07 (±0,07)	0,21 (±0,15)
Bolo fecal	0,71 (±0,13)	0,86 (±0,18)	0,43 (±0,14)	0,57 (±0,17)

Valores expressos como média ± erro padrão médio ($n = 14$ por grupo experimental). Efeito do tratamento: (*) Diferença significativa $P < 0,05$ entre os grupos experimentais e (**) diferença significativa $P < 0,01$ entre os grupos experimentais. Efeito da sessão: (#) Diferença significativa $P < 0,05$ e (##) Diferença significativa $P < 0,01$ no mesmo grupo experimental.

b) Campo aberto após imobilização prévia em caixa escura (Tabela 4)

No DPN1 as categorias comportamentais observadas (tempo de latência, movimentos exploratórios, autolimpeza e bolo fecal) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. No DPN5 os movimentos exploratórios e a autolimpeza foram mais expressivos no grupo controle, com diferença significativa quando comparado ao grupo tratado com metilmercúrio. A ANOVA para medidas repetidas revelou um aumento significativo na autolimpeza e nos movimentos exploratórios no grupo controle.

Tabela 4 – Categorias comportamentais de *Gallus domesticus* observadas no campo aberto com imobilização prévia em caixa escura nos grupos experimentais no DPN1 e DPN5.

Categorias Comportamentais	Grupo Controle		Grupo Tratado	
	DPN1	DPN5	DPN1	DPN5
Latência (segundos)	40,14 (±19,74)	10,14 (±3,71)	50,00 (±20,62)	70,00 (±28,16)
Movimentos Exploratórios	125,57 (±10,73)	193,43 (±17,19)##	134,36 (±14,40)	116,79 (±18,64) **
Autolimpeza	0,00 (±0,00)	1,21 (±0,43) #	0,29 (±0,13)	0,86 (±0,47)
Bolo fecal	0,57 (±0,14)	0,29 (±0,13)	0,43 (±0,14)	0,36 (±0,13)

Valores expressos como média ± erro padrão médio ($n = 14$ por grupo experimental). Efeito do tratamento: (*) Diferença significativa $P < 0,05$ entre os grupos experimentais e (**) diferença significativa $P < 0,01$ entre os grupos experimentais. Efeito da sessão: (#) Diferença significativa $P < 0,05$ e (##) Diferença significativa $P < 0,01$ no grupo controle.

c) Campo aberto com novos estímulos (Figura 21)

Apenas no DPN1 o tempo total de exploração dos estímulos (objetos de madeira, plástico, vidro e papelão) apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais. O tempo de latência para sair do quadrado central no DPN1 e DPN5, bem como, o tempo total de exploração dos estímulos no DPN5 não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais. No grupo tratado na análise entre os dias de teste (DPN1 e DPN5), observou-se aumento dos tempos de latência e exploratório, enquanto no grupo controle, houve diminuição desses tempos. A ANOVA para medidas repetidas não revelou significância entre os dias de teste (DPN1 e DPN5) nos grupos experimentais.

Nossos resultados mostram que no grupo tratado o tempo de latência foi maior nos dois dias de teste, este no DPN1 não realizou alternância dos braços. No DPN5 o grupo tratado apresentou menor número de tentativas para alternar, um menor número de pintos realizaram esta tarefa, sendo que o tempo para a sua realização foi menor quando comparado ao grupo controle.

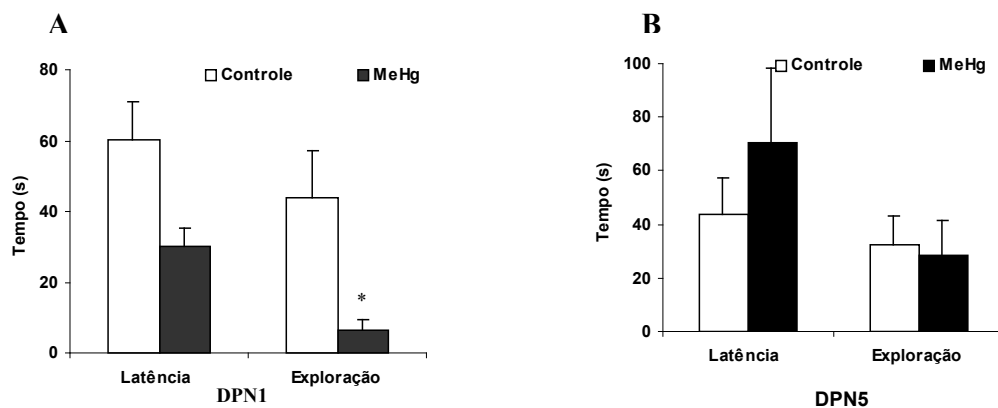


Figura 21 - Campo aberto com estímulo: Tempo de latência em segundos para sair do quadrado central e tempo exploratório total em segundos nos grupos experimentais de *Gallus domesticus* no DPN1 e DPN5 ($n = 14$ por grupo experimental). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Diferença significativa: (*) $P < 0,05$ entre os grupos experimentais.

d) Campo aberto em plataforma elevada (Tabela 5)

No DPN1, o tempo de latência para sair do quadrado central foi menor no grupo tratado, e no DPN5, este tempo foi menor no grupo controle. O número de indivíduos que atingiram a plataforma central aumentou no grupo tratado, enquanto que, no grupo controle diminuiu.

No DPN1 e DPN5 todos os pintos que atingiram a plataforma o fizeram em apenas uma tentativa e o tempo para atingi-la foi menor no grupo tratado. A análise estatística não mostrou diferença entre os grupos e também não revelou efeito da sessão nos grupos experimentais.

Tabela 5 – Registro dos comportamentos de *Gallus domesticus* no campo aberto com estímulo em plataforma elevada nos grupos experimentais no DPN1 e DPN5.

Categorias Comportamentais	Grupo Controle		Grupo Tratado	
	DPN1	DPN5	DPN1	DPN5
Latência (segundos) *	58,21 (± 16,10)	23,43 (± 4,07)	45,36 (±18,27)	34,21 (± 7,99)
Número de indivíduos que atingiram a plataforma **	04 (28,57%)	03 (21,43%)	02 (14,29%)	06 (42,86%)
Tempo (segundos) para atingir a plataforma *	174 (± 44,49)	127,33 (± 26,59)	146 (± 92,27)	119(± 23,27)

(*) Valores expressos como média ± erro padrão médio por grupo experimental. (**) Valores absolutos e percentagem por grupo experimental ($n = 14$ por grupo experimental).

4.5.2 Comportamento de Alternância Espontânea

a) Labirinto em “T” sem estímulo (Tabela 6)

Nossos resultados mostram que no grupo tratado o tempo de latência foi maior nos dois dias de teste, este no DPN1 não realizou alternância dos braços, no DPN5 apresentou maior número de tentativas para alternar e um menor número de pintos realizaram esta tarefa com menor gasto de tempo, quando comparado ao grupo controle.

Tabela 6 – Registro da alternância espontânea de *Gallus domesticus* no labirinto em “T” nos grupos experimentais no DPN1 e DPN5.

Categorias Comportamentais	Grupo Controle		Grupo Tratado	
	DPN1	DPN5	DPN1	DPN5
Latência (segundos) *	51,14 ($\pm 14,14$)	16,21 ($\pm 3,91$)	90,93 ($\pm 25,25$)	22,71 ($\pm 6,01$)
Indivíduos que alternaram os braços **	05 (35,71%)	10 (71,42%)	–	02 (14,29%)
Tentativas para alternância dos braços *	3,40 ($\pm 0,59$)	2,70 ($\pm 0,26$)	00	4 ($\pm 0,59$)
Tempo (segundos) para alternância de dos braços *	185 ($\pm 34,91$)	176,67 ($\pm 21,48$)	–	166 ($\pm 0,88$)

(*) Valores expressos como média \pm erro padrão médio por grupo experimental. (**) Valores absolutos e percentagem por grupo experimental ($n = 14$ por grupo experimental).

b) Labirinto em “T” com estímulo luminoso

A tabela 7 mostra que no grupo tratado o tempo de latência foi maior nos dois dias de teste e no DPN1 não realizou alternância dos braços. No DPN5 o grupo tratado apresentou menor número de tentativas para alternar, um menor número de pintos realizaram esta tarefa, sendo que o tempo para a sua realização foi menor quando comparado ao grupo controle.

Tabela 7 - Registro da alternância espontânea de *Gallus domesticus* no labirinto em “T” com estímulo luminoso nos grupos experimentais no DPN1 e DPN5.

Categorias Comportamentais	Grupo Controle		Grupo Tratado	
	DPN1	DPN5	DPN1	DPN5
Latência (segundos) *	21,57 ($\pm 7,37$)	16,00 ($\pm 4,55$)	69,71 ($\pm 20,70$)	46,43 ($\pm 11,70$)
Indivíduos que alternaram os braços **	06 (42,86%)	11 (78,57%)	—	02 (14,29%)
Tentativas para alternância dos braços*	4,50 ($\pm 0,33$)	2,91 ($\pm 0,28$)	00	2,00 ($\pm 0,00$)
Tempo (segundos) para alternância dos braços *	183 ($\pm 29,41$)	141,45 ($\pm 10,27$)	—	67,70 ($\pm 27,58$)

(*) Valores expressos como média \pm erro padrão médio por grupo experimental. (**) Valores absolutos e percentagem por grupo experimental ($n = 14$ por grupo experimental).

4.6. Caracterização histológica do encéfalo: mesencéfalo e cerebelo

No mesencéfalo do grupo controle (Figura 22A e 22B), pode-se reconhecer os corpos celulares dos neurônios e células gliais. Os neurônios apresentaram citoplasma pálido, com limites definidos e substância de Nissl distribuída uniformemente, núcleo e nucléolo bem evidentes e centralizados na maioria das células visualizadas. No grupo tratado com metilmercúrio, os neurônios apresentaram citoplasma com limites imprecisos com coloração violácea, núcleo róseo e com diminuição do tamanho, alguns neurônios apresentaram substância de Nissl em grumos (característica de cromatólise) e nucléolo pouco evidenciado (Figura 22C e 22D).

No córtex cerebelar do grupo controle (Figura 22E) pode-se reconhecer as camadas corticais: camada granular, camada de células de Purkinje e camada molecular, que se mostraram distintas uma das outras. Os tipos celulares apresentaram-se com nitidez, o citoplasma das células de Purkinje mostrou-se regularmente distribuído e a presença da substância de Nissl característica, núcleo e nucléolo bem evidentes (Figuras 25A e 25C). No grupo tratado com metilmercúrio (Figuras 24B e 24D), os tipos celulares destas camadas corticais não se mostraram tão evidentes e na camada de Purkinje as células apresentaram-se mais distanciadas uma das outras, as células de Purkinje apresentaram substância de Nissl em grumos, nucléolo pouco evidente (Figura 22F, 25B e 25D).

Na região medular do cerebelo os componentes celulares neuronais mostraram-se evidente no grupo controle (Figura 22G e 22H), apresentando citoplasma pálido, bem delimitado com coloração homogênea e substância de

Nissl distribuída uniformemente, núcleo e nucléolo bem definidos em sua maioria. No grupo tratado com metilmercúrio, os componentes celulares não foram tão evidenciados, porém, alguns neurônios apresentaram substância de Nissl em grumos (Figura 22I e 22J).

4.6.1 Análise dos Locais de Deposição do Metilmercúrio no Mesencéfalo e Cerebelo

As lâminas do grupo controle não apresentaram marcação para o metilmercúrio em nenhuma das regiões analisadas (Figuras 23A, 23C e 23E). No grupo tratado, pôde-se observar uma impregnação discreta do metilmercúrio no mesencéfalo (Figura 23B), nas camadas corticais (Figura 23D) e região medular do cerebelo (Figura 23F), sendo possível verificar intensidade diferenciada nas regiões marcadas pela deposição do metal (Figura 24A, 24B, 24C e 24D e Tabela 8).

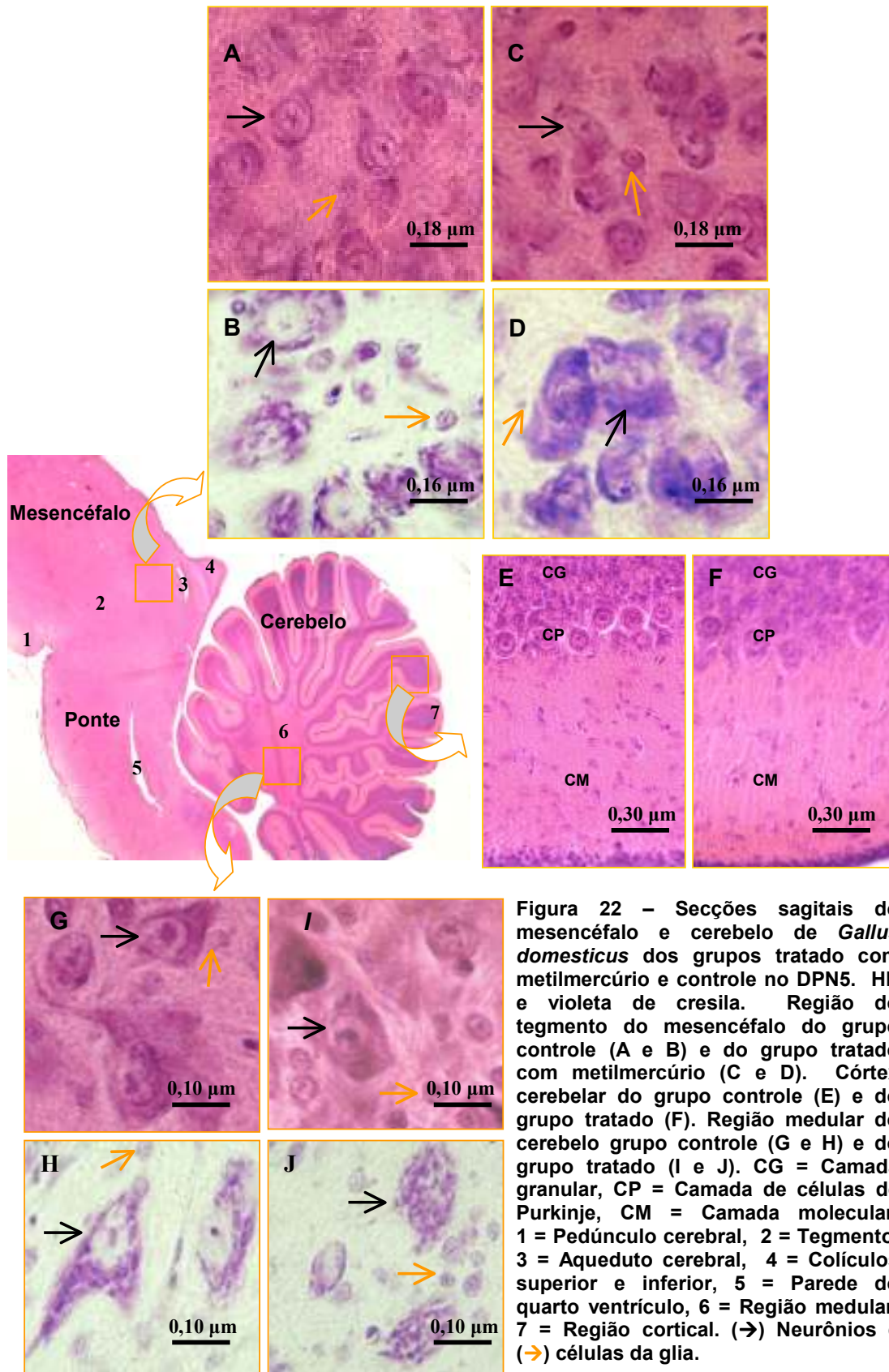


Figura 22 – Secções sagitais do mesencéfalo e cerebello de *Gallus domesticus* dos grupos tratado com metilmercúrio e controle no DPN5. HE e violeta de cresila. Região do tegmento do mesencéfalo do grupo controle (A e B) e do grupo tratado com metilmercúrio (C e D). Córtex cerebello do grupo controle (E) e do grupo tratado (F). Região medular do cerebello grupo controle (G e H) e do grupo tratado (I e J). CG = Camada granular, CP = Camada de células de Purkinje, CM = Camada molecular. 1 = Pedúnculo cerebello, 2 = Tegmento, 3 = Aqueduto cerebello, 4 = Colículos superior e inferior, 5 = Parede do quarto ventrículo, 6 = Região medular, 7 = Região cortical. (→) Neurônios e (⇒) células da glia.

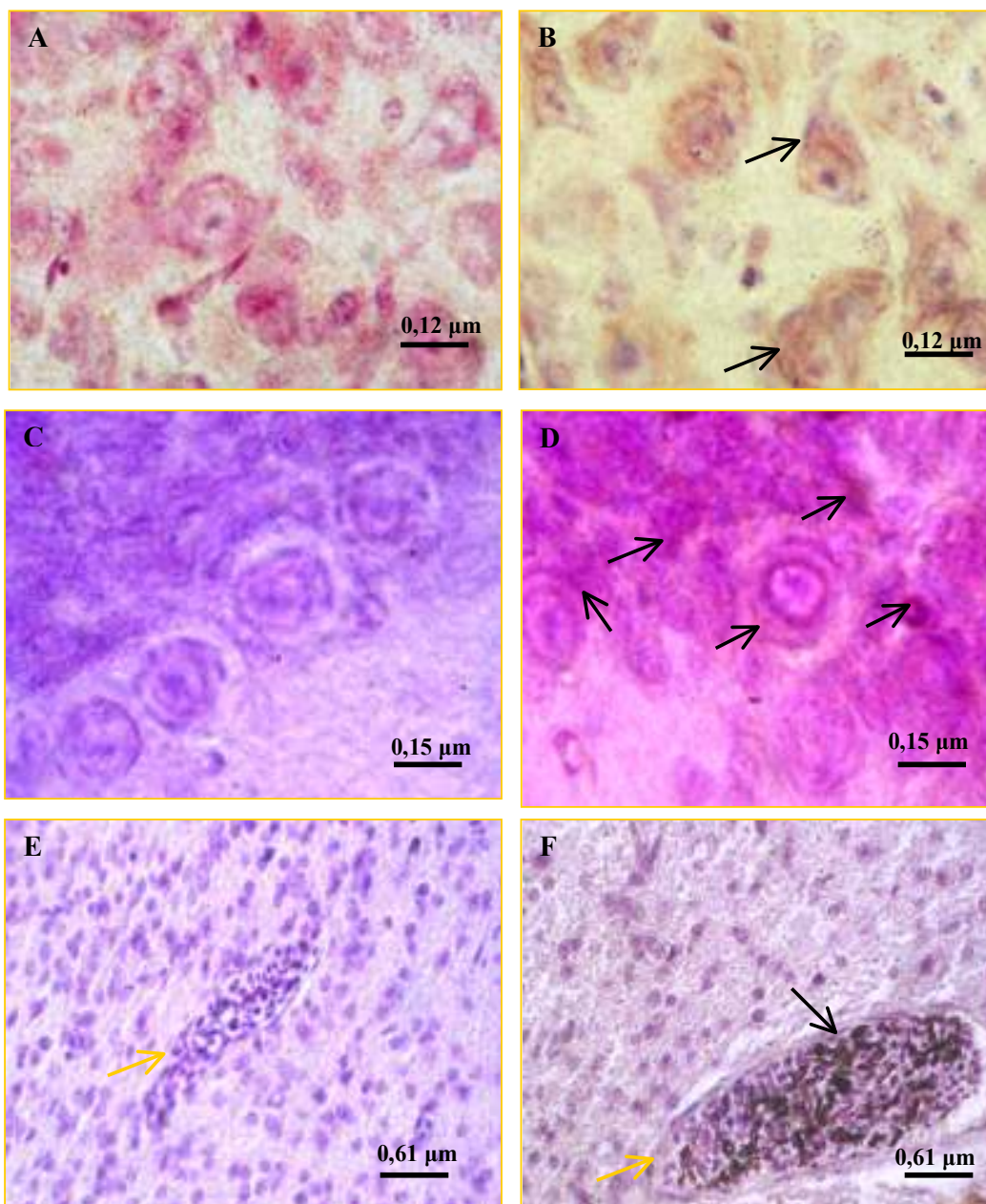


Figura 23 - Secções sagitais do mesencéfalo, região cortical e medular do cerebelo de *Gallus domesticus* no DPN5. Autometalografia de Timm com contra-coloração Hematoxilina. (A, C e E) Grupo controle. (B, D e F) Grupo tratado. Mesencéfalo (A e B), região cortical (C e D) e medular (E e F) do cerebelo. (→) indica deposição do metal e (→) a presença de vaso sanguíneo.

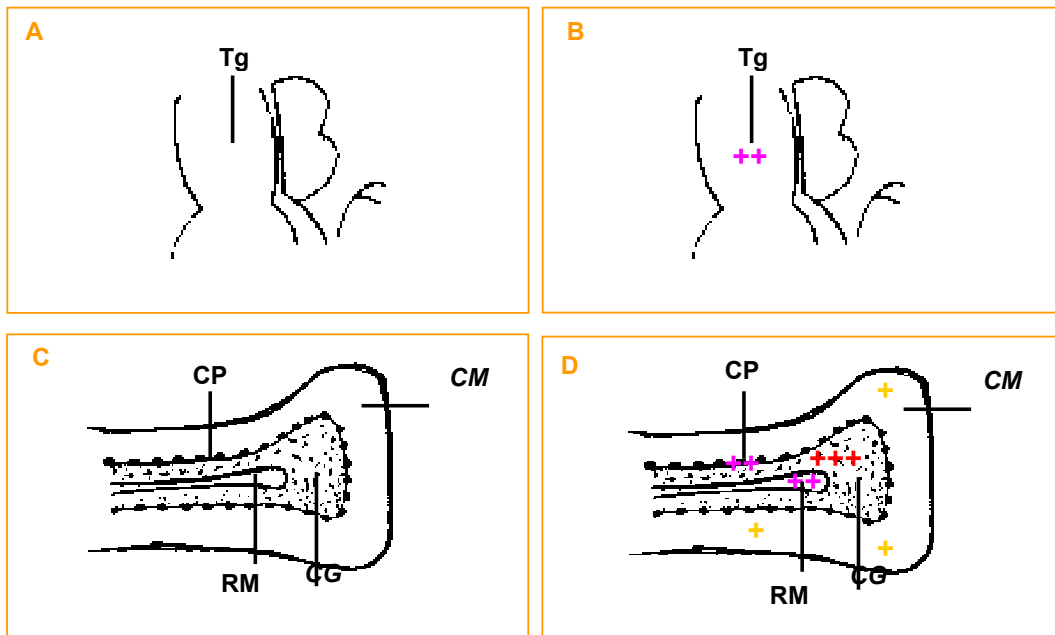


Figura 24 - Esquemas indicando a deposição de metilmercúrio no mesencéfalo e cerebelo em *Gallus domesticus* no DPN5. Grupo controle (A e C) e grupo tratado com metilmercúrio (B e D). Mesencéfalo (A e C), cerebelo (C e D). Deposição intensa (+++), moderada (++) e fraca (+) de metilmercúrio. Tg = Tegmento, RM = Região medular, CM = Camada molecular, CP = Camada de Purkinje e CG = Camada granular.

Tabela 8 - Impregnação do metilmercúrio no mesencéfalo e no cerebelo de pintos de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais no DPN5.

Região SNC	Mesencéfalo	Cerebelo			
		Camadas Corticais			Região Medular
		CM	CP	CG	
Grupos Experimentais					
Grupo Controle	-	-	-	-	-
Grupo Tratado	++	+	++	+++	++

4.6.2 Morfometria do Córtex Cerebelar

A morfometria das camadas corticais do cerebelo (Tabela 9) do grupo tratado com metilmercúrio revelou menor espessura na camada molecular, maior espessura nas camadas de Purkinje e granular (Figura 25B), quando comparado ao grupo controle (Figura 25A).

As células de Purkinje do grupo tratado (Figura 26B) apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 26A) no número de células por campo observado, na distância entre as células e no diâmetro dos núcleos (Tabela 10).

Tabela 9 - Morfometria das camadas corticais do cerebelo de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais no DPN5.

Grupos Experimentais	Espessura das Camadas Corticais (μm)		
	Camada Molecular	Camada de Purkinje	Camada Granular
Grupo Controle	0,99 ($\pm 0,1$)	0,20 ($\pm 0,03$)	1,06 ($\pm 0,2$)
Grupo Tratado	0,94 ($\pm 0,2$)	0,22 ($\pm 0,04$)	1,24 ($\pm 0,4$)

Valores expressos como média \pm desvio padrão da análise de dez campos em quatro lâminas de cada grupo experimental. Sem diferença significativa.

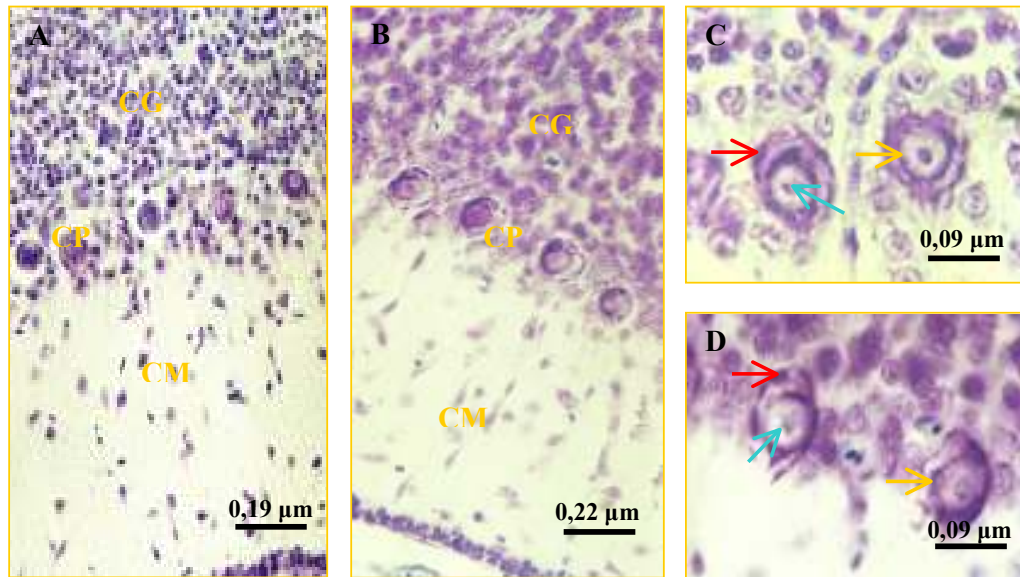


Figura 25 - Secções sagitais das camadas do córtex cerebelar de *Gallus domesticus* no DPN5. Violeta de Cresila. Grupo controle (A e C) e grupo tratado com metilmercúrio (B e D). CP = Camada de células de Purkinje, CM = Camada molecular, CG = Camada granular. (→) Substância de Nissl, (→) Nucléolo, (→) Núcleo.

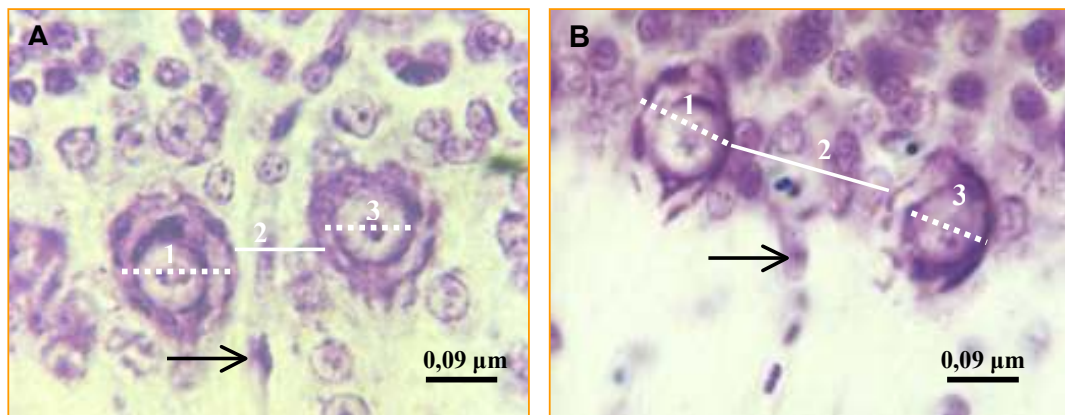


Figura 26 - Secções sagitais da camada de células de Purkinje de *Gallus domesticus* no DPN5. Violeta de Cresila. Grupo controle (A) e grupo tratado com metilmercúrio (B). Diâmetro do corpo celular (1), distância entre as células de Purkinje (2) e diâmetro do núcleo (3). (→) Vaso sangüíneo.

Tabela 10 - Caracterização da camada de células de Purkinje do cerebelo de *Gallus domesticus* nos grupos experimentais no DPN5.

Grupos Experimentais	Células de Purkinje			
	Quantidade de Células	Distância entre as Células (μm)	Diâmetro do Corpo das Células (μm)	Diâmetro do Núcleo das Células (μm)
Grupo Controle	2,90 (\pm 0,60)	0,10 (\pm 0,05)	0,14 (\pm 0,02)	0,10 (\pm 0,03)
Grupo Tratado	2,00* (\pm 0,00)	0,29 (\pm 0,15) *	0,13 (\pm 0,03)	0,08* (\pm 0,02)

Valores expressos como média \pm desvio padrão da análise de dez campos em quatro lâminas de cada grupo experimental. (*) Diferença significativa $P < 0,05$ entre os grupos experimentais.

4.7 Análises Bioquímicas

4.7.1 Níveis de glutathiona (GSH)

Os níveis de glutathiona foram significativamente maiores no cerebelo e no encéfalo dos pintos do grupo tratado com metilmercúrio quando comparados com os animais do grupo controle (Figura 27).

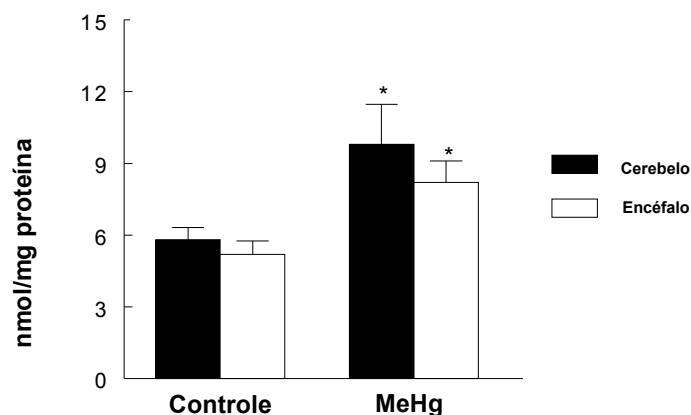


Figura 27 – Níveis de glutatona cerebelar e encefálica em *Gallus domesticus* no DPN5. Valores expressos como média \pm erro padrão ($n = 7$ por grupo experimental). Diferença significativa: (*) $P < 0,05$ entre os grupos experimentais.

4.7.2 Atividade da enzima glutatona redutase (GR)

A atividade da enzima glutatona redutase foi significativamente maior no cerebelo e no encéfalo nos pintos do grupo tratado com metilmercúrio quando comparados com os animais do grupo controle (Figura 28).

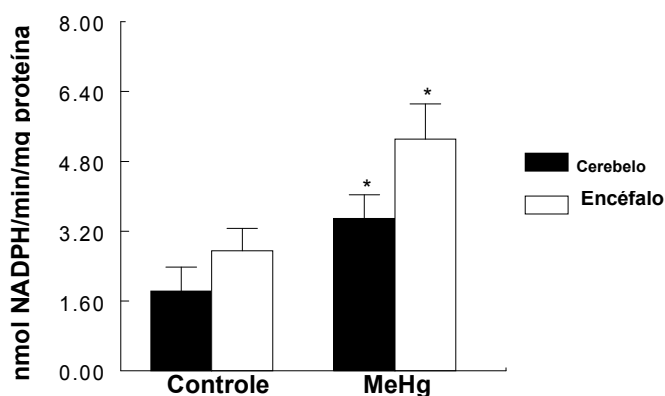


Figura 28 - Atividade da glutatona redutase cerebelar e encefálica em *Gallus domesticus* no DPN5. Valores expressos como média \pm erro padrão ($n = 7$ por grupo experimental). Diferença significativa: (*) $P < 0,05$ entre os grupos experimentais.

4.7.3 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da enzima glutathiona peroxidase foi significativamente maior no encéfalo dos pintos do grupo tratado em relação ao grupo controle. A atividade da glutathiona peroxidase no cerebelo foi maior que no grupo controle, entretanto não houve diferença significativa (Figura 29).

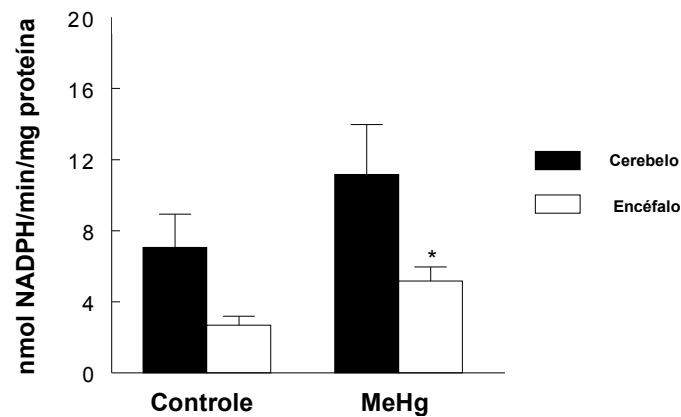


Figura 29 - Atividade da glutathiona peroxidase cerebelar e encefálica em *Gallus domesticus* no DPN5. Valores expressos como média \pm erro padrão ($n = 7$ por grupo experimental). Diferença significativa: (*) $P < 0,05$ entre os grupos experimentais.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos na espécie *Gallus domesticus* o efeito da exposição ao metilmercúrio durante o desenvolvimento, a partir do quinto dia embrionário. Nossos resultados em relação à sobrevivência mostraram que o período de maior susceptibilidade dos embriões foi durante E15 - E21, especialmente entre E19 - E20. ROMANOFF & ROMANOFF (1972) relatam que durante o desenvolvimento embrionário das aves, existem três períodos considerados críticos: até o E4 quando tem início a embriogênese; no E11 quando ocorre a secreção de vários hormônios e respostas proprioceptivas e auditivas (SCANES *et al.*, 1987) e no E19, que de acordo com FREEMAN & VINCE (1974) os embriões se preparam para a eclosão através da maturação muscular, da absorção do líquido do alantóide, da mobilização hepática de glicogênio para fornecer a energia durante a eclosão, e da absorção do restante do saco vitelínico na cavidade abdominal. Além disso, o fato de termos utilizado a injeção de metilmercúrio *in ovo*, via saco vitelínico, estrutura esta responsável por fornecer os nutrientes para o embrião durante o desenvolvimento, pode também ter contribuído para o aumento dos níveis de mercúrio no organismo e conseqüentemente causado a interrupção do desenvolvimento no período muito próximo à eclosão.

Nos estudos de DE WITT e colaboradores (2004), foi mostrado que a vulnerabilidade do embrião da galinha doméstica nos períodos acima relatados pode resultar em morte do embrião, em malformação, ou em processo neuronal anormal, levando a mudanças comportamentais.

Ao avaliarmos o ganho de peso corporal diário dos pintos, ficou evidente que os animais tratados com metilmercúrio apresentaram desde o nascimento ao quinto dia pós-natal, menor peso corporal quando comparado aos animais controle. Esta condição também foi observada em outros estudos realizados com este metal, como os de CARRATÚ e colaboradores (2006), onde ratos machos tratados no período pré-natal com o metilmercúrio na dose de 8 mg/kg no E15, apresentaram diminuição do ganho de peso durante o primeiro ao vigésimo primeiro dia pós-natal. Ratos jovens tratados com metilmercúrio apresentaram redução de peso a partir do nono dia de tratamento (WAKABAYASHY *et al.*, 1995) e ratos adultos tratados durante duas semanas com metilmercúrio apresentaram redução do peso corporal significativa no final do tratamento (FARINA *et al.*, 2003b). Os estudos acima relatados mostram que o metilmercúrio compromete em algum momento o ganho de peso, e conseqüentemente, o crescimento dos indivíduos. De acordo com SAKAMOTO e colaboradores (1998), a perda de peso de ratos adultos após intoxicação por metilmercúrio é um fenômeno típico da anorexia causada por este metal.

Portanto, está evidente que o incremento do peso de animais expostos ao metilmercúrio vem sendo utilizado como um parâmetro de comparação dos índices de toxicidade e vulnerabilidade induzidos ao metal, estando diretamente relacionada à redução de reserva energética e massa muscular, o que compromete o desenvolvimento do aparelho locomotor (CORREA *et al.*, 2004), o

que poderá levar à diminuição do deslocamento ao local do comedouro e ingestão de alimento, causando prejuízos nutricionais e inatividade. Apesar de sua relevância as informações relativas ao peso corporal de indivíduos expostos ao metilmercúrio não devem ser analisadas isoladamente e sim em conjunto com outros parâmetros, como suas características comportamentais, estruturais e bioquímicas, objetivo do presente trabalho.

O repertório comportamental do grupo tratado com metilmercúrio apresentou maior frequência na maioria das categorias observadas, enquanto o grupo controle apresentou maior frequência apenas no movimento exploratório. O aumento da interação social (aproximação dos pintos na caixa-ninho) no grupo tratado pode estar associado à necessidade de termorregulação, de acordo com os estudos de BURGER & GOCHFELD (1994), à ausência da mãe, e também pode ter sido agravada ao fato dos pintos deste grupo exposto ao metilmercúrio apresentarem menos movimentos exploratórios. Também, em estudos em laboratório e em ambiente natural dos efeitos da intoxicação em baixos níveis de chumbo em aves marinhas (BURGER & GOCHFELD, 1995; 2000), foi observado que o chumbo afetou o crescimento, locomoção, equilíbrio, termorregulação e alimentação. Em nosso estudo e nos estudos de BURGER & GOCHFELD acima citados, o fato dos animais do grupo tratado apresentarem maior frequência no movimento de asas pode estar relacionado à tentativa de equilibrar o corpo para a realização de movimentos e também para auxiliar a autolimpeza, devido à necessidade das aves em remover os remanescentes extra-embrionários como as membranas do ovo, vitelo e casca, mostrando que os metais pesados como o metilmercúrio e o chumbo afetam características comportamentais básicas das aves.

Nos testes de campo aberto padrão e campo aberto com imobilização em câmara escura, de um modo geral, os pintos do grupo tratado com metilmercúrio apresentaram período de latência maior e índices menores de atividade exploratória. De acordo com WALSH & CUMMINS, (1976), a imobilidade no campo aberto geralmente indica altos níveis de estresse. Nesse sentido, constatamos que em nosso estudo, o metilmercúrio elevou os níveis de estresse no grupo tratado. Nossos resultados no campo aberto foram bastante semelhantes aos estudos de KIM e colaboradores (2000), em que camundongos expostos ao metilmercúrio no período pré-natal apresentaram maior número de autolimpeza, menor atividade locomotora e número de bolo fecal sem diferença significativa entre os grupos. Também em estudos com galinha doméstica em campo aberto, expostas a um fator estressante (confinamento em local pequeno com água), durante a primeira semana de vida, HEIBLUM e colaboradores (1998) observaram que nos indivíduos submetidos ao estresse, o período de menor latência foi no DPN1 e aumento da atividade locomotora ocorreu a partir do DPN2, retornando ao valor do DPN1 apenas no DPN7. No estudo de DIETRICH e colaboradores (2005), os camundongos adultos expostos ao metilmercúrio nas doses de 20 e 40 mg/l exibiram declínio no comportamento locomotor em campo aberto, e FRANCO e colaboradores (2006a) mostraram em camundongos expostos a este metal no período lactacional apresentaram significativo prejuízo motor no aparelho “rotarod” e redução na atividade motora no campo aberto. Tais autores relatam que os prejuízos locomotores induzidos pela exposição ao metilmercúrio em roedores estão relacionados, ao menos em parte, aos danos cerebelares induzidos por este metal.

A diferença observada entre os grupos experimentais no teste de campo aberto com estímulo em plataforma elevada foi que o grupo tratado apresentou os melhores resultados no segundo dia de teste, entretanto ambos os grupos apresentaram baixo número de pintos que atingiram a plataforma, o que pode estar relacionado ao fato dos pintos de ambos os grupos apresentarem-se saciados e não se sentirem atraídos pelo estímulo “ração”, permanecendo então mais tempo explorando o campo aberto em outras áreas ou em inatividade.

No teste de campo aberto com estímulo em ambos os grupos experimentais, no segundo dia de teste (DPN5) o tempo de latência foi menor e o tempo exploratório foi maior, o que sugere que os dois grupos experimentais estavam mais familiarizados aos novos estímulos. Situação semelhante também foi observada por RIVERO (2005), em *Gallus domesticus* expostos ao acetato de chumbo no quinto dia embrionário e submetidos a este tipo de teste no DPN5 e DPN6, em que o tempo exploratório aumentou no segundo dia nos grupos experimentais, entretanto o tempo de latência diminuiu apenas no grupo controle.

MARÍN e colaboradores (1997), ao estudar o comportamento de pintos no DPN2 no labirinto em “T” após tratamento com baixas doses de diazepam, observaram que estes apresentaram melhor desempenho. 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 maior frequência da alternância espontânea. Deste modo, podemos sugerir que o metilmercúrio possivelmente atua no processo neurocomportamental relacionado ao medo, visto que em nossos resultados obtivemos uma porcentagem pouco representativa de animais do grupo tratado com metilmercúrio que apresentaram o comportamento de alternância espontânea e maior tempo de latência. Estudos

de MELLO e colaboradores (1998), mostraram uma menor porcentagem de animais que apresentaram o comportamento de alternância espontânea no grupo de ratos expostos ao chumbo no período pré-natal, revelando efeito semelhante ao metilmercúrio.

O estudo de DORÉ e colaboradores (2001) mostra que os camundongos expostos ao metilmercúrio no período pré-natal (7º ao 9º dia) necessitaram de maior número de sessões para alternar o braço no labirinto em “T”, quando comparados aos camundongos expostos às mesmas dosagens de metilmercúrio no período pré-natal (12º ao 14º dia), revelando que a aprendizagem e a memória foram alteradas nos animais expostos mais precocemente ao metal. Em nosso estudo, ao comparar o número de indivíduos que alternaram o braço durante os testes de alternância espontânea com e sem estímulo luminoso no labirinto em “T”, observamos que a presença do estímulo luminoso não causou diferença nos resultados dos pintos do grupo exposto ao metilmercúrio e também estes foram inferiores quando comparados ao grupo controle, sugerindo que os pintos do grupo exposto ao metilmercúrio apresentaram alterações visuais. Estudos clínicos em humanos após a exposição crônica ao metilmercúrio revelaram que 60% dos pacientes apresentaram perda da acuidade visual (ISHILKAWA *et al.*, 1979) e constrição do campo visual (HARADA *et al.*, 1978). Também BURBACHER e colaboradores (2005), em estudos com macacos adultos, expostos a este metal durante o período embrionário, verificaram a perda permanente da visão espacial.

Em nosso estudo, a análise morfométrica comprovou o maior espaçamento entre as células de Purkinje no grupo tratado e conseqüentemente uma menor quantidade de células por campo observado, e também menor diâmetro do núcleo. A utilização desta metodologia revelou alterações na espessura das

camadas molecular e granular do córtex cerebelar dos grupos experimentais, comprovando a interferência do metilmercúrio na organização morfológica do cerebelo e, conseqüentemente, na sua fisiologia e no comportamento dos pintos.

No cerebelo de galinha doméstica exposta ao acetato de chumbo RIVERO (2005) observou alterações na distribuição de células nas diferentes camadas, na disposição e no espaçamento entre elas. BERTOSSI e colaboradores (2004), observaram na mesma estrutura em embriões de galinha tratados com metilmercúrio que os neurônios mais severamente afetados estão na camada granular e de Purkinje. O comprometimento na camada granular tem sido bastante documentado tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, entretanto em humanos adultos e ratos no período neonatal e adulto, a camada de Purkinje parece não ser atingida (WAKABAYASHI *et al.*, 1995; SAKAMOTO *et al.*, 1998, 2002). O fato de o metilmercúrio afetar os neurônios da camada de Purkinje em embriões de galinha corrobora com os estudos de que a vulnerabilidade e a sensibilidade ao metilmercúrio variam de acordo com a espécie animal e a idade (WAKABAYASHI *et al.*, 1995; KAKITA *et al.*, 2000 a, b; KIM *et al.*, 2000, BERTOSSI *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, pode-se perceber uma maior intensidade da impregnação do metilmercúrio no cerebelo nos locais correspondentes aos corpos dos neurônios e células gliais da camada granular, seguido da camada de Purkinje e região medular. Intensidade semelhante à camada de Purkinje e região medular também foi encontrada no tegmento do mesencéfalo, entretanto, na camada molecular do córtex cerebelar, local com poucos corpos celulares e ricos em fibras nervosas, pouco se evidenciou a impregnação deste metal, indo de encontro aos estudos realizados em ratos expostos a doses baixas de

metilmercúrio, que apresentaram neurônios predominantemente marcados na medula espinal (MOLLER-MADSEN, 1990) e no cérebro (MOLLER-MADSEN, 1991). De acordo com o estudo de SCHIONNING & DANSCHER (1999), em ratos expostos a doses baixas de mercúrio os principais alvos da impregnação do metal são os neurônios, enquanto que na exposição em períodos longos ou em doses elevadas os principais alvos da impregnação são as células gliais. Tais autores ainda relatam que a distribuição da deposição do mercúrio depende de vários fatores, incluindo o tecido analisado, a dose utilizada, a duração da exposição, o período de sobrevivência após intoxicação, bem como a espécie animal.

SAKAMOTO e colaboradores (2004), analisando lesões cerebrais em ratos, promovidas pela exposição ao metilmercúrio no período neonatal, mostram a evidente perda neuronal na camada granular no córtex cerebelar bem como, degeneração de neurônios também no núcleo vermelho do mesencéfalo. De acordo com WAKABAYASHI e colaboradores (1995), a camada granular do córtex cerebelar, em ratos adultos expostos ao metilmercúrio, é uma região de maior vulnerabilidade, quando comparada a outras áreas cerebrais ou outras idades. A deposição do metilmercúrio em nosso experimento 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 do metilmercúrio no saco vitelínico dos embriões ocorreu no 5º dia, no momento da exposição, ou seja, cinco dias antes da efetivação deste processo, os embriões apresentavam uma proteção hematoencefálica deficiente, o que permitiu mais facilmente a passagem do metilmercúrio. Além disso, ressalta-se a possibilidade da entrada de metilmercúrio ao longo do período E5 - E21, sob a forma de um complexo molecular com o aminoácido cisteína, o qual é facilmente

transportado através de carreadores de aminoácidos neutros (SIMMONS-WILLIS, *et al.*, 2002).

Análises bioquímicas demonstraram uma significativa e positiva correlação entre a atividade da enzima glutathiona redutase e os níveis de glutathiona reduzida, tanto no cerebelo quanto no encéfalo dos pintos do grupo tratado com metilmercúrio. De fato, a exposição ao metilmercúrio parece ter induzido a ativação de todo o sistema antioxidante da glutathiona, aumentando as atividades das enzimas antioxidantes GPx e GR, além de aumentar os níveis de glutathiona no cerebelo e encéfalo. Tendo em vista o importante papel deste sistema antioxidante na proteção do sistema nervoso central contra o dano oxidativo, este aumento representa uma resposta compensatória de proteção para preservar a homeostasia redox nestas estruturas. Neste contexto, muitos trabalhos em roedores têm demonstrado a ativação do sistema antioxidante da glutathiona após insultos pró-oxidativos, inclusive ao metilmercúrio (FRANCO *et al.*, 2006a, b).

Nossos resultados revelaram que a espécie *Gallus domesticus*, nos estágios precoces de desenvolvimento embrionário, são suscetíveis à exposição *in ovo* ao metilmercúrio, sugerindo ser um modelo biológico adequado e efetivo para determinar os mecanismos da toxicidade deste metal pesado durante o processo da embriogênese, em um período relativamente curto. Neste contexto, observou-se uma nítida relação entre danos morfofuncionais no cerebelo, a partir de alterações morfológicas, histológicas e bioquímicas e variáveis comportamentais, principalmente alterações motoras. Este estudo é o primeiro a demonstrar alterações bioquímicas no sistema da glutathiona, danos histológicos e depósito de mercúrio no cerebelo e mesencéfalo de *Gallus domesticus*, associados a alterações motoras após a exposição *in ovo*.

6. Considerações Finais

Nossos resultados mostram que em *Gallus domesticus* no período perinatal é possível observar os efeitos da exposição *in ovo* ao metilmercúrio, sobre a morfologia, bioquímica e comportamento. O metilmercúrio, na dose utilizada além de comprometer a sobrevivência dos embriões e pintos, afetou:

- A morfologia externa em neonatos, causando erros que inviabilizaram a sobrevivência, bem como, a diminuição do peso corporal, peso encefálico e cerebelar;

- O repertório comportamental na caixa-ninho do primeiro ao quinto dia pós-natal diminuindo a frequência dos movimentos exploratórios e aumentando o tempo de inatividade e a frequência dos movimentos anômalos;

- Os testes de campo aberto e a alternância do labirinto em "T" aumentando a latência e diminuindo o número de pintos que realizaram a tarefa;

- A morfologia dos neurônios na região do tegmento do mesencéfalo, na região cortical e medular do cerebelo, regiões onde se verificou a deposição do metal;

- A camada de Purkinje, com maior distanciamento entre as células, menor número destas por campo analisado e diminuição do diâmetro do seu núcleo;

- Os níveis de glutathione no encéfalo e cerebelo, promovendo seu aumento, bem como, nas atividades das enzimas glutathione reductase em ambas as estruturas e glutathione peroxidase no encéfalo.

Faz-se necessário alertar para uma maior conscientização a respeito do uso e da emissão desse metal pesado no meio ambiente, devido sua potencialidade teratogênica multipotente nos organismos vivos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASCHNER, M. (1996). Methylmercury in astrocytes - what possible significance? **Neurotoxicology** 17: 93 - 106.
2. ASCHNER, M.; VITARELLA, D.; ALLEN, J. W.; CONKLIN, D.R.; COWAN, R. S. (1998). Methylmercury induced inhibition of regulatory volume decrease in astrocytes: characterization of osmoregulator efflux and reversal by amiloride. **Brain Research**. 811: 133 - 142.
3. ASCHNER, M.; YAO, C. P.; ALLEN, J. W.; TAN, K. H. (2000). Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. **Neurochemistry International**. 37: 199 - 206.
4. AREY, L. B. (1974). **Developmental Anatomy: A Textbook and Laboratory Manual of Embryology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 695p.
5. AUGER, N.; KOFMAN, O.; KOSATSKY, T.; ARMSTRONG, B. (2005). Low-level methylmercury exposure as a risk factor for neurologic abnormalities in adults. **Neurotoxicology**. 26: 149 -157.
6. BAATRUP, E. & DANSCHER, G. (1987). Cytochemical Demonstration of mercury deposits in trout liver and kidney following methylmercury intoxication: differentiation of two mercury pools by selenium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 14: 129 - 141.
7. BALINSKY, B. L. (1981). **An Introduction to Embryology**. Philadelphia Saunders College Publishing. 5ª Ed. 768p.

8. BEÇAK, W. & PAULETE, J. (1976). **Técnicas de Citologia e Histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos.
9. BERTOSSI, M.; GIROLAMO, F.; ERREDE, M.; VIRGINTINO, D.; ELIA, G.; AMBROSI, L.; RONCALI, L. (2004). Effects of methylmercury on the microvasculature of the development brain. **Neurotoxicology**. 25: 846 - 857.
10. BISINOTI, M. C. & JARDIM, W. (2004). O comportamento do metilmercúrio no ambiente. **Química Nova**, 27: 593 - 600.
11. BORNSCHEIN, R.; PEARSON, D.; REITER, L. (1980). Behavioral effects of moderate lead exposure in children and animal models: Part 2, animal studies. CRC. **Critical Reviews in Toxicology**. 8: 327 - 340.
12. BURBACHER T. M.; RODIER, P. M.; WEISS, B. (1990). Methylmercury developmental neurotoxicity: a comparison of effects in humans and animals. **Neurotoxicology teratology**. 12: 191 - 202.
13. BURBACHER, T. M.; GRANT, K.; SMAYFIELD, D. B.; GILBERT, S. G.; RICE, D. C. (2005). Prenatal methylmercury exposure affects spatial vision in adult monkeys. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 208: 21 - 28
14. BURGER J., GOCHFELD M. (1994). Effects of lead and exercise on endurance and learning in young herring gulls. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 57: 136 - 144.
15. BURGER J., GOCHFELD M. (1995). Effects of varying temporal exposure to lead on behavioral development in herring gull (*Larus argentatus*) chicks. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 52(3): 601 – 608.

16. BURGER J., GOCHFELD M. (2000). Effects of lead on birds (Laridae): a review of laboratory and field studies. **Journal Toxicology Environmental Health Critical Reviews**. 3 (2):59-78.
17. BUTLER, A. B. & HODOS, W. **Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaptation**. New York: Wiley-Liss, 1996. 10ed. 514p.
18. CARLBERG, I. & MANNERVIK, B. (1985). **Glutathione reductase, Methods Enzymol**. 113: 484 - 490.
19. CARRATÚ M. R.; BORRACCI, P.; COLUCCIA, A.; GIUSTINO, A.; RENNA, G.; TOMASINI, M. C.; RAISI, E.; ANTONELLI, T.; CUOMO, V.; MAZZONI, E.; FERRARO, L. (2006). Acute exposure to methylmercury at two developmental windows: focus on neurobehavioral and neurochemical effects in rat offspring. **Neuroscience**. 141 (3):1619-1629.
20. CARVALHO, M.S.L. (2002). **Efeitos do Acetato de Chumbo no desenvolvimento de embriões de gallus domesticus, com ênfase na Morfologia e organização das células Microgliais do telencéfalo**. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
21. CHANG, L. W. (1977). Neurotoxic effects of mercury: A review. **Environment Research**. 14: 329 - 373.
22. CHANG, L.W. & GUO, G. L. (1998). **Fetal Minimata disease: Congenital methylmercury poisoning**, in: SILKLER, W. S. & CHANG, L. W. (Eds.), *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Academic Press, San Diego.
23. CLARKSON, T. W. (1997). The toxicology of mercury. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**. 34: 369 - 403.

24. CLARKSON, T. W. (2002). The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspectives**. 110: Supplement1: 11 - 23.
25. CLARKSON, T. W.; MAGOS, L.; MYERS, G. L. (2003). The toxicology of mercury current exposures and clinical manifestations. **The New England Journal of Medicine**. 349: 1731 - 1737.
26. CORREA, M.; ROIG-NAVARRO, A. F.; ARAGON C. M. G. (2004). Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. **Life Sciences**. 74 (16): 2009-2021.
27. DANBOLT, N. C. (2001). Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**. 65: 1 - 105.
28. DAVIDSON, P. W.; MYER, G. J.; SHAMLAY, C.; COX, C.; WILDING, G. E. (2004). Prenatal exposure to methylmercury and child development: influence of social factors. **Neurotoxicology and Teratology**. 26: 553 - 559.
29. DE WITT, J.C.; MEYER, E. B.; HENSHEL, D.S. (2005). Environmental toxicity using chickens as surrogates for wildlife: effects of injections day. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 48: 270-277.
30. DIAS, P.F., MÜLLER, Y.M.R. (1998). Ação da insulina na morfogênese de embriões de *Gallus gallus domesticus*. **Revista Brasileira de Biologia**. 59 (2): 343 - 350.
31. DORÉ, F. Y.; GOULET, S.; GALLAGHER, A.; HARVEY, P.O.; CANTIN, F. J.; AIGLE, T. D.; MIRAULT, M. E. (2001). Neurobehavioral changes in mice treated with methylmercury at two different stage of fetal development. **Neurotoxicology and Teratology**. 23: 463 - 472.

32. DIETRICH M. O.; MANTESE, C.E.; ANJOS, G.; SOUZA, D. O.; FARINA, M. (2005). Motor impairment induced by oral exposure to methylmercury in adult mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 19: 169 - 175.
33. EDWARDS, J. R.; MARTY, M. S.; ATCHISON, W. D. (2005). Comparative sensitivity of rat cerebellar neurons to dysregulation of divalent cation homeostasis and cytotoxicity caused by methylmercury. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 208: 222 - 232.
34. ELLMAN, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 82: 70 - 77.
35. FARINA, M.; DAHM, K. C. S.; SCHWALM, F. D.; BRUSQUE, A. M.; FRIZZO, M. E. S.; ZENI, G.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B. T. (2003a). Methylmercury increases glutamate release from brain synaptosomes and glutamate uptake by cortical slices from suckling rat pups: modulatory effect of ebselen. **Toxicology Sciences**. 73: 135 - 140.
36. FARINA M.; FRIZZO, M. E. S.; SOARES , F. A. A.; SCHWALM, F. D.; DIETRICH, M. O.; ZENI, G.; SOUZA, D. O. (2003b). Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. **Toxicology Letters**. 144: 351 - 357.
37. FARINA, M.; FRANCO, J.L.; RIBAS, C.M.; MEOTTI, F.C.; PIZZOLATTI, M.G.; DAFRE, A.L.; SANTOS, A.R.S. (2005a). Protective effects of Polygala paniculata extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 57: 1503 - 1508.

38. FARINA M.; CERESER, V.; PORTELA, L. V.; MENDEZ, A.; PORCIÚNCULA, L. O.; FORNAGUERA, J.; GONÇALVES, C. A.; WOFCHUK, S. T.; ROCHA, J. B. T.; SOUZA, D. O. (2005b). Methylmercury increases S100B content in rat cerebral fluid. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 19: 249 - 253.
39. FERGUNSON, S. A. & BOWMAN, R. E. (1990). Effects of postnatal lead exposure on open field behavior in monkeys. **Neurotoxicology and Teratology**. 12: 91 - 97.
40. FLOHÉ, L. & GÜNZLER, F. 1984. **Methods Enzymology**. 105:114 - 121.
41. FRANCO, J L.; TEIXEIRA, A.; MEOTTI, F.C.; RIBAS, C. M.; STRINGARI, J.; S. C.G. POMBLUM; MORO, A. M.; BOHRER, D.; BARROS, A. V.; DAFRE, A.L.; SANTOS, A. R. S.; FARINA, M. (2006a). Cerebellar thiol status and motor deficit after Lactational exposure to methylmercury. **Environmental Research**. 102: 22 - 28.
42. FRANCO, J L.; BRAGA H. C.; NUNES, A. K. C.; RIBAS, C. M.; STRINGARI, J. ; SILVA, A. P.; GARCIA, S. C.G. POMBLUM; MORO, A. M.; BOHRER, D.; SANTOS, A. R. S.; DAFRE, A.L.; FARINA, M. (2006b). Lactational exposure to inorganic mercury: Evidence of neurotoxic effects. **Neurotoxicology and Teratology**. 20: 1- 8.
43. FREEMAN, B. M. & VINCE, M. A. (1974). **Development of the avian embryo: A behavioral and physiological study**. Chapman and Hall, London.
44. GARG, T. K. & CHANG, J. Y. (2005). Methylmercury causes oxidative stress and cytotoxicity in microglia: Attenuation by 15-deoxy-delta 12, 14-Prostaglandin J2. **Journal of Neuroimmunology**. 171(1-2): 17-28.

45. GILBERT, S. F. (2001). **Development Biology**. Massachusetts: Sinauer.
46. GOCHFELD, M. (2003). Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 56: 174 - 179.
47. GONZALES, E. (1994). **Embriologia e Desenvolvimento Embrionário**. In: APINCO. Manejo da Incubação. São Paulo.
48. GOULET, S.; DORE, F. Y.; MIRAULT, M. E. (2003). Neurobehavioral changes in mice chronically exposed to methylmercury during fetal and early postnatal development. **Neurobiology**. 22: 353 - 363.
49. GOUTLIEBB, A.; KEYDAR, I.; EPSTEIN, H.T. (1977). Rodent brain growth stages: An analytical review. **Biology Neonate**. 32: 166 - 176.
50. GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R. F.; DEBES, F.; ARAKI, S. YOKOYAMA, K.; MURATA, K.; SORENSEN, N.; DAHL, R.; JORGENSEN, P. J. (1997). Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicology and Teratology**. 19: 417- 428.
51. GUALLAR, E., SANZ-GALLARDO, M. T. (2002). Mercury, fish Oils, and the risk of myocardical infarction. **The New England Journal of Medicine**. 234: 1747 - 17454.
52. HAMBURGER, V. & HAMILTON, H. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**. 88: 49 - 92.
53. HARADA, M. (1978). Congenital Minimaya disease: intrauterine methylmercury poisoning. **Teratology**. 18: 285 - 288.
54. HEIBLUM, R., AIZENSTEIN, O., GVARYAHU, G., VOET, H., ROBINZON, B., SNAPIR, N. (1998). Tonic immobility and open field responses in

domestic fowl chicks during the first week of life. **Applied Animal Behavior Science**. 60:347 - 357.

55. ISHILKAWA, S., OKAMURA, R., MUKUNO, K. (1979). A simple grating test for contrast sensitivity (Arden Grating Test) with Minamata disease. **Nippon Ganka Gakkai Zasshi**. 83: 336 - 343.

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

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

58. KAKITA, H. A.; WAKABAYASHI, K.; SU, M.; SAKAMOTO, M.; IKUTA, F.; TAKAHASHI, H. (2000 a) Distinct pattern of neuronal degeneration in the fetal rat brain induced by consecutive transplacental administration of methylmercury, **Brain Research**. 859: 233 - 239.

59. KAKITA, H. A.; WAKABAYASHI, K.; SU, M.; Yoneoka, Y.; SAKAMOTO, M.; IKUTA, F.; TAKAHASHI, H. (2000b). Intrauterine methylmercury intoxication Consequence of the inherent brain lesions and cognitive dysfunction in maturity. **Brain Research**. 877: 322 - 330.

60. KIM, C. Y.; NAKAI, K.; KASUNUMA, Y.; SATOH, H. (2000). Comparison of neurobehavioral changes in three inbred strains of mice prenatally exposed to methylmercury. **Neurotoxicology and Teratology**. 22: 397- 403.

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

62. LIN & PEHKONEN, C. J. & PEHKONEN, S. O. (1999). The chemistry of atmospheric mercury: a review. **Atmospheric Environment**. 33: 2067 - 2079.
63. MAGALDI, M. A. (1974). **Construcciones manejo y alimentación**. In: Produccion de aves. Ed. Cathebra, Argentina. 259 - 278.
64. MANFROI, C. B.; SCHWALM, F. D.; CERESER, V. ABREU, F.; OLIVEIRA, A.; BIZARRO, L. ROCHA, J. B. T.; FRIZZO, M. E. S.; SOUZA, D. O.; FARINA, M. (2004). Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. **Toxicological Sciences**. 81: 172 - 178.
65. MARIN, R. H., MARTIJENA, I. D., ARCE, A. (1997). Effect of diazepam and A₁-carboline on open-field and T-maze behaviors in 2-day-old chicks. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 58 (4): 915 - 921.
66. MARQUES, D. (1986). **Manual do incubador**. São Paulo: CASP. 184p.
67. MELLO, C. F., KRAEMER, C. K., FILIPPIN, A., MORSCH, V.M., RODRIGUES, A. L. S. & RUBIN M. A. (1998). Effect of lead on neurobehavioral development of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 31: 943 - 950.
68. MOLLER-MADSEN, B. (1990). Localization of mercury in CNS of rat. II. Intraperitoneal injection of methylmercuric chloride (CH₃HgCl) and mercuric chloride (HgCl₂). **Toxicology Applied Pharmacology**. 103: 303 - 23.
69. MOLLER-MADSEN, B. (1991). Localization of mercury in CNS of rat. III. Oral administration of methylmercury chloride (CH₃HgCl). **Fundamental and Applied Toxicology**. 16: 172 - 187.

70. MANTOVANI, M.; MATTEUSSI, A.S.; RODRIGUES, A.L.S. (1999). Antidepressant-like effect of lead in adult mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 32: 1555 - 1560.
71. NAHAS, T. R. (1999). **O Teste de campo aberto**. In: XAVIER, G. F. Técnicas para o estudo do Sistema Nervoso. São Paulo: Plêiade.
72. ONISHI, B. K. A. (1999). **Coloração de Nissl por Violeta de Cresila**. In: XAVIER, G. F. Técnicas para o estudo do sistema nervoso. São Paulo: Plêiade.
73. OU, Y. C.; WHITE, C. C.; KREJDA, C. M. PONCE, R. A.; KAVANAGH, T. J.; FAUSTMAN, E. M. (1999). The role of glutathione in methylmercury-induced toxicity in embryonic neural cells. **Neurotoxicology**. 20, 793 - 804.
74. PATTEN, B. M. (1951). **Early embryology of the chick**. 4. ed. Philadelphia: Blakiston. 244p.
75. PEDERSEN, M. B.; HANSEN, J. C.; MULVAD, G.; PEDERSEN, H. S.; GREGERSEN, M.; DANSCHER, G. (1999). Mercury accumulations in brains from populations exposed to high and low dietary levels of methylmercury. **International Journal of Circumpolar Health**. 58: 96 - 107.
76. PIRLOT, P. (1976). **Morfología evolutiva de los cordados**. Ed. Omega, S.A. Barcelona. 696p.
77. RISAU, W., WOLBURG, H. (1990). Development of the blood-brain barrier. **Trends in Neurosciences**. 13: 174 - 178.
78. RIVERO, L. B. D.; CARVALHO, M. C.; DALLANHOL, S.; MÜLLER, Y. M. R. (2004). **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.

79. RIVERO, L. B. D. (2005). **Exposição de embriões de *Gallus domesticus* ao acetato de chumbo e seus efeitos sobre a histologia cerebelar e comportamento no período pós-natal inicial.** 79p. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
80. RIVERO, L. B. D.; SCHATZ, J. C.; CARVALHO, M. S. L.; CARVALHO, M. C.; MÜLLER, Y. M. R. (2006). Ação do Acetato de chumbo sobre o padrão de desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology.** 1: 83 - 87.
81. RODRIGUES, A. L. S.; ROCHA, J. B. T.; MELLO, C. F.; SOUZA, D. O. (1996). Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacology & Toxicology.** 79: 150 - 156.
82. ROMANOFF, A. & ROMANOFF, A. (1972). **Pathogenesis of the avian embryo.** John Wiley and Sons Inc., New York.
83. ROMBOLI, I.; MORI, B.; SALAMI, A.; FEDELI - AVANZI, C. (1984). Storage Condition and Hatchability in Muscovy Duck Eggs. Proceedings and Abstracts. **Finnish Branch of the World's Poultry Science Associated.** 218 - 219.
84. SAKAMOTO, M.; NAKANO, A.; KAJIWARA, Y.; NARUSE, I.; FUJISAKI, T. (1993). Effects of methyl mercury in postnatal developing rats. **Environment Research.** 61: 43 - 50.
85. SAKAMOTO, M.; WAKABAYASHI, K.; KAKITA, A.; TAKAHASHI, H.; ADACHI, T.; NAKANO, A. (1998). Widespread neuronal degeneration in rats following oral administration of methylmercury during the postnatal

development phase: a model of fetal-type Minimata disease. **Brain Research**. 784: 351 - 354.

86. SAKAMOTO, M.; KAKITA, A.; WAKABAYASHI, K.; TAKAHASHI, H.; NAKANO, A.; AKAGI, H. (2002). Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat in brain and effects: A study with consecutive and moderate dose exposure throughout gestation and lactation periods. **Brain Research**. 949: 51- 59.
87. SAKAMOTO, M.; KAKITA, A.; OLIVEIRA, R. B.; PAN, H. S.; TAKAHASHI, H. (2004). Dose-dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. **Developmental Brain Research**. 152: 171 - 176.
88. SANTOS, A. M. G. (1999). **Histoquímica de metais pesados**. Coloração de Timm. In: Xavier, G. F. Técnicas para o estudo do sistema nervoso. São Paulo: Editora Plêiade.
89. SCANES, C. G.; HART, L. E.; DECUYPERE, E.; KUHN, E. R. (1987). Endocrinology of the avian embryo: an overview. **The Journal of Experimental Zoology**. Supplement 1: 253 - 264.
90. SCHATZ, J.C. (2003). **Caracterização morfológica de embriões de *gallus domesticus*, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula**. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
91. SCHIONNING, J. D. & DANSCHER, G. (1999). Autometallographic mercury correlates with degenerative changes in dorsal root ganglia of rats intoxicated with organic mercury. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. 107:303 - 310.

92. SCHOENWOLF, G. C. (1999). **The avian embryo: A model for descriptive and experimental embryology.** In: Cell Lineage and Fate Determination. Moody. Academic Press, New York. Pp. 429 - 437.
93. SCORZA, F.A.; ARIDA, R.M.; CYSNEIROS R.M.; SCORZA C.A.; ALBUQUERQUE M.; CAVALHEIRO A. C. (2005). Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. Arquivo de Neuropsiquiatria.vol. 63 nº 2. São Paulo. **Scielo Brasil.**
94. SHANKER, G.; ASCHNER, J.L.; SYVERSEN, T.; ASCHNER, M., (2004). Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. **Brain Research. Molecular Brain Research.** 128: 48 - 57.
95. SIMMONS-WILLIS T. A.; KOH A. S.; CLARKSON T. W.; BALLATORI, N. (2002). Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. **Biochemical Journal.** Oct 1; 367(Pt 1): 239 - 46.
96. SIROIS, J. E. & ATCHISON, W. D. (2000). Methylmercury affects multiple subtypes of calcium channels in rat cerebellar granule cells. **Toxicology Applied Pharmacology.** 167: 1 - 11.
97. STRINGARI, J.; MEOTTI, F.C.; SOUZA, D.O.; SANTOS, A.R.; FARINA, M. (2006). Postnatal methylmercury exposure induces hyperlocomotor activity and cerebellar oxidative stress in mice: dependence on the neurodevelopmental period. **Neurochemistry Research.** 31: 563 - 569.
98. TAKAMATSU, T. & FUJITA, S. (1987). Growth of Notochord and Formation of Cranial and Mesencephalic Flexures in Culture of chick Embryo. **Developmental Growth and Differentiation.** 29 (5), 497- 502.

99. WAKABAYASHI, K., SAKAMOTO, M., SU, M., IWANAGA, K., IKUTA, F. (1995). Variability of brain lesions in rat administered methylmercury at various postnatal developmental phases. **Brain Research**. 705: 267- 272.
100. WALSH, R. N. & CUMMINS, R. A. (1976). The open-field test: a critical review. **Psychology Bulletin**. 83: 482 - 504.
101. WENDEL, A. (1981). **Glutathione peroxidase**. Methods in Enzymology. Vol. 77, 325 - 333.
102. WOLPERT L, BEDDINGTON R, JESSELL TM & LAWRENCE P. (1998). **Principles of development**. NY: Oxford University Press.
103. WHO (World Health Organization -1990). **International Programme on Chemical Safety (IPCS), Environmental Health Criteria**. 101 - Methylmercury. WHO, Geneva.p. 60 - 99.
104. ZAR, J. H. (1999). **Biostatistical Analysis**. 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 918p.