

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO
ORIENTADORA: PROF^a.DR^a. YARA MARIA RAUH MULLER

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE EMBRIÕES DE *Gallus domesticus*, EXPOSTOS AO ACETATO DE CHUMBO, COM ÊNFASE NA SUA AÇÃO EM NÍVEL TECIDUAL E CELULAR NA MEDULA.

JANAÍNA CHAVES SCHATZ

FLORIANÓPOLIS, JULHO DE 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO
ORIENTADORA: PROF^a.DR^a. YARA MARIA RAUH MULLER

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE EMBRIÕES DE *Gallus domesticus*, EXPOSTOS AO ACETATO DE CHUMBO, COM ÊNFASE NA SUA AÇÃO EM NÍVEL TECIDUAL E CELULAR NA MEDULA.

JANAÍNA CHAVES SCHATZ

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, para à obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

FLORIANÓPOLIS, JULHO DE 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.

JANAÍNA CHAVES SCHATZ

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

Orientador

Yara Maria Rauh Müller

Coordenador do Curso

Yara Maria Rauh Müller

Banca Examinadora

Yara Maria Rauh Müller (Presidente)

Adair Roberto Soares dos Santos

Cristine Maria Bressan

Maria Cecília Menks Ribeiro

A Deus

“Se vencemos, Alguém esteve conosco.

Se nada conseguimos, Ele continua junto a nós.

Se persistimos juntos, veremos realmente que

Quem nos fez continuar sorrirá para nós, mesmo que Dele,

na felicidade, nós tenhamos esquecido.”

Aos meus queridos Pais

A vocês, que mesmo distante,

se mantiveram sempre presentes ao meu lado,

amparando-me lutando comigo, agradeço com a mais

profunda admiração amor e respeito.

Ao Dr: Juan Carlos

Agradeço por me guiar e amparar nesta luta

tão árdua, luta de cada dia e por me ensinar com amor os

verdadeiros valores desta vida terrena.

Ao meu amor Eduardo...

*A sua companhia, o seu sorriso, as
suas palavras, e mesmo a sua ausência foram
demonstrações de amor profundo. Muito
obrigada, por todas as vezes que
você me ouviu e me apoiou*

Te Amo...

A Sra: Maria Lenita e ao Sr: José Carlos

Muito Obrigada pelo apoio e

pelo carinho...

Que Deus os abençoe...

AGRADECIMENTOS

A Profa Yara, por sua orientação e dedicação no decorrer deste trabalho e do curso.

A Evelise por sua atenção durante todos os momentos difíceis; e ao Dib pelo auxílio em todas as técnicas e principalmente por toda sua paciência.

A Cristine, obrigada pela ajuda na Imuno-histoquímica, e pelo auxílio nesta etapa final do trabalho...

Ao Professor Paulo, obrigada pelo apoio durante todo este tempo, com certeza o Sr. terá uma excelente defesa de doutorado.

Ao amigo Marcelo pelo início ... e a Márcia, amiga querida de momentos difíceis, obrigada pela ajuda durante todo o mestrado, que Deus te ilumine e proteja...

Aos queridos amigos, Crisley, Marcos e Jacque, com certeza as nossas tardes no laboratório nunca serão esquecidas...você fazem parte da minha história...

As amigas Talita, Liliana por todas as tardes no laboratório...

A amiga Cláudia por toda ajuda nas técnicas do laboratório, principalmente quando faltava algum material...

Ao Nivaldo, obrigada sua colaboração durante estes anos de mestrado.

A Clínica Santa Mônica, pela compreensão e apoio... Aos queridos amigos, Mastroiani, Fabiane, César, Melissa, Lizandra e Bruna, obrigada... A amiga Atená pelas longas horas ao telefone e por sua amizade... A Cecília e Basso pelo auxílio durante todo o percurso... Ao amigo Silvio pela paciência ...

A Empresa de Frangos Macedo, pela doação do material biológico para este estudo.

À Capes pelo apoio financeiro

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Generalidades.....	01
1.2 Morte Celular.....	05
1.3 Toxicidade do Acetato de Chumbo.....	08
1.4 Caracterização das Glia Radial.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Modelo Animal Experimental.....	18
3.2. Características do Ovo.....	18
3.3. Procedimentos com os Ovos e Embriões	20
3.3.1 Condições de Incubação.....	20
3.3.2. Grupos Experimentais.....	20
3.3.3 Análise Morfológica dos Embriões	22
3.3.4 Procedimento Histológico	23
3.3.4.1 Dissecção e Fixação	23
3.3.4.2 Desidratação, Diafinização e Inclusão.....	23
3.3.4.3 Confeção dos Cortes e Desparafinização.....	24
3.3.5 Técnicas para Estudos Tecidual e Celular.....	24
3.3.5.1 Colorações Histológicas.....	24
(A) Hematoxilina e Eosina.....	24
(B) Coloração de Nissl por Violeta de Cresila.....	25
3.3.5.2 Técnica Histoquímica da Autometalografia de TIMM.....	25
3.3.5.3 Técnicas Imuno-Histoquímicas.....	26
(A) Imuno-Histoquímica para Vimentina.....	26

(B) Imuno-Histoquímica para Evidenciar – Apoptose – TUNEL Kit (TdT).....	27
3.3.6 Análise das Lâminas.....	28
3.3.6.1 Determinação dos Locais de Deposição do Acetato de Chumbo e da Localização de Células Apoptóticas.....	28
3.3.6.2 Estereologia dos Cortes Histológicos.....	29
3.3.7 Análise Estatística.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Análise Morfológica dos Embriões Tratados com Acetato de Chumbo.....	30
4.1.1 Análise Morfológica de Embriões Tratados no Terceiro e Quinto dia de desenvolvimento com a dose de 150 µg de Acetato de Chumbo.....	31
4.1.2 Análise Morfológica de Embriões Tratados no Terceiro e Quinto dia de desenvolvimento com a dose de 450µg de Acetato de Chumbo.....	32
4.2 Análise dos Locais de Deposição do Acetato de Chumbo na Medula	40
4.3 Caracterização das Células em Apoptose da Medula após Tratamento com Acetato de Chumbo.....	51
4.3.1 Localização das Células Apoptóticas.....	51
4.3.2 Análise Estereológica das Células Apoptóticas.....	53
4.4 Caracterização das Células da Glia Radial da Medula Espinhal após o tratamento com Acetato de Chumbo.....	64
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÕES.....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho esquemático do ovo de <i>Gallus domesticus</i>	19
Figura 2: Estufa Petersime, modelo Mibo E-1	20
Figura 3: Vista lateral de embrião no terceiro e quinto dia de desenvolvimento embrionário.....	21
Figura 4 : Modelo esquemático da medula para marcação dos locais de deposição do acetato de chumbo e células apoptóticas.....	28
Figura 5 : Graticula de Weibel.....	29
Figura 6 : Análise morfológica dos embriões tratados com a dose de 150µg de acetato de chumbo.....	33
Figura 7 : Análise morfológica dos embriões tratados com a dose de 150µg, de acetato de chumbo.....	33
Figura 8: Análise morfológica dos embriões tratados com a dose de 450µg de acetato de chumbo.....	34
Figura 9: Análise morfológica dos embriões tratados com a dose de 450µg de acetato de chumbo.....	34
Figura 10: Embrião normal de <i>Gallus domesticus</i> no nono dia de desenvolvimento embrionário (E9).	35
Figura 11: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a dose de 150 µg de [Pb (CH ₃ CO ₂) ₂] em E3.	35
Figura 12: : Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a dose de 450µg [Pb(CH ₃ CO ₂) ₂] em E3.	36
Figura 13: : Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a dose de 450µg [Pb(CH ₃ CO ₂) ₂] em E3.	36
Figura 14: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a dose de 450µg [Pb(CH ₃ CO ₂) ₂] em E3.	37
Figura 15: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a dose de 450µg [Pb(CH ₃ CO ₂) ₂] em E3.	37

Figura 16: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a dose de 150µg [Pb(CH ₃ CO ₂) ₂] em E5.	38
Figura 17: : Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a dose de 450µg [Pb(CH ₃ CO ₂) ₂] em E5.	38
Figura 18: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a dose de 450µg [Pb(CH ₃ CO ₂) ₂] em E5.	39
Figura 19: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a dose de 450µg [Pb(CH ₃ CO ₂) ₂] em E5.	39
Figura 20: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a dose de 450µg [Pb(CH ₃ CO ₂) ₂] em E5.	40
Figura 21: Corte esquemático indicando regiões da medula espinhal.....	42
Figura 22: Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a dose de 450µg. Coloração Hematoxilina Eosina.....	43
Figura 23 (A) e (B): Figura: Secção histológica da medula de embrião normal de <i>Gallus domesticus</i> em E9. Técnica TIMM. Contra-coloração Hematoxilina.....	43/44
Figura 24 (A) e (B): Secção histológica da medula de embrião normal de <i>Gallus domesticus</i> em E11. Técnica TIMM. Contra-coloração Hematoxilina.....	44/45
Figura 25: Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E3. Técnica TIMM. Contra-coloração Hematoxilina.....	45
Figura 26: Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E3. Técnica TIMM. Contra-coloração Hematoxilina.....	46
Figura 27: : Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a 450µg de acetato de chumbo em E3. Técnica TIMM. Contra-coloração Hematoxilina.....	46
Figura 28: Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a 450µg de acetato de chumbo em E3. Técnica TIMM. Contra-coloração Hematoxilina.	47
Figura 29: : Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a 450µg de acetato de chumbo em E3. Técnica TIMM. Contra-coloração Hematoxilina.	47

Figura 30 (A) e (B): Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E3. Técnica TIMM. Contra-coloração Hematoxilina.....	48
Figura 31: : Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a 450µg de acetato de chumbo em E5. Técnica TIMM. Contra-coloração Hematoxilina.....	49
Figura 32: : Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a 450µg de acetato de chumbo em E5. Técnica TIMM. Contra-coloração Hematoxilina.	49
Figura 33: : Desenhos esquemáticos indicando a deposição de acetato de chumbo nas medulas dos embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E9 e E11.....	50
Figura 34: Corte esquemático indicando regiões da medula espinhal.....	54
Figura 35(A) e (B) Secção histológica da medula de embrião normal de <i>Gallus domesticus</i> em E9. Técnica TdT. Contra-coloração: Verde de Metila	55/56
Figura 36 (A) e (B): : Secção histológica da medula de embrião normal de <i>Gallus domesticus</i> em E11. Técnica TdT. Contra-coloração: Verde de Metila.....	56
Figura 37: Figura: Secção histológica da medula de embrião normal de <i>Gallus domesticus</i> em E11. Técnica TdT. Contra-coloração: Verde de Metila.....	57
Figura 38 (A) e (B): : Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E3. Técnica TdT Contra-coloração: Verde de Metila.....	57
Figura 39: Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E3. Técnica TdT. Contra-coloração: Verde de Metila.....	58
Figura 40 (A) e (B): Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a 450µg de acetato de chumbo em E3. Técnica TdT. Contra-coloração: Verde de Metila.....	58/59
Figura 41: : Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a 450µg de acetato de chumbo em E3. Contra-coloração: Verde de Metila.....	59
Figura 42: Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E5. Técnica TdT. Contra-coloração: Verde de Metila.....	60

Figura 43 (A) e (B): Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E5. Técnica TdT. Contra-coloração: Verde de Metila.....	60
Figura 44 (A) e (B): Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E5. Técnica TdT. Contra-coloração: Verde de Metila.....	61
Figura 45: : Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a 450µg de acetato de chumbo em E5. Técnica TdT. Contra-coloração: Verde de Metila.....	61
Figura 46: Secções histológicas de medulas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> submetidos a técnica de coloração de Nissl.	62
Figura 47: Cortes esquemáticos indicando a dose de células apoptóticas nas medulas dos embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E9 e E11.	63
Figura 48: Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E3. Técnica de Imuno-histoquímica para a Vimentina. Contra-coloração: Hematoxilina.....	65
Figura 49: Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E3. Técnica de Imuno-histoquímica para a Vimentina. Contra-coloração: Hematoxilina.....	65
Figura 50: : Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E5. Técnica de Imuno-histoquímica para a Vimentina. Contra-coloração: Hematoxilina.....	66
Figura 51: : Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E5. Técnica de Imuno-histoquímica para a Vimentina. Contra-coloração: Hematoxilina.....	66
Figura 52: Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E11, controle. Técnica Vimentina. Técnica de Imuno-histoquímica para a Vimentina. Contra-coloração: Hematoxilina.....	67
Figura 53: : Secção histológica da medula de embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido a 450µg de acetato de chumbo em E3. Técnica de Imuno-histoquímica para a Vimentina. Contra-coloração: Hematoxilina.....	67

Tabela 1 – Demonstrativo dos grupos experimentais, relacionando dia de tratamento, dia de análise, número de medulas submetidos às técnicas histoquímicas.....	22
Tabela 2 – Impregnação do Acetato de Chumbo pela Autometalografia de TIMM em nos cortes esquemáticos nas diferentes regiões das medulas de embriões de <i>Gallus domesticus</i>	42
Tabela 3 – Estereologia das células apoptóticas presentes na medula dos embriões expostos ao acetato de chumbo e dos embriões controle.....	54
Tabela 4 – Distribuição das células apoptóticas nos cortes esquemáticos em diferentes regiões das medulas de embriões de <i>Gallus domesticus</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS

° C	Temperatura em Graus Celsius
Ca ⁺²	Cálcio
Cd	Cádmio
DAB	3'3 Diaminobenzidine
E3	Terceiro dia de desenvolvimento embrionário
E9	Nono dia de desenvolvimento embrionário
E5	Quinto dia de desenvolvimento embrionário
E11	Décimo primeiro dia de desenvolvimento embrionário
g	Gramas
GFAP	Proteína Ácida dos Filamentos Gliais
HH	Estádio embrionário postulado por Hamburger & Hamilton
MCP	Morte Celular Programada
µg	Microgramas
µm	Micrômetros
ml	Mililitros
Pb	Chumbo
[Pb CH ₃ CO ₂) ₂]	Acetato de chumbo
PBS	Tampão Fosfato
PN	Pós-Natal
ppm	Partes por milhão
SNC	Sistema Nervoso Central

RESUMO

O presente estudo caracterizou os efeitos do acetato de chumbo no desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus*, analisando a nível tecidual sua ação na medula. Os animais tratados (n=81) foram divididos em quatro grupos experimentais, conforme a dose de acetato de chumbo (150µg ou 450µg), e de acordo com o dia em que foram tratados (E3 ou E5) e analisados (E9 ou E11). Os grupos controle (n=24) receberam apenas solução salina nas mesmas condições dos tratados. A análise morfológica consistiu na caracterização do padrão normal e alterado do desenvolvimento. Para análise histológica, as medulas dos embriões foram fixadas e submetidas aos procedimentos para microscopia óptica, verificando posteriormente a concentração do metal no tecido neural, bem como a concentração de células em degeneração pela ação do metal e a representatividade das células da glia radial. Foi realizada a análise estereológica das células em apoptose, analisando as diferenças estatísticas da representatividade destas células entre os grupos. A caracterização das células em apoptose e da glia radial foram realizadas através de técnicas Imunohistoquímicas utilizando o Kit para morte celular (TdT FragGel) e o anticorpo anti-vimentina, respectivamente. Para avaliar a impregnação do acetato de chumbo na medula, utilizou-se a técnica histoquímica da Autometalografia de TIMM. Os embriões submetidos ao acetato de chumbo apresentaram desde o desenvolvimento normal até malformações e alterações hemorrágicas em áreas encefálicas e na região lombar da medula espinhal. Quanto a deposição do acetato de chumbo, verificou-se a impregnação do metal de uma forma difusa, tendo uma marcação mais acentuada nas leptomeninges, ao redor do canal medular e regiões da parte ventral da medula, tanto na camada marginal quanto na camada do manto. A marcação mais intensa foi verificada na maior dose (450 µg). As células apoptóticas foram observadas principalmente ao redor do canal central e na região anterior da medula espinhal, registrado tanto nos grupos controle quanto nos grupos tratados. Diferenças estatísticas foram encontradas no grupo E9 450µg quando comparados aos demais grupos, indicando a ação deletéria do acetato de chumbo quando administrados em idades iniciais e em grandes doses. Nas medulas submetidas a técnica da vimentina, obtivemos marcação positiva apenas nos grupos tratados na dose de 150µg, não obtendo nos demais. Em conclusão verificamos, que o acetato de

chumbo é um agente causador de alterações morfológicas no embrião de *Gallus domesticus* e conseqüentemente de alterações histológicas relativas a sua impregnação, tanto a nível tecidual quanto a nível celular.

ABSTRACT

This study characterized the effects of lead acetate in the development of embryos of *Gallus domesticus*, analyzing its action on the tissues of the medulla. Embryos exposed to lead acetate (n=81) were divided into four experimental groups, according to the dose (150 μ g ou 450 μ g), day of treatment (E3 or E5) and analyzed (E9 and E11). The control group (n=24) was exposed to a saline and maintained under the same conditions as the experimental groups. Morphological analysis consisted of the characterization of the normal and altered patterns of development. The medullas were fixed and submitted to procedures of optical microscopy. Aspects such as the concentration of lead in the neural tissue, the amount of degenerating cells due to the action of the metal, and the abundance of the cells of radial glia were investigated. The stereology of the apoptotic cells was analysed, and the amount of these cells per group was compared statistically. The identification of apoptotic cells and the radial glia was performed immunohistochemically, with a cell death detection kit (TdT FraGel - Oncogene) and an anti-vimentin antibody, respectively. The lead acetate impregnation was evaluated with TIMM's Autometallography histochemical technique. Embryos treated with lead acetate presented different responses to the substance, ranging from a normal state to malformations and hemorrhagic alterations in the encephalic areas and the lumbar region of the spinal medulla. As for the lead acetate deposition, impregnation of the metal was diffuse, with stronger labeling in the leptomeninges surrounding the medullar channel and regions of the ventral part of the medulla, both in the marginal layers and the mantle. The strongest labeling was observed in the group that received the largest dose (450mg). Apoptotic cells were located mainly around the central channel and the anterior region of the spinal medulla of the control and experimental groups. Statistical differences were observed in the E9-450 μ g groups, when compared to the other groups, suggesting that the deleterious action of the lead acetate is stronger when larger doses administrated in earlier stages of embryonic development. In the medullas submitted to the vimentin technique, positive labeling was obtained only in the groups treated with a 150 μ g dose. In conclusion, we verified that the lead

acetate is an agent that causes morphological alteration in the embryo of *Gallus domesticus* thus resulting in histologic alterations related to its impregnation, both on tissue and cells.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

O desenvolvimento embrionário na maioria dos vertebrados é bastante semelhante nas fases iniciais do desenvolvimento, a partir do qual os processos tornam-se espécie-específicos, definindo padrões característicos de cada espécie (GILBERT, 2001).

Nas aves a formação de estruturas embrionárias primitivas precede a postura do ovo sendo que o processo de desenvolvimento só terá continuidade, em ambiente natural ou experimental, se existirem condições favoráveis a expressão gênica e fenotípica do programa de morfogênese e organogênese estabelecidos para a espécie (WOLPERT, 1998).

No ovo da galinha doméstica o processo de gastrulação inicia antes da postura sendo possível reconhecer neste momento o blastoderma, estrutura embrionária constituída por duas camadas celulares, e epiblasto e o hipoblasto (GILBERT, 2001).

Para que após a postura o desenvolvimento embrionário possa ter continuidade é necessário, incubar os ovos das aves e, em *Gallus domesticus*, o período de incubação dos ovos na temperatura de 38°C é de 21 dias (GARCIA *et al*, 2001).

Durante as primeiras horas de incubação, dá-se continuidade a gastrulação e deste processo resultará uma intensa migração de células mesodérmicas, que passarão a ocupar o espaço existente entre as demais camadas. Esta migração ocorre através da linha primitiva, sendo a estrutura mais evidente e característica da gastrulação de aves, répteis e mamíferos (BALINSKI, 1981).

Através de processos indutivos (CATALÃ, 2003), a notocorda e a mesoderme adjacente induzem a porção dorsal do ectoderma a diferenciar-se em ectoderma neural, onde as células tornam-se distintas das demais, principalmente por adotarem a forma cilíndrica com o núcleo posicionado próximo à região basal da célula, constituindo a placa neural. As células que originarão a epiderme apresentam forma pavimentosa, não possuindo função neural ou propriedades migratórias (HEMMATI-BRINVALOU & MELTON, 1997).

Em embriões de *Gallus domesticus*, a formação da placa neural inicia com 16-18h de incubação e em 24h, as pregas neurais da região cefálica começam a se aproximar, induzindo a fusão de suas extremidades. A organização do tubo neural não ocorre simultaneamente ao longo de todo eixo corporal, sendo que em embriões de 27 horas, a região cefálica do tubo neural apresenta-se alargada quando comparada com regiões mais caudais, estando o processo de neurulação mais adiantado na região anterior. O tubo neural é composto por uma única camada de células neuroepiteliais em fases assincrônicas do ciclo mitótico (HAMBURGER & HAMILTON, 1951; AREY, 1974).

As células do neuroepitélio através de proliferação e migração celular formam uma segunda camada, a Zona Intermediária ou do Manto, local de diferenciação de células neurais e gliais. A terceira camada a se organizar é a Zona Marginal, formada principalmente por prolongamentos celulares (JACOBSON, 1991; GILBERT, 2000).

Em decorrência do alongamento do corpo do embrião ocorrem flexuras neurais e o movimento de rotação em torno do próprio eixo, sendo estes eventos importantes para a diferenciação do sistema nervoso (GOODRUM & JACOBSON, 1981). Os eventos morfogenéticos se devem em grande parte à intensa atividade proliferativa das células precursoras dos neurônios e da glia (LENT, 2002).

Na região anterior do tubo neural dos embriões de aves, são claramente visíveis a partir de 33 a 38 horas de incubação (10 HH), as três vesículas cerebrais primárias, o

Prosencéfalo, o Mesencéfalo e o Rombencéfalo (HAMBURGER & HAMILTON, 1951; PATTEN, 1951; WISCHNITZER, 1980).

Com 38h de incubação as três vesículas cerebrais primárias dividem-se formando cinco vesículas as quais irão se diferenciar nas regiões características no cérebro adulto, sendo que, o prosencéfalo subdivide-se formando telencéfalo e diencéfalo, o mesencéfalo não se divide, e o rombencéfalo divide-se para formar o metencéfalo e mielencéfalo (HAMBURGER & HAMILTON, 1951).

No terceiro dia de desenvolvimento (estádio 20 HH), observam-se 37 ou mais pares de somitos posicionados ao longo da região dorsal do corpo, a cabeça apresenta-se grande em relação ao tronco e vesícula óptica com pigmentação tênue. Os membros posteriores são relativamente maiores que os anteriores (HAMBURGER & HAMILTON, 1951; PATTEN, 1951)

No quarto dia de desenvolvimento (estádio 23 HH), o embrião apresenta somitos atingindo a extremidade da cauda, vesícula óptica com pigmentação evidente, membros anteriores e posteriores do mesmo tamanho. No quinto dia as cinco vesículas encefálicas apresentam-se bem discerníveis (HAMBURGER & HAMILTON, 1951; PATTEN, 1951).

As células neuroepiteliais que estão presentes na camada proliferativa são consideradas multipotentes, gerando os neuroblastos (precursores de neurônios) e glioblastos (precursores das células da glia) (JACOBSON, 1991; GARCIA & FERNANDEZ, 2001).

Em decorrência do processo de neurogênese, na região anterior do tubo neural, os neurônios se organizam em seis camadas, e nestas há interação com axônios em crescimento para formar o circuito neuronal cerebral. Estudos de genética molecular indicam que a migração celular no SNC está relacionada ao estabelecimento da identidade celular, migração ordenada e agrupamento em camadas neuronais (HATTEN, 1999).

A região posterior do tubo neural não se dilata e dará origem a medula espinhal, estrutura que em embriões bem como em adultos, mantêm o padrão básico de três camadas, e é considerada uma região conservativa do sistema nervoso dos vertebrados (TANABE & JESSEL, 1996; GILBERT, 2000).

Para que o processo de neurogênese ocorra é fundamental a participação das células da glia radial, sendo que estas proliferam intensamente antes da migração neuronal. Com o início da migração, elas tornam-se mitoticamente inativas, garantindo a estrutura necessária para o deslocamento dos neuroblastos (GOTZ *et al.*, 2002).

A proliferação dos neuroblastos é superior as necessidades definitivas do sistema, sendo que os neurônios estabelecem sinapses com outros neurônios, havendo uma competição pelos alvos, onde uma pequena parte destas células torna-se funcional e as outras células serão eliminadas por morte celular (CATALÃ, 2003).

Após os axônios terem atingido seu alvo e ter iniciado estabelecimento das sinapses, ocorre um progressivo declínio do número de axônios pré-sinápticos e de neurônios. A morte celular reflete a competição por fatores tróficos, substâncias essenciais ao desenvolvimento que são fornecidos em quantidades limitadas pela célula-alvo (BEAR *et al.*, 2002).

O sistema nervoso em desenvolvimento pode ser alvo de muitos agentes tóxicos, sendo que a permeabilidade vascular está relacionada a toxicidade neonatal, produzindo danos estruturais em diferentes regiões e estágios distintos do desenvolvimento (COLE & LEE, 1997).

Diversas substâncias quando administradas no decorrer da embriogênese alteram o padrão normal de desenvolvimento, desencadeando malformações características, como a insulina, que em embriões de *Gallus domesticus*, causa nanismo ou atraso no desenvolvimento (DIAS & MÜLLER, 1999).

Heaton e Bradley (1995) observaram que a exposição crônica ao etanol no período pré-natal de embriões de galinhas reduziu a atividade neurotrófica havendo perda dos motoneurônios particularmente entre os estágios E9-E11 e após o período de morte celular em E12, havendo uma redução acentuada no número de motoneurônios presentes na coluna lateral motora, conseqüentemente diminuindo a motilidade embrionária.

Antonio e colaboradores (1999), estudaram a ação do cádmio (Cd) e do chumbo (Pb) no cérebro de ratos, durante o período gestacional e lactacional. Os autores verificaram que os níveis de Pb e Cd era menor quando administrados em conjunto, do que administrados independentemente. Uma possível explicação para esta ação é a competição dos locais de absorção, devido à expressiva afinidade dos metais aos canais de cálcio. Nos grupos tratados também foi observada uma diminuição dos níveis de dopamina no metencéfalo.

1.2 Morte Celular

Durante as duas últimas décadas, o mecanismo da morte celular programada (MCP) tem sido extensivamente reconhecida como uma característica do desenvolvimento normal. Estudos pioneiros de Hamburger & Levi-Montalcini citados por Oppenheim (1991), em embriões de galinha foram fundamentais para demonstrar que a eliminação de células neuronais por morte celular programada é essencial para o funcionamento adequado do SNC.

A apoptose é descrita como um mecanismo de morte celular programada sendo um processo regulado por um conjunto de genes os quais são ativados pela presença ou ausência de sinais específicos, que podem ser influenciados consideravelmente por estímulos externos. Apresenta características próprias, podendo ser geneticamente regulada e evidenciada por características morfológicas, que consistem na redução ou compactação e condensação

nuclear, e eventos bioquímicas que resultam na fragmentação de DNA (LOWRIE & LAWSON, 2000).

A apoptose não ocorre ao acaso em todos os tecidos, sugere-se que ocorra preferencialmente em células envelhecidas, danificadas ou excessivas, sendo uma possível proteção contra doenças (BURSCH *et al.*, 1992).

Na medula espinhal lombar de aves, os motoneurônios começam a ser eliminados no sexto dia embrionário, seu número começa a tornar-se estabilizados em E12, correspondendo a 55% das células iniciais, não havendo posteriormente alterações significativas no número de neurônios (CALDERO *et al.*, 1998). Na região cervical há uma expressiva morte celular em E4, antes do período de contato com os alvos, seguindo por uma segunda MCP, levando a uma perda total de 85% (YAGINUMA *et al.*, 1996).

As proteínas dão suporte a sobrevivência neuronal pela interação com receptores da superfície da célula, sendo que a mais conhecida é a neurotrofina denominada Fator de Crescimento dos Nervos (NGF), que está presente tanto no sistema nervoso central quanto periférico. As quantidades excessivas de neurônios que são produzidos competem pela limitada quantidade de NGF, e esta competição produz uma redução no número de neurônios (GERHART & KIRSCHNER, 1997; WOLPERT, 1998).

Evidências morfológicas indicam que tipos de morte celular como apoptose e necrose podem coexistir em tecidos lesados. A dose e o tipo da lesão determinam a extensão em que a apoptose e a necrose ocorrem, em baixas doses pode haver o predomínio de apoptose e em altas doses o de necrose; em fígados de ratos expostos a doses subnecrogênicas (10 mg/Kg) de dietilnitrosamina (DEN) foram observadas alterações apoptóticas enquanto que as necróticas foram registradas em maiores doses (100 mg/Kg) (DAOUST & MORAES, 1986).

Durante o processo de apoptose, acredita-se que a mitocôndria tenha uma participação ativa, liberando o citocromo c dentro do citosol (DESAGER & MARTINOU, 2000). A

liberação mitocondrial de citocromo c é o maior alvo para as proteínas antiapoptóticas tais como, Bcl-2 e BCL-xl que podem bloquear a liberação de citocromo c da mitocôndria e, por conseguinte a ativação da caspase 3 (KLUCK *et al.*, 1997).

Muitas técnicas tem sido usadas para marcar a morte celular, dentre elas principalmente as baseadas na integridade nuclear de DNA. No decorrer do processo de morte celular, as endonucleases ativadas por $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ digerem o DNA. A degradação do DNA genômico indica um estágio irreversível de morte celular (TOMINAGA *et al.*, 1993).

Louw e colaboradores (2002) investigaram a apoptose na camada marginal da porção cervical da medula espinhal de ratos, durante o segundo, quinto e oitavo dia pós-natal. As células apoptóticas foram marcadas usando TUNEL e caspase-3, e mostraram-se distribuídas difusamente na substância branca da medula. Em P2 havia um número reduzido de células apoptóticas, quando comparadas ao registrado em P8.

A coloração de Violeta de Cresila associado ao método de TUNEL e Hoeschst, foram utilizados para avaliar células apoptóticas, em lesões traumáticas na medula espinhal de pacientes que morreram entre três horas a dois meses após a lesão medular. Verificou-se a presença de células apoptóticas principalmente nas bordas das lesões da substância cinzenta e na substância branca nas regiões dos tratos ascendentes (EMERY *et al.*, 1998).

Em ratos, após a contusão da medula espinhal, foi observado apoptose na substância branca, em locais distantes do foco da lesão, associada ao processo degenerativo de fibras, comprometendo os oligodendrócitos, e a perda destas células está associada com desmielinização dos axônios que sobrevivem ao trauma. Nestas situações há uma reativação microglial induzida por sinais emitidos pela degeneração de axônios, ou pelo próprio oligodendrócito sendo este fagocitado pela microglia (SHUMAN *et al.*, 1997).

Doenças autoimunes estão relacionadas com a diminuição de células apoptóticas, enquanto que o aumento excessivo destas células estão ligadas principalmente a doenças

neurodegenerativas e parte da destruição tecidual que ocorre após oclusões vasculares no cérebro e coração (KAUFMANN & HENGARTNER, 2001).

O chumbo pode também induzir, de acordo com Sharifi e colaboradores (2002) apoptose através de uma intoxicação aguda. Os autores verificaram a ação do acetato de chumbo em ratos Wistar jovens e adultos. A análise foi realizada no hipocampo, onde foi demonstrado que os ratos jovens, tanto tratados quanto controles tinham mais células apoptóticas do que adultos. Através da técnica de Western blotting, verificou-se a expressão da proteína Bax e Bcl-2, onde houve alteração de Bax, tendo quantidades significativamente maiores em relação ao controle, não havendo alteração da Bcl-2. Nos jovens tratados, houve uma expressão aumentada da proteína Bax em relação aos adultos, o que indica que o chumbo é um metal neurotóxico que induz a apoptose em hipocampo de rato *in vivo* de maneira idade dependente.

1.3 Toxicidade do Acetato de Chumbo

A contaminação por chumbo tem sua origem principalmente nas emissões atmosféricas, tendo o ar como o principal meio de transporte e distribuição deste metal, e grandes quantidades de chumbo tendem a localizar-se na vizinhança de fontes geradoras como indústrias de baterias (ARAÚJO *et al.*, 1999), sendo importante a análise da camada superficial do solo, para avaliar o impacto causado pela contaminação do chumbo (ABREU *et al.*, 1998; LEWIN *et al.*, 1999).

O chumbo e o seu sulfato são pouco absorvidos e praticamente inócuos, no entanto os sais solúveis de chumbo como o cloreto, o nitrato e o acetato de chumbo, são considerados venenos muito ativos (COLE & LEE, 1997).

Enquanto que a inalação é a principal forma de absorção em indivíduos adultos expostos por meios ocupacionais, a principal forma de absorção em crianças é por via gastrointestinal. Os adultos absorvem em média 10-15% de chumbo na alimentação e as crianças 40-50%. Nas gestantes, o chumbo pode atravessar a barreira placentária durante a gestação, tendo um efeito cumulativo sobre o feto até o nascimento (HENRETIG *et al.*,1998).

Quando comparados aos adultos, as crianças apresentam grande suscetibilidade aos agentes tóxicos como o chumbo, devido em muitos aspectos ao seu metabolismo, que incluem uma maior absorção intestinal, metabolismo ósseo aumentado, e o rápido desenvolvimento do sistema nervoso. Em crianças desnutridas, com deficiência de ferro e baixa dieta de cálcio, a absorção do chumbo é aproximadamente cinco vezes maior do que em adultos (MAFAFFEY, 1990)

Chahoud e colaboradores (1999) estudaram a correlação entre toxicidade materna e a toxicidade materno/fetal em ratas Wistar e verificaram que a porcentagem de fetos com anomalias foi significativamente maior nos grupos tratados quanto comparados ao controle. No entanto os autores consideram que não se pode ainda afirmar que exista uma relação direta entre a toxicidade materno/fetal, pois há necessidade de realizar estudos complementares comprovando estes resultados.

Kishi e colaboradores (1982) verificaram que a quantidade de chumbo presente em ratos jovens foi maior do que em adultos. Nos jovens as concentrações de chumbo no córtex, cerebelo e medula oblonga foram mais intensas, sendo que uma possível explicação para as elevadas concentrações de chumbo no córtex e cerebelo em ratos jovens, pode ser o fato de a barreira hematoencefálica estar pouco desenvolvida.

Em seres humanos o primeiro trimestre da gestação é considerado um período de grande vulnerabilidade a agentes tóxicos, ocasionando principalmente malformações graves. Malformações consideradas menores ou anomalias podem ser resultantes de uma exposição

em períodos mais tardios. Seriam necessárias avaliações precoces do sangue materno e do cordão umbilical, a fim de correlacionar os níveis do chumbo no sangue com índices de mortalidades e malformações (ERNHARDT, 1992).

A exposição ao chumbo durante períodos iniciais do desenvolvimento pode causar deficiências neurológicas, as quais podem comprometer a sobrevivência e alterar a expressão de moléculas de adesão celular (CAMs), responsáveis pela formação e manutenção da estrutura neural e função sináptica (DEY *et al.*, 2000). Estes autores examinaram possíveis alterações na adesão de moléculas NCAM, L1 e N-caderinas no cérebro de gaiivotas após a exposição ao acetato de chumbo. Verificou-se alteração na expressão das moléculas de acordo com a idade, sendo que a N-caderina foi substancialmente modificada, havendo 44% de redução no 34º dia e 61% no 44º dia. Concomitantemente houve um aumento na expressão da NCAM no 34º dia pós natal, e os níveis de L1 foram baixos neste dia, mantendo-se os mesmos níveis nos outros dias analisados. Alterações em moléculas como NCAM e N-caderinas coincidem temporalmente com anormalidades relacionadas ao comportamento de aprendizado nestas aves sugerindo uma relação causal ou não entre estes dois fenômenos.

Needleman e colaboradores (1990) estudaram 132 adultos jovens expostos a baixa dose de chumbo durante a infância. Os jovens que apresentaram maiores níveis de chumbo na dentina (acima de 20 ppm) tiveram um maior risco de reprovação e dificuldades de leitura. Os altos níveis de chumbo na infância também foram associados a um menor tempo de estudo, vocabulário restrito, reduzida capacidade de coordenação motora e maior tempo de reação a estímulos. Estes autores concluíram que exposição ao chumbo na infância é associada com deficiências no funcionamento do sistema nervoso central que persistem na vida adulta.

Outras evidências a cerca da intoxicação crônica pelo acetato de chumbo, foram estudadas por Mello e colaboradores (1998) onde se observaram alterações significativas no desenvolvimento de ratos, acelerando a abertura dos olhos e adiantando o início dos reflexos.

Rehman (1984); Henretig e colaboradores (1998) pesquisaram a ação do acetato de chumbo na água ingerida pelos ratos, durante dez dias, e mostraram que houve um aumento significativo nas concentrações do metal em todas regiões cerebrais, sendo os locais mais atingidos, em ordem decrescente, a medula espinhal, cerebelo, córtex cerebral e tronco encefálico. A captação do metal no cérebro fetal é relativamente maior que a exposição pós-natal, sendo as concentrações do chumbo maiores no hipocampo, cerebelo, córtex cerebral e medula.

O efeito da exposição simultânea e precoce a baixos níveis de chumbo e outros metais como o cádmio, mostraram que estes aumentam o comportamento de ansiedade dos ratos adultos analisados no labirinto em cruz elevado, em conjunção com aumento nos níveis de dopamina e serotonina (LERET *et al.*, 2003).

Schneider e colaboradores (2001) pesquisaram como os fatores ambientais poderiam influenciar o desenvolvimento de ratos após o contato com o chumbo. Os resultados mostram que o crescimento em um meio enriquecido (com brinquedos infantis), pode atenuar os efeitos do chumbo, quando avaliados o quesito aprendizado e memória. Houve um aumento na síntese de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), NGF (fator de crescimento de nervos), FGF (fator de crescimento básico de fibroblasto) e NT-3 (neurotrofina 3), quando examinados a região dorsal do hipocampo. O BDNF está relacionado com a sobrevivência neuronal, brotamento axonal e sinaptogênese, juntamente com os demais possui uma importante função mediando a plasticidade neuronal relacionada ao aprendizado, memória e cognição.

O chumbo em combinação com o cádmio foi administrado em hamsters no oitavo dia de gestação, sendo verificadas malformações como exencefalia, agenesia ou disgenesia dos órgãos, artérias umbilicais e genitália externa (HILBELINK & KAPLAN , 1986). Em aves o chumbo administrado no sétimo dia de incubação, causou malformações de face, hidrocefalia, alterações nos membros e redução da eclosão (ANWER *et al.*, 1988).

Estudos têm demonstrado que, uma única exposição ao chumbo durante o período embrionário de aves, resulta em significativas alterações no sistema imune. Foram administrados na câmara de ar de ovos de galinha doses subletais de chumbo (200µg/ ovo) em quatro estágios de desenvolvimento (E5, E7, E9 e E12). A imunotoxicidade foi avaliada entre a quinta e sexta semana do período pós-natal, e os resultados indicam que a produção de interferon- γ (INF- γ) foi significativamente suprimida (medido apenas em E7 e E9) e a produção de óxido nítrico por macrófagos foi significativamente diminuída em E5, E7 e E9. Verificou-se que a introdução de chumbo nas idades mais tardias causou diminuição nas células T, enquanto que os embriões expostos em períodos iniciais evidenciaram principalmente alterações macrofágicas (LEE *et al.*, 2001)

A administração diária do acetato de chumbo em galinhas levou a uma intoxicação crônica e durante o período em que as galinhas sobreviveram, foram feitos controles da função motora e da velocidade da condução nervosa. Após vinte e cinco semanas foram observadas os primeiros sinais de intoxicação como: anemia, fraqueza motora e diarreia, sendo as galinhas sacrificadas. Observou-se um conjunto de alterações repetidas durante todo o processo de toxicidade pelo metal, consistindo em falha na amplitude da resposta motora, degeneração de neurônios motores da medula espinhal, perda de axônios motores e atrofia muscular, sendo que padrões similares são registrados em doenças do neurônio motor em humanos (MAZLIAH *et al.*, 1989).

A neuropatia periférica é um outro efeito bem conhecido da toxicidade severa ao chumbo. Altos níveis de exposição podem resultar em neuropatia motora que se manifesta com fraqueza e paralisia das extremidades extensoras das mãos e pés. Histopatologicamente apresenta-se como desmielinização segmentar axonal e degeneração. Níveis sanguíneos abaixo de 0.96 $\mu\text{mol/L}$ de chumbo em crianças tem sido associadas com alteração da função nervosa periférica, mostrando uma condução motora nervosa diminuída (SCHWARTZ *et al.*, 1988).

Concentrações micromolares de chumbo induzem a morte neuronal através de apoptose em células granulares no cerebelo de rato. Este efeito pode ser impedido pelos antagonistas de canais Ca^{2+} indicando que a entrada de Pb^{2+} dentro das células, ou alternativamente o influxo de cálcio pode ser importante para este efeito (OBERTO *et al.*, 1996). O chumbo isolado ou em conjunto com o glutamato induz a fragmentação de DNA em células de neuroblastoma humano, em 48 e 72 horas após o início da exposição (NAARALA *et al.*, 1995).

O chumbo e o glutamato, bem como sua combinação, provoca a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e induz estresse oxidativo em células do sistema nervoso. Estes eventos parecem estar associados com aumento da letalidade neuronal, através de mecanismos necróticos e apoptóticos. A citotoxicidade, a morte celular por necrose ou apoptose parecem depender da dose que é administrada (SAVOLAINEN *et al.*, 1998)

O chumbo induz alterações na expressão da proteína ácida dos filamentos gliais (GFAP), proteína presente no astrócito maduro, sendo que no imaturo a proteína característica é a vimentina. Em ratos tratados com chumbo durante o período peri-natal e pós-natal, havia elevação no nível de GFAP até o vigésimo dia pós-natal (PN 20), alterando o padrão normal, quando que o aumento esperado seria entre PN 9 e PN 15. Estes resultados demonstram que a exposição ao chumbo pode alterar o período da diferenciação e maturação

astrocitária no cérebro, indicando existir um mecanismo protetor contra a neurotoxicidade (HARRY *et al.*, 1996).

1.4 Caracterização das Células da Glia Radial

O nome glia radial é devido a duas características, o longo prolongamento radial e propriedades de células (astro)gliais. Suas características morfológicas foram primeiro descritas por Camilo Golgi (BENTIVOGLIO & MAZZARELLO, 1999) e suas características astrogliais, foram descobertas apenas ao final do século XX, quando métodos imunohistoquímicos revelaram a expressão de GFAP nos prolongamentos radiais de células em desenvolvimento no córtex cerebral em primatas.

Filamentos intermediários são os maiores constituintes de todos os tecidos *in situ* nos organismos e em cultura de células. Eles podem ser reconhecidos pelo seu diâmetro de 7-11 nm, segundo estudos imunológicos e bioquímicos podem ser subdivididos em cinco grupos: 1 - citoqueratinas, 2 - fibras de desmina, típicos de certas células musculares, 3 - filamentos gliais, típicos de astrócitos, 4 - neurofilamentos característicos de neurônios e 5 - filamentos de vimentina, típico de várias células não epiteliais e descritas como células de origem mesênquimais (OSBORN *et al.*, 1982).

As características morfológicas da glia radial são definidas por um núcleo na zona ventricular, pequenos prolongamentos se estendendo para superfície ventricular com largas porções terminais, finos prolongamentos radiais se estendendo para superfície externa e freqüentes contatos com vasos sanguíneos (NOCTOR *et al.*, 2001)

O neurônio se mantém aderido à célula glial através de muitas proteínas, sendo a mais importante uma proteína de adesão chamada de astrotactina. Os mecanismos pelos quais os

movimentos de neurônios ocorrem apenas em uma direção e como estes são informados para atingir a glia radial ainda são pouco conhecidos (GILBERT, 2000).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso em vertebrados é reconhecido que ocorrem em neurônios e glia, transições na expressão de proteínas do filamento intermediário, e que mudanças na maturação deste filamento pode ser crucial na função de células do SNC (COLE & LEE, 1997).

Anticorpos anti-vimentina marcam a proteína constituinte do filamento intermediário de origem mesenquimal denominada vimentina, sendo esta encontrada em estágios iniciais do desenvolvimento; estudos na medula espinhal de embriões de *Gallus domesticus*, indicam que a expressão da vimentina ocorre em E7, sendo inicialmente observada no quadrante ventral e em E11 em níveis mais reduzidos, tendo em grande parte desaparecido em E13 (COLE & LEE, 1997). Rezaie e colaboradores (1999), demonstraram que em embriões de nove dias, a glia radial na medula espinhal é imunorreativa à vimentina.

Estudos em ratos, demonstraram o desaparecimento das células gliais corticais positivas ao anticorpo monoclonal anti-vimentina, entre os dias oito e vinte pós- natal, e o aumento do número de células gliais GFAP positivas entre o dia do nascimento e após vinte dias (PIXLEY & DE VELLIS, 1984). Estes autores confirmaram que a vimentina é o filamento intermediário predominante usando o anticorpo monoclonal anti-vimentina e também que a vimentina desaparece com a perda da glia radial e sua transformação em glia madura.

Os estudos de Kentroti e Verdanakis (1997) confirmam que a glia radial após a neurogênese, modifica sua morfologia radial e Pixley & De Vellis (1984) verificaram a perda do contato com a superfície apical e se transforma em astrócito, perdendo nas suas células a expressão de vimentina

O desenvolvimento da glia em aves e em mamíferos é um processo similar, no que diz respeito a substituição da glia radial que expressa a vimentina por astrócitos positivos à GFAP (KALMAN & AJTAI, 2001).

Anormalidades causadas nos processos de migração neuronal através da glia radial, podem originar malformações corticais como microcefalia, lisencefalia, macrogíria, paquigíria e polimicrogíria. Estas desordens na migração podem ser hereditárias ou causadas por danos isquêmicos, tóxicos ou metabólicos durante o período perinatal, podendo causar a morte da glia radial ou interrupção da rede que ela forma. Nestas condições a arquitetura cortical colunar ou laminar torna-se anormal (CONN, 1995).

Estudos desenvolvidos no laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal-Biologia Embriologia e Genética - Centro de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Santa Catarina, utilizaram como modelo experimental embriões de *Gallus domesticus*, avaliando os efeitos de lesões mecânicas no decorrer do desenvolvimento (RIES, 1998) e (IGNÁCIO,1998), e o efeito da administração de substâncias tóxicas, como o acetato de chumbo (CARVALHO, 2002).

Carvalho (2002) abordou a ação do acetato de chumbo no desenvolvimento do telencéfalo de embriões de *Gallus domesticus*, verificando as alterações nos padrões morfométricos e estereológicos das células microgliais, e as alterações provocadas pelo acetato de chumbo ao longo do desenvolvimento dos embriões.

Dando continuidade aos estudos citados, torna-se importante caracterizar outras células presentes no sistema nervoso, como a glia radial, verificando-se a impregnação do metal em locais específicos, como na medula, altera o seu padrão de desenvolvimento radial, e correlacionar as células apoptóticas envolvidas neste processo neurotóxico com os locais de maior marcação de acetato de chumbo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a ação do acetato de chumbo [Pb (CH₃CO₂)₂], no desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus*, enfatizando sua ação na medula espinhal.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar alterações morfológicas nos embriões de *Gallus domesticus*, após administração do metal comparando-os ao grupo controle.
- Caracterizar áreas de maior deposição do Acetato de Chumbo na medula, considerando-se as diferentes doses administradas em distintos estágios de desenvolvimento.
- Analisar a representatividade das células em apoptose nas áreas de maior deposição do acetato de chumbo.
- Investigar a reação das células gliais radiais após a administração do acetato de chumbo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo Animal Experimental

Neste trabalho foram utilizados embriões de *Gallus domesticus*, com o desenvolvimento até o nono dia (E9) ou décimo primeiro dia de fecundação (E11). Os ovos fecundados foram doados pela Empresa de Frangos Macedo-Koerich S/A-São José, sendo os experimentos, realizados no Laboratório de Embriologia, do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

De acordo com Berger (1971), a espécie utilizada no presente estudo apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- Classe Aves.
- Sub classe Neornithes.
- Super ordem Neognathae.
- Ordem Galliformes.
- Família Phasianidae.

3.2 Características do Ovo

O ovo de *Gallus domesticus*, consta das seguintes partes: casca, membrana da casca, albúmen (clara) e vitelo (gema). A gema flutuante na clara apresenta um disco

esbranquiçado, a cicatrícula, situado na superfície posterior.

Os ovos desta espécie são relativamente volumosos, devido principalmente à abundante reserva nutritiva (ovos tipo macrolécito) e ao conjunto de membranas acessórias. A região a qual se originará o embrião, limita-se a camada discóide, de aproximadamente 3,0 mm de diâmetro, concernente a cicatrícula (HOUILON, 1972) (Figura 1).

No presente trabalho, foram considerados ovos homogêneos, segundo a forma (ovalada), cor (bege) e tamanho (peso médio: 63g).

Em nosso laboratório a casca foi limpa com algodão para evitar a entrada de germes infecciosos e propiciar a respiração do embrião. A estocagem dos ovos até serem incubados, ocorreu numa temperatura de 10 a 15° C, num período não superior a 5 dias.

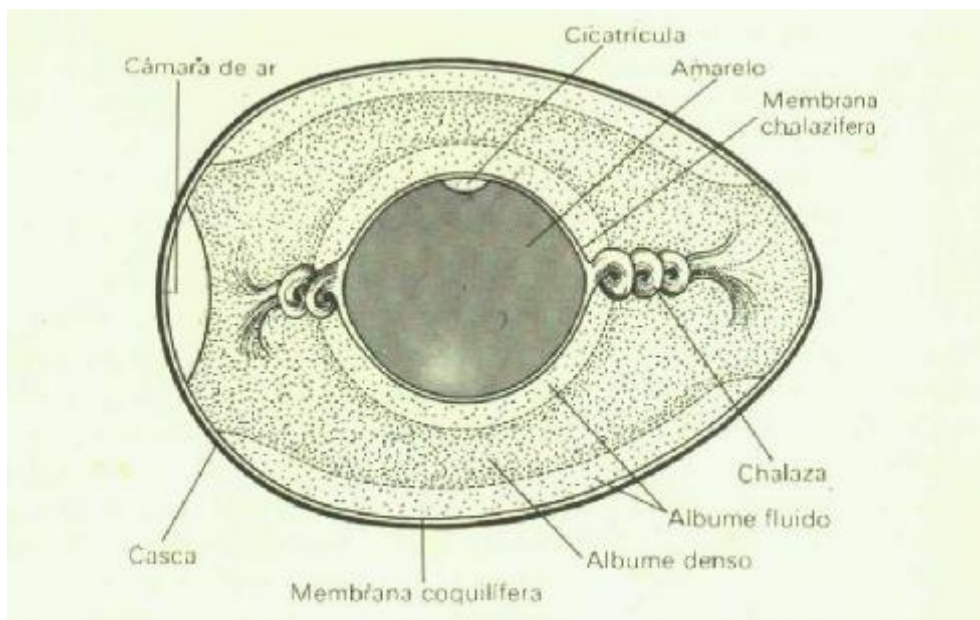


Figura 1 : Desenho esquemático do ovo de *Gallus domesticus* (Houilion, 1972).

3.3 Procedimentos com os Ovos e Embriões

3.3.1 Condições de Incubação

A incubação dos ovos foi realizada em uma estufa Petersime, modelo Mibo E-1 (figura: 2), a uma temperatura entre 37,5° C e 38° C, umidade atmosférica mantida através de dois recipientes com 500 ml de água, trocada de três em três dias. Diariamente a incubadora foi aberta por três minutos, para que assim se garantisse a renovação do ar (Magaldi, 1974; Marques, 1986).



Figura 2: Estufa Petersime, modelo Mibo E-1.

3.3.2 Grupos Experimentais

Neste estudo foram manipulados um total de 105 embriões, sendo que 81 foram submetidos ao tratamento com acetato de chumbo (Reagen) e destes, 15 embriões não sobreviveram até o final do experimento. Vinte e quatro ovos foram destinados para controle, dentre estes, 6 não foram viáveis no decorrer da pesquisa.

Os animais submetidos ao acetato de chumbo (n= 81) foram divididos em quatro grupos experimentais, conforme a dose e o dia que foram tratados e analisados.

Para administrar o metal, fez-se um pequeno orifício (2x2 cm) na porção mediana da casca (indicado pela seta na figura 2), sendo o acetato de chumbo injetado com uma seringa de insulina com agulha ultra-fina, na vesícula vitelínica no 3^o (E3) (Figura 3A) e no 5^o (E5) dia (figura 3B) do desenvolvimento embrionário com análise em E9 e E11 respectivamente.

Foram utilizadas duas doses, de 150 μ g e 450 μ g de acetato de chumbo/0,1 ml de salina, sendo que os dois grupos receberam as duas doses, conforme a tabela 1.

Os grupos controle (n= 24) foram submetidos a mesma via de administração, no mesmo período de desenvolvimento que os embriões tratados, porém, recebendo apenas solução salina a 0,9%.

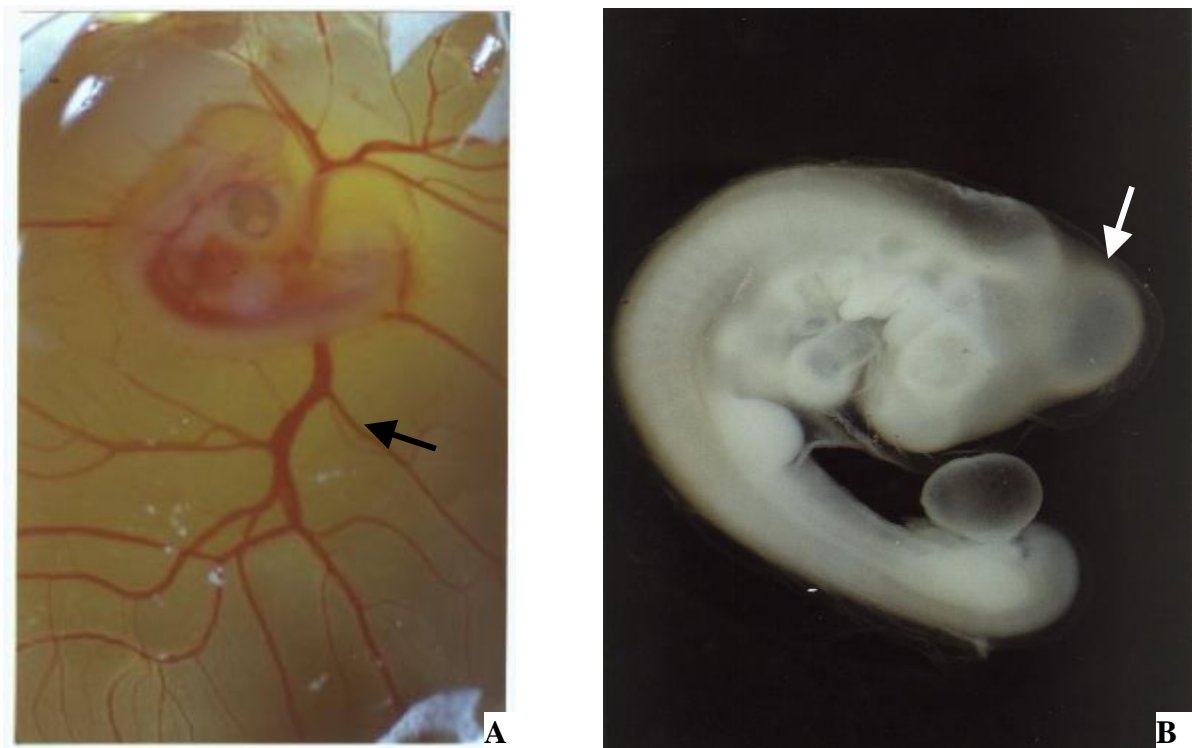


Figura 3: Vista lateral de embrião no terceiro dia (A) e quinto dia (B) de desenvolvimento embrionário respectivamente. Observe em A, o embrião no ovo, envolto por suas membranas. A seta (↔) está indicando o local de injeção na vesícula vitelínica. Notar em B as cinco vesículas encefálicas, indicado pela seta (↔).

TABELA 1: Demonstrativo dos grupos experimentais, relacionando dia de tratamento, dia de análise e o número de medulas submetidas as diferentes metodologias:

Tratamento	Dia Tratamento	Dia Análise	No de medulas/ técnica utilizada		
			TdT	TIMM	VIM
150µg/ 0,1 ml salina (n=18)	E3	E9	6	6	6
150µg/ 0,1 ml salina (n=16)	E5	E11	5	5	6
450µg/ 0,1 ml salina (n=16)	E3	E9	5	5	6
450 µg/ 0,1 ml salina (n=16)	E5	E11	5	5	6
0,1 ml salina- Controle (n=9)	E3	E9	3	3	3
0,1 ml salina- Controle (n=9)	E5	E11	3	3	3

3.3.3 Análise Morfológica dos Embriões

No dia previsto para a análise, os ovos foram colocados em refrigerador com temperatura de 4° C por um período de 10 minutos, com a finalidade de dessensibilizar o animal. Após este período, com auxílio de tesoura e colher de tamanho adequado, o embrião foi separado do saco vitelínico, retirado do ovo e colocado em placa Petri contendo solução salina. Os animais foram analisados e classificados de acordo com as seguintes características.

I - Padrão Normal

- Padrão de desenvolvimento da espécie (tamanho, curvatura e formação dos membros),
- Fechamento adequado da região torácica e abdominal,
- Diferenciação das estruturas faciais,
- Organização das vesículas cerebrais.
- Vascularização subcutânea e extra-embriônica.

II - Alteração do Padrão Normal

- Os embriões que apresentavam alterações do padrão normal, acima descritos foram organizados em dois grupos: Alterações vasculares (processos hemorrágicos) e malformações.

3.3.4 Procedimento Histológico

3.3.4.1 Dissecção e Fixação

Os embriões foram dissecados com auxílio de tesoura, pinças de pontas retas e bisturi, tendo suas medulas fixadas conforme a técnica histológica ou histoquímica a que foram submetidos:

- Técnica de controle histológico- Coloração Hematoxilina e Eosina – fixação em Formol 10% por 24h e conservação em álcool 70% (Beçak & Paulet, 1976)
- Coloração Violeta de Cresila- fixado em Solução Carnoy por 28 horas.
- Técnica Histoquímica de Timm- fixação na Solução Carnoy- Sulfeto por 28 horas e conservação em álcool absoluto (Danscher, 1981).
- Técnica da Imuno-Histoquímica para a Vimentina: fixação em formol 10% por 12 horas.
- Técnica de Imuno-Histoquímica para Morte Celular: fixação paraformaldeído 4% por 16 horas

3.3.4.2 Desidratação, Diafinização e Inclusão

Desidratação: realizada em série etanólica crescente (70 até 100%) por 8 minutos em cada álcool, sendo que a permanência no álcool 100% foi repetido uma vez.

Diafinização: as peças foram colocadas 5 minutos em álcool/xilol (1:1), em seguida submetidas duas vezes ao xilol aproximadamente por 5 minutos, até a peça tornar-se translúcida.

Inclusão: três banhos em parafina a 57° C por 1 hora cada, sendo que no último ocorreu a inclusão final. Após as peças serem orientadas para realização de cortes transversais, os blocos foram mantidos em temperatura ambiente para solidificação da parafina.

3.3.4.3 Confeção dos Cortes e Desparafinização

Os cortes com a espessura de 10µm foram realizados em micrótomo rotativo. As lâminas foram albuminizadas, sendo colocados 8 cortes por lâmina utilizando esquema de descarte na proporção 1:5.

As lâminas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol por 8 minutos , seguido de álcool/xilol, hidratação em seqüência decrescente de álcool absoluto até álcool 70% e em água destilada por 8 minutos cada.

3.3.5 Técnicas para Estudos Tecidual e Celular

3.3.5.1 Colorações Histológicas

A) Hematoxilina e Eosina

Cortes dos grupos tratados com acetato de chumbo e dos grupos controle foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina para controle histológico conforme segue:

- a) Após desparafinização e hidratação;
- b) Corar com hematoxilina de Harris, durante 90 segundos;
- c) Lavar em água de torneira por 10 minutos;
- d) Lavar rapidamente em água destilada;
- e) Corar com Eosina Aquosa (1%) durante 40 segundos;
- f) Lavar em água destilada;
- g) Desidratar em série etanólica crescente (70% a 100%), durante 8 minutos em cada álcool;

- h) Diafinizar em xilol/álcool por 5 minutos e xilol (2 banhos de 5 minutos cada);
- i) Montar as lâminas com lamínula e Bálsamo do Canadá.

B) Coloração de Nissl por Violeta de Cresila

Esta coloração foi utilizada para evidenciar a substância de Nissl, localizada predominantemente no nucléolo. As lâminas após desparafinização e hidratação foram colocadas trinta minutos no corante violeta de cresila e três minutos em água destilada. Após a coloração as lâminas foram desidratadas, diafinizadas e foi realizada montagem com Bálsamo do Canadá (ONISHI, 1999).

3.3.5.2 Técnica Histoquímica da Autometalografia de TIMM (Danscher, 1981; 1984)

Esta técnica é utilizada para visualizar a presença de metais no tecido como o acetato de chumbo. As lâminas após desparafinização e hidratação foram colocadas na solução de desenvolvimento físico (Danscher et al, 1987), por 25 minutos, descrita abaixo:

- a) Goma Arábica (90 ml)
- b) Tampão Citrato de Sódio (0,2 M)
- c) Solução de Hidroquinona (0,15 M)
- d) Solução de Nitrato de Prata (5×10^{-3} M)

Após a Solução de Desenvolvimento Físico as lâminas foram submetidas ao protocolo a seguir:

- a) Água de torneira por 30 minutos, sendo feita uma troca após 15 minutos;
- b) Desidratação em álcool 70% por 30 minutos;
- c) Posteriormente as lâminas controle e tratadas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 60 segundos e lavadas com água de torneira por 10 minutos;

- d) Desidratação em série etanólica crescente sendo dado 2 banhos de 5 minutos em álcool 96%, 2 banhos de 5 minutos em álcool 99%
- e) Diafanização em xilol e montar com lamínula e Bálsamo do Canadá .

3.3.5.3 Técnicas Imuno-Histoquímicas

A) Imuno-Histoquímica para Vimentina

O anticorpo anti-vimentina possui afinidade por células astrocíticas em estágios iniciais do desenvolvimento (glia radial). As lâminas após desparafinização e hidratação foram submetidas ao protocolo que segue:

Bloqueio da atividade das peroxidases endógenas: 1 banho de peróxido de hidrogênio (0,3%) em PBS por 10 minutos; em seguida as lâminas foram lavadas 6 vezes por 5 minutos em tampão fosfato (PBS) 0,1M , pH de 7,4 + Triton X-100 1%.

Bloqueio de Sítios Inespecíficos: as lâminas foram incubadas com Soro normal de Cabra (NGS) 10% em PBS- Triton 0,3% por 30 minutos.

Incubação com Vimentina: as lâminas foram incubadas com anticorpo anti - vimentina V9 (DAKO) na diluição de 1:50 em PBS- triton, por 12 horas `a 4°C. Após a incubação com o anticorpo, as secções foram lavadas 6 vezes por 5 minutos em PBS + Triton X-100 1%.

Incubação com Anticorpo Secundário: as secções foram incubadas com anti-camundongo IgG biotilado (DAKO) na diluição 1: 50 em PBS- Triton X-100, por 1 hora e trinta minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas 6 vezes em PBS-Triton por 5 minutos cada.

Incubação com StreptAvidina: as secções foram incubadas com streptavidina (DAKO) na diluição de 1:20 em PBS-Triton 0,3%, por 1 hora, em temperatura ambiente.

Revelação: as secções foram tratadas com solução de 3-3'- Diaminobenzidine (DAB-Sigma Chemical) por tempo suficiente até que os cortes apresentassem a tonalidade marrom claro; em seguida bloqueou-se a reação com água destilada.

Após, as lâminas foram contracoradas em Hematoxilina de Harris, desidratadas, diafanizadas e foi realizada a montagem com Bálsamo do Canadá.

Controle negativo da especificidade: Visando identificar se a reatividade à vimentina não ocorreu devido a ligações não específicas, foi adotado como controle negativo a realização do protocolo para histoquímica descrito acima, porém omitindo-se a incubação com a vimentina e substituindo-a por PBS.

B) Imuno-Histoquímica para Evidenciar Apoptose – TUNEL Kit (TdT) FragGel

Este Kit marca fragmentos de DNA resultantes da dissolução e fragmentação do núcleo, decorrentes do processo de apoptose. Lâminas após desparafinização e hidratação foram submetidas ao protocolo que segue:

Lâminas após desparafinização e hidratação foram submetidas ao protocolo que segue:

Permeabilização dos Cortes: Diluir Proteinase K (1:100) em Tris pH 8, incubar em temperatura ambiente por 20 minutos, em seguida lavar com TBS.

Bloqueio da atividade das peroxidases endógenas: Diluir H₂O₂ 30% (1:10) em metanol, cujo a proporção, incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida lavar com TBS

Reação de Equilíbrio e Marcação: Diluir tampão de equilíbrio 5xTdT , 1:5 com água destilada, incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida preparar a Reação para marcar morte celular com: 57.0 µl TdT e 3.0µl de TdT enzima, manter as lâminas incubadas em uma câmara umidecida em uma temperatura de 37o C por 1.5 h .

Finalização da Reação de Marcação: Incubar com tampão de parada por 5 minutos, em seguida lavar com TBS.

Detecção: Incubar com tampão de bloqueio, por dez minutos em temperatura ambiente, após a incubação, diluir Conjugado 50X (1:50) em tampão de bloqueio sendo então incubado em câmara umidecida por 30 minutos em temperatura ambiente, em seguida lavadas com TBS.

Revelação: as secções foram tratadas com solução de 3-3'- Diaminobenzidine (DAB-Sigma Chemical) por 8 minutos; em seguida bloqueou-se a reação com água destilada.

Após, as lâminas foram contracoradas em verde de metila por 3 minutos, desidratadas em etanol 100%, diafanizadas e realizada a montagem com Bálsamo do Canadá.

3.3.6 Análise das Lâminas

As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico para determinação dos locais de deposição do acetato de chumbo, a localização das células apoptóticas e as células gliais radiais. A partir desta análise foram realizados esquemas e fotos.

3.3.6.1 Determinação dos Locais de Deposição do Acetato de Chumbo e da Localização de Células Apoptóticas

O mapeamento destas áreas foi representado em desenho esquemático (figura 4), sendo que a padronização utilizada para que se realizasse uma análise qualitativa dos locais de marcação, obedecendo-se os seguintes critérios: (+) marcação fraca, (++) marcação moderada e (+++) marcação intensa.

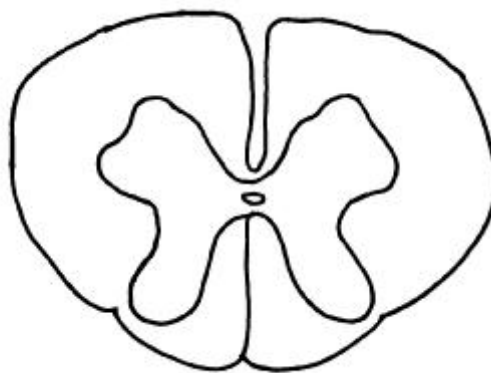


Figura 4: Modelo esquemático da medula para marcação dos locais de deposição do acetato de chumbo e células apoptóticas.

3.3.6.2 Estereologia dos Cortes Histológicos

Foram realizados contagens de células apoptóticas, com auxílio da Grátícula de Weibel (figura 5) (MANDARIM-DE LACERDA, 1999), acoplada ao microscópio óptico em um aumento de 40x. Os cortes foram divididos em direito e esquerdo, para contagem de células em cinco campos visuais alternados. Em cada campo visual foram contadas 42 células, perfazendo nos 5 campos um total de 210 células por lâmina, o que corresponde a 100% das células contadas. Ao final da contagem, obteve-se a porcentagem parcial de células apoptóticas em cada lâmina (FREERE & WEIBEL, 1967).

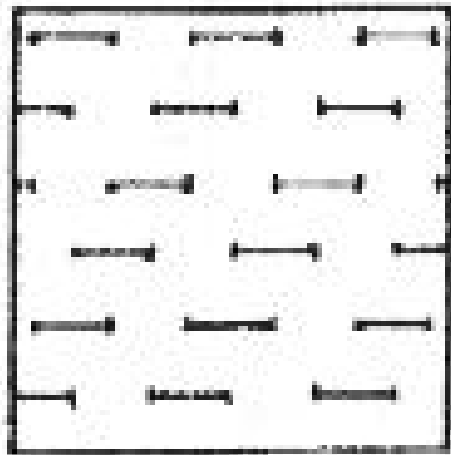


Figura 5: Grátícula de Weibel (Mandarim-de-Lacerda, 1999)

3.3.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos referentes a quantidade das células apoptóticas foram analisados no programa estatístico Statistica® para Windows. Para verificar se haviam diferenças significativas entre os grupos, foi utilizado o teste de análise de variância de uma via (One-Way ANOVA), $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Neste estudo foram acompanhados eventos do desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus*, até o nono (figura 10) ou décimo primeiro dia de incubação, verificando alterações no padrão morfológico decorrentes da administração do acetato de chumbo, bem como, visualizando a impregnação do metal no tecido nervoso, células apoptóticas e células da glia radial na medula.

4.1 Análise Morfológica dos embriões submetidos ao Acetato de Chumbo

A análise morfológica, permitiu a caracterização de três grupos:

- 1º) Grupo caracterizado por embriões aparentemente normais.
- 2º) Grupo caracterizado por lesões hemorrágicas, avaliando-se o acúmulo excessivo de sangue entre ou dentro das vesículas cerebrais, na região do tronco encefálico e região lombar da medula.
- 3º) Grupo, foram consideradas as categorias de malformações que correspondem:
 1. Extrusão visceral, onde órgãos como rins e fígado estão dispostos fora da cavidade abdominal.
 2. Malformação de face- o embrião apresenta ciclopia, ausência ou formação incompleta do bico.
 3. Hidrocefalia, aumento de líquido entre as vesículas.

4.1.1 Análise Morfológica de Embriões Tratados no Terceiro e Quinto dia de desenvolvimento com a dose de 150 mg de Acetato de Chumbo

Embriões submetidos a dose de 150µg de acetato de chumbo, apresentaram padrão morfológico condizentes ao desenvolvimento normal (figura 6) e padrão morfológico alterado (figuras 6 e 7) .

Os efeitos da administração relativo da dose de 150µg de acetato de chumbo, no terceiro dia (E3) de desenvolvimento e análise no nono dia (E9) foram avaliadas, sendo que o padrão normal da espécie foi evidenciado em 14,28% dos embriões (figuras 6) .

Nos demais embriões foi possível caracterizar lesões hemorrágicas no tecido nervoso em 47,6% dos embriões, principalmente, na região anterior do encéfalo (figura 11) e região lombar. Deste total foi possível discriminar quatro níveis hemorrágicos: hemorragia cefálica em pequenas proporções (leve) (23,8%), hemorragia cefálica em pequenas proporções visualizadas no encéfalo/lombar (4,76%), hemorragia cefálica em proporções moderadas (9,52%), hemorragia cefálica em grandes proporções (9,52%) (figura 7).

Malformações na morfogênese foram observadas em 23,77% dos embriões submetidos a esta dose, evidenciando-se principalmente a hidrocefalia (4,73%) e mal formações de face (19,04) (figura 6). Foram mortos 14,28% nesta dose (figura 6).

Quando a mesma dose foi administrada no quinto dia (E5) e analisada no décimo primeiro dia (E11) do desenvolvimento, observou-se desenvolvimento normal em 10% dos embriões tratados (figura 6).

As lesões hemorrágicas relativas a esta idade e dose apresentadas por um grupo de embriões foram caracterizadas por hemorragia cefálica em pequenas proporções (25%), hemorragia cefálica em proporções moderadas encéfalo (10%), hemorragia moderada em encéfalo/lombar (5%), hemorragias em grandes proporções foram visualizadas no encéfalo/lombar (10%) (figura 7).

Em um outro grupo de embriões foram observadas malformações (20%), relacionados à hidrocefalia (10%) e extrusão visceral (10%) (figura 16) e 20% dos embriões morreram com este tratamento (figura 6).

4.1.2 Análise Morfológica de Embriões Tratados no Terceiro e Quinto dia de desenvolvimento com a dose de 450mg de Acetato de Chumbo

Em embriões submetidos as mesmas condições de incubação, porém com a dose de 450µg de acetato de chumbo, administrado no terceiro dia de desenvolvimento (E3) e análise no nono dia de desenvolvimento (E9), verificamos desenvolvimento normal em 10% dos embriões (figura 8).

Lesões hemorrágicas foram evidenciadas em 50% dos embriões, sendo discriminadas em: hemorragias em pequenas proporções no encéfalo (15%), encéfalo/lombar (5%), hemorragias em proporções moderadas no encéfalo (10), encéfalo/lombar (5%), hemorragias em grandes proporções encéfalo (5%), encéfalo/lombar (10%) (figura 9).

Malformações foram observadas em 20% dos embriões analisados, sendo divididos em: malformação de face (10%) (figuras 8, 12, 13, 14, 15), extrusão visceral (10%) (figuras: 8 e 14). Sendo que 20% dos embriões deste grupo a dose foi letal (figura 8).

Nos embriões tratados com a dose de 450µg de acetato de chumbo no quinto dia de desenvolvimento (E5) e análise no décimo primeiro dia de desenvolvimento (E11), não houve desenvolvimento normal (figura 8).

Houveram alterações hemorrágicas em 70% dos embriões (figuras 9, 17 e 20), caracterizadas por: hemorragia em pequenas proporções no encéfalo (30%), hemorragias em proporções moderadas no encéfalo (5%), encéfalo/lombar (5%), hemorragias em grandes proporções encéfalo (20%), encéfalo/lombar (10%) (figura 9).

Malformações foram observadas em 10% dos embriões que receberam esta dose, destacando-se alterações como a hidrocefalia (figuras 8, 18 e 19), sendo que 20% dos embriões foram mortos (figura 8).

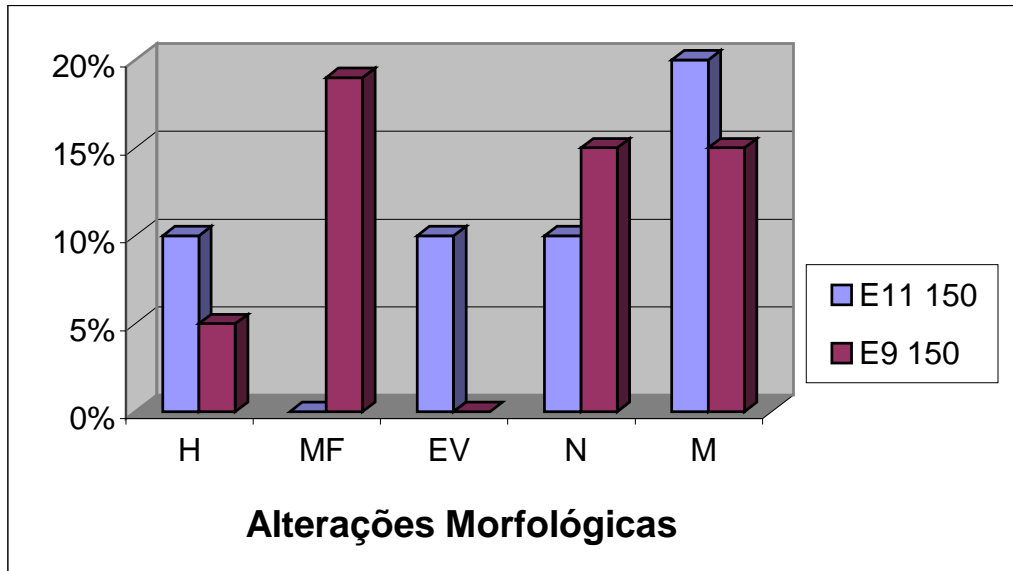


Figura 6: Análise morfológica dos embriões tratados com a dose de 150µg de acetato de chumbo, no quinto (E5) e terceiro (E3) dia, com análise no décimo primeiro (E11) e nono (E9) dia respectivamente. Comparando-se com o número de embriões normais e mortos no mesmo período de desenvolvimento. H (hidrocefalia), MF (Malformação face), EV (extrusão visceral), N (normal), M (mortos).

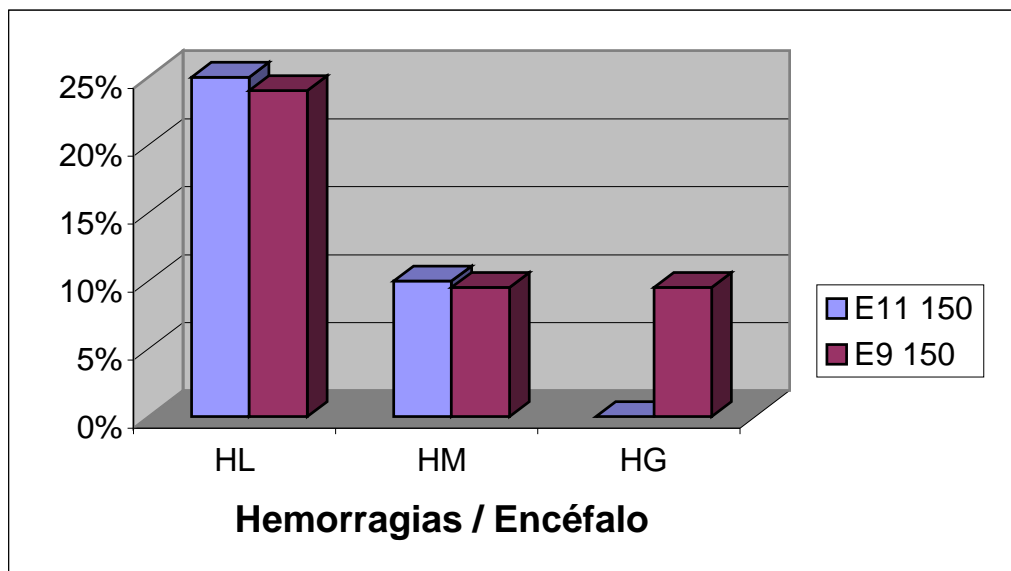


Figura 7: Análise morfológica dos embriões tratados com a dose de 150µg, no quinto (E5) e terceiro (E3) dia com análise no décimo primeiro dia embrionário (azul) e nono dia embrionário (vermelho) respectivamente. HL (hemorragia leve), HM (hemorragia moderada) e HG (hemorragia grave).

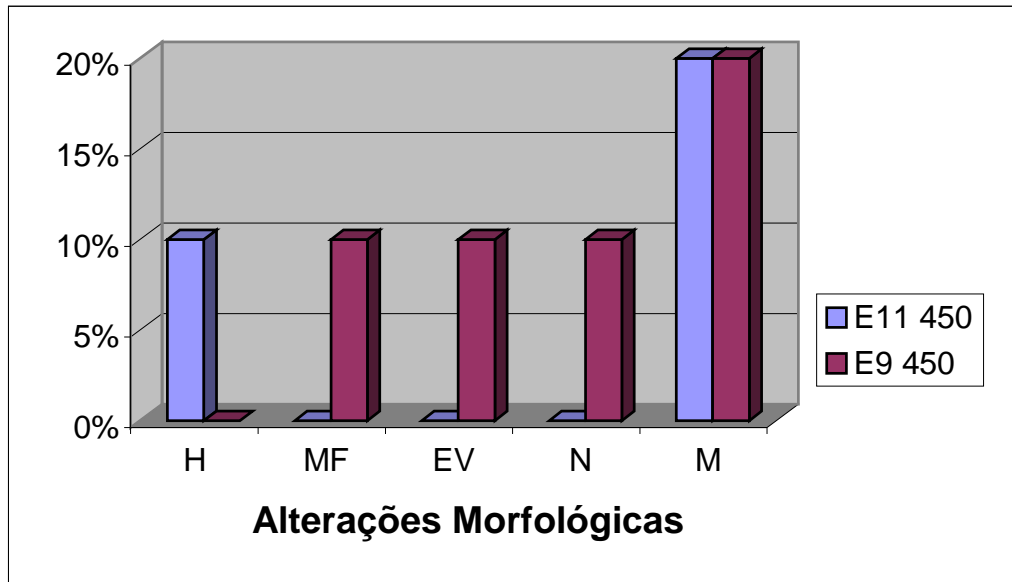


Figura 8: Análise morfológica dos embriões tratados com a dose de 450µg de acetato de chumbo, no quinto e terceiro dia, com análise no décimo primeiro (E11) (azul) e nono dia (E9) (vermelho) respectivamente. Comparando-se com a número de embriões normais e mortos no mesmo período de desenvolvimento. H (hidrocefalia), MF (Malformação face), EV (extrusão visceral), N (normal), M (mortos).

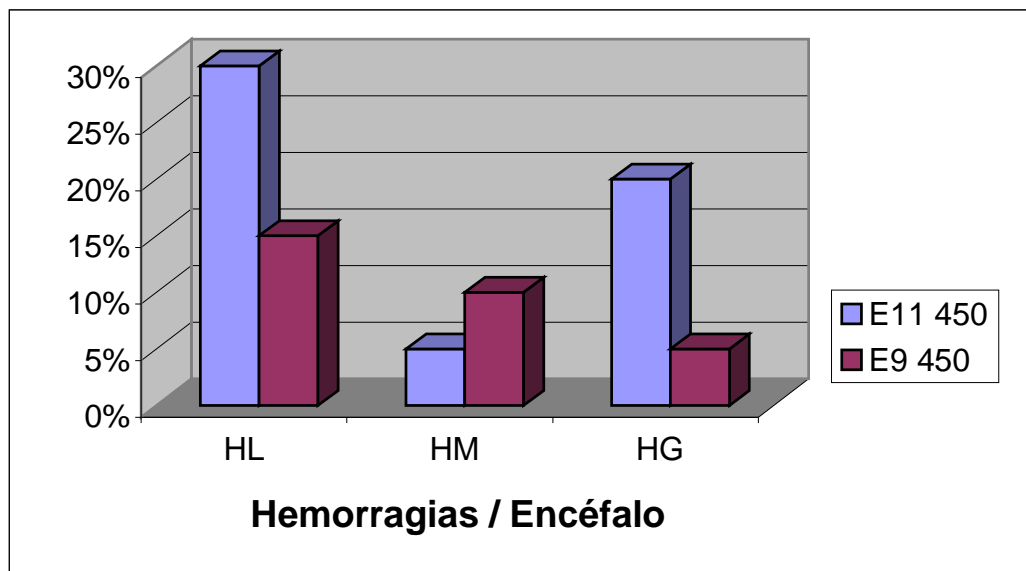


Figura 9: Análise morfológica dos embriões tratados com a dose de 450µg, no quinto (E5) e terceiro (E3) dia e análise no décimo primeiro (E11) (azul) e nono (E5) dia embrionário (vermelho) respectivamente. HL (hemorragia leve), HM (hemorragia moderada) e HG (hemorragia grave).



Figura 10: Embrião normal de *Gallus domesticus* no nono dia de desenvolvimento embrionário (E9). Escala- 100 μ m.



Figura 11: Embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a dose de 150 μ g de $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ em E3, apresentando hemorragia cefálica, que está indicada pela seta (\rightarrow). Escala: 100 μ m

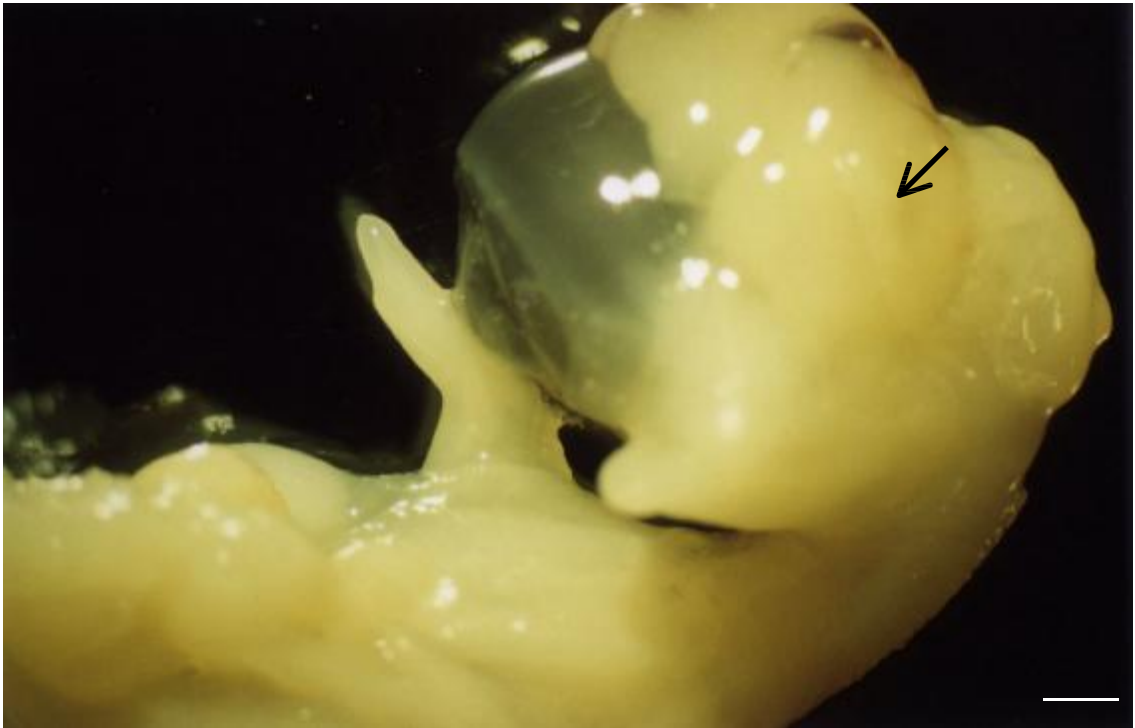


Figura 12: Embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a dose de 450 μ g [Pb(CH₃CO₂)₂] em E3, a seta (→) indica mal formação de face. Escala: 100 μ m

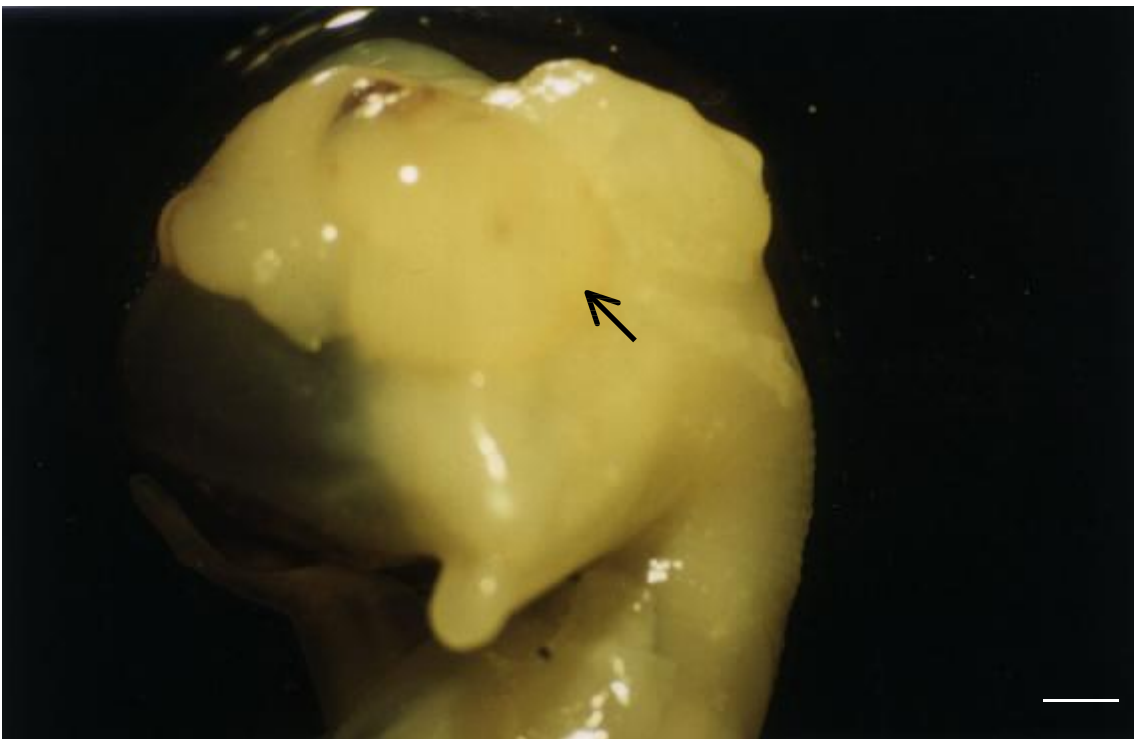


Figura 13: Embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a dose de 450 μ g [Pb(CH₃CO₂)₂] em E3, a seta (→) indica a mal formação de face (ciclopia). Escala. 100 μ m

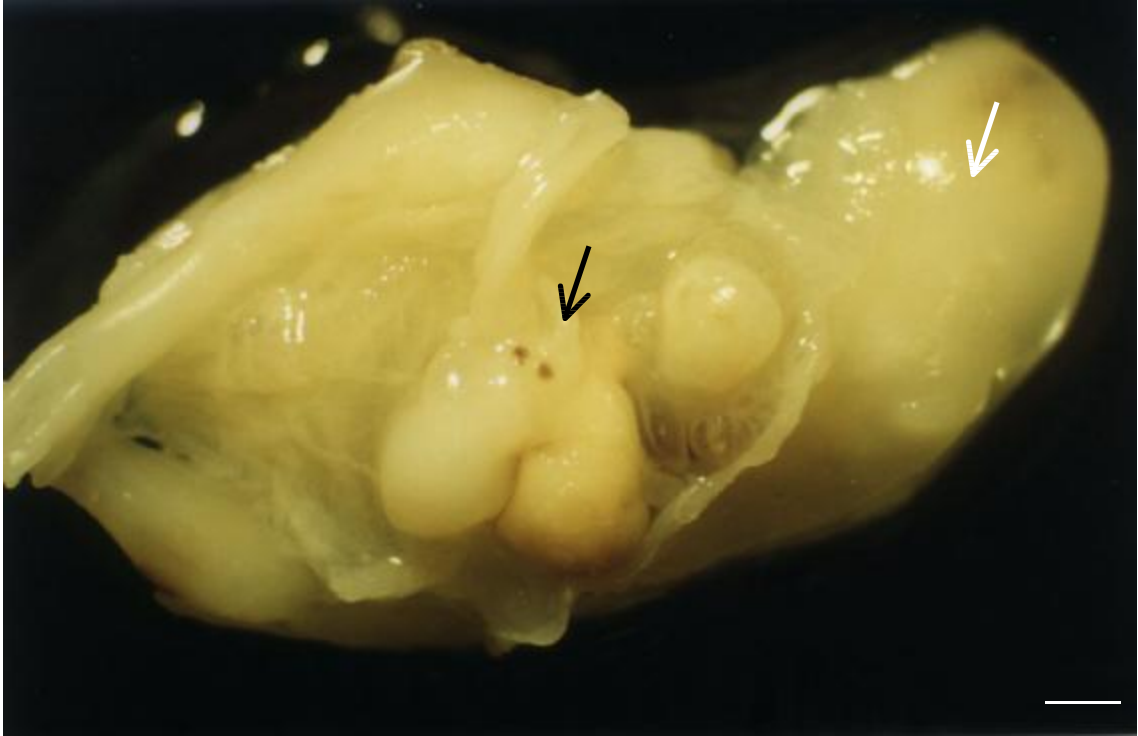


Figura 14: Embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a dose de 450µg [Pb(CH₃CO₂)₂] em E3. a seta branca (→) indica malformação de face e a seta preta (→) indica extrusão visceral. Escala. 100µm

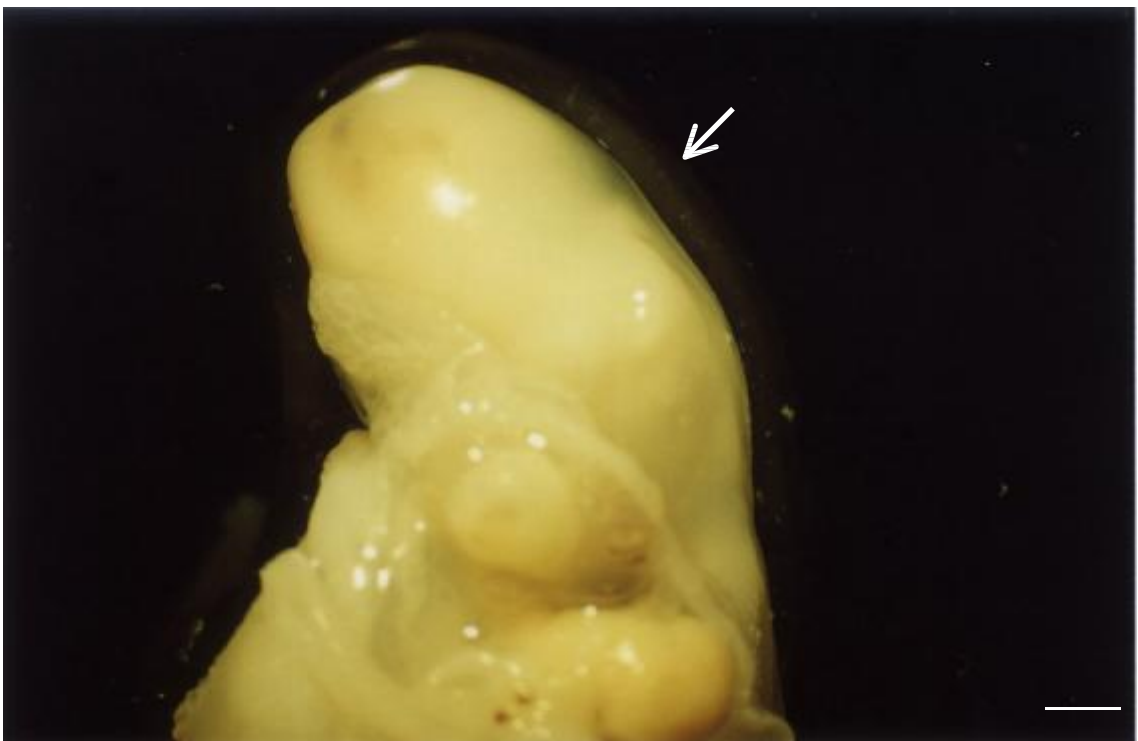


Figura 15: Embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a dose de 450µg [Pb(CH₃CO₂)₂] em E3, apresentando malformação de face, indicado pela seta (→). Escala. 100µm

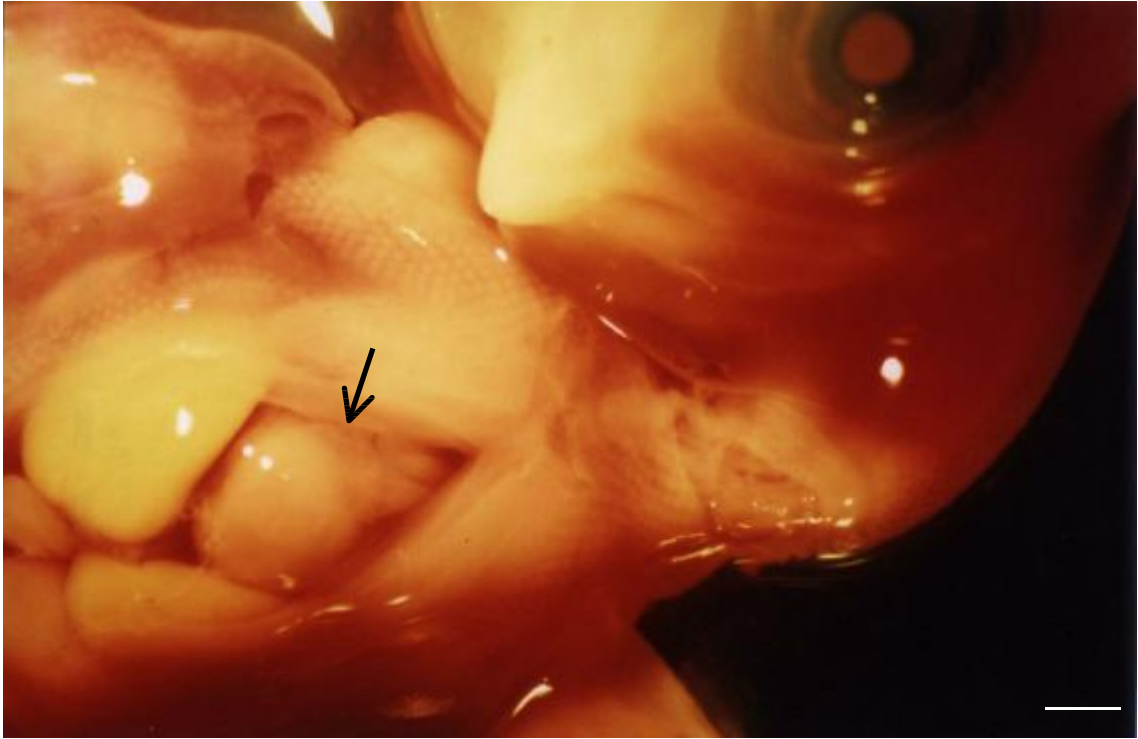


Figura 16: Embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a dose de 150 μ g [Pb(CH₃CO₂)₂] em E5, a seta (→) indica extrusão visceral. Escala. 100 μ m

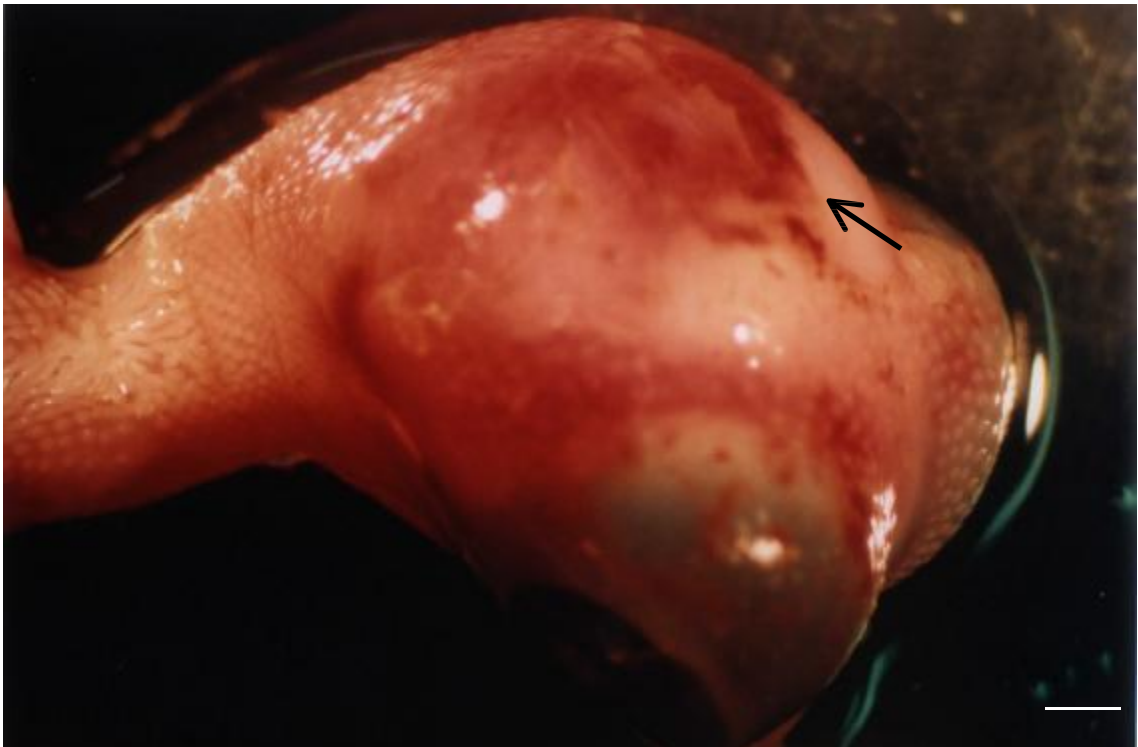


Figura 17: Embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a dose de 450 μ g [Pb(CH₃CO₂)₂] em E5, a seta (→) indica hemorragia cefálica. Escala. 100 μ m

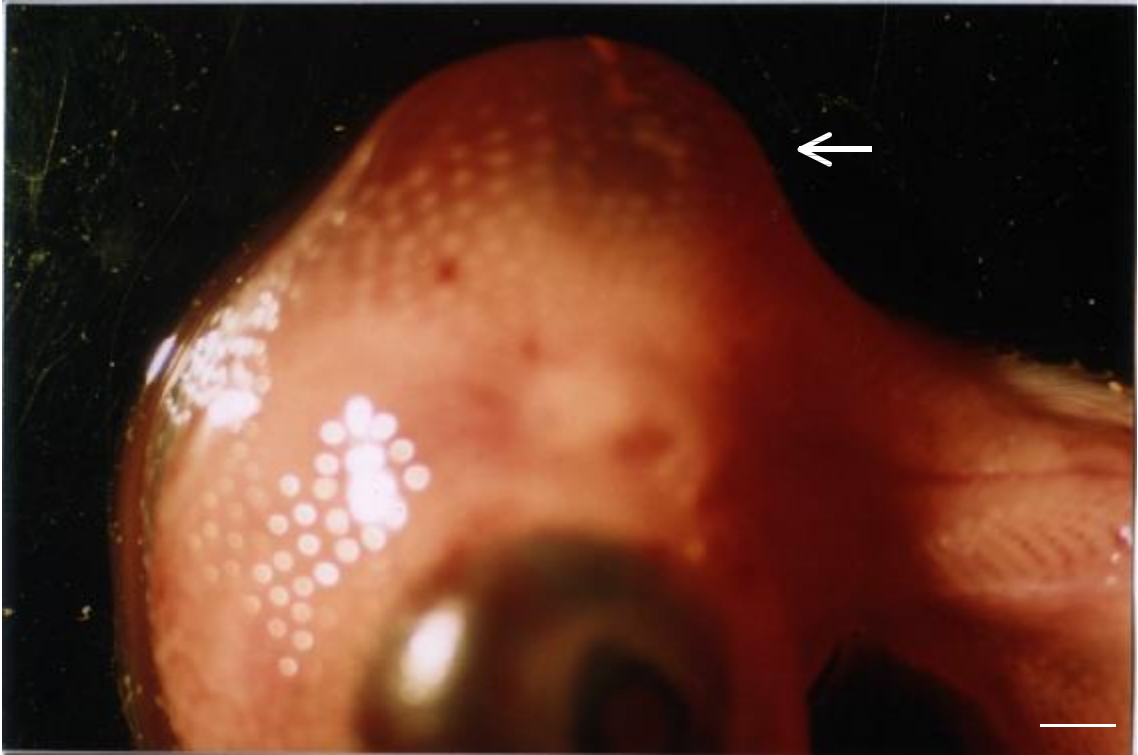


Figura 18: Embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a dose de $450\mu\text{g}$ $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ em E5, a seta (\rightarrow) indica hidrocefalia. Aumento 7x. Escala. $100\mu\text{m}$



Figura 19: Embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a dose de $450\mu\text{g}$ $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ em E5, a seta (\rightarrow) indica hidrocefalia. Escala. $100\mu\text{m}$



Figura 20: Embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a dose de 450µg [Pb(CH₃CO₂)₂] em E5, a seta (→) indica hemorragia cefálica. Escala. 100µm

4.2 Análise dos Locais de Deposição do Acetato de Chumbo na Medula

As secções transversais da medula dos animais controle e tratados, foram submetidas à coloração de Hematoxilina e Eosina para controle histológico (figura 22) e a técnica histoquímica de TIMM, para demarcar os locais de maior impregnação do acetato de chumbo (figura 21).

Os animais controle dos dois grupos, não apresentaram marcação histoquímica para o acetato de chumbo, como pode ser evidenciado nas figuras 23 A e B, referentes ao tratamento no terceiro dia e nas figuras 24 A e B, referentes ao tratamento no quinto dia.

Nos embriões tratados com o [Pb (CH₃CO₂)₂] nas doses de 150µg e 450µg, pode-se observar uma marcação difusa por toda a medula, verificando-se deposição do metal tanto na

camada do manto (substância cinzenta) quanto na camada marginal (substância branca), sendo ilustrado nas figuras 25, 26, 27, 29, 30 (A e B) e 31.

Evidenciou-se uma marcação mais intensa na maior dose (450 μ g [Pb(CH₃CO₂)₂]), tanto no tratamento em E3 (figuras 27, 28 e 29) quanto no tratamento em E5 (figuras 31 e 32), identificando-se principalmente marcação ao redor do canal central (figuras 27 e 31), na camada marginal (figuras 28 e 32), nas leptomeninges e na dura-máter, principalmente a pia-máter (figuras 28 e 32), onde ela adere intimamente no tecido nervoso, penetrando na fissura mediana anterior, quando comparados ao controle (figuras 23A e B; 24 A e B).

Na marcação com a dose de 150 μ g de [Pb (CH₃CO₂)₂], nos dois dias de tratamento, observou-se o metal acumulado ao redor do canal medular (figuras 25 e 30 B), uma marcação mais acentuada no corno ventral do que no dorsal (figura 30 A), marcação difusa em toda extensão da camada marginal (figuras: 25, 26 e 30 A) e também nas leptomeninges, quando comparados ao controle (figuras: 23A e B; 24 A e B).

Nos cortes esquemáticos (figura 33) comparando-se todos os grupos, visualizamos uma marcação intensa (xxx) ao redor do canal central e no corno anterior da medula principalmente nos grupos tratados no quinto dia de desenvolvimento (E5) e no grupo tratado no terceiro dia com a dose 450 μ g de [Pb (CH₃CO₂)₂]. Houve uma impregnação mais tênue (fraca) (x) no grupo tratado no terceiro dia com a dose de 150 μ g de [Pb (CH₃CO₂)₂].

No corno dorsal obtivemos marcação moderada (xx) nos grupos onde as doses de 150 ou 450 μ g de [Pb (CH₃CO₂)₂] foram administradas no terceiro dia de desenvolvimento e uma marcação intensa (xxx) no grupo E11 150 μ g de [Pb (CH₃CO₂)₂] (figura 33). Na camada marginal (porção lateral), visualizados uma marcação intensa (xxx) com a dose de 450 μ g de [Pb (CH₃CO₂)₂], quando administrado tanto no terceiro dia (E3) quanto no quinto dia (E5) de desenvolvimento, nos grupos de dose 150 μ g de [Pb (CH₃CO₂)₂], a marcação variou de leve a moderada (figura 33). Não se obteve marcação nos grupos controle (figura 33).

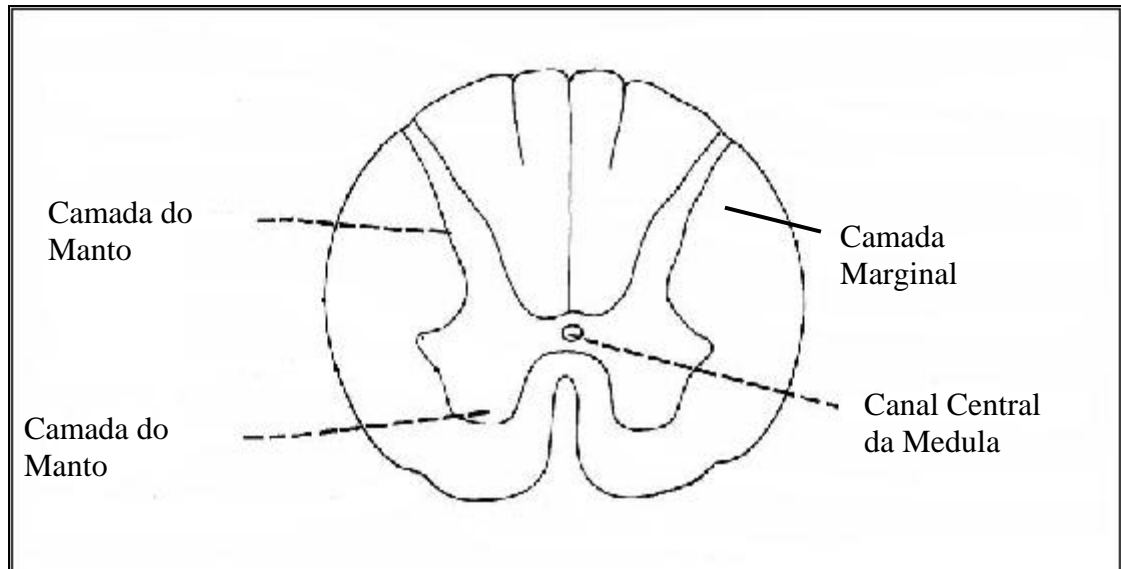


Figura 21: Corte esquemático indicando regiões da medula espinhal.

Tabela 2: Impregnação do Acetato de Chumbo pela Autometalografia de TIMM em nos cortes esquemáticos nas diferentes regiões das medulas de embriões de *Gallus domesticus*

	CNT E9	CNT E11	E9 150	E9 450	E11 150	E11 450
Canal medular			+++	+++	+++	+++
Região ventral			+++	+++	+++	+++
Camada do Manto			+	++	+++	+++
Região Dorsal			++	++	+++	++
Camada Marginal			+	+++	+	++
Região Lateral			++	+++	+	+++
Camada Marginal			++	+++	+	+++

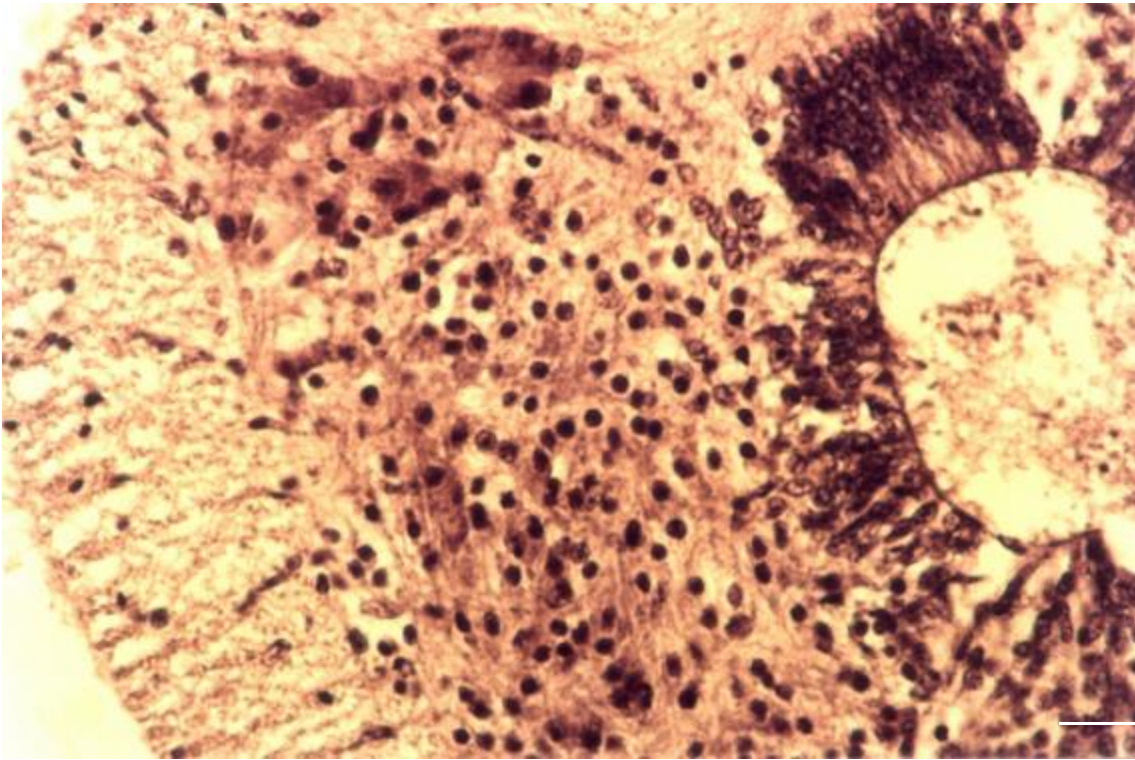
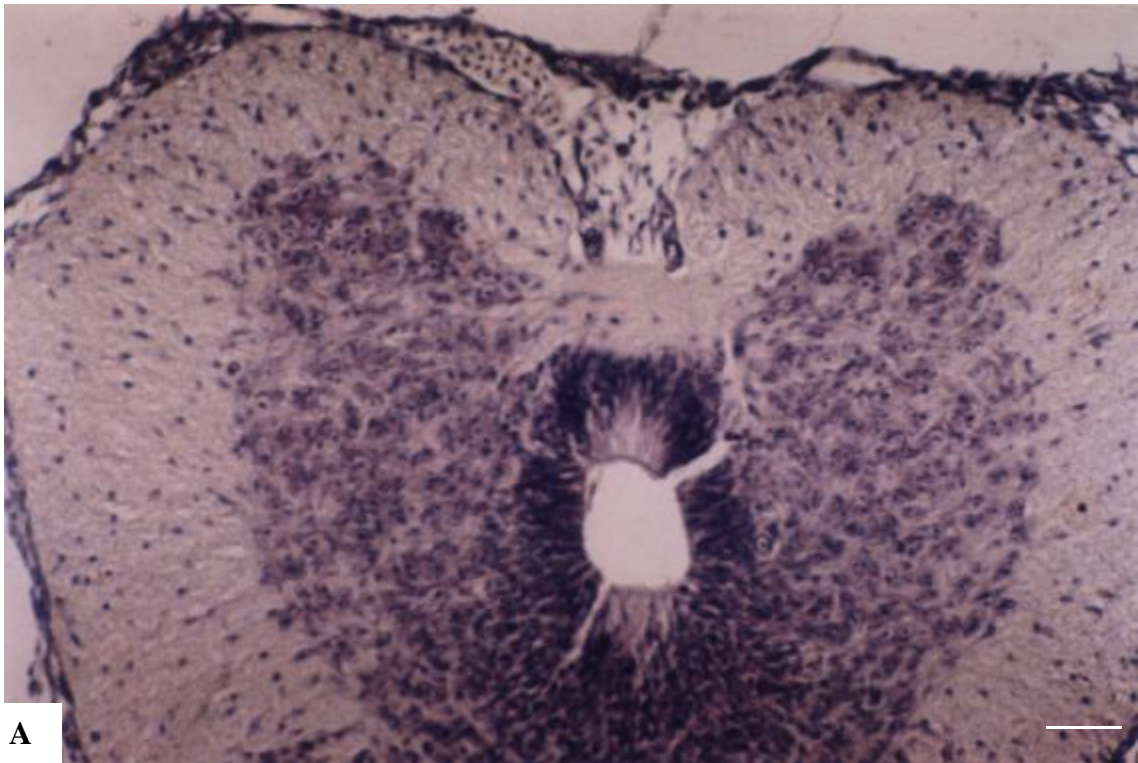


Figura 22: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a dose de 450µg. Coloração Hematoxilina Eosina. Escala: 7,7µm .



A

Figura 23 (A): Secção histológica da medula de embrião normal de *Gallus domesticus* em E9, mostrando o controle da técnica TIMM. Contra-coloração Hematoxilina. Escala: 15µm .

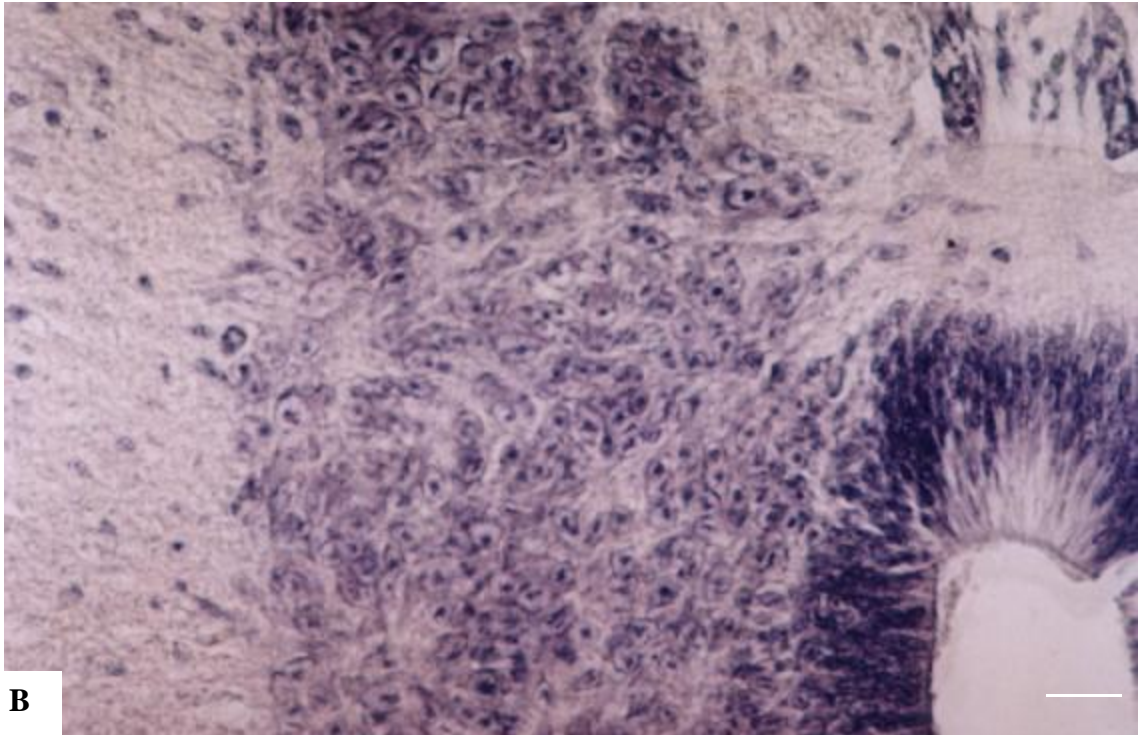


Figura 23 (B): Secção histológica da medula de embrião normal de *Gallus domesticus* em E9, mostrando o controle da técnica TIMM. Contra-coloração Hematoxilina. Escala: 7,7 μ m .

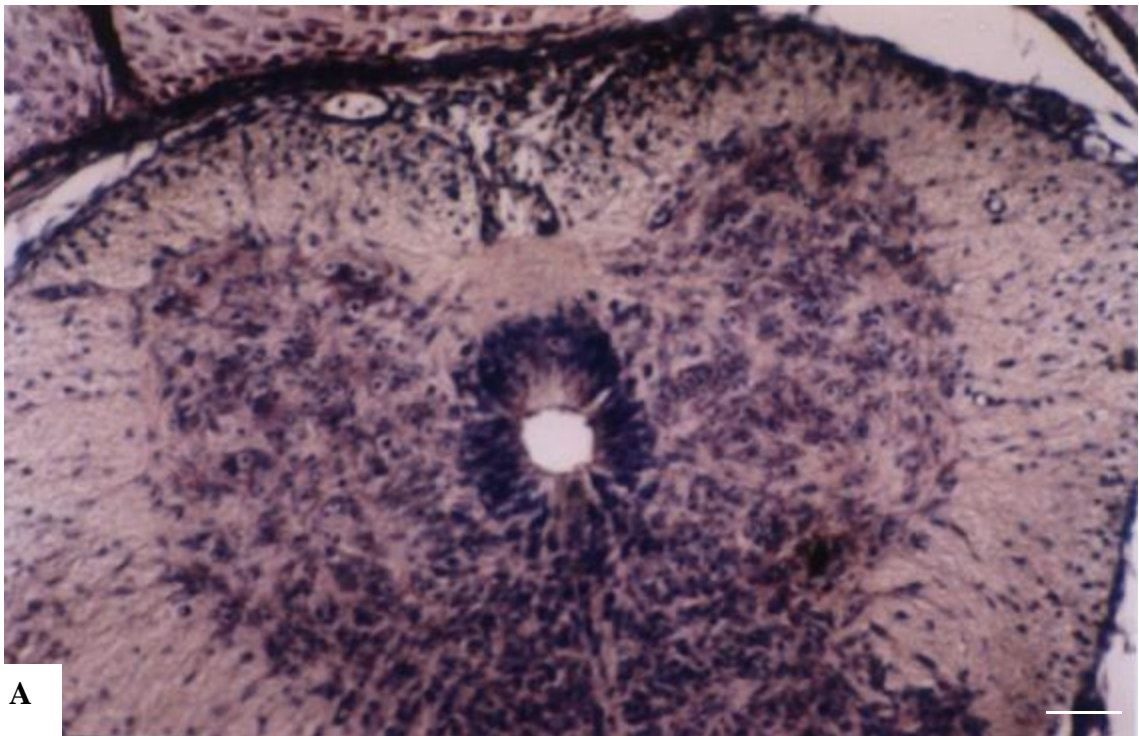


Figura 24 (A): Secção histológica da medula de embrião normal de *Gallus domesticus* em E11, mostrando o controle da técnica TIMM, contra-coloração Hematoxilina. Escala: 15 μ m .

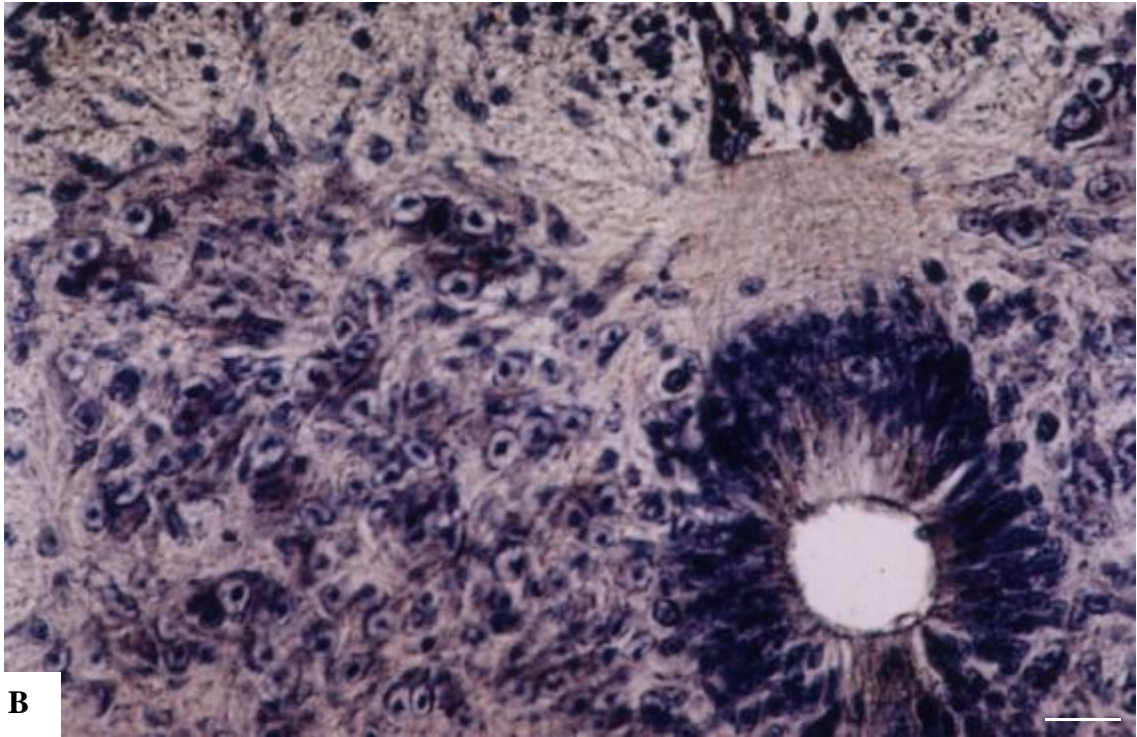


Figura 24 (B): Secção histológica da medula de embrião normal de *Gallus domesticus* em E11, mostrando o controle da técnica TIMM, contra-coloração Hematoxilina. Escala: 7,7 μ m.

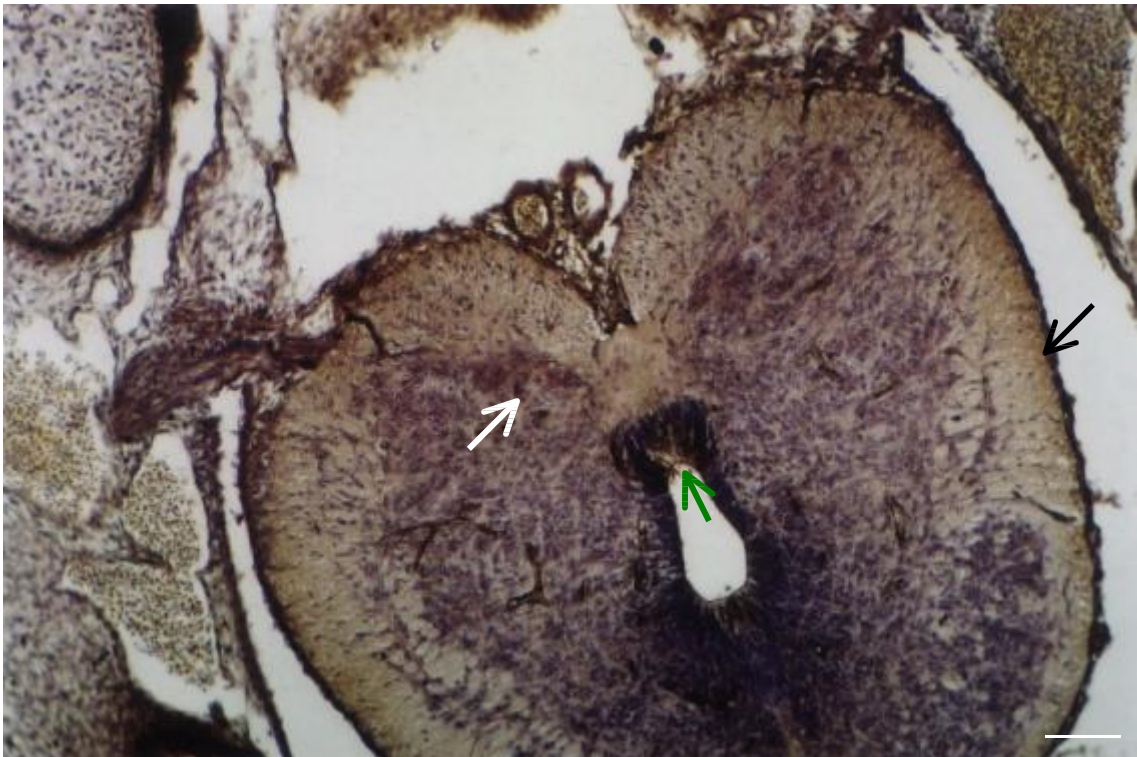


Figura 25: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 150 μ g de acetato de chumbo em E3. Técnica TIMM, contra-coloração Hematoxilina. A seta (\rightarrow) indica a deposição difusa do metal na camada do manto (seta branca) e camada marginal (seta preta) e ao redor do canal medular (seta verde). Escala: 15 μ m.

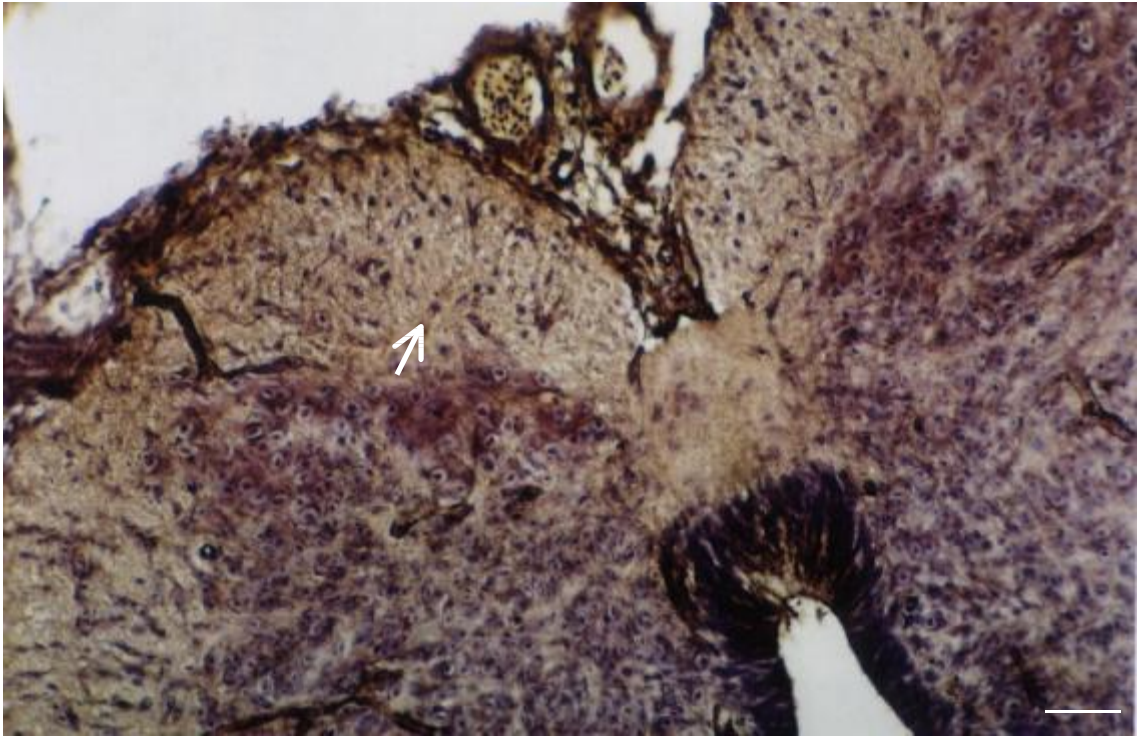


Figura 26: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 150 μ g de acetato de chumbo em E3. Técnica TIMM. Coloração Hematoxilina. A seta (\rightarrow) indica a deposição do metal na camada marginal. Escala: 7,7 μ m.

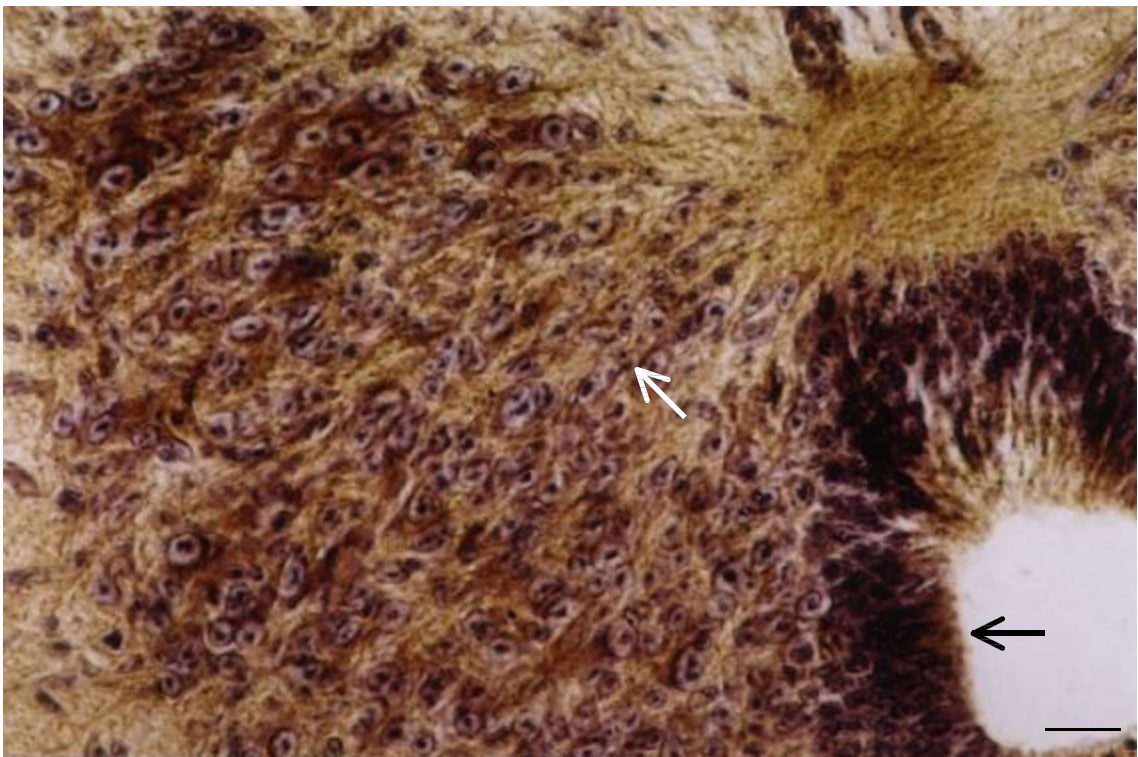


Figura 27: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 450 μ g de acetato de chumbo em E3. Técnica TIMM, contra-coloração Hematoxilina. As setas (\rightarrow) indicam os locais de maior deposição do metal no corno ventral na camada do manto (seta branca) e ao redor do canal central (seta preta). Escala: 7,7 μ m .

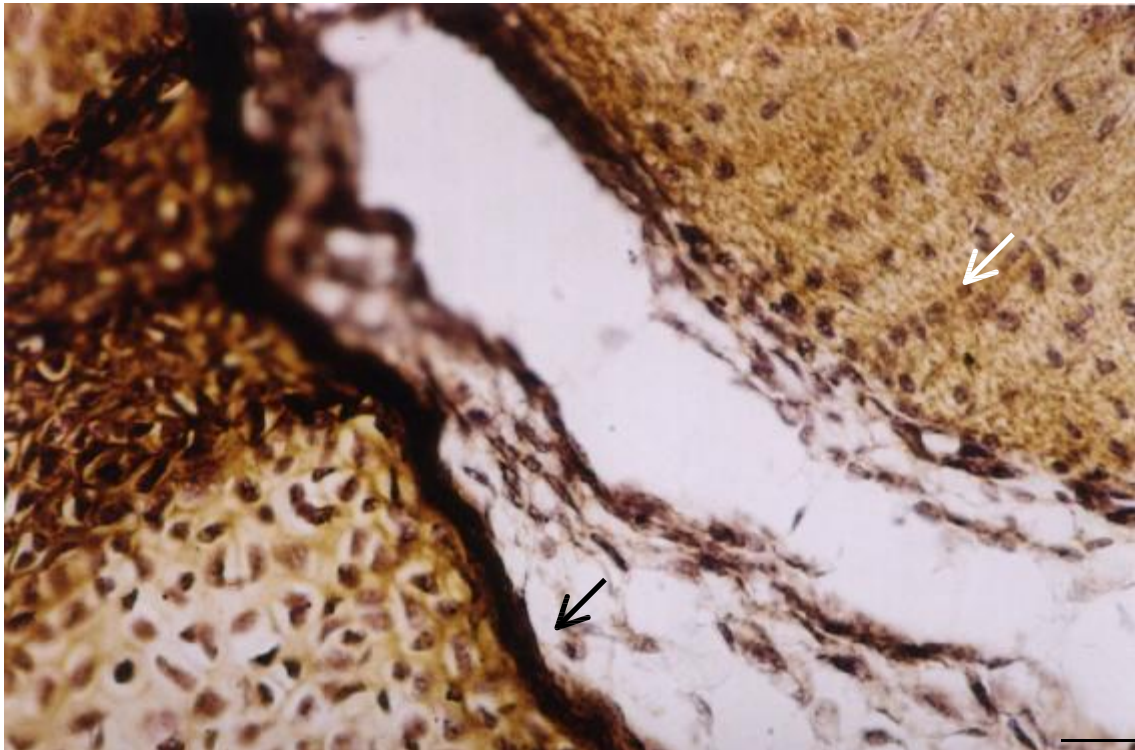


Figura 28: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 450 μ g de acetato de chumbo em E3. Técnica TIMM, contra-coloração Hematoxilina. A seta preta (\rightarrow) indica a deposição do metal nas leptomeninges e a seta branca (\rightarrow) indica deposição do metal na camada marginal. Escala: 7,7 μ m.

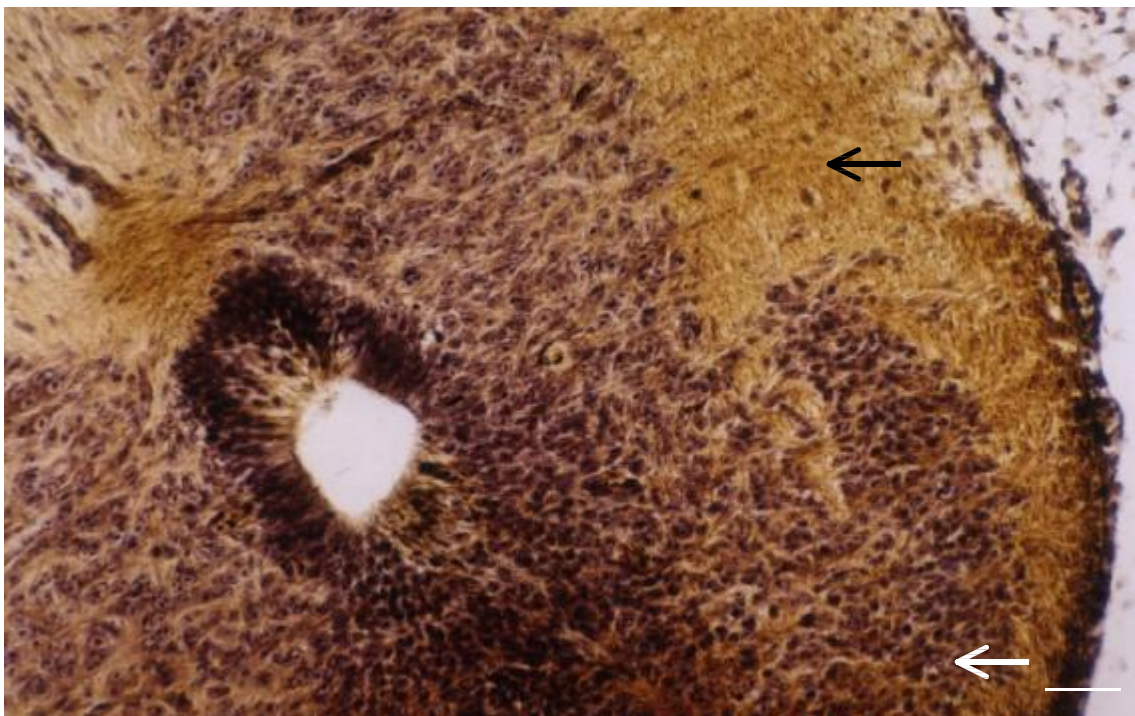
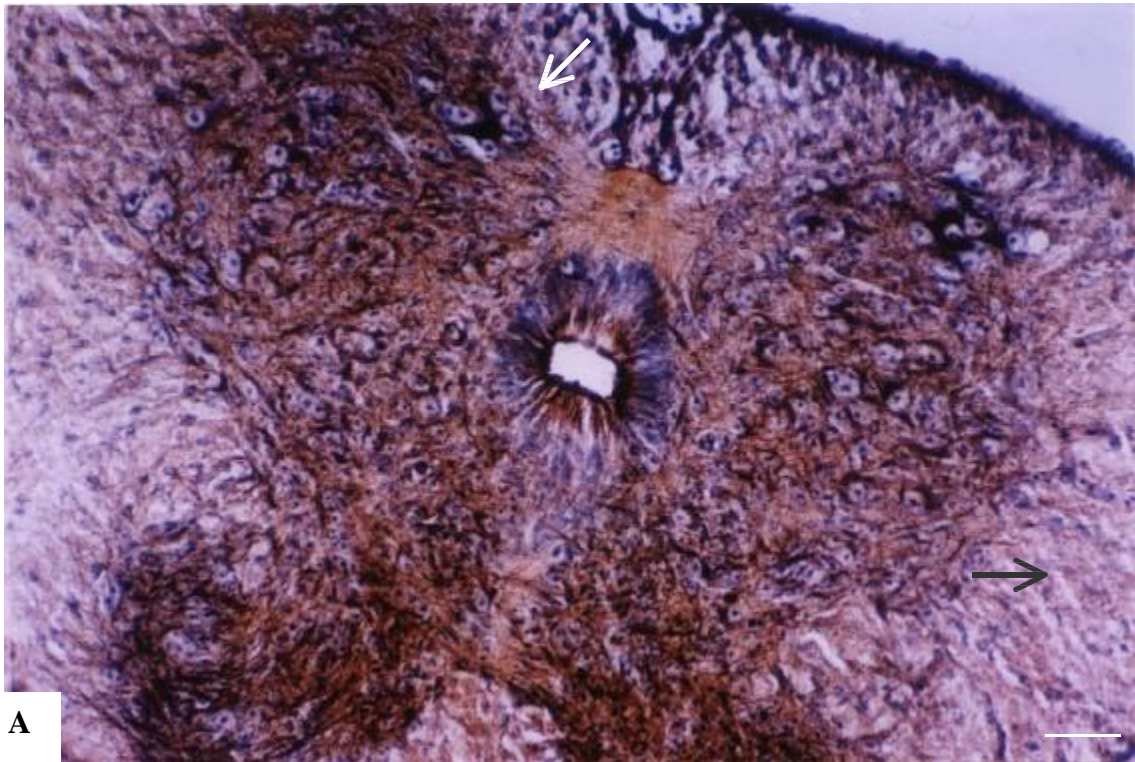
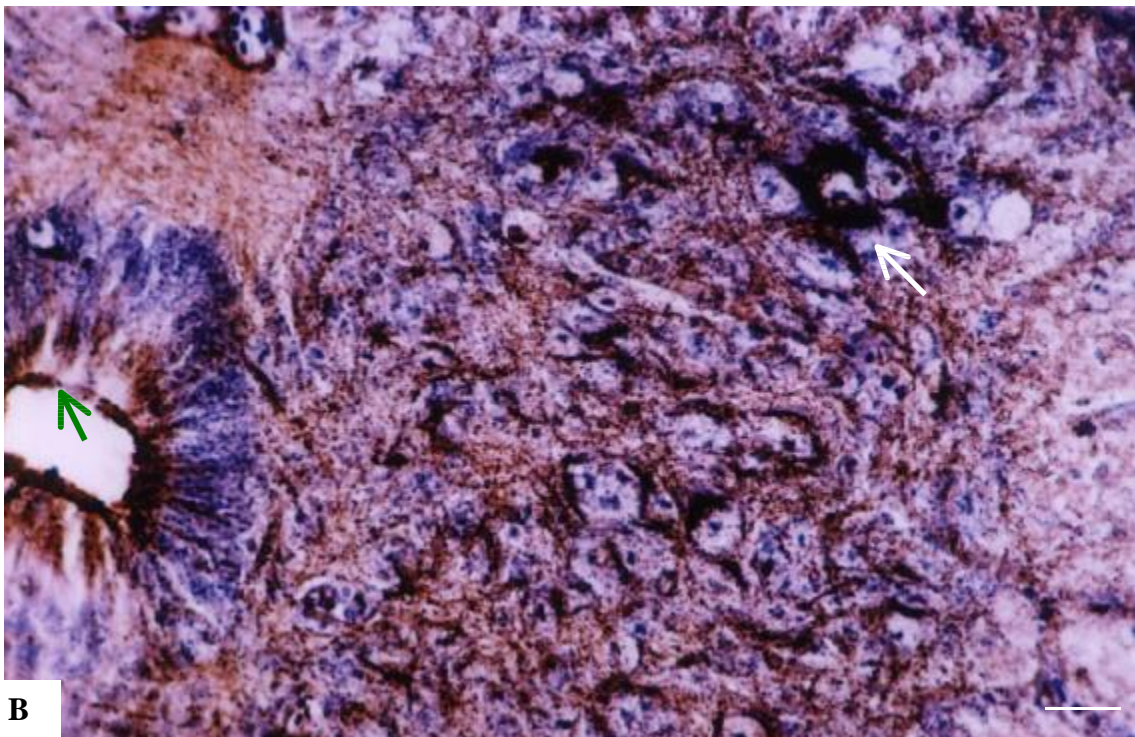


Figura 29: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 450 μ g de acetato de chumbo em E3. Técnica TIMM, contra-coloração Hematoxilina. A seta (\rightarrow) indica a deposição do metal no corno dorsal na camada do manto (seta branca) e camada marginal (seta preta). Escala: 7,7 μ m.



A

Figura 30 (A): Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 150 μ g de acetato de chumbo em E3. Técnica TIMM, contra-coloração Hematoxilina. A seta branca (\rightarrow) indica a região de maior deposição do metal no corno ventral na camada do manto e seta preta (\rightarrow) indica deposição do metal na camada marginal. Escala: 15 μ m.



B

Figura 30 (B): Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 150 μ g de acetato de chumbo em E5. Técnica TIMM, contra-coloração Hematoxilina. A seta (\rightarrow) indica a região de maior deposição do metal no corno ventral na camada do manto e ao redor do canal medular (seta verde). Escala: 7,7 μ m

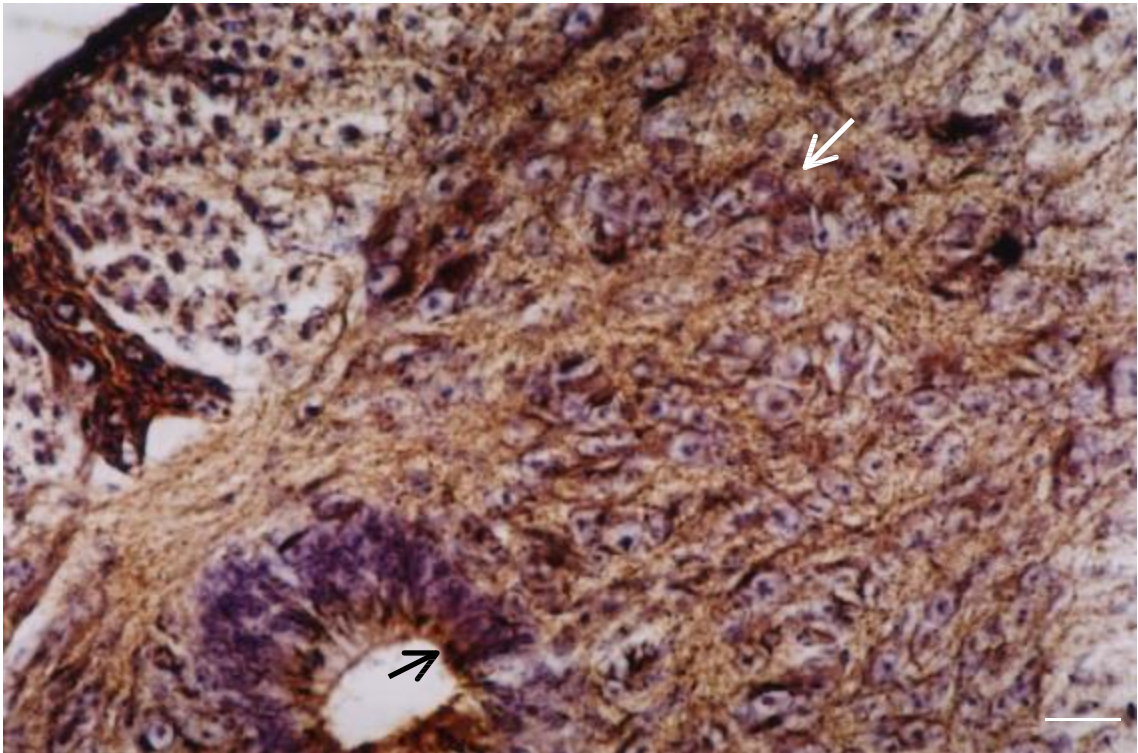


Figura 31: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 450 μ g de acetato de chumbo em E5. Técnica TIMM, contra-coloração Hematoxilina. As setas (→) indicam os locais de deposição do metal ao redor do canal medular (seta preta) e corno ventral na camada do manto (seta branca). Escala: 7,7 μ m.

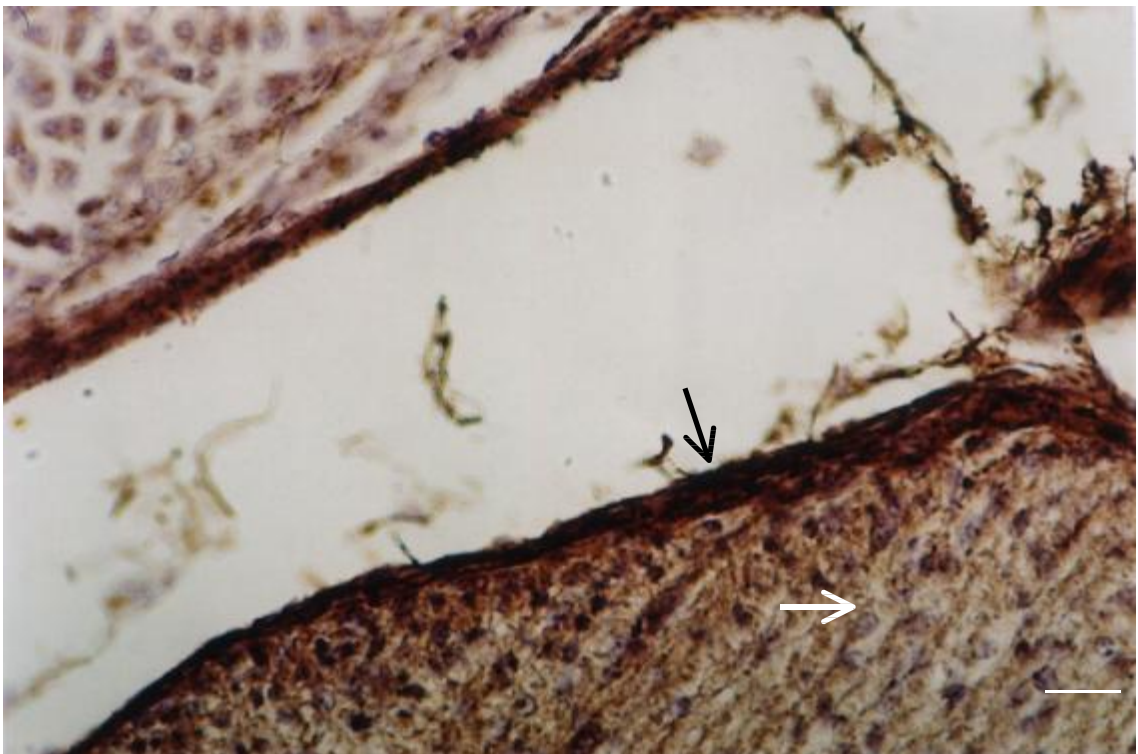


Figura 32: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 450 μ g de acetato de chumbo em E5. Técnica TIMM, contra-coloração Hematoxilina. Seta preta (→) indica o local de maior deposição do metal nas leptomeninges e a seta branca indica a impregnação do metal na camada marginal. Escala: 7,7 μ m.

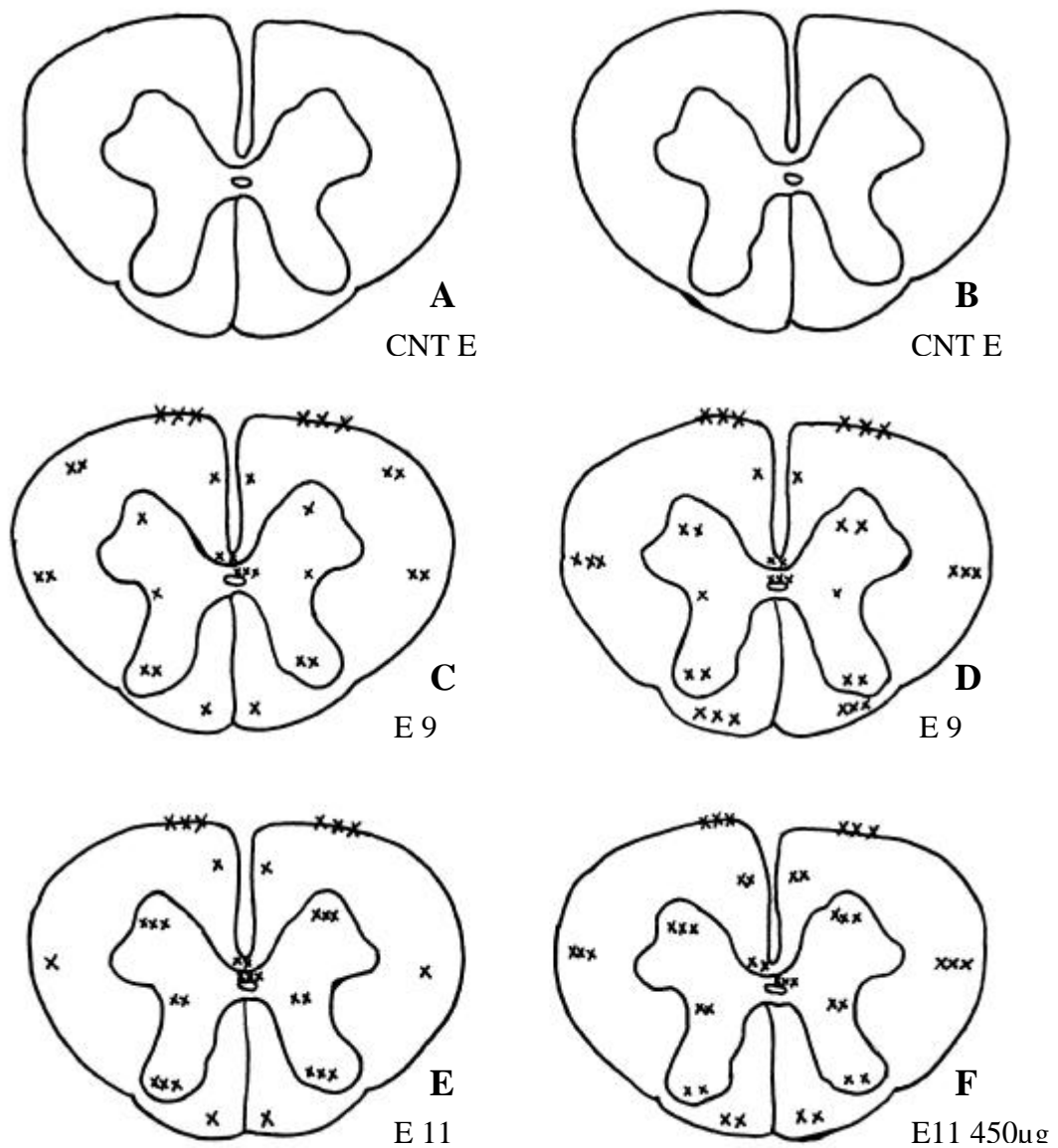


Figura 33: Desenhos esquemáticos indicando a deposição de acetato de chumbo nas medulas dos embriões de *Gallus domesticus* em E9 e E11. A - controle E9, B - controle E11, C - E9 150µg, D - E9 450µg, E - E11 150µg, F - E11 450µg, onde (x) indica marcação fraca, (xx) marcação moderada e (xxx) marcação intensa.

4.3 Caracterização das Células em Apoptose da Medula após Tratamento com Acetato de Chumbo

4.3.1 Localização das Células Apoptóticas

Os cortes das medulas de animais controle (figuras 35 (A e B) e 36 (A e B), que receberam apenas salina, quando incubados com TdT mostraram marcação para células em apoptose, mas estas em número reduzido, quando comparados ao grupo de dose 450 μ g, injetado no terceiro dia (E3) e analisados no nono dia (E9) de desenvolvimento (tabela 3).

Os cortes das medulas controle em E11 apresentaram marcação na região do funículo anterior, algumas células na coluna anterior e algumas células dispersas em todo tecido neural (figuras 36 A e B). Os cortes do controle E9, em geral apresentavam em todo tecido neural as células apoptóticas mais dispersas e em menor quantidade quando comparados aos demais grupo. Apresentavam-se mais evidentes ao redor do canal central da medula, contudo em número mais reduzido do que na maior dose (figuras: 35 A e B).

Os cortes das medulas dos animais que foram submetidos a dose de 150 μ g de [Pb (CH₃CO₂)₂] no terceiro dia de desenvolvimento embrionário foram marcadas positivamente para apoptose. Estas células foram evidenciadas principalmente ao redor do canal central (figuras 38 A e B) e dispersas na região anterior medula, tanto na camada do manto quanto na camada marginal figura 38 B e na região do corno ventral visualizada na figura 39.

Os animais tratados com a dose de 450 μ g de [Pb (CH₃CO₂)₂] no terceiro dia de desenvolvimento embrionário as medulas foram marcadas positivamente. As células foram evidenciadas na região do sulco lateral anterior (figura 40A), na coluna anterior (figura 40A), ao redor do canal central (figura 40B), na região do corno ventral (figura 40B e 41) e camada marginal (figura 40B) e dispersas no restante do tecido neural (figuras 40 (A e B)).

Os animais tratados com a dose de 150µg de $[Pb (CH_3CO_2)_2]$ no quinto dia de desenvolvimento embrionário, apresentaram um acúmulo de células apoptóticas na porção periférica do funículo anterior e ao redor do canal central da medula (figura 42). Nas demais regiões evidenciou-se uma marcação reduzida e difusa em todo tecido neural porém esta distribuição foi mais acentuada na região ventral do que na dorsal (figuras 43 A e B).

Os animais tratados com a dose de 450µg de $[Pb (CH_3CO_2)_2]$ no quinto dia de desenvolvimento embrionário, apresentaram uma distribuição mais acentuada na região anterior da medula (figura 45) destacando-se a: porção periférica do funículo anterior (figura 44 A), fascículo anterior e coluna anterior (figura 44 B). Obteve-se marcação ao redor do canal central (figura 44 A e B), marcações difusas nas regiões coluna posterior (figura 44 A), funículo posterior, fascículo cuneiforme e fascículo grácil.

As células apoptóticas nas concentrações analisadas e em menor proporção nos controles, apresentaram principalmente uma distribuição na região ventral da medula, tanto na porção periférica da camada do manto quanto na camada marginal (regiões funículo anterior, sulco lateral anterior e parte anterior do funículo lateral) e ao redor do canal central da medula.

Pode-se observar uma marcação mais evidente na dose de 450µg de $[Pb (CH_3CO_2)_2]$ administrada no terceiro dia embrionário, quando comparada a dose de 150µg, nas duas idades estudadas e aos grupos controle.

Na análise com a coloração de Violeta de Cresila, visualizamos a retração dos núcleos apoptóticos na porção anterior e lateral da camada marginal, tanto nos cortes controle quanto nos cortes tratados (figura: 50).

Nos cortes esquemáticos (figura 47) comparando-se todos os grupos visualizamos uma marcação mais acentuada em torno do canal central e na porção anterior da medula em todos os grupos tratados em menor proporção os grupos controle (tabela 4). Na região posterior

obtivemos marcação fraca (x) tanto na camada do manto quanto camada marginal visualizados em todos os grupos (figura 47) (tabela 4).

4.3.2 Análise Estereológica das Células Apoptóticas

O grupo onde a dose utilizada foi de 450µg de $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ injetada no terceiro dia de desenvolvimento, apresentou diferença estatística significativa quanto ao número de células apoptóticas presentes na medula, quando comparados aos demais grupos (tabela 3).

Os grupos cujo a dose utilizada foi de 150µg de $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ e injetada tanto no terceiro quanto no quinto dia embrionário não apresentaram entre si diferenças estatísticas quanto ao número de células apoptóticas localizadas na medula. O grupo E3 150µg de $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ apresentou diferenças estatísticas com o grupo controle E3 (tabela 3).

Os animais tratados com a dose de 450µg de $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$, no terceiro e quinto dia de desenvolvimento apresentaram diferenças estatísticas entre si, no entanto o grupo tratado no quinto dia não apresentaram diferenças estatísticas com os outros grupos (tabela 3).

Os animais tratados com salina no terceiro dia de desenvolvimento, apresentaram diferenças estatísticas com os animais tratados com a dose de 150µg de $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ e com os animais tratados com a dose de 450µg de $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ no terceiro dia de desenvolvimento (tabela 3).

Os animais tratados com salina no quinto dia de desenvolvimento, apresentaram diferenças estatísticas significativas apenas com grupo E9 450µg de $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$ (tabela 3).

Tabela 3: Estereologia das células apoptóticas presentes na medula dos embriões expostos ao acetato de chumbo e dos embriões controle.

Tratamento	Dia Análise	Porcentagem média de células (desvio padrão)
E3 CNT (n=6)	E9	03 (\pm 1)**
E5 CNT (n=6)	E11	05 (\pm 3)
E3 150 (n=9)	E9	10 (\pm 4)**
E5 150 (n=10)	E11	09 (\pm 3)
E3 450 (n=9)	E9	20 (\pm 8)*
E5 450 (n=10)	E11	10 (\pm 6)

* indicam diferenças significativas entre a quantidade de células apoptóticas nos grupos de tratamento ($p \leq 0,05$); (n) corresponde ao número de medulas (divididas em lado direito e esquerdo) analisados em cada grupo.

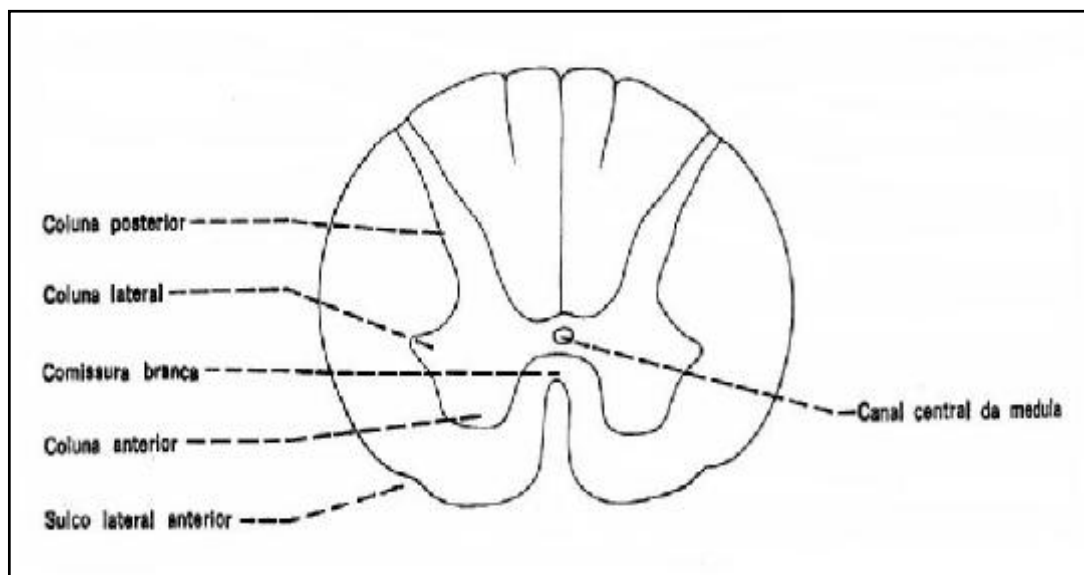
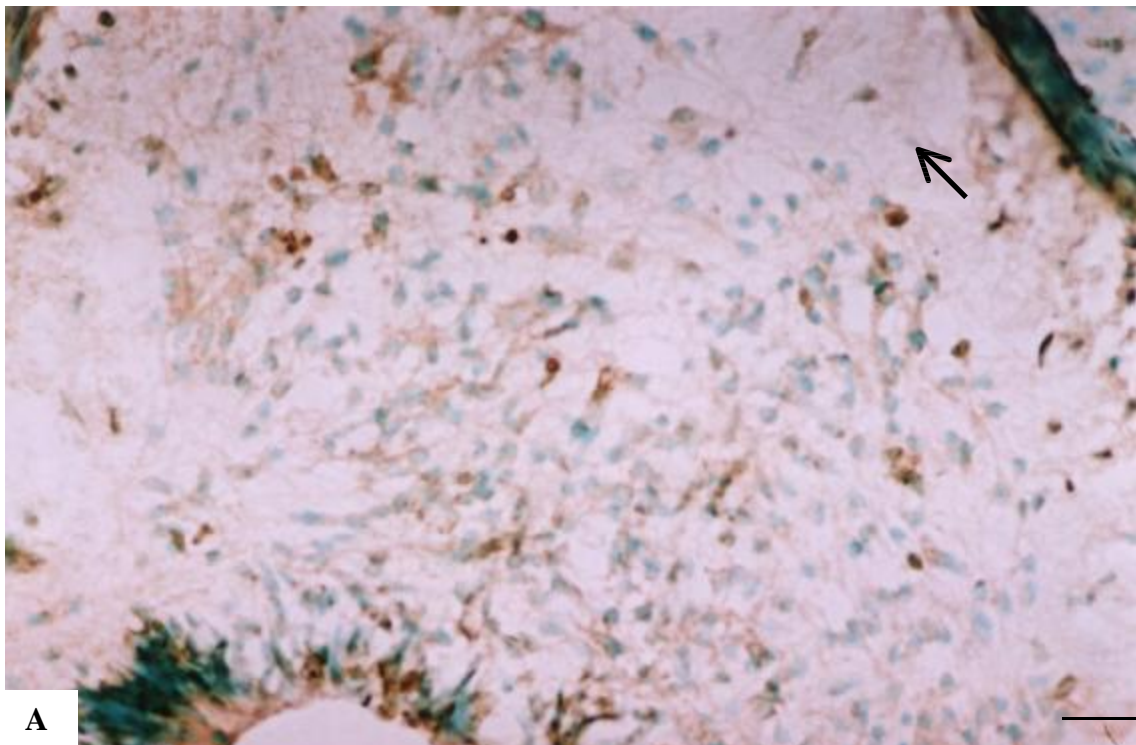


Figura 34: Corte esquemático indicando regiões da medula espinhal.

Tabela 4: Distribuição das células apoptóticas nos cortes esquemáticos em diferentes regiões das medulas de embriões de *Gallus domesticus*

	CNT E9	CNT E11	E9 150	E9 450	E11 150	E11 450
Canal medular	++	+	+++	+++	++	+++
Região ventral						
Camada Marginal	+	++	+	+++	+++	++
Camada do Manto	+	+	+	+++	+	+
Região Dorsal						
Camada do Manto	+	+	+	+++	+	+
Camada Marginal	+	+	+	+	+	+
Região Lateral						
Camada Marginal	+	+	+	+	+	+



A

Figura 35 (A): Secção histológica da medula de embrião normal de *Gallus domesticus* em E9. Seta (→) indica célula em apoptose. Técnica TdT no embrião controle (injetado salina), contra-coloração com Verde de Metila. Escala: 7,7µm .

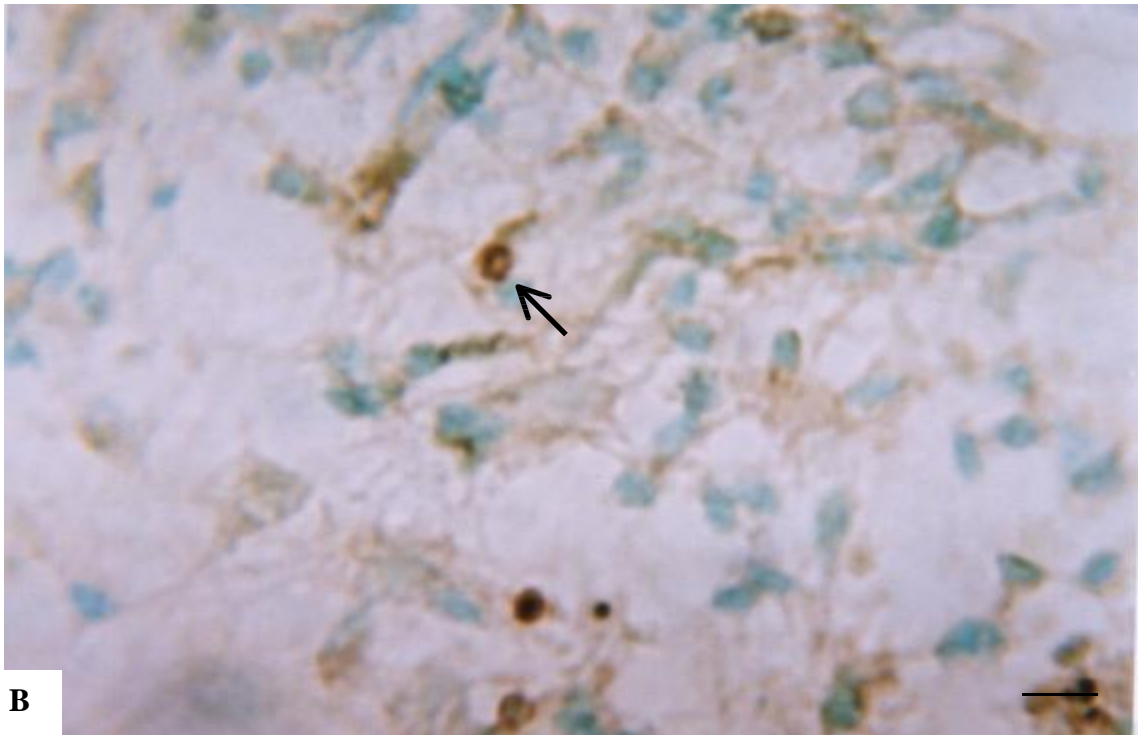
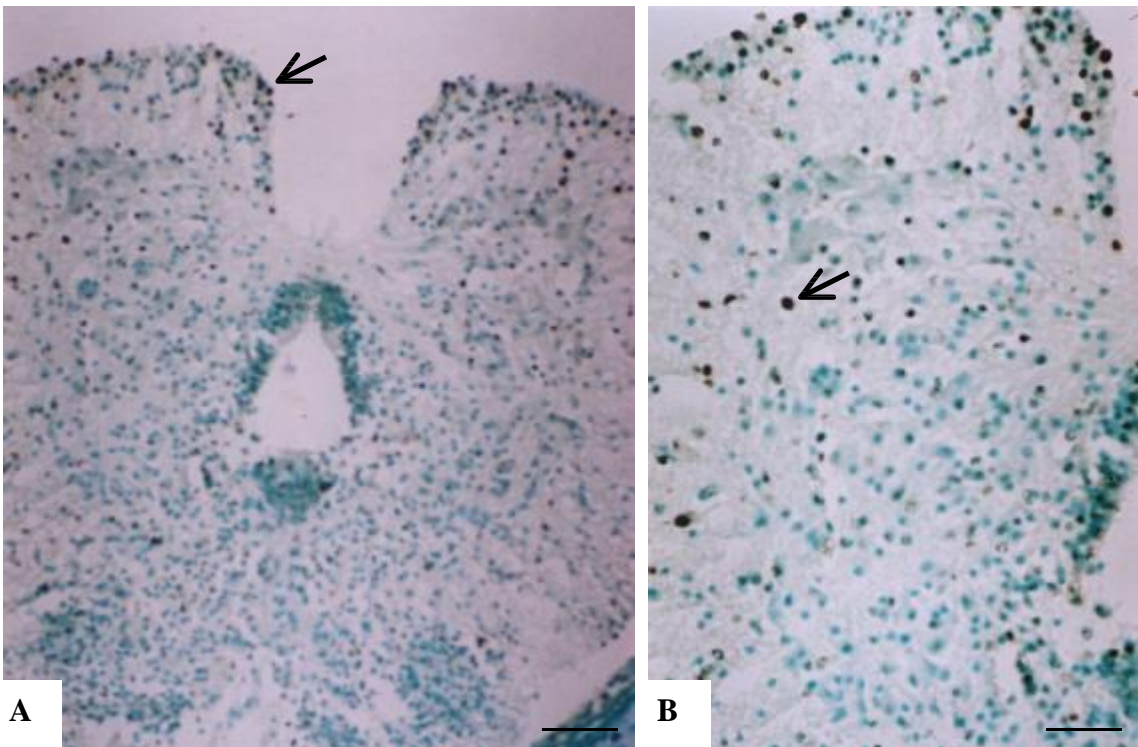


Figura 35 (B): Secção histológica da medula de embrião normal de *Gallus domesticus* em E9. Seta (→) indica célula em apoptose. Técnica TdT no embrião controle (injetado salina) , contra-coloração com Verde de Metila Escala: 3 μ m .



Figuras 36 (A) e (B): Secção histológica da medula de embrião normal de *Gallus domesticus* em E11, Técnica TdT, contra- coloração com Verde de Metila.. Setas indicam núcleos apoptóticos (→) no embrião controle. Escalas: A/ 15 μ m e B/ 7,7 μ m.

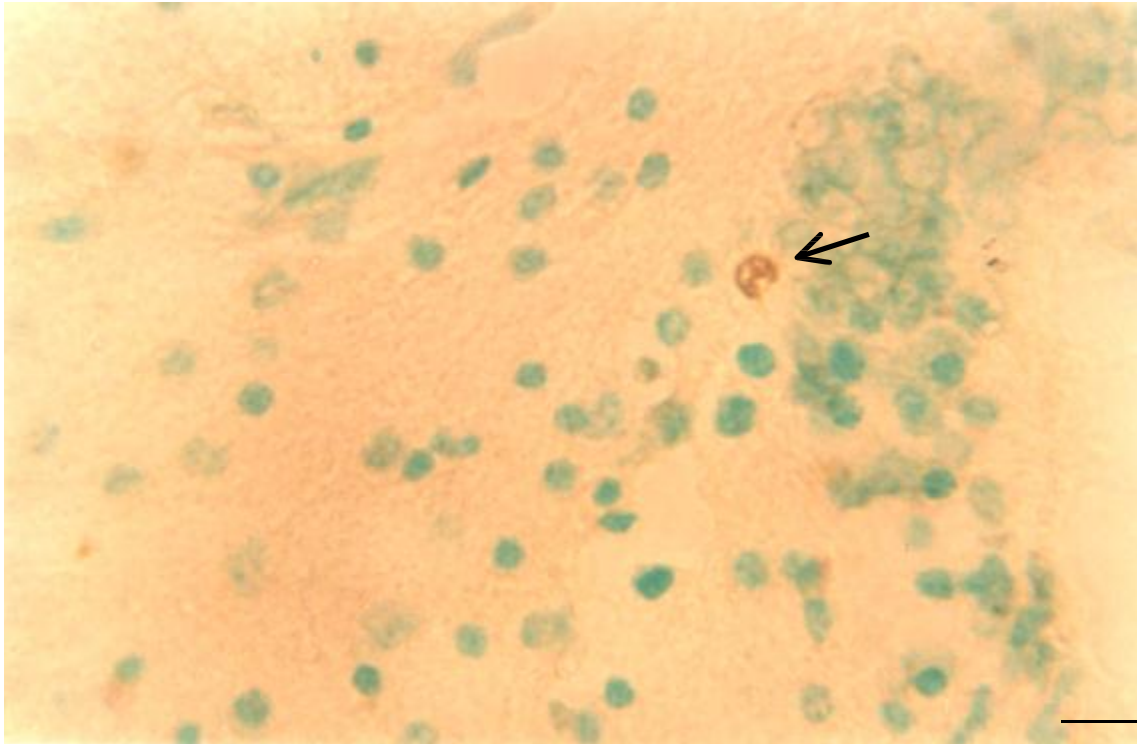


Figura 37: Secção histológica da medula de embrião normal de *Gallus domesticus* em E11. Seta indica núcleo apoptótico (→) no embrião controle. Técnica TdT, contra-coloração: Verde de Metila. Escala: 3 μ m.

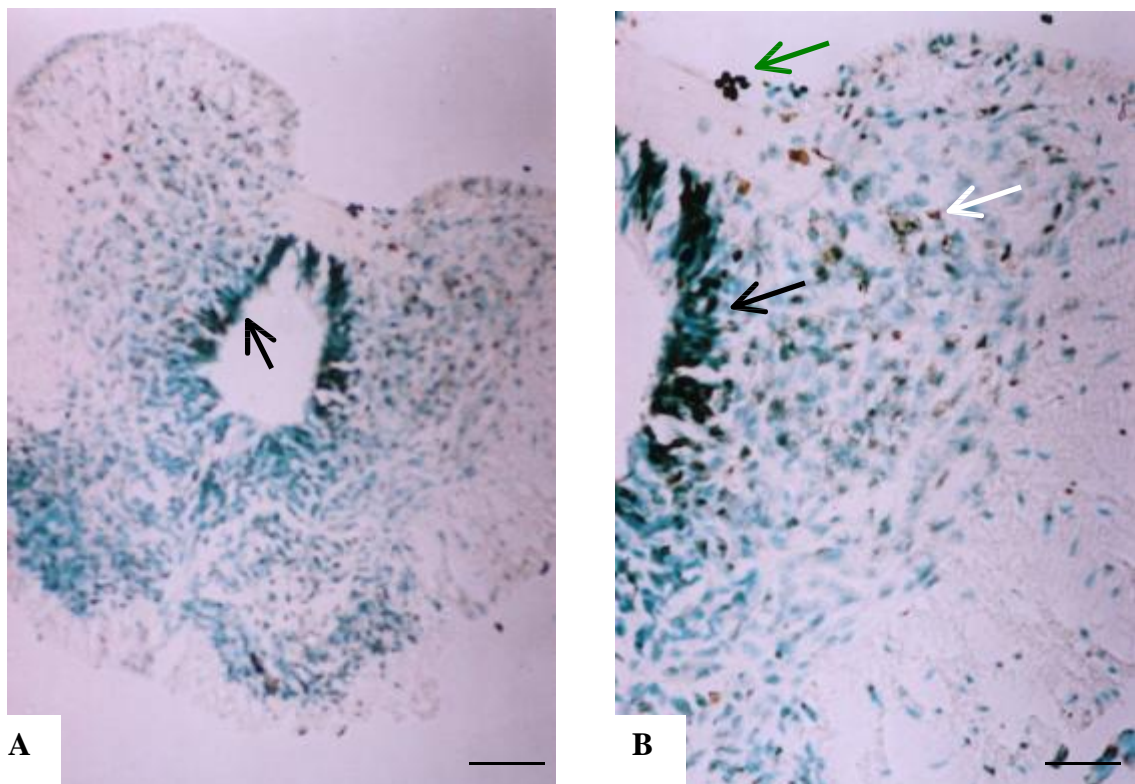


Figura 38 (A) e (B): Secções histológicas da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 150 μ g de acetato de chumbo em E3. Técnica TdT, contra-coloração: Verde de Metila. Setas (→) indicam os locais de marcação de células apoptóticas ao redor do canal central (setas pretas) e na região anterior da medula tanto na camada do manto (seta branca) quanto camada marginal (seta verde). Escalas: A/ 15 μ m e B/ 7.7 μ m .

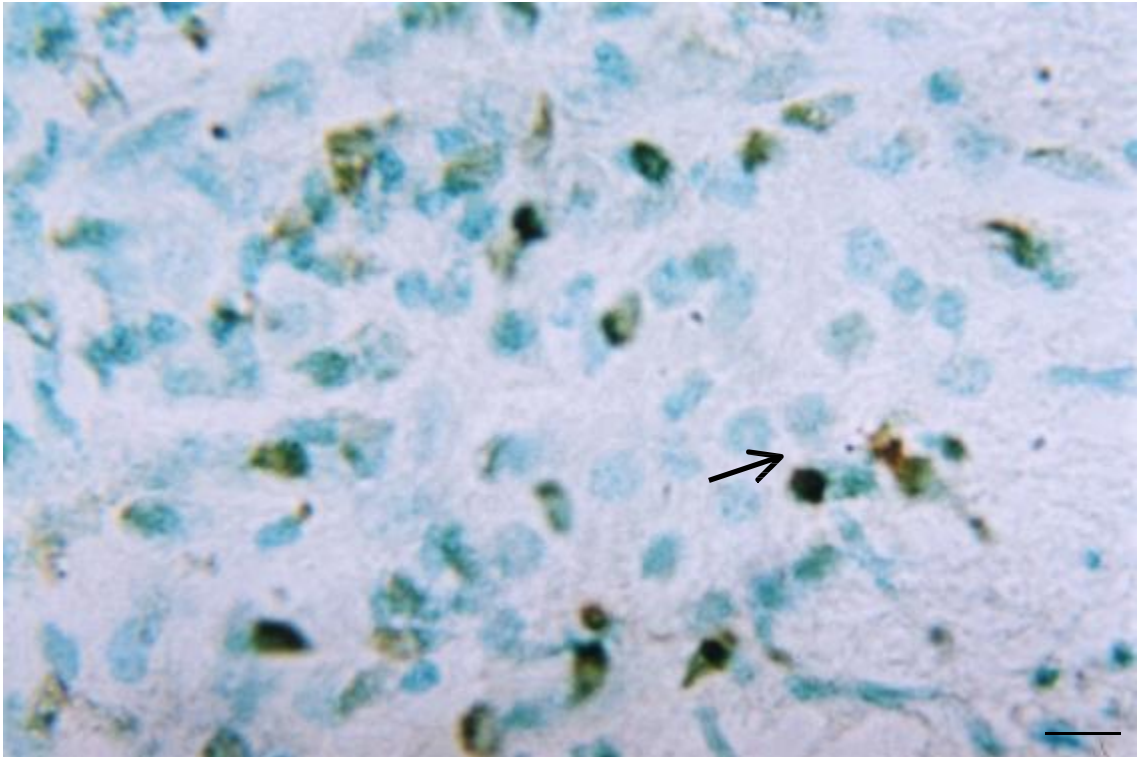


Figura 39: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E3. Técnica TdT, contra-coloração com Verde de Metila . Seta (→) indica as células apoptóticas no corno ventral. Escala: 3µm.

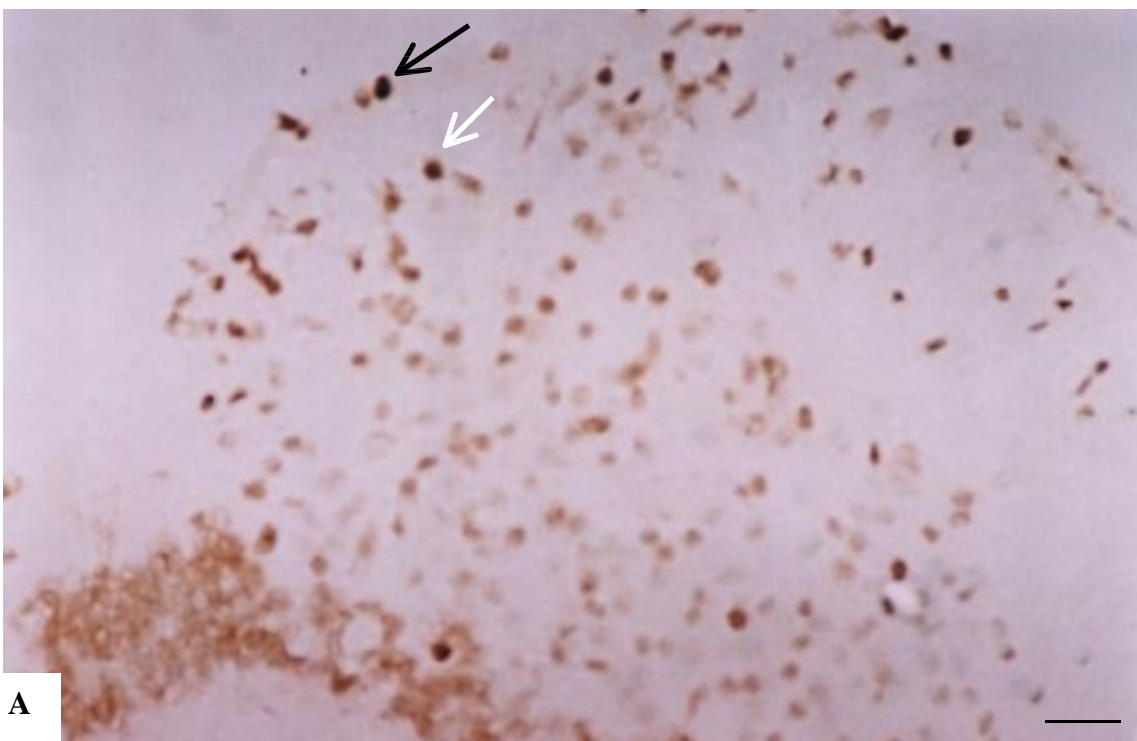
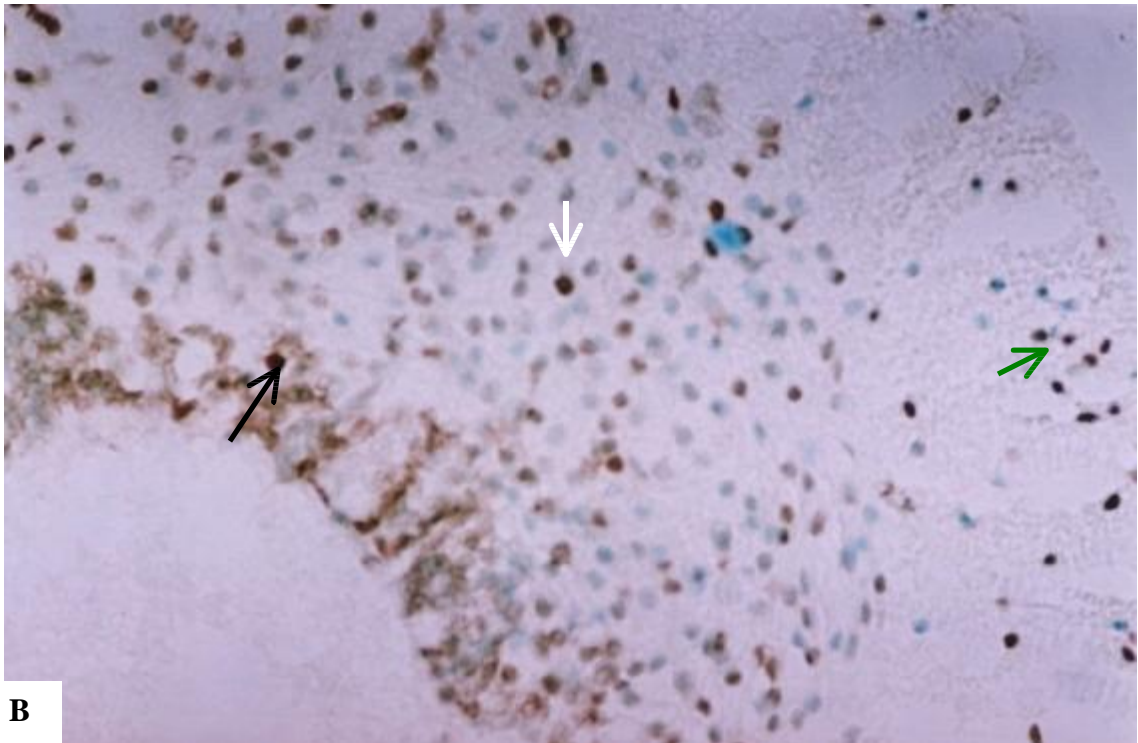


Figura 40 (A): Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 450µg de acetato de chumbo em E3. Técnica TdT, contra-coloração com Verde de Metila. Seta preta (→) indica o local de células apoptóticas na região ventral região referente ao sulco lateral anterior e seta branca indica célula apoptótica na coluna anterior. Escala: 7,7µm.



B

Figura 40 (B): Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 450 μ g de acetato de chumbo em E3. Técnica TdT, contra- coloração com Verde de Metila. Setas (\rightarrow) indicam as células apoptóticas ao redor do canal central (seta preta), corno ventral (seta branca) e camada marginal (seta verde). Escala: 7,7 μ m.

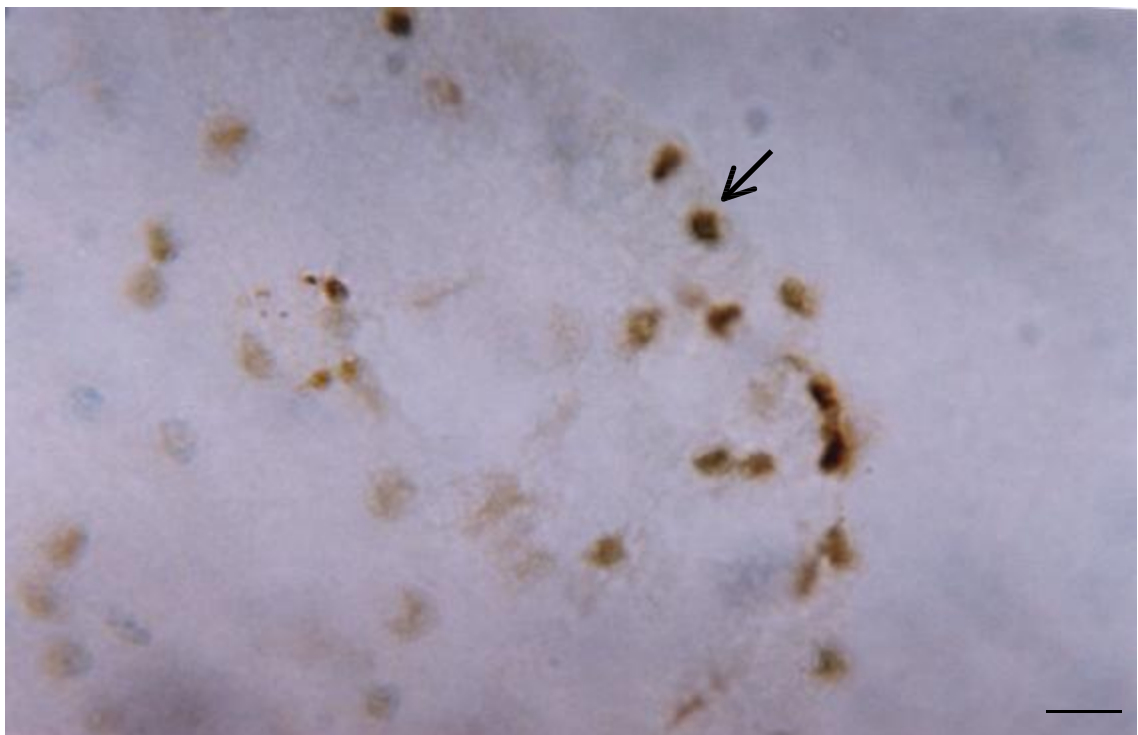


Figura 41: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 450 μ g de acetato de chumbo em E3. Técnica TdT, contra- coloração com Verde de Metila. Seta (\rightarrow) indica o local de células apoptóticas na região ventral. Escala: 3 μ m.

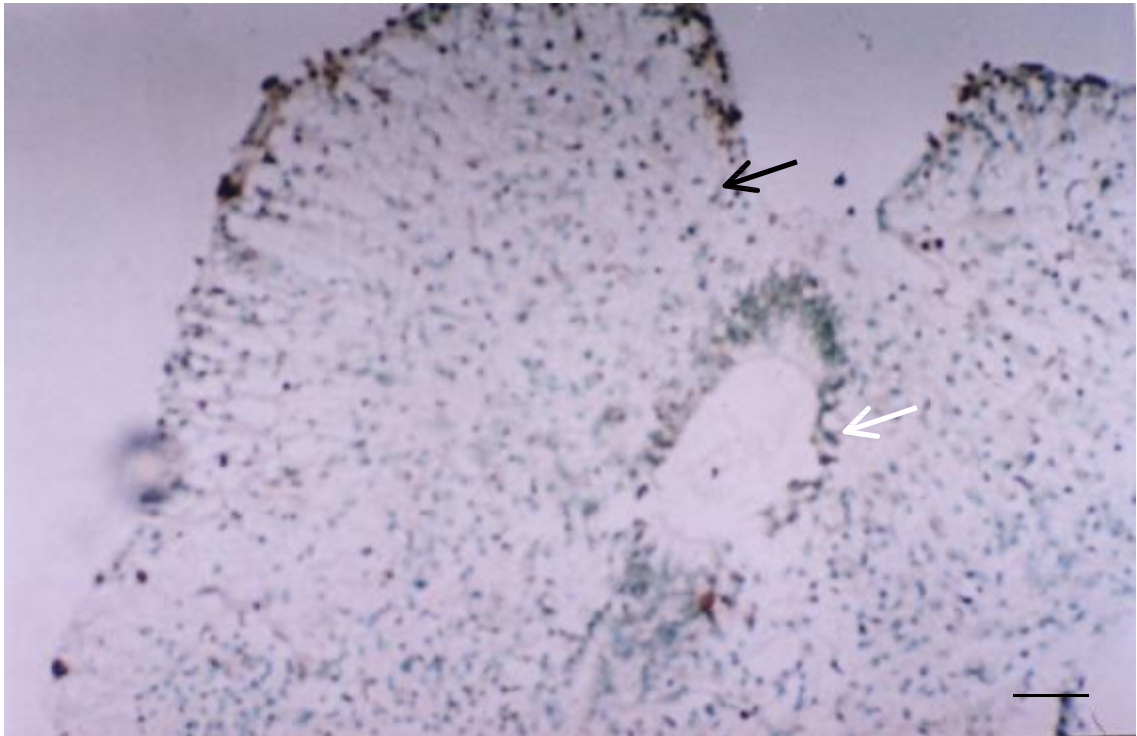


Figura 42: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E5. Técnica TdT, contra-coloração: Verde de Metila . Seta (→) indicam as células apoptóticas na região ventral (porção periférica do funículo anterior) e ao redor do canal central da medula (seta branca). Escala: 15µm.

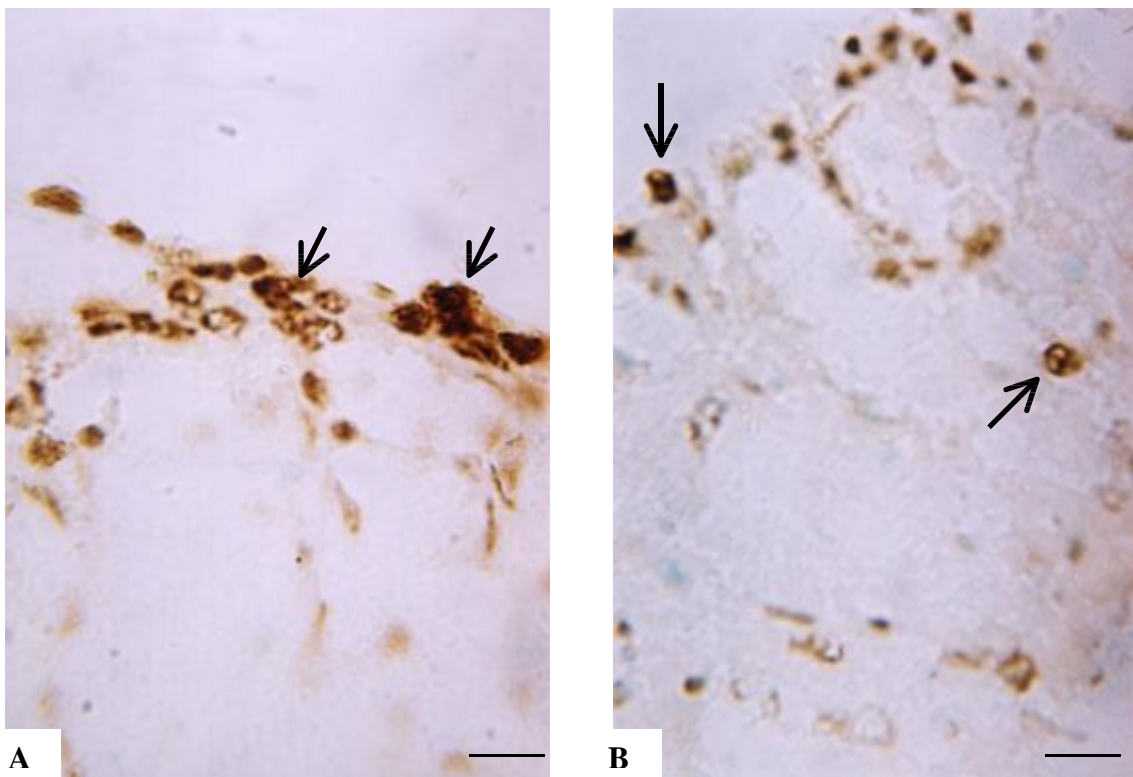


Figura 43 (A) e (B): Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E5. Técnica TdT, contra-coloração: Verde de Metila. Setas (→) indicam as células apoptóticas no corno ventral. Escala: 3µm .

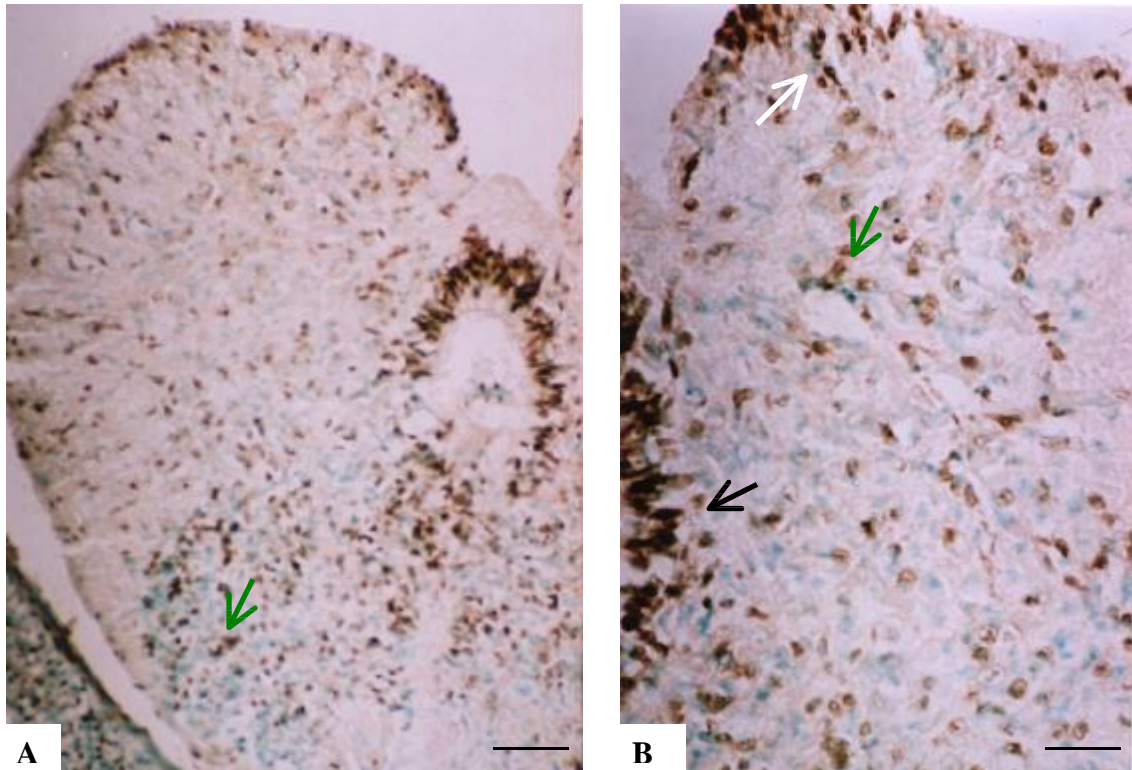


Figura 44 (A) e (B): Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 450 μ g de acetato de chumbo em E5. Técnica TdT, contra-coloração: Verde de Metila. Figura (A): Setas (\rightarrow) indicam as células apoptóticas no corno ventral (seta branca) na porção periférica do funículo anterior, ao redor do canal central (seta preta) e células na coluna posterior da medula (seta verde). Figura (B): Indica as células apoptóticas ao redor do canal central (seta preta), na região fascículo anterior (seta branca) e na região coluna anterior (seta verde). Escala: A/ 15 μ m e B/ 7,7 μ m.

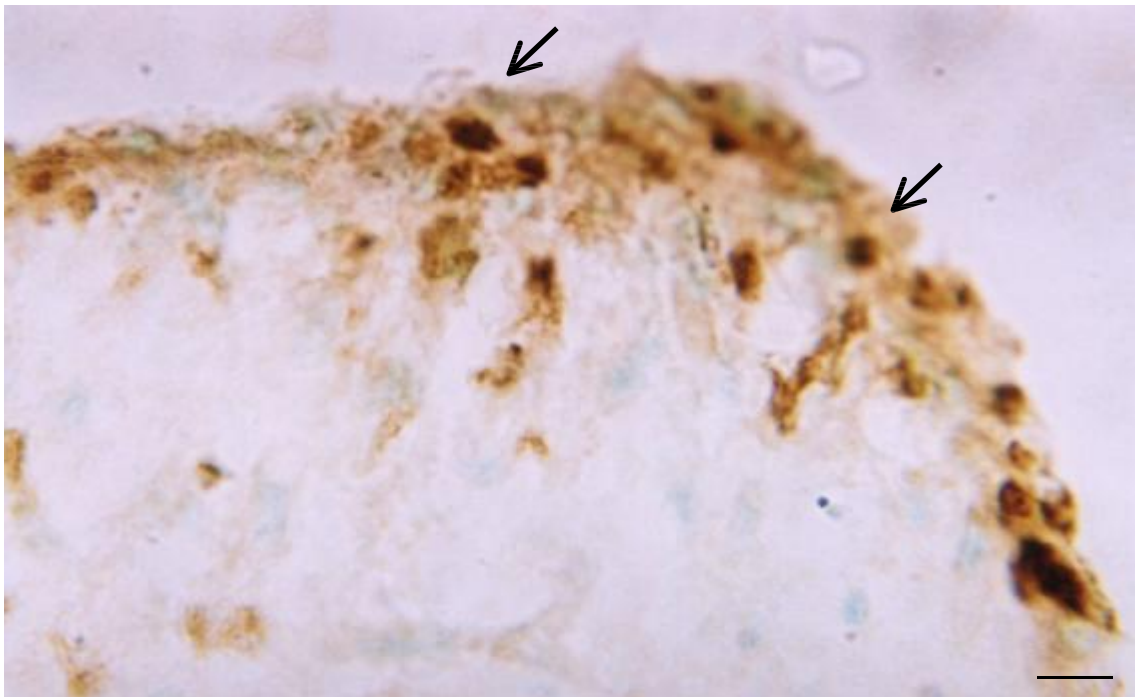


Figura 45: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 450 μ g de acetato de chumbo em E5. Técnica TdT, contra-coloração: Verde de Metila. As setas (\rightarrow) indicam as células apoptóticas na região ventral. Escala: 3 μ m

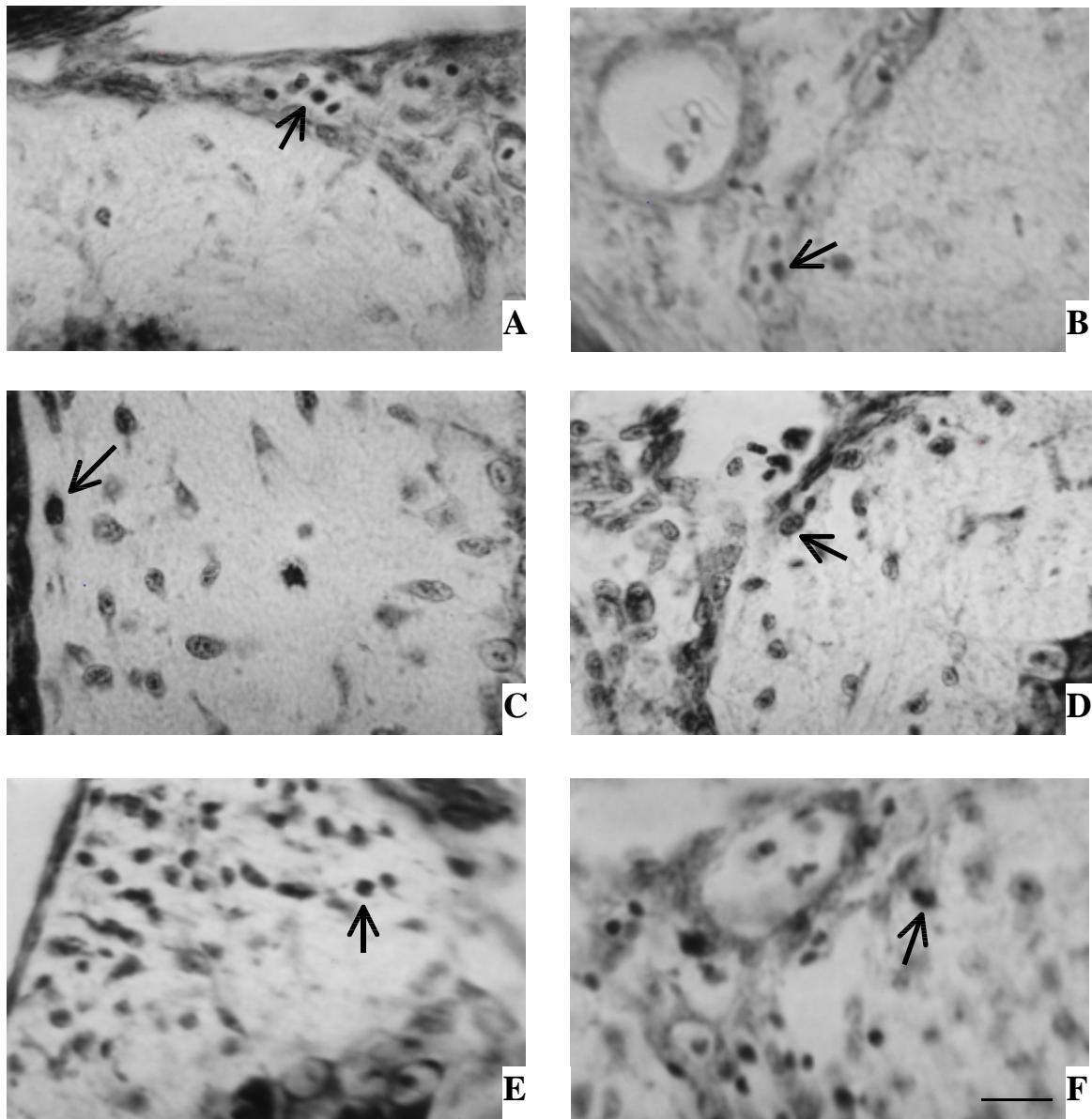


Figura 46: Secções histológicas de medulas de embriões de *Gallus domesticus* submetidos a técnica de coloração de Nissl. Aumento: 100x. Escala: 3µm. A - controle E9, B – controle E11, C – E9 150µg, D – E9 450µg, E -E11 150µg, F- E11 450µg. Setas indicam os núcleos na camada marginal das secções que mostram características de degeneração, demonstrando um encolhimento da célula e forte marcação pelo Nissl.

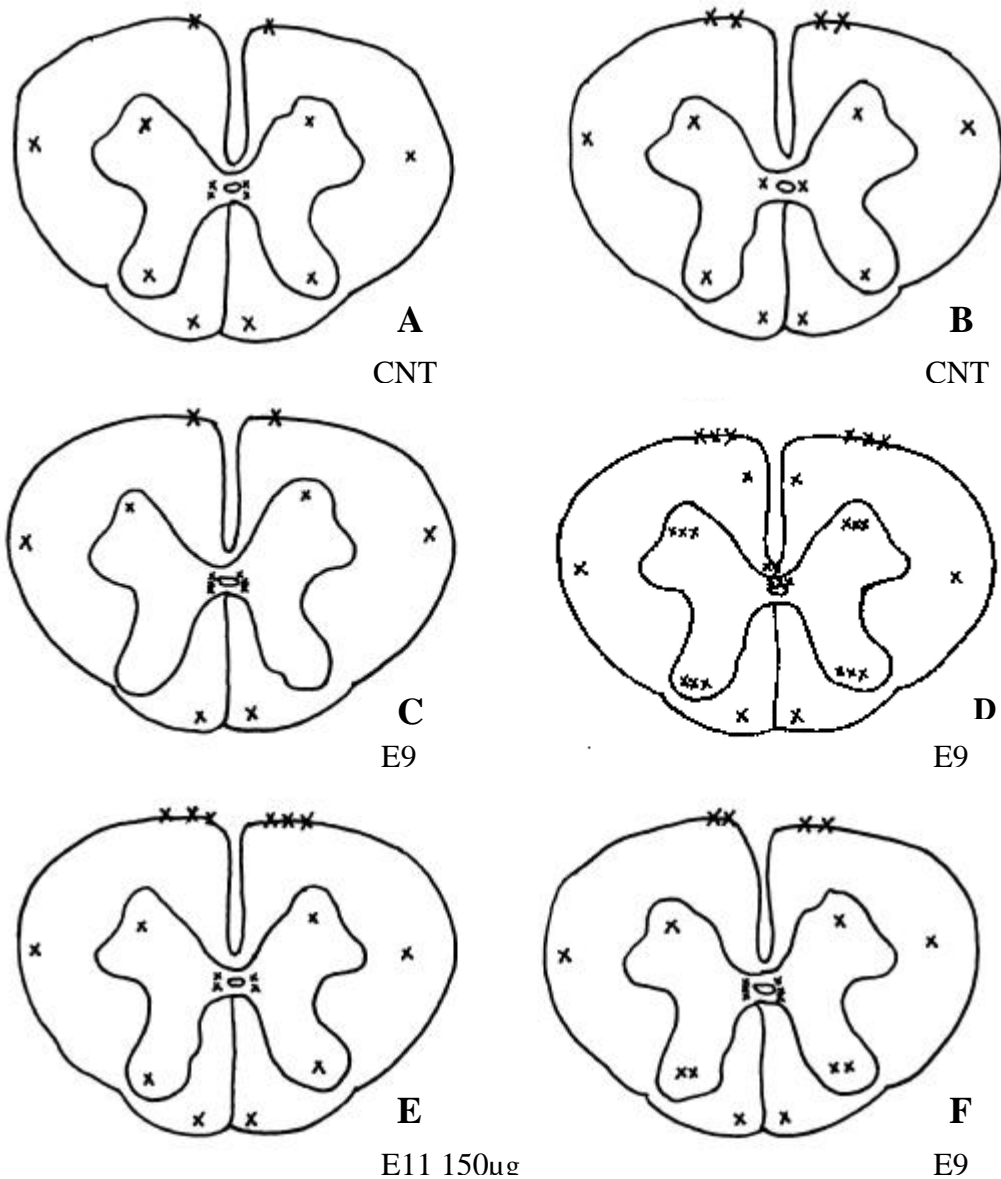


Figura 47: Cortes esquemáticos indicando a distribuição das células apoptóticas nas medulas dos embriões de *Gallus domesticus* em E9 e E11. A - controle E9, B - controle E11, C - E9 150µg D - E9 450µg, E - E11 150µg, F - E11 450µg. (+) indica marcação leve, (++) marcação moderada e (+++) marcação grave para apoptose.

4.4 Caracterização das Células da Glia Radial na Medula Espinhal após o tratamento com Acetato de Chumbo

Os cortes de medula dos embriões submetidos a dose de 150 μ g de [Pb (CH₃CO₂)₂], no terceiro dia de desenvolvimento, foram marcadas positivamente para células da glia radial. Estas células apresentam finos prolongamentos que se estendem desde a camada do manto até a camada marginal (figuras 48 e 49).

No quinto dia de desenvolvimento, quando submetidos a dose de 150 μ g de [Pb (CH₃CO₂)₂], foram marcadas positivamente para células da glia radial. Estas células apresentaram finos prolongamentos, com inúmeras ramificações, nas quais observar-se corpos de células neurais alongados migrando (figura 51). Os prolongamentos das células gliais se estendem desde a camada do manto até a camada marginal (figuras 50 e 51).

Os cortes das medulas dos embriões controle, que receberam apenas salina, quando incubados com anticorpo anti-vimentina, mostraram ausência de marcação, mesmo após diversas variações da técnica e todo controle necessário para realização de Imuno-histoquímica (figura 52)

A medula dos embriões submetidos a dose de 450 μ g de [Pb (CH₃CO₂)₂], no terceiro e quinto dia não apresentou caracterização da glia radial (figura 53).

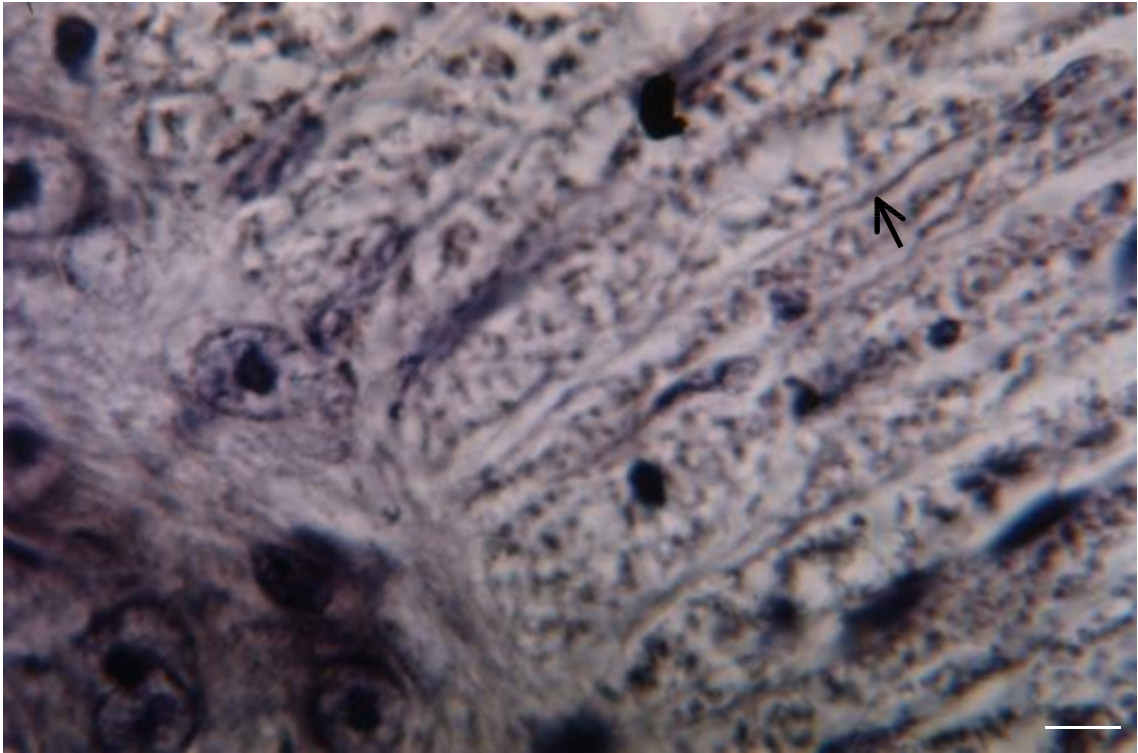


Figura 48: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E3. Técnica Imuno-histoquímica para a Vimentina, contra-coloração com Hematoxilina. Seta (→) indica a célula da glia radial . Escala: 3µm.

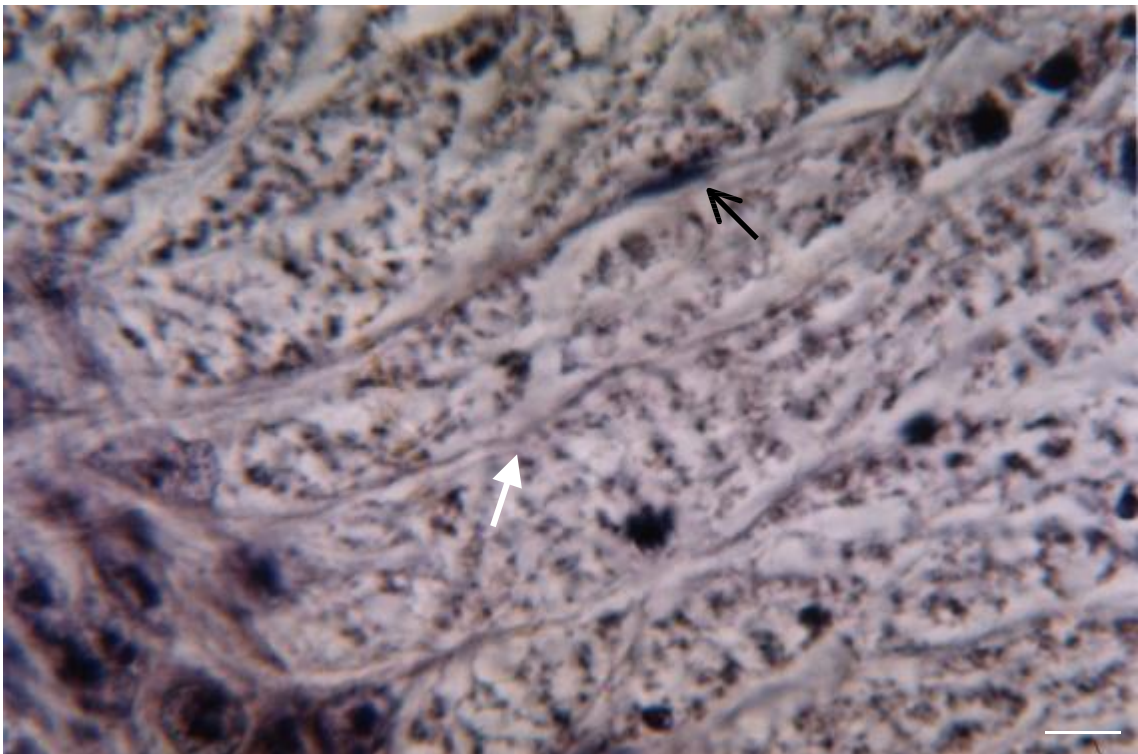


Figura 49: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 150µg de acetato de chumbo em E3. Técnica Imuno-histoquímica para a Vimentina., contra-coloração com Hematoxilina . Seta (→) indica célula da glia radial (seta branca) e neurônios migrando (seta preta). Escala: 3µm

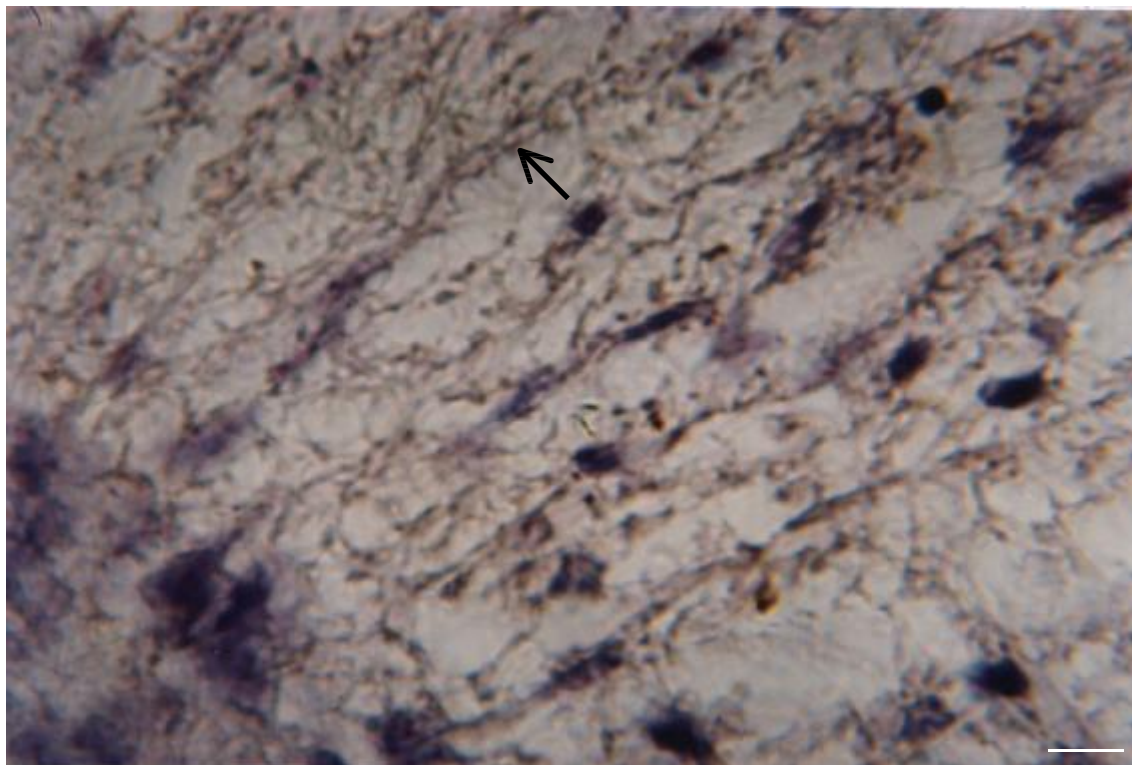


Figura 50: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 150 μ g de acetato de chumbo em E5. Técnica de Imuno-histoquímica para a Vimentina, contra-coloração com Hematoxilina . Seta (\rightarrow) indica a célula da glia radial. Escala: 3 μ m

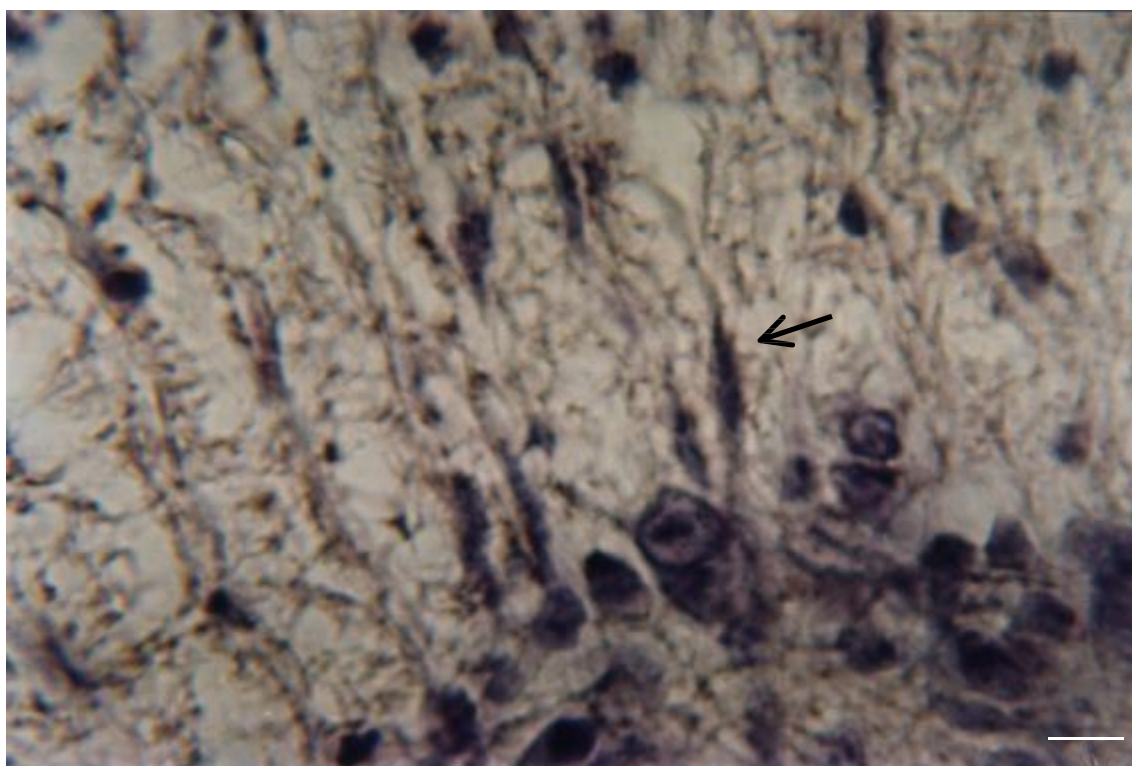


Figura 51: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 150 μ g de acetato de chumbo em E5. Técnica de Imuno-histoquímica para a Vimentina. Contra-coloração com Hematoxilina . Seta (\rightarrow) indica neurônio migrando. Escala: 3 μ m.



Figura 52: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E11, controle. Técnica de Imuno-histoquímica para a Vimentina, contra-coloração: Hematoxilina . Seta (→) indica ausência de marcação para vimentina . Escala: 3 μ m.

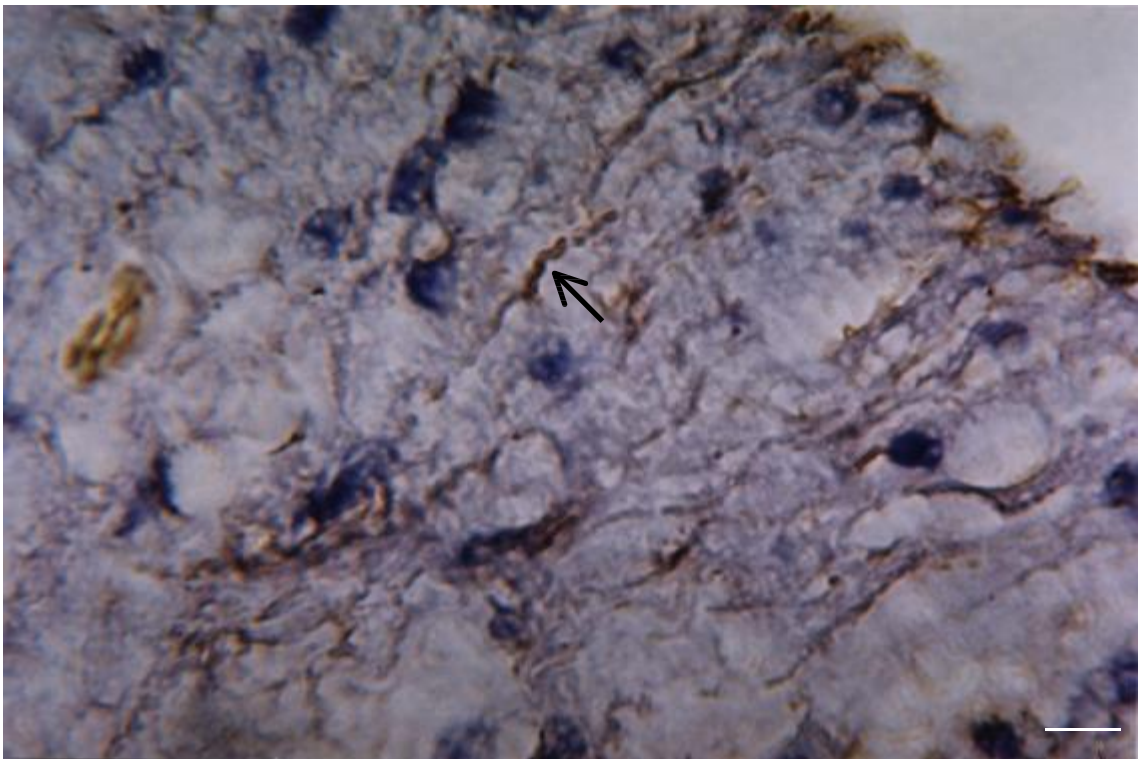


Figura 53: Secção histológica da medula de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 450 μ g de acetato de chumbo em E3. Técnica de Imuno-histoquímica para a Vimentina, contra-coloração com Hematoxilina . Seta (→) indica não caracterização da glia radial pela marcação com a vimentina. Escala: 3 μ m.

5. DISCUSSÃO

Para estudos do desenvolvimento de vertebrados, os embriões de aves são utilizados freqüentemente como modelo experimental, pois permitem avaliar a ação de agentes exógenos, como acetato de chumbo, e as alterações induzidas por este metal durante os períodos embrionários.

Neste estudo os embriões submetidos à salina (controle), apresentaram pequenos focos hemorrágicos, não mostrando, porém alterações das características morfológicas próprias da espécie. Nos embriões tratados com o acetato de chumbo pode-se observar alterações vasculares de grande representatividade, caracterizando-se por extravasamento sangüíneo dentro das vesículas cerebrais. Alterações morfológicas como hidrocefalia, extrusão visceral e malformação de face, foram observadas em todos os grupos tratados com acetato de chumbo, comprometendo o padrão normal do desenvolvimento de *Gallus domesticus*, indicando a ação deletéria deste metal no desenvolvimento do sistema nervoso desta espécie.

Erros são inerentes ao processo de desenvolvimento embrionário (CARLSON, 1996) entretanto a repetição do padrão da malformação, bem como sua representatividade, diferem o processo normal do patológico. Os números de malformações registradas em nosso estudo indicam que nas doses utilizadas o acetato de chumbo é um agente teratogênico multipotente, interferindo nos mecanismos de formação de vários sistemas orgânicos.

Narbaitz e colaboradores (1985) administrou uma única dose de nitrato de chumbo diluído, na câmara de ar de ovos de White Leghorn, no décimo dia de incubação e vinte e quatro horas após a administração do metal, observou pequenos e múltiplos focos hemorrágicos na maioria dos embriões observados. Após quarenta e oito horas de

administração do chumbo, houve uma ampliação da área hemorrágica em todos os embriões estudados. No terceiro dia após a administração, aumentou a área hemorrágica, conseqüentemente havendo necrose no tecido nervoso. Estes resultados nos indicam que a hemorragia consiste na lesão primária produzida pelo chumbo.

Pérez-Coll e colaboradores (1988) trataram embriões do anfíbio *Bufo arenarum* com diferentes concentrações de nitrato de chumbo, e observaram alterações morfológicas principalmente nos embriões tratados nas concentrações abaixo de 1.0 mg/L Pb⁺⁺. Os autores registraram alta incidência de malformações, como neurulação parcial, embriões com forma de pêra e microcefalia. Em concentrações mais altas (1.0 mg/L Pb⁺⁺), houve um aumento gradual da teratogênese e letalidade, sendo que 80 a 100% dos embriões não sobreviveram além de quarenta e oito horas.

Nossos resultados corroboram com os achados de Narbaitz e colaboradores (1985) e Pérez-Coll e colaboradores (1988) que observaram que altas doses de chumbo administradas no decorrer do desenvolvimento, causam alterações morfológicas e histológicas podendo em casos mais graves levar a letalidade, inviabilizando a eclosão.

A ampla distribuição do chumbo no meio ambiente possibilita a ação deletéria sobre o desenvolvimento, podendo alterar tanto o padrão da morfogênese quanto da organogênese, produzindo alterações em animais como embriões de ratos, Antonio e colaboradores (1996) e Dearth e colaboradores (2002) ou até mesmo em humanos, em conseqüência da exposição materna ao metal (ZAREMBSKI et al.,1983; ROTHENBERG *et al.*,1999).

A hidrocefalia observada em nossos embriões, também foram descritas por Goldstein (1992), evidenciando que baixos níveis de chumbo pode alterar a composição do líquido cerebral causando edema, com efeitos diretos em neurônios e junções sinápticas. A exposição do cérebro em formação ao chumbo, durante a fase de formação sináptica e remodelamento, pode levar a alterações estruturais e funcionais.

Nos embriões que apresentaram extrusão visceral, visualizamos macroscopicamente o aumento do fígado em relação aos demais órgãos (figura: 14). Columbano e colaboradores (1984; 1985) afirmam que o chumbo pode estar associado a uma ativação da proliferação celular hepática e que após a retirada do metal ocorre à involução do fígado, com a presença de muitos núcleos apoptóticos. Utilizando o método de TIMM, Parmley e colaboradores (1979) e Tomczok e colaboradores (1991) verificaram uma impregnação acentuada de chumbo no duodeno e intestino de ratos respectivamente.

As anormalidades da região facial, como ciclopia, microftalmia, anofalmia e redução do bico, foram verificadas nos embriões do presente estudo, após a exposição ao chumbo no terceiro dia de desenvolvimento (figuras, 12, 13, 14, 15), Anwer e colaboradores (1988) argumentam que cinquenta microgramas de chumbo quando injetados no sétimo dia de incubação, são suficientes para causar uma redução da eclosão, retardo do crescimento, hidrocefalia, defeitos no bico e membros, microftalmia e anoftalmia. Assim, considerando as concentrações utilizadas em nossos estudos, seria esperada a ocorrência destas malformações.

De acordo com os estudos realizados por Carvalho (2002) o chumbo administrado no terceiro dia de desenvolvimento na concentração de 350µg, causou inúmeras malformações, dentre elas ciclopia e extrusão visceral, além de atraso no desenvolvimento e alterações vasculares, sendo que as últimas desencadearam hemorragias cefálica e lombar.

O acetato de chumbo também pode levar a alterações tardias quando administrado no período pré-natal, causando em ratos segundo Crofton e colaboradores (1980) prejuízo da atividade exploratória e locomotora, evidenciada apenas dezesseis dias após o nascimento. Possivelmente esta ação foi desencadeada por prejuízos motores, via área motora no encéfalo ou na medula.

Nossos resultados, bem como os dos autores acima citados, demonstram que as exposições a um meio tóxico causam efeitos adversos ao desenvolvimento. Rice e Barone

(2000) afirmam que, devido a suscetibilidade inerentes ao processo do desenvolvimento do sistema nervoso, há uma maior sensibilidade aos insultos do meio, porque neste período há uma intensa proliferação, migração, diferenciação e morte celular, bem como sinaptogênese, e mielinização, eventos essenciais a neurogênese.

No presente estudo, as secções de medula dos embriões tratados em E3 e E5, nas duas concentrações (150 μ g e 450 μ g), foi possível observar deposição do acetato de chumbo ao redor do canal medular, leptomeninges e de forma difusa no restante do tecido nervoso.

Schroder e colaboradores (1978) através da autometalografia de TIMM, avaliaram que o chumbo impregnado na medula espinhal de ratos, apresentava-se distribuído de forma difusa, em vários locais, e verificaram que a diminuição do metal não era seguido pela redução da marcação e vice-versa.

Rehman (1984) expôs ratos ao acetato de chumbo por um período de dez dias, verificando que havia impregnação de chumbo em todas regiões do cérebro, com uma marcação acentuada na medula espinhal e cerebelo.

Correlacionando os achados destes autores com os nossos resultados, podemos afirmar que a medula espinhal de embriões apresenta uma alta afinidade com o chumbo, tendo em vista sua impregnação tanto na camada marginal quanto na camada do manto.

A grande deposição do metal nas medulas estudadas, pode estar relacionada como observado por Risau e Wolburg (1990) ao fato que em embriões de aves a barreira hematoencefálica torna-se efetiva no décimo terceiro dia de incubação com pequenas variações em diferentes áreas do sistema nervoso. No décimo e décimo segundo dia de incubação quando realizado imunohistoquímica para GFAP, Grange-Messent e colaboradores (1996) há uma marcação muito tênue indicando que os astrócitos estão pouco diferenciados. Estas células participam na constituição da barreira hematoencefálica, e o fato desta estrutura não estar plenamente constituída implica em uma baixa seletividade, permitindo a passagem

substâncias tóxicas. A deficiência da proteção hematoencefálica para certos agentes tóxicos, pode justificar a marcação do acetato de chumbo pelo TIMM de forma intensa em nossas medulas.

A cito-toxicidade por parte do acetato de chumbo foi referida por Niu e colaboradores (2002) repercutindo no sistema nervoso como um todo, podendo induzir a apoptose em células cerebrais de rato atuando em dois mecanismos, na baixa regulação do bcl-2 e na alta regulação da expressão do gene bax.

A concentração de 150µg de acetato de chumbo utilizada neste estudo, foi suficiente para induzir a apoptose, no entanto não houve diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e controle, o que sugere que neste período a morte celular programada é um processo normal, não sendo este mecanismo aparentemente alterado quando utilizada esta concentração.

Nossos resultados evidenciam que a representatividade de células apoptóticas estão provavelmente relacionadas a dois fatores: a concentração do acetato de chumbo e a idade a qual o metal foi administrado, pois verificamos que quando administrado no terceiro dia e na concentração de 450µg, há predominância neste grupo de células apoptóticas em relação aos demais grupos.

Em relação a morte celular induzida pela administração de chumbo, considera-se relevante o estudo de Sharifi e colaboradores (2002) realizado em ratos de diferentes idades, evidenciando que o chumbo é um metal neurotóxico, o qual induz a apoptose em hipocampo in vivo de maneira idade dependente, onde os indivíduos mais jovens apresentavam células apoptóticas em maior quantidade, tanto nos animais controle quanto nos tratados.

A interação tempo-espaço inerentes aos processos de proliferação e morte celular, estão presentes desde os estágios iniciais do desenvolvimento. Quando da formação dos neurônios em aves, muitas destas células sofrem apoptose, principalmente as que estão na

periferia, localizadas na margem entre a área opaca e a área pelúcida. Em outras regiões há dispersão das células, mas a presença deste centro apoptótico, define claramente a região de delimitação entre tecidos neurais e epiteliais, cujos sinalizadores delimitam os dois territórios, sendo que as células que não reconhecem estes sinais são eliminadas (LOZANO-CORDERO *et al.*, 2001).

Simonati e colaboradores (1997) reportaram que, a exposição à agentes tóxicos nos períodos críticos do desenvolvimento podem modificar o equilíbrio de sinais neurotróficos que regulam a apoptose, causando aumento ou diminuição do número de células em determinadas regiões do sistema nervoso.

Em relação a outros metais pesados como o zinco, que induzem a neurotoxicidade envolvendo mecanismos apoptóticos, pesquisas realizadas por Manev e colaboradores (1997) em culturas de neurônios granulares cerebelares expostos a uma concentração de 100-500 μ M de zinco, durante 15 a 30 minutos, verificou-se através do TUNEL, que 6h após a exposição à maior concentração, houve um aumento no número de células com sinais de injúrias no DNA, indicando apoptose.

O chumbo e/ ou o cálcio, mostraram uma ação relacionada à degeneração da retina em ratos, produzindo apoptose por indução da despolarização mitocondrial, inchaço e liberação do citocromo c. Conseqüentemente a caspase 3 e a caspase 9 são ativadas, desencadeando todo processo apoptótico (HE *et al.*, 2000).

A ação do chumbo, bem como a de outros agentes toxicológicos, evidenciam que há uma indução apoptótica produzida por concentrações subletais, e que o chumbo é capaz de se acumular e causar danos no tecido cerebral. Quando analisamos os modelos esquemáticos da marcação com TIMM (figura 33) e com TdT (figura: 47), verificamos que os locais de grande impregnação do metal, como ao redor do canal medular, na camada marginal e do manto

principalmente a porção ventral, também foram locais onde houve uma concentração considerável de células em apoptose.

Em relação ao efeito do chumbo endógeno nas proteínas sintetizadas por células astrogliais em cultura de ratos, Opanasuk e Finkelstein (1994) verificaram que os astrócitos possuem ou adquirem mecanismos compensatórios, os quais permitem a adaptação das células ao chumbo. Os resultados revelam que as células astrogliais respondem a neurotoxicidade alterando seu padrão normal da síntese protéica, o que foi evidenciado pelo aumento da síntese de proteínas com pesos moleculares, 90, 70, 35, 32 e 23 kDa, principalmente a p-23, sugerindo que o chumbo pode alterar a síntese protéica de maneira específica. O aumento da síntese de algumas proteínas em particular, provavelmente é um mecanismo de defesa e adaptativo aos efeitos tóxicos.

Buchheim e colaboradores (1994) estudaram a exposição de macacos Rhesus ao acetato de chumbo no período pré e pós natal, seguido por um período de intoxicação de 32 meses. Secções de hipocampo foram submetidas a marcação com GFAP e vimentina. Os resultados indicam que astrócitos imaturos não são capazes de reagir com gliose em resposta a exposição pré e pós natal. A perda da resposta glial devido a baixos níveis de exposição ao chumbo pode resultar em uma diminuição da diferenciação astrocitária, mostrando a permanência da glia radial.

No sistema nervoso dos embriões de *Gallus domesticus*, a presença da glia radial no período compreendido entre E9 e E11, evidencia que ainda não estava estabelecido o efeito protetor das células astrogliais. O estágio indiferenciado destas células, acarreta uma maior destruição do tecido neural, principalmente nas maiores concentrações do metal, quando administradas na menor idade, ocasionando deste modo o aumento no número de células apoptóticas.

Considerando a importância da glia radial no desenvolvimento, estas células estão presentes em estágios precoces da ontogenia das aves, e mudanças no ambiente intercelular devem agir em todo processo de migração neuronal ao longo dos prolongamentos radiais para os seus respectivos destinos, alterando a maturação dos astrócitos.

Alterações na migração neuronal podem afetar primariamente o desenvolvimento do córtex cerebral, mas a extensão e a natureza da região atingida podem variar intensamente, ocasionando malformações. Anormalidades como a lissencefalia, caracterizada em humanos por uma diminuição do número de neurônios, com uma drástica diminuição no número de giros no córtex, podem estar associadas com alteração na migração neuronal (DOBYNS *et al.*, 1996). Ela pode ocorrer como uma anormalidade isolada ou em associação com dimorfismo facial como o caso de pacientes com lissencefalia Miller-Dieker (ALBRECHT *et al.*, 1996).

Outros agentes podem alterar a migração neuronal, sendo que o etanol, quando administrado no período pré-natal, pode induzir alterações na proliferação e diferenciação de astrócitos, sugerindo que ele afeta as células gliais radiais, os principais precursores dos astrócitos e fundamentais no processo de migração neuronal (VALLÉS *et al.*, 1996).

No presente trabalho, não foi possível marcar as células da glia radial em todos os grupos. Obtivemos resultados positivos apenas no grupo de $150\mu\text{g}[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$, nas duas idades.

Em nosso material, foram utilizadas várias concentrações de diluição para o anticorpo primário como 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1000, sendo testados diferentes tempos de incubação, tanto do anticorpo primário quanto do anticorpo secundário.

O anticorpo secundário, bem como a strepAvidina, também foram testados em diversas concentrações. O protocolo dos resultados positivos obtidos, foram reaplicados tanto nos controles, quanto na concentração de $450\mu\text{g}$ de $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2]$, não obtendo sucesso.

Os resultados acima, podem estar relacionados com o anticorpo monoclonal Anti-Vimentina (DAKO), clone V9, sendo este, próprio para marcar proteínas de vimentina do filamento intermediário de 57 kDa, integrantes do citoesqueleto de células de vertebrados. De acordo com o próprio fabricante, em células de espécies de aves como as galinhas domésticas, os resultados ainda são contraditórios.

O efeito da fixação em álcool absoluto ou formol para técnicas de imunohistoquímicas do filamento intermediário foram analisadas por Alves e colaboradores (1992) que demonstram a grande reatividade para vimentina quando os tecidos são fixados em álcool, mesmo em amostras estocadas até 60 dias, o formol mostrou-se deletério para marcação com vimentina.

Para estudos do desenvolvimento, Sarnat (1998) verificou que a incubação da vimentina em temperatura ambiente, ou durante a noite em um refrigerador é recomendada a diluição de 1:25 ou 1:50, para evitar falhas na interpretação. Não se deve intensificar a temperatura devido a excessiva marcação, tendo alteração dos resultados.

Analisando o conjunto dos resultados obtidos neste estudo, salienta-se a importância de focar a tríade: chumbo-morte celular-células nervosas, em outros estágios do desenvolvimento de *Gallus domesticus*.

Estudos podem ser realizados no período pós-natal, utilizando as células astrocíticas, estabelecendo sua função neuroprotetora na neurotoxicidade do chumbo em aves, afim de avaliar as alterações provocadas pelo chumbo na barreira hematoencefálica. Esta pesquisa permitiria a correlação entre a extensão das lesões e possíveis malformações, com a deficiência das junções endoteliais nos capilares e a maturação dos astrócitos.

Outras concentrações do metal poderiam ser utilizadas, a fim de comparar com estudos prévios o efeito dose-resposta. Concentrações menores do acetato de chumbo seriam necessárias para que os embriões chegassem a eclodir e que fossem acompanhados durante

semanas, o que abriria possibilidades de estudar o padrão locomotor destes animais, verificando alterações provocadas pelo chumbo na velocidade da condução nervosa em membros superiores e inferiores.

6- CONCLUSÕES

No estudo com embriões de *Gallus domesticus*, o modo o qual o ovo é transportado ao laboratório, o seu manuseio, incluindo a abertura da casca e as condições da incubadora, são situações que podem causar alterações em todo processo do desenvolvimento.

O modelo experimental adotado neste estudo torna-se efetivo para a avaliação da neurotoxicidade, pois podemos obter respostas significativas quanto a ação do metal, no processo da embriogênese em um período de curta duração.

O acetato de chumbo quando administrado em estágios iniciais do desenvolvimento provoca alterações irreversíveis, como hemorragias, hidrocefalia, extrusão visceral e malformações de face, alterando o padrão normal do desenvolvimento de *Gallus domesticus*.

Utilizando técnicas como a do TIMM, para marcação do acetato de chumbo, pode-se observar a impregnação do metal por todo tecido nervoso, principalmente ao redor do canal central da medula, porção ventral da medula e leptomeninges nas duas concentrações observando diferenças quando comparados aos grupos controle.

Com a utilização da técnica para marcar células em apoptose, pode-se evidenciar uma marcação acentuada na porção ventral, locais correspondentes a região do funículo anterior, na região do sulco lateral anterior, na coluna anterior e ao redor do canal central da medula em todos os grupos.

Para a glia radial, utilizou-se a imuno-histoquímica para a vimentina, a qual foi possível obter marcação apenas na concentração de 150µg, nos dois dias de tratamento, sendo necessárias maiores adaptações para esta técnica, ou em novos estudos utilizar outros anticorpos para filamentos intermediários como por exemplo a nestina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. A.; ABREU, M. F.; ANDRADE, J. C. Distribuição de chumbo no perfil de solo avaliada pelas soluções de DPTA e MEHLICH-3. **Bragantia** 57 (1): 1-6, 1998.

ALBRECHT U, ABU-ISSA R, RATZ B, HATTORI M, AOKI J, ARAI H, INOUE K, EICHELE G. Platelet-activating factor acetylhydrolase expression and activity suggest a link between neuronal migration and platelet-activating factor. **Dev Biol** 15 (180): 579-93, 1996.

ALVES, V. A. F.; WAKAMATSU, A.; KANAMURA, C .T.; MAGALHAES, E. S.; SIQUEIRA, S. A. C. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med**, Univ. Sao Paulo, 47 (1): 19-24, 1992.

ANTONIO, M.T.; CORPAS, I., LERET, M.T. Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. **Toxicology Letters** 104: 1-9, 1999.

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

ARAÚJO,U.C; PIVETTA,F.R; MOREIRA,J.C. Avaliação da exposição ocupacional ao chumbo: proposta de uma estratégia de monitoramento para prevenção dos efeitos clínicos e subclínicos. **Cad de Saúde Pública** 15 (1), 1999.

AREY.L.B. **Developmental Anatomy. A textbook and Laboratory Manual of Embryology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1974.

BALINSKY, B. I. An Introduction to Embryology. Philadelphia: Saunders College Publishing. 1981. 768 p.

BEAR.M.F; CONNORS.BW.; PARADISO.M.A. **Neurociências Desvendando o Sistema Nervoso**. 2^a ed. São Paulo: Artmed, 2002. 855p.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. 574 p.

BENTIVOGLIO.M; MAZZARELLO.P. The History of radial glia. **Brain Research Bulletin** 49 (5): 305-315, 1999.

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

BUCHHEIM K; NOACK S; STOLTENBURG. G; LILIENTHAL H; WINNEKE G. Developmental delay of astrocytes in hippocampus of rhesus monkeys reflects the effect of pre- and postnatal chronic low level lead exposure. **Neurotoxicology** 15 (3): 665-669, 1994.

BURSCH. W; OBERHAMMER. F; SCHULTE-HERMANN. R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. **TiPS** 13: 245-250, 1992.

CALDERO´, J.; PREVETTE, D.; MEI, X.; OAKLEY, R. A.; LI, L.; MILLIGAN, C.; HOUENOU, L., BUREK, M., OPPENHEIM, R. W. Peripheral Target Regulation of the Development and Survival of Spinal Sensory and Motor Neurons in the Chick Embryo. **The Journal of Neuroscience** 18 (1): 356–370, 1998.

CARLSON. B.M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

CARVALHO, M. S. L. **Efeitos do Acetato de Chumbo no desenvolvimento de Embriões de *Gallus domesticus*, com ênfase na Morfologia e Organização das Células Microgliais do Telencéfalo**. 2002. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CATALÃ. M. **Embriologia: Desenvolvimento Humano Inicial**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2003.

CHAHOU, I.; LIGENSA, A., DIETZEL, L E; FAQI,A.S. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reproductive Toxicology** 13: 375-381, 1999.

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

COLUMBANO, A; LEDDA-COLUMBANO, G..M.; CONI, P.P.; FAA, G.; LEGUORI, C.; SANTA CRUZ, G.; PANI,P. Occurrence of cell death (apoptosis) during a involution of liver hiperplasia. **Lab Invest** 52 (6): 670-675, 1985.

COLUMBANO, A; LEDDA-COLUMBANO, G..M.; CONI, P.P.; FAA, G.; LEGUORI, C.; SANTA CRUZ, G.; PANI,P. Liver hiperplasia and regression after lead nitrate administration. **Toxicol. Pathol** 12 (1): 89-95, 1984.

CONN, P.M. **Neuroscience in Medicine**. Philadelphia: Ed. J.B. Lippincott Company, 1995.660p.

CROFTON, K. M.; TAYLOR, H.; SIVULKA, D. J.; LUTKENHOFF, S. D. Developmental Delays in Exploration and Locomotor Activity in Male rats exposed to low level lead. **Life Sciences** 26: 823- 831, 1980.

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

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

DANSCHER, G.; RYTTER NORGAARD, J. O.& BAATRUP, E. Autometallography: Tissue metals demonstrated by a silver enhancement kit. **Histochemistry**, 86: 465-469, 1987.

DAOUST,R.; MORAES, R. Degenerative changes, DNA Syntesis and Mitotic Activity in Rat Liver Following Single Exposure to Diethylnitrosamine. **Chem Biol Int** 57: .55-64, 1986.

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

DESAGER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology** 10 (9): 369-377, 2000.

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

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

DOBYNS, W. B.; ANDERMANN, E.; ANDERMANN, F.; CZAPANSKY-BEILMAN, D.; DUBEAU, F.; DULAC, O.; GUERRINI, R.; HIRSCH, B.; LEDBETTER, D. H.; LEE, N. S.; MOTTE, J.; PINARD, J. M.; RADTKE, R. A.; ROSS, M. E.; TAMPIERI, D.; WALSH, C. A.; TRUWIT, C. L. X-linked malformations of neuronal migration. **Neurology** 47 (2): 331-9, 1996.

EMERY.E; ALDANA.P; BUNGE.M.B; PUCKET. A.S; KEANE. R.W; BETHEA.J; LEVI.A. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. **J. Neurosurgery** 89 (6): 911-920, 1998.

ERNHARDT, C. B. A Critical Review of Low-Level Prenatal Lead Exposure in the Human: 1. Effects on the Fetus and Newborn. **Reproductive Toxicology** 6: 9-19, 1992.

FREERE, R. H., WEIBEL, E. R. Stereologic techniques in microscopy. **J. Royal Microsc. Soc** 87: 25-34, 1967.

GARCIA, D. A.; MARIN, R. H.; PERILLO, M.A. Stress-induced decrement in the plasticity of the physical properties of chick brain membranes. **Mol Membr Biol** 19 (3): 221-30, 2002.

- GARCIA, S. M. L.; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia**. 2^a ed. SP: Artmed, 2001.
- GERHART, J.; KIRSCHNER, M. **Cells, Embryo and Evolution**. . Massachusetts: Blackwell Science Inc. 1997.
- GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. Massachusetts: Sinauer, 2000; 2001. 749 p.
- GOLDSTEIN, G.W. Neurologic concepts of lead poisoning in children. **Pediatric Ann** 18: 4-7, 1992.
- GOODRUM, G. R.; JACOBSON, A. G. Cephalic Flexure Formation in the Chick Emryo. **Journal Experimental Zoology** 216: 339-408, 1981.
- GOTZ, .M.; HARTFUSS, E.; MALATESTA, P. Radial cells as neuronal precursors: A new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex in mice. **Brain Research Bulletin** 57 (6): 777-788, 2002.
- GRANGE-MESSENT, V.; RAISON, D.; BOUCHAUD, C. Astrocyte-endotelial cell relationships during the establishment of the blood-brain barrier in the chick embryo. **Biol. Cell** 86: 45-51, 1996.
- HAMBURGUER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology** 88: 49-92, 1951.
- HARRY, J. G.; SCHMIDT, T. J.; GONG, Z.; BROWN, H.; ZAWIA, N.; EVANS, H. L. Lead-induced alterations of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in the Developing Rat Brain. **Toxicology and Applied Pharmacology** 139: 84-93, 1996.
- HATTEN, M.; Central Nervous System Neuronal Migration. **Annu. Rev. Neurosci.** 22: 511–39, 1999.

HE, L.; POBLENZ, A. T; MEDRANO, C. J; FOX, D. A. Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. **J Biol Chem** 21 (16): 12175-84, 2000.

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

HEMMATI-BRIVANLOU, A.; MELTON, D. Vertebrate Neural Induction. **Neuroscience** 20: 43-60, 1997.

HENRETING, F. M. Lead. In: GOLDFRANK'S, L. R.; GOLDFRANK'S, N. E.; FLOMENBAUEM, N. E. A.; LEWIN, R. S.; WEISMAN, M. A. H. & HOFFMAN, R. S. **Goldfrank's Toxicology Emergence**. 6ª edição. Townford Connecticut: Appleton & Lange, 1998. Chapter 79.

HILBELINK, D. R; KAPLAN, S. Sirenomielia: analysis in the cadmium and lead treated golden hamster. **Teratog. Carcinog. Mutagen.** 6 (5): 431-40, 1986.

HOUILLON, C. **Embriologia**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1972. 160 p.

IGNÁCIO, A. R. A. **Estudo do prosencéfalo e de células microgliais durante o desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus***. 1998. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 116 pp.

JACOBSON, M. **Developmental Neurobiology**. New York: Plenum Press. 1991.782 p.

KÁLMAN, M.; AJTAI, B. M. A comparison of intermediate filament markers for presumptive astroglia in the developing at neocortex: immunostaining against nestin reveals more detail, then GFAP or vimentin. **International Journal of Developmental Neuroscience** 19 (1): 101-108, 2001.

KAUFMANN, S. C; HENGARTNER, M. O. Programmed cell death: alive and well in the new millenium. **Trends in cell Biology** 11 (12): 526-534, 2001.

KENTROTI, S.; VERDANAKIS,. A. Differential Expression in Glial Cells Derived from Chick Embryo Cerebral Hemispheres at an Advanced Stage of Development. **Journal of Neuroscience Research** 47: 332-331, 1997.

KISHI, R.; IKEDA, T.; MIYAKE, H.; UCHINO, E; TSUZUKI, T.; INOUE, K. Regional distribution of lead, zinc, iron and cooper in suckling and adult rat brains. **Brain Research** 251: 180-182, 1982.

KLUCK, R. M.; WETZEL, E. B; GREEN, D.R e NEWMeyer. The release of cytochrome c from mitocindria: A promary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. **Science** 21 (275): 1132-1136, 1997.

LEE et al, Developmental windows of diferential lead- induced immunotoxicity in chickens. **Toxicology** 156 (2-3):161-170, 2001.

LENT. Roberto. **Cem Bilhões de Neurônios**. 1^a ed. RJ: Ed. Atheneu. 2002.

LERET, M. L.; SAN MILLÁN, J. A.; ANTONIO, T. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. **Toxicology** 186: 125-130, 2003.

LEWIN, M. D.; SARASUA, S.; JONES, P. A. Multivariate Linear Regression Model for Predicting Children's Blood Lead levels Basead on Soil Lead Levels: A Study at four Superfund Sites. **Environmetal Research** 81: 52-61, 1999.

LOUW, A. J.; VAN DE BERG, W. D.; DE VENTE, J.; BLANCO, C. E.; GAVILANES, A. W.; STEINBUSCH, H.P.; STEINBUSCH, H.W.; TROOST, J.; VLES, J. S. Developmental apoptosis in the spinal cord white matter in neonatal rats. **Glia** 37 (1): 89-91, 2002.

LOWRIE, M. B; LAWSON, S. J. Cell death of spinal interneuronnes. **Progress in Neurobiology** 61: 543-555, 2000.

LOZANO-CORDERO, G.; SÁNCHEZ-VALDÉZ, M. L.; MIGUEL-LASOBRAS, E. M.; ALVAREZ, I. S. Pattern of cell proliferation and cell death in early chick embryos and their control by growth factors. **Int. J. Dev. Biol** 451: 111-112, 2001.

MAFAFFEY, K. R. Environmental lead toxicity: Nutrition as a component if intervention. **Environ Health Perspect** 89: 75-8, 1990.

MAGALDI, M. A . Incubation. In: **Produccion de Aves**. Argentina: Cathebra, 1974. 259-278p.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Estereologia aplicada a pesquisa no sistema nervoso. In: XAVIER, G. F. (Org.). **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: Editora Plêiade. 1999. p. 9-32

MANEV, H.; KHARLAMOV, E.; MASON, P. R. CAGNOLI, C. .M. Characterization of Zinc-Induced Neuronal death in Primary Cultures of Rat Cerebelar Granule Cells. **Experimental Neurology** 146: 171-178, 1997.

MARQUES, D. **Manual do Incubador**. São Paulo: CASP. 1986. 184p.

MAZLIAH, J.; BARRON, S.; BENTAL, E., ROGOWSKI, Z., COLEMAN, R., SILBERMANN, M. The effects of long-term lead intoxication on the nervous system of the chicken. **Neurosci Lett** 101 (3): 253-7, 1989.

MELLO, C. F.; KRAEMER, C. K.; FILIPPIN, A.; MORSCH, V. M.; RODRIGUES, A. L.; MARTINS, A. F.; RUBIN, M. A. Effect of lead acetate on neurobehavioral development of rats. **Braz J Med Biol Res** 31 (7): 943-50, 1998.

NAARALA, J.; LOIKKANNEN, J.; RUOTSALAINEN, M. H.; SAVOILANEN, K. M. Lead amplifies induced oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med** 19: 689-693, 1995.

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

NEEDLEMAN, H. L.; SCHELL, A.; BELLINGER, D.; LEVITON, A.; ALLRED, E. N. The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. An 11-year follow-up report. **N Engl J Med** 11: (322): 83-8, 1990.

NEEDLEMAN, H. L. The removal of lead from gasoline: historical and personal reflections. **Environmental Research** 84: 20-35, 2000.

NIU Y, ZHANG R, CHENG Y, SUN X, TIAN J. [Effect of lead acetate on the apoptosis and the expression of bcl-2 and bax genes in rat brain cells] **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi** 36 (1): 30-3, 2002. Abstract.

NOCTOR,S.C; FLINT.A.C; WEISSMAN.T.A; DAMMERMAN.R.S; KRIEGSTEIN.A.R. Neurons derived from radial cells establish radial units in neocortex. **Nature** 409 (8): 714-720, 2001.

OBERTO, A., MARKS, N., EVANS, H. L., GUIDOTTI, A. Lead (Pb+2) promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications. **J Pharmacol Exp Ther** 279 (1): 435-42, 1996.

ONISHI, B. K. A.Coloração de Nissl por Violeta de Cresila. In: XAVIER, G. F. (Org.). **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: Editora Plêiade. 1999. p. 93-104.

OPANASUK, L. A.; FINKELSTEIN, J. N. Induction of Newly Synthesized Proteins in Astroglial Cells Exposed to Lead. **Toxicology and Applied Pharmacology** 131: 21-30, 1995.

OPPENHEIM RW. Cell death during development of the nervous system. **Annu Rev Neuroscience** 14:453-501, 1991.

OSBORN.M; GEISLER.N, SHAW.G,SHARP.G, WEBER.K. Intermediate Filaments. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 46 (1): 413-429, 1982.

PARMELEY, R. T; BARTON, J. C; CONRAD, M. E.; AUSTIN, R. L. Ultrastructural Radioautography and Cytochemistry of Lead Absorption. **Am J Pathol** 96 (1): 85-99, 1979.

- PATTEN, B. M. **Early embryology of the chick**. 4. ed. Philadelphia: Blakiston, 1951. 244p.
- PÉREZ-COLL, C. S.; HERKOVITS, J.; SALIBIAN, A. Embryotoxicity of lead on *Bufo arenarum*. **Bulletin Environmental Contaminant Toxicology** 41: 247-252, 1988.
- PIXLEY.S.K.R.; DE VELLIS.J. Transition Between Immature radial Glia and Mature Astrocytes Studied with a monoclonal Antibody to Vimentin. **Developmental Brain Research** 15: 201-209, 1984.
- REHMAN, U. S. Lead- Induced Regional lipid Peroxidation in Brain. **Toxicology Letters** 21: 333-337, 1984.
- REZAIE, P.; PATEL, K.; MALE, D. K. Microglia in the human fetal spinal cord patterns of distribution, morphology and phenotype. **Developmental Brain Research** 115 (1-8):. 71-81, 1999.
- RICE, D.; BARONE, S. J. Critical Periods of vulnerability for the Developing nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. **Environmental Health Perspectives** 108: 511-533, 2000.
- RIES, L. G. K. **Efeitos de lesão no sistema nervoso central de embriões de *Gallus gallus domesticus***. 1998. 107 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- RISAU, W.; WOLBURG, H. Development of the blood-brain barrier. **TINS** 13: 174-178, 1990.
- ROTHENBERG, S. J.; MANALO, M.; JIANG, J.; KHAN, F.; CUELLAR, R.; REYES. S.; SANCHEZ, M.; REYNOSO, B.; AGUILAR, A.; DIAZ, M.; ACOSTA, S.; JAUREGUI, M.; JOHNSON, C. Maternal blood lead level during pregnancy in South Central Los Angeles. **Arch Environ Health** 54 (3): 151-7, 1999.
- SALAZAR, C. E. H. **Manual de Neuroembriologia**. Universidade de los Andes. Venezuela: Conselho de Publicaciones, 1992. 273p.

SARNAT, H. B. Vimentin immunohistochemistry in human fetal brain: methods of standard incubation versus thermal intensification achieve different objectives. **Pediatr Dev Pathol.** 1 (3): 222-229, 1998.

SAVOLAINEN, K. M.; LOIKKANEN, J.; EERIKAINEN, S.; NAARALA, J. Interactions of excitatory neurotransmitters and xenobiotics in excitotoxicity and oxidative stress: glutamate and lead. **Toxicol Lett.** 28 (102-103): 363-7, 1998.

SCHNEIDER, J. S.; LEE, M. H.; ANDERSON, D. W.; ZUCK, L; LIDSKY, T. I. Enriched Environment during Development is Protective against lead-induced Neurotoxicity. **Brain Research** 896: 48-55, 2001.

SCHRODER, H. D.; FJERDINGSTAD, E; DANSCHER, G.; FJERDINGSTAD, E.J. Heavy metals in the spinal cord of normal rats and of animals treated with chelating agents: a quantitative (zinc, copper, and lead) and histochemical study. **Histochemistry** 56 (1): 1-12, 1978.

SCHWARTZ, J.; LANDRIGAN, P. J., FELDMAN, R. G., SILBERGELD, E. K., BAKER, E. L., VON LONDERN, J. H. Threshold effect in lead-induced peripheral neuropathy. **J. Pediatric.** 112. 1988.

SHARIFI, A. M.; BANIASADI, S.; JORJANI, M.; RAHIMI, F.; BAKHSHAYESH, M. Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo. **Neurosci -ence Letters.** 329 (1): 45-8, 2002.

SHUMAN, S. L; BRESNAHAN, J. C; BEATTIE.M, C. Apoptosis of Microglia and Oligodendrocyts After Spinal Cord Contusion in Rats. **Journal of Neuroscience Research** 50: 798-808, 1997.

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

TANABE, Y.; JESSEL, T. M. Diversity and Pattern in the Developing Spinal Cord. **Science** 274: 1115-1122, 1996.

TOMCZOK, K. J.; SILWA-TOMCZOCK, W.; GRZYBEK, H. The small intestinal enterocytes of rats during lead poisoning: The application of Timm sulphide Silver Method and an ultrastructural study. **Exp Pathol** 42 (2): 107-113, 1991.

TOMINAGA, T.; KURE, S.; NARISAWA, K.; YOSHIMOTO, T. Endonuclear activation following focal ischemic injury in the rat brain. **Brain Research** 608: 21-26, 1993.

VALLÉS, S.; SANCHO-TELLO, M.; MIÑANA, R.; CLIMENT, E.; RENAU-PIQUERAS, J.; GUERRI, C. Glial fibrillary acidic protein expression in rat brain and in radial glia culture is delayed by prenatal ethanol exposure. **J Neurochem** 67 (6): 2425-2433, 1996.

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

WISCHNITZER. S. **Atlas y guia de Laboratorio de Embriologia de Vertebrados**. Barcelona: Ed. Omega, S.A., 1980.

WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R.; BROCKES, J.; JESSEL, T.; LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ, E. **Principles of Development**. NY: Oxford University Press, 1998. 345p.

YAGINUMA, H.; TOMITA, M.; TAKASHITA, N.; MCKAY, S. E.; CARDWELL, C.; YIN, Q. W.; OPPENHEIM, R. W. A novel type of programmed neuronal death in the cervical spinal cord of the chick embryo. **J Neurosci** 16 (11): 3685-703, 1996.

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

ZHONGHUA, Y.; FANG, Y.; XUE, Z. Z. Effect of lead acetate on the apoptosis and the expression of bcl-2 and bax genes in rat brain cells. 36 (1):30-3, 2002.