



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**EFEITOS DO ACETATO DE CHUMBO NO DESENVOLVIMENTO
DE EMBRIÕES DE *Gallus domesticus*, COM ÊNFASE NA
MORFOLOGIA E ORGANIZAÇÃO DAS CÉLULAS MICROGLIAIS DO
TELENCÉFALO.**

MÁRCIA SILVA LUCIANO CARVALHO

Florianópolis - 2002

**EFEITOS DO ACETATO DE CHUMBO NO DESENVOLVIMENTO
DE EMBRIÕES DE *Gallus domesticus*, COM ÊNFASE NA
MORFOLOGIA E ORGANIZAÇÃO DAS CÉLULAS MICROGLIAIS DO
TELENCÉFALO.**

POR

MÁRCIA SILVA LUCIANO CARVALHO

Dissertação Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à Obtenção do
Título de Mestre em Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Rauh Müller

Florianópolis, SC, Brasil

Julho de 2002

A minha mãe e aos quatro homens da minha vida,

Meu pai Eralmo, meu irmão Luciano,

meu amor Alexandre e meu amorzinho Felipe

Como Nossos Pais

Não quero lhe falar meu grande amor, das coisas que aprendi nos discos
Quero lhe contar como vivi e tudo que aconteceu comigo
Viver é melhor que sonhar, eu sei que o amor é uma coisa boa
Mas também sei que qualquer canto é menor do que a vida de qualquer pessoa
Por isso cuidado meu bem, há perigo na esquina
Eles venceram e o sinal está fechado pra nós que somos jovens
Para abraçar seu irmão e beijar sua menina na rua
É que se fez o seu braço, o seu lábio e a sua voz

Você me pergunta pela minha paixão
Digo que estou encantada com uma nova invenção
Eu vou ficar nesta cidade, não vou voltar pro sertão
Pois vejo vir vindo no vento o cheiro da nova estação
Eu sei de tudo na ferida viva do meu coração

Já faz tempo que eu vi você na rua, cabelo ao vento, gente jovem reunida
Na parede da memória essa lembrança é o quadro que dói mais

Minha dor é perceber que apesar de termos feito tudo que fizemos
Ainda somos os mesmos e vivemos como nossos pais

Nossos ídolos ainda são os mesmos e as aparências não enganam não
Você diz que depois deles não apareceu mais ninguém
Você pode até dizer que eu tô por fora, ou então que eu tô inventando
Mas é você que ama o passado e que não vê
É você que ama o passado e que não vê
Que o novo sempre vem

Hoje eu sei que quem me deu a idéia de uma nova consciência e juventude
Tá em casa guardado por Deus contando vil metal

Minha dor é perceber que apesar de termos feito tudo, tudo que fizemos
Ainda somos os mesmos e vivemos
Ainda somos os mesmos e vivemos como nossos pais.

(Belchior)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que muito me auxiliaram em mais esta etapa da minha vida profissional e pessoal, de Coração Muito Obrigado a todos.

À Prof^a Yara, orientadora e amiga, que foi para mim uma mãe, em momentos em que eu estava iniciando a tarefa de ser mãe. Obrigado pela credibilidade e pela confiança em mim depositados, minha gratidão eterna.

À Evelise, por ter sido amiga, ter me ajudado em vários momentos. Sem você com certeza ficaria muito mais difícil...

Ao Dib e ao Prof Paulo, que desde o começo foram companheiros incansáveis.

À Janaína, amiga querida, que me ajudou e muito a me tornar uma pessoa bem melhor do que eu era antes....Obrigado pelos deliciosos momentos de discussões teóricas regados a cafés...

Ao irmãozinho Marcelo, que muito me ensinou e ajudou nesta difícil jornada que é o mestrado.

Ao amigo Marcos, que me fazia a cada dia com sua curiosidade e jovialidade retornar aos bons tempos da Iniciação Científica.

Aos amigos Crislei, Roberto e Talita, pelas ótimas tardes entre discussões científicas, cafés e bolachas doces e salgadas. Vocês são ótimos.

À Cristine, pelo rápido e grande apoio na elucidação da diluição do revelador.

Ao Nivaldo, querido amigo que sempre fez tudo para tornar a minha vida mais tranquila.

À minha família, Pai Querido (em memória), que neste momento você esteja orgulhoso do que está vendo. Mãe Querida e Querido Irmão, que sempre me deram forças e o ânimo para que eu continuasse nas horas mais difíceis...

Ao meu amor Alexandre, por dar-me compreensão, carinho e a paz que só um amor verdadeiro poderia dar.

Ao meu bebezinho Felipe, que muitos cortes fez no micrótomo, realizou técnicas histoquímicas e assistiu aulas de Neurofisiologia (ainda dentro da barriga) sempre pacientemente. Vocês são tudo para mim.

Aos Bons Espíritos que sempre me auxiliam nesta Jornada...

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

À Capes pelo apoio financeiro

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Organização do Sistema Nervoso de <i>Gallus domesticus</i>	16
1.2 Toxicidade do Acetato de Chumbo.....	18
1.3 Caracterização das Células Microgliais.....	23
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Material Biológico de Estudo.....	31
3.2. Características do Ovo.....	32
3.3. Condições de Incubação.....	32
3.4. Grupos Experimentais.....	34
3.5. Procedimentos para Análise Morfológica	37
3.6. Dissecção e Fixação dos Encéfalos.....	38
3.6.1 Inclusão e Seção do Material.....	38
3.6.2 Técnicas de Coloração Histológica.....	39
3.6.2.1 Hematoxilina e Eosina de Harris.....	39
3.6.2.2 Histoquímica de Timm.....	40
3.6.2.3 Histoquímica com Lectina de Tomate.....	40
3.7 Análise das Lâminas.....	41
3.8 Análise Estatística.....	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Análise Morfológica dos Embriões Tratados com Acetato de Chumbo	44
4.2. Análise das Áreas de Deposição do Acetato de Chumbo no Telencéfalo.....	50
4.3. Caracterização das Células Microgliais após Tratamento com Ac ₂ Pb	58
4.3.1 Análise Estereológica das Células Microgliais.....	59

4.3.2 Análise Morfométrica das Células Microgliais.....	61
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Demonstrativo dos grupos experimentais, relacionando dia de tratamento, dia de análise, número de telencéfalos submetidos às técnicas histoquímicas.	33
Tabela 2 – Estereologia das células microgliais presentes no telencéfalo de embriões de Gallus domesticus normais e expostos ao acetato de chumbo.	58
Tabela 3 - Valores médios dos eixos longitudinal e transversal das células microgliais nas diferentes idades e doses de acetato de chumbo utilizadas.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vista lateral de embrião de <i>Gallus domesticus</i> no 3° dia de desenvolvimento embrionário.	16
Figura 2: Esquema representando o embrião de <i>Gallus domesticus</i> no ovo, no 4° e 5° dias de desenvolvimento embrionário.	31
Figura 3: Desenho esquemático do ovo de <i>Gallus domesticus</i> .	32
Figura 4: Vista geral da estufa marca Petersime, modelo Mibo-1.	33
Figura 5: Dados de mortalidade do total de animais manipulados neste estudo.	34
Figura 6: Vista lateral de embrião em E3 de <i>Gallus domesticus</i> no ovo.	36
Figura 7: Desenho com câmara clara de secção coronal de telencéfalo de <i>Gallus domesticus</i> , com 9 dias de desenvolvimento embrionário.	42
Figura 8: Embrião normal de <i>Gallus domesticus</i> no 9° dia de desenvolvimento embrionário(E9). Aumento: 7x. Escala – 0,769 cm.	46
Figura 9: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido ao tratamento com 250µg Ac ₂ Pb em E3. Aumento: 7x. Escala – 0,769 cm.	46
Figura 10: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido ao tratamento com 250µg Ac ₂ Pb em E3. Aumento: 7x. Escala – 0,769 cm.	47
Figura 11: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido ao tratamento com 350µg Ac ₂ Pb em E3. Aumento: 7x. Escala – 0,769 cm.	47
Figura 12: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido ao tratamento com 350µg Ac ₂ Pb em E3. Aumento: 7x. Escala – 0,769 cm.	48
Figura 13: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido ao tratamento com 350µg Ac ₂ Pb em E3. Aumento: 7x. Escala – 0,769 cm.	48
Figura 14: Embrião de <i>Gallus domesticus</i> em E9, submetido ao tratamento com 350µg Ac ₂ Pb em E3. Aumento: 7x. Escala – 0,769 cm.	49
Figura 15: Análise morfológica dos embriões de <i>Gallus domesticus</i> tratados com as doses de 250 e 350µg de acetato de chumbo no 3° e 5° dias de desenvolvimento embrionário.	50
Figura 16: Corte esquemático frontal de telencéfalo de embrião normal de <i>Gallus domesticus</i> em E9.	52

- Figura 17:** Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus* em E9. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 4x. Escala 660mm. 52
- Figura 18:** Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus* em E9. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 20 x. Escala 5,4 mm. 52
- Figura 19:** Corte esquemático frontal de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus* em E11. 53
- Figura 20:** Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus* em E11. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 20 x. Escala 5,4 mm. 53
- Figura 21:** Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus* em E11. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 4x. Escala 660 mm. 53
- Figura 22:** Corte esquemático indicando a deposição do acetato de chumbo no telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 250µg Ac₂Pb em E3. 54
- Figura 23:** Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 250µg Ac₂Pb em E3. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 20 x. Escala 5,4 mm. 54
- Figura 24:** Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 250µg Ac₂Pb em E3. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 40 x. Escala 0,66 mm. 54
- Figura 25:** Corte esquemático indicando a deposição do acetato de chumbo no telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 350µg Ac₂Pb em E3. 55
- Figura 26:** Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 350µg Ac₂Pb em E3. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 10 x. Escala 2,7 mm 55
- Figura 27:** Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 350µg Ac₂Pb em E3. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 20 x. Escala 5,4 mm 55

- Figura 28:** Corte esquemático indicando a deposição do acetato de chumbo no telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 250µg Ac₂Pb em E5. 56
- Figura 29:** Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 250µg Ac₂Pb em E5. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 20 x. Escala 5,4 mm 56
- Figura 30:** Corte esquemático indicando a deposição do acetato de chumbo no telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 350µg Ac₂Pb em E5. 57
- Figura 31:** Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 350µg Ac₂Pb em E5. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 20 x. Escala 5,4 mm 57
- Figura 32:** Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 350µg Ac₂Pb em E5. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 20 x. Escala 5,4 mm 57
- Figura 33:** Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 250µg Ac₂Pb em E3. Controle Negativo de Especificidade. Histoquímica com TBS. Aumento 4 x. Escala 660 mm 63
- Figura 34:** Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus*. Histoquímica com Lectina. Aumento 20 x. Escala 5,4 mm 64
- Figura 35:** Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus*. Histoquímica com Lectina. Aumento 40 x. Escala 0,66 mm 64
- Figura 36.** Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 250µg Ac₂Pb em E3. Histoquímica com Lectina. Aumento 10 x. Escala 0,27 mm 65
- Figura 37.** Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 250µg Ac₂Pb em E3. Histoquímica com Lectina. Aumento de 100 x. Escala 0,27 mm 66
- Figura 38:** Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 350µg Ac₂Pb em E3. Histoquímica com Lectina. Aumento 40 x. Escala 0,66 mm 67
- Figura 39:** Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em 67

E9, submetido a 350µg Ac₂Pb em E3. Histoquímica com Lectina. Aumento 100 x.
Escala 0,27 mm

Figura 40: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 350µg Ac₂Pb em E3. Histoquímica com Lectina. Aumento 40 x.
Escala 0,27 mm 68

Figura 41: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 350µg Ac₂Pb em E3. Histoquímica com Lectina. Aumento 20 x.
Escala 0,27 mm 68

Figura 42: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 250µg Ac₂Pb em E5. Histoquímica com Lectina. Aumento 10 x.
Escala 2,7 mm 69

Figura 43: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 250µg Ac₂Pb em E5. Histoquímica com Lectina. Aumento 20 x.
Escala 5,4 mm 70

Figura 44: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 250µg Ac₂Pb em E5. Histoquímica com Lectina. Aumento 40 x.
Escala 5,4 mm 70

Figura 45: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 250µg Ac₂Pb em E5. Histoquímica com Lectina. Aumento 40 x.
Escala 5,4 mm 71

Figura 46: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 250µg Ac₂Pb em E5. Histoquímica com Lectina. Aumento 100x.
Escala 0,27 mm 71

Figura 47: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 350µg Ac₂Pb em E5. Histoquímica com Lectina. Aumento 40 x.
Escala 5,4 mm 72

Figura 48: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 350µg Ac₂Pb em E5. Histoquímica com Lectina. Coloração Hematoxilina. Aumento 100 x. Escala 0,27 mm 72

LISTA DE ABREVIATURAS

AcP	Proteína carreadora do radical acyl
BEG	Biologia Embriologia e Genética
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CNT	Controle
CSF	Fatores estimulantes da formação de colônias
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
G6PDH	Fosfatase Dehidrogenase 6-Glicose
GSA-B ₄	Isolectina B ₄ biotinizada Griffonia simplicifolia
HH	Estádio embrionário postulado por Hamburger & Hamilton
IL-3	Interleucina-3
KDA	KiloDaltons
MCP-1	Proteína inflamatória de macrófago
NOS	Óxido nítrico sintase
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS	Solução Salina Tamponada
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

RESUMO

Foram caracterizados morfológicamente os possíveis efeitos do acetato de chumbo no desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus*, bem como caracterizado a nível tecidual sua ação no telencéfalo. Neste estudo os animais tratados (n=48) foram divididos em quatro grupos experimentais, conforme dose (de 250 ou 350 μg Ac_2Pb), dia que foram tratados (E3 ou E5) e analisados (E9 ou E11). Os grupos controle (n=8) receberam apenas solução salina nas mesmas condições. A análise morfológica consistiu na caracterização do padrão normal e alterado do desenvolvimento. Para análise histológica, os telencéfalos dos embriões foram fixados e submetidos aos procedimentos para microscopia óptica, sendo posteriormente realizada a análise estereológica e morfométrica das células microgliais. A responsividade destas células foi utilizada como indicativo de injúria do SNC em desenvolvimento. A caracterização das células microgliais, assim como das áreas de maior deposição do acetato de chumbo foi realizada através de técnicas histoquímicas, Lectina do Tomate e Autometalografia de Timm, respectivamente. Os embriões submetidos ao acetato de chumbo apresentaram desenvolvimento normal, atraso do desenvolvimento, malformações, hemorragia cefálica e lombar e hemorragia extraembrionária. As áreas de maior deposição do acetato de chumbo no telencéfalo de *Gallus domesticus* foram entre os hemisférios, na região cortical do telencéfalo, nos vasos sanguíneos e nas paredes dos ventrículos. A marcação mais intensa ocorreu nos animais tratados em E5, com a dose de 350 μg Ac_2Pb , havendo deposição por todo tecido neural. As células microgliais dos animais submetidos ao metal pesado variaram da forma arredondada, para alongada e amebóide, não apresentando prolongamentos em nenhuma das idades estudadas. Estas células encontravam-se principalmente na região cortical do telencéfalo e nas paredes dos ventrículos. As maiores células foram encontradas nos animais tratados em E5 com a dose de 350 μg Ac_2Pb . Animais tratados sempre apresentaram um maior número de células microgliais quando comparados aos seus controles. Estes achados refletem que as células microgliais podem ser consideradas um parâmetro de localização para injúria pelo acetato de chumbo, sendo que neste momento do desenvolvimento ainda não é capaz de sofrer alteração morfológica para reativa e ramificada.

ABSTRACT

In this study, embryos of *Gallus domesticus* exposed to lead acetate were morphologically characterized, and the action of this metal on the telencephalus was investigated. The animals submitted to this treatment (n=48) were divided in four experimental groups, according to the dose (250 ou 350 μg Ac_2Pb), to the day they were treated (E3 or E5) and analysed (E9 or E11). The control groups (n=8) were exposed to a saline solution instead of the lead acetate and maintained under the same conditions as the experimental groups. Morphological analysis consisted in the characterization of the normal and altered development patterns. To accomplish the histological analysis, the telencephalus of the embryos was fixed and submitted to the procedures of optical microscopy. Subsequently, a stereological and morphometric analysis of the microglia was performed. The answer of those cells was used as an indicator of injury on the developing CNS. The microglial cells and the lead deposition regions were identified with histochemistry techniques (Tomato Lectin and Autometallography). Embryos exposed to lead acetate presented delay of the development, malformations, cephalic and lumbar hemorrhagic, and embryonic extra hemorrhagic. The regions with greater deposition of lead acetate on the telencephalus of *Gallus domesticus* were located between the cerebral hemispheres, on the cortical regions of the telencephalus, blood vessels and and in the walls of the ventricles. Animals exposed to the 350 μg Ac_2Pb on E5 presented the strongest labelling, with generalized lead deposition on the neural tissue. The shape of the microglial cells of the embryos submitted to the lead acetate treatment varied from round to elongated and ameboid, and they did not present prolongations on any of the ages studied. These cells were located mainly on the cortical region of the telencephalus and on the walls of the ventricles. The largest cells were found on the animals treated on E5 with a 350 μg Ac_2Pb dose. The experimental groups always presented a larger number of microglial cells when compared to the control groups. Those findings suggest that the microglial cells can be used as a parameter to locate injury sites caused by the lead acetate, and at this time of the development it is not still capable to suffer morphologic alteration for it reactivates and ramified.

1 - INTRODUÇÃO

Em aves e mamíferos o desenvolvimento embrionário é acompanhado por um expressivo crescimento e aumento de volume do corpo, sendo o entendimento dos processos de diferenciação que ocorrem durante o crescimento bastante relevantes para a compreensão da morfogênese destes animais (Schoenwolf & Yuan, 1995).

Vários eventos importantes ocorrem durante a embriogênese inicial de aves. O ovo telolécito é eliminado do ovário esquerdo e fecundado no infundíbulo, nos 15 minutos posteriores à ovulação. À medida que o ovo vai se deslocando no oviduto em direção à cloaca, ocorre a clivagem e inicia a formação do blastoderma bem como a deposição do albúmen, das membranas da casca e da casca rica em cálcio (Magaldi, 1974).

O ovo de galinha no momento da postura apresenta-se formando o hipoblasto, evidenciando que já iniciou a gastrulação. Em seguida é completada a formação deste hipoblasto, sendo que duas camadas podem ser distinguidas: o epiblasto mais superficial e o hipoblasto mais profundamente, constituindo o blastoderma bilaminar.

O ovo de *Gallus domesticus* deve ser incubado após a postura para prosseguir seu desenvolvimento. Nesta espécie a incubação dos ovos à temperatura de 38°C é de 21 dias até o desenvolvimento completo do embrião, sendo que à temperatura de 40°C, o desenvolvimento é duas vezes mais rápido, mas normalmente não prossegue por muito tempo, inviabilizando a eclosão (Houillon, 1972; Dias & Müller, 1998).

O processo de gastrulação reinicia durante as primeiras horas de incubação dos ovos, sendo que durante esta etapa há a formação das três camadas germinativas, uma camada interna - endoderme, uma camada intermediária - mesoderme e uma camada externa - ectoderme.

O mecanismo de indução do sistema nervoso ocorre quando a mesoderme e a notocorda induzem ao ectoderme sobrejacente a organizar a placa neural que posteriormente formará o tubo neural, estrutura localizada na região dorsal do embrião (Gilbert, 2000).

A neurulação em *Gallus domesticus* inicia próximo das 12 horas de incubação - estágio 3 HH (Hamburger & Hamilton, 1951) e envolve proliferação e migração das células do tubo neural de forma desigual para dar origem a medula espinhal e as diferentes regiões do encéfalo. Assim, na região posterior organiza-se uma estrutura tubular, enquanto a região anterior diferencia-se para formar as vesículas cerebrais primitivas, o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo (Fujimoto et al., 1987).

Com o decorrer do desenvolvimento, o corpo do embrião irá alongar-se, ocorrendo então movimentos de flexura e rotação em torno do próprio eixo, sendo estes eventos importantes para o desenvolvimento do sistema nervoso (Goodrum & Jacobson, 1981; Shostak, 1991).

Com o fechamento dos neuróporos anterior e posterior, intensifica-se a morfogênese embrionária, pelo desenvolvimento do botão caudal e dos arcos faríngeos.

Neste momento é possível identificar os somitos, estruturas de origem mesodérmica dispostas lateralmente à notocorda e ao tubo neural, que desempenham um papel importante nos processos de migração e diferenciação celular (Balinsky, 1981, Gilbert, 2000).

1.1 Organização do Sistema Nervoso de *Gallus domesticus*

No embrião de *Gallus domesticus*, no 3º dia de desenvolvimento (estádio 20 HH), observa-se 37 ou mais pares de somitos posicionados ao longo da região dorsal do corpo; a cabeça apresenta-se grande em relação ao tronco; o encéfalo apresenta proeminências, estando o prosencéfalo ainda com aparência de estrutura única (Patten, 1951; Eyal-Gilad, et al., 1992) (Figura 1).

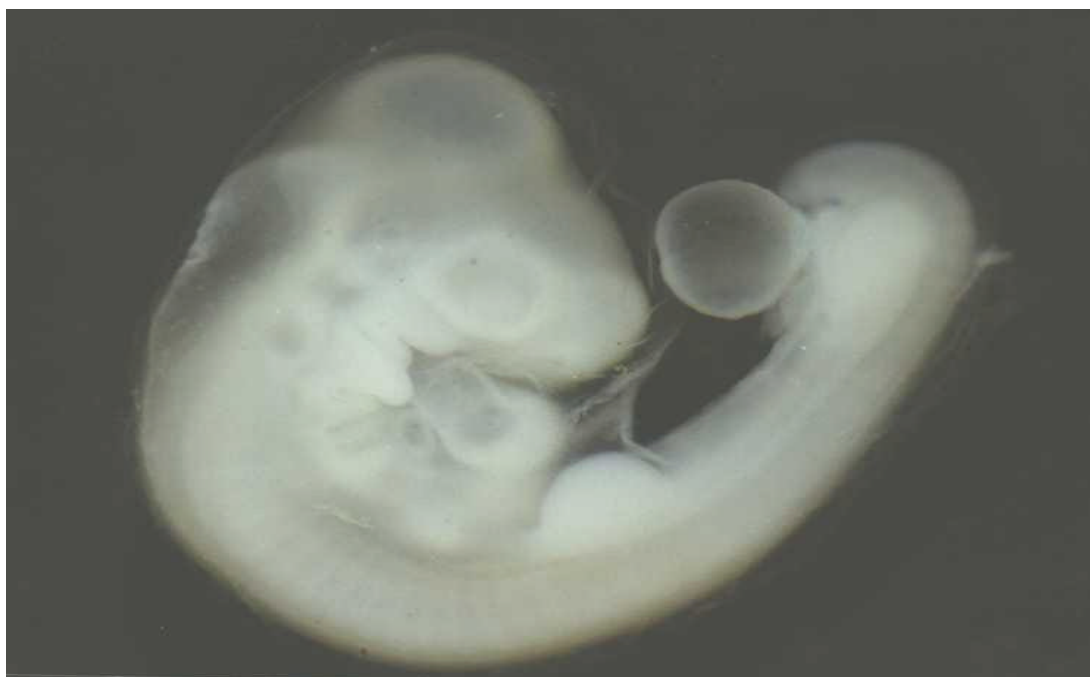


FIGURA 1: Vista lateral de embrião de *Gallus domesticus* com 3 dias de desenvolvimento. Aumento de 10X.

As vesículas telencefálicas apresentarão sua forma definitiva durante o 4º dia embrionário. Nesta idade (estádio 23HH), o embrião apresenta as vesículas ópticas com pigmentação; rotação completa do corpo e o botão caudal voltado para a região sacral; a flexura do tronco corresponde a uma ampla linha curva e o alantóide tem o tamanho aproximado ao da cabeça. Em decorrência da presença das estruturas acima relacionadas, o embrião apresenta características concernentes à espécie (Browder et al., 1991).

No 5º dia de desenvolvimento, as cinco vesículas encefálicas são discerníveis, sendo que o telencéfalo e o diencéfalo apresentam-se estruturados em três camadas: a camada proliferativa, a camada do manto e a camada marginal. A primeira constituída por células neuroepiteliais, a segunda por células em diferenciação e a camada marginal pelos prolongamentos destas células. Neste momento podem ser observados vasos sanguíneos primitivos, distribuídos nos espaços intercelulares, presentes na camada do manto (Schoenwolf & Yuan, 1995).

As células neuroepiteliais são consideradas multipotentes (Salazar, 1992) podendo gerar tanto a linhagem de neuroblastos (precursores de neurônios) quanto a de glioblastos (precursores das células de glia).

A organização das camadas do tubo neural ocorre de forma diferenciada na medula espinhal e no encéfalo. Neste último, os processos de migração celular, proliferação celular diferenciada e morte celular seletiva produzem modificações levando à estruturação de camadas distintas, de acordo com a função, nas diferentes regiões do encéfalo (Jacobson, 1991).

Neuroblastos da zona do manto migram nos processos gliais através da camada branca para gerar uma segunda zona de neurônios na superfície externa do cérebro. Esta região é chamada de neocórtex, que na espécie humana apresenta-se estratificada em seis camadas de corpos celulares neuronais. Cada camada do neocórtex difere uma da outra em

suas propriedades funcionais, nos tipos de neurônios encontrados, e na forma como estabelecem conexões (Jacobson, 1991; Gilbert, 2000).

Os glioblastos, ou células gliais primitivas, migram para as camadas do manto e marginal. Na camada do manto elas irão diferenciar-se em astrócitos protoplasmáticos, fibrosos, e oligodendrócitos (Gomes et al., 1999). As células ependimais são resultado da diferenciação das células neuroepiteliais que cessaram a produção de neuroblastos e glioblastos e permaneceram revestindo o canal central. Posteriormente estará presente outro tipo de célula glial no sistema nervoso, as células microgliais (Martin & Jessel, 1991; Salazar, 1992).

O SNC é dotado de receptores e sinais amplamente regulados no espaço, sendo suscetível à ação de substâncias químicas tanto endógenas (fatores de crescimento, insulina, etc.) quanto provenientes do meio externo (metais pesados, contaminantes ambientais, etc.), que podem acarretar efeitos neurotóxicos quando em contato com este sistema, tanto de embriões quanto de adultos (Cole & Trasler, 1980; Depablo & Delarosa, 1995).

1.2 Toxicidade do Chumbo

Estudos têm demonstrado que a contaminação de embriões e indivíduos jovens por substâncias tóxicas (como o chumbo, cádmio etc.), pode acarretar prejuízos ao desenvolvimento normal do sistema nervoso (Rodier, 1995; Vodela et al., 1997; Chahoud et al., 1999).

O chumbo é um elemento com muitas aplicações industriais, sendo que as mais importantes fontes de exposição ao chumbo ocupacional incluem principalmente, a mineração e fusão de chumbo onde a concentração no ar pode exceder 1.0 mg/m^3 ; corte e

soldagem de estruturas pintadas com chumbo; manufatura de baterias de chumbo; produção de tintas a base de chumbo. O consumo anual de chumbo na indústria, nos Estados Unidos é de aproximadamente 2 milhões de toneladas (Needleman, 2000; Matos et al., 2001).

Devido à elevada toxicidade do chumbo, as autoridades sanitárias mundiais estão preocupadas em estabelecer medidas para reduzir a concentração desse metal nos alimentos, como no leite, ovos, carne, uma vez que são considerados a principal fonte de ingestão desse contaminante. Observou-se que os níveis de chumbo vêm diminuindo significativamente em função da substituição gradativa dos tipos de embalagens e soldas que possam liberar o metal durante o armazenamento dos alimentos (Okada et al., 1997).

O ar é o principal meio de transporte e distribuição do chumbo e grandes quantidades deste metal, tendem a localizar-se nas regiões próximas de fontes geradoras (CETESB, 1993; Cook et al., 1994; Eklund, 1995).

O chumbo e seu sulfatos são pouco absorvidos, no entanto, os sais solúveis, o cloreto, o nitrato, o acetato são venenos muito ativos, acumulando-se no organismo de animais expostos. Os sistemas orgânicos mais afetados são o gastrointestinal, hematopoiético, sistema nervoso e neuromuscular. O sistema renal e cardiovascular são também bastante afetados. Após a absorção, o chumbo é transportado para todos os órgãos e tecidos do corpo pelo sangue. Aproximadamente 95% do chumbo no sangue está associado a hemácias e o restante com as proteínas do plasma (Al-Saleh, 1994; Klaassen, 1996; Henretig, 1998).

O aumento de glutathione, um peptídeo antioxidante, nos tecidos parece ser uma resposta compensatória a toxicidade do chumbo. Resultados envolvendo o papel das espécies reativas de oxigênio e do estresse oxidativo na toxicidade ao chumbo são

consistentes com resultados encontrados para outros metais pesados (Sarafin & Verity, 1991).

O chumbo parece aumentar a pressão parcial do oxigênio resultando na indução gradual de mudanças na coagulação, levando a uma rota de coagulação intrínseca com consumo coagulopatológico e coagulação intravascular disseminada. O sistema esquelético é o local de maior deposição do chumbo em caso de intoxicação, o que leva a um aumento dos efeitos no sistema de coagulação levando a coagulação intravascular disseminada, tendo como consequência necrose óssea. Esta necrose é de particular interesse tendo em vista que tem sido relacionada com necrose na cabeça femural com tendências hemorrágicas e trombóticas (Kiesow et al. , 1977).

Estudos têm demonstrado que exposição prolongada ao chumbo induz a diminuição na condução nervosa e alteração na homeostase do cálcio (Lockitch, 1993; Orrenius & Nicotera, 1992). Como o cádmio, o níquel e o cobalto, o chumbo interfere com os canais iônicos que transportam cálcio por mecanismos mediados por calmodulina, que competem com cálcio por locais de ligação Ca^{2+} - calmodulina. Os efeitos citotóxicos do chumbo parecem estar relacionados pelo menos em parte, com a estimulação de reações peroxidativas ocorridas na membrana celular (Lawton & Donaldson, 1991).

O chumbo pode produzir um aumento da peroxidação lipídica em neurônios, com alterações na composição e função de membranas ocasionando danos, funcionamento inadequado e eventualmente morte celular. O aumento da peroxidação parece ser localizado em áreas específicas do cérebro indicando que o chumbo pode não se distribuir uniformemente em todo o sistema nervoso central (Ali & Bondy, 1989).

A administração de trietilchumbo na dose de 1,75 mg/kg peso diariamente durante 5 dias resultou em um aumento significativo na peroxidação lipídica no córtex frontal de

ratos. Contudo as membranas hipocâmpais e cerebrais não mostraram aumento na capacidade peroxidativa (Donaldson & Knowles, 1993).

A intoxicação por chumbo induz danos ao sistema dopaminérgico, agindo tanto diretamente na síntese do neurotransmissor como indiretamente no transporte de cálcio. Como consequência, a condução do sinal e a transmissão nos circuitos neuronais do sistema nervoso central e do sistema nervoso periférico podem ser comprometidos (Lasley, 1992).

O chumbo agride o sistema nervoso periférico, levando à degeneração axonal e desmielinização, por meio de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (Cordeiro, 1996). Estas alterações manifestam-se ao exame eletroneurográfico, como diminuição da velocidade de condução do impulso nervoso, particularmente nos nervos radiais (Windebank, 1993).

Embriões de várias espécies, apresentam dois tipos de neurotoxicidade quando expostos ao chumbo. Primeiro, altos níveis de chumbo no sangue podem produzir uma aguda encefalopatia hemorrágica com severos edemas e alta mortalidade. Esta encefalopatia capacita o chumbo a abrir as junções dos capilares endoteliais que formam a barreira sangue - cérebro. Segundo, a neurotoxicidade está relacionada com um declínio eventual na capacidade cognitiva e motora em jovens roedores e crianças expostas ao metal durante a primeira infância (Johnston & Goldstein, 1998; Rodrigues et al., 1996).

O efeito tóxico em crianças é maior por que o chumbo depositado nos ossos fica em constante mobilidade devido ao crescimento. O esqueleto, na primeira infância, aumenta quarenta vezes em relação à sua massa original, e durante esse período há uma maior capacidade de acumular chumbo. Estudos têm demonstrado que crianças absorvem cerca de 40% do chumbo ingerido, enquanto que os adultos absorvem somente 5 a 10% (Angle, 1993).

Franklin et al., (1997) em experimentos com macacos observaram que há transferência transplacentária de chumbo endógeno, sendo que de 7 a 39% do chumbo do esqueleto fetal originou-se do esqueleto materno. A mobilização do chumbo do esqueleto pode produzir elevados níveis de chumbo no sangue, sendo que este fenômeno pode ocorrer durante a gravidez (Gulson et al., 1997).

Tem sido encontrada uma correlação inversa entre níveis de chumbo no sangue materno e idade gestacional, com um aumento na frequência de nascimentos prematuros em áreas altamente contaminadas por chumbo (West et al., 1994).

Se, de fato, o chumbo afeta a duração da gravidez, uma possível explicação pode ser a interferência deste com a síntese de colágeno, o metabolismo energético e a estrutura da membrana, que podem afetar a integridade da membrana amnio-coriônica com predisposição para sua ruptura prematura (Torres-Sanchez, et al., 1999). Outra explicação pode ser o aumento espontâneo de contrações uterinas, o que tem sido observado em estudos experimentais com ratos expostos ao chumbo (Modzelewski et al., 1986).

A contaminação da água por agentes químicos (chumbo, arsênio, benzeno, cádmio, tricloroetileno) resulta em prejuízo à capacidade reprodutiva em aves, evidenciado pela diminuição da produção de ovos, diminuição do peso do ovo, aumento da mortalidade embrionária e redução da ninhada (Vodela et al., 1997).

Narbaitz et al. (1985) observaram, em embriões de aves tratados com chumbo, a ocorrência de múltiplos focos hemorrágicos, alterações no fechamento do tubo neural e/ou retardo do crescimento da cabeça e necrose cefálica, além de alterações histológicas e ultraestruturais das células nervosas. Este estudo demonstrou ainda que a administração do chumbo após o terceiro dia de incubação, resulta em hemorragias no tecido nervoso, seguidos por derrame de sangue nos ventrículos cerebrais e no espaço subaracnóide.

Há indícios de que as células gliais geram uma defesa contra a toxicidade do chumbo, com um aumento no grau de diferenciação. As células gliais respondem primariamente ao processo tóxico com um aumento dos níveis de cálcio intracelular. As enzimas fosfatase desidrogenase 6-glicose (G₆PDH) e proteínas carreadoras do radical acyl (AcP) são ativadas após o contato com altas concentrações de chumbo, aparentemente com o papel de manter a homeostase celular. Injúrias, de variadas formas, ao SNC produzem uma reação glial, envolvendo células microgliais. Considerando a função fagocitária da microglia, é possível que estas células encontrem-se alteradas quanto ao seu número e organização no caso de haver exposição do sistema nervoso (Grundt et al., 1995; Ignácio, 1998).

1.3 Caracterização das Células Microgliais

As células microgliais foram primeiramente reconhecidas por Nissl em 1899, que nomeou-as de células haste, sugerindo que teriam a capacidade para migração e fagocitose, por serem consideradas células da neuroglia reativa. Em 1932 surgiram os trabalhos de Rio-Hortega que reconheceu as células microgliais como um elemento mesenquimal residente dentro do SNC e distinto dos astrócitos e oligodendrócitos. Partindo dos estudos de Rio-Hortega, na década de 80 aumentou o interesse pelo estudo da microglia, encorajados pelas descobertas de marcadores específicos e pelo emprego de novas técnicas que garantiram maior especificidade no reconhecimento dos tipos celulares (Ling et al., 1982; Boya et al., 1991; Navascués et al., 1995; Dalmau et al., 1997).

A origem das células microgliais é ainda bastante controversa. Segundo Nakajima & Kohsaka, (1993) elas derivariam de células relacionadas à linhagem monocítica, que

invadiram o cérebro durante o desenvolvimento embrionário assumindo a forma de microglia amebóide e subseqüentemente tornando-se microglia ramificada. Outras origens tem sido propostas a partir de células que se originariam de glioblastos ou do neuroepitélio, tendo assim origem neuroectodermal (Fujita & Kitamura, 1975; Fedoroff et al., 1997); ou mesodermal (Ashwell, 1991; Boya et al., 1991; Cuadros & Navascués, 2001).

Por outro lado, Kaur et al. (2001) sugerem que a microglia se origina no tecido mesenquimal do saco vitelínico e durante a neurulação, células provenientes deste tecido associar-se-ão ao neuroepitélio.

As células microgliais têm sido classificadas em cinco categorias (Fujimoto et al., 1987; Cuadros et al., 1997; 2000), conforme as características morfológicas que apresentam:

- microglia amebóide tipo 1 (células com forma arredonda, superfície celular lisa, desprovida de prolongamentos),
- microglia amebóide tipo 2 (célula com forma arredondada, presença de vacúolos citoplasmáticos e ausência de prolongamentos),
- microglia amebóide tipo 3 (células com corpo celular mais alongado, presença de um a dois prolongamentos),
- microglia ramificada primitiva (células que exibem poucos e curtos prolongamentos),
- microglia ramificada (células que apresentam mais de 3 prolongamentos citoplasmáticos, ramos partindo dos prolongamentos e expansões em várias direções).

As células microgliais após alcançarem sua localização final, adquirem progressivamente a morfologia ramificada, apresentando inicialmente escassas ramificações, depois tornam-se maduras e posteriormente completamente ramificadas. Esta

diferenciação é acompanhada por mudanças imunofenotípicas: células ramificadas não são marcadas ou são pouco marcadas com anticorpos que evidenciavam microglia amebóide (Cuadros & Navascués, 1998).

A atividade proliferativa da microglia ocorre durante o desenvolvimento normal do sistema nervoso de vertebrados (Ling & Wong, 1993) sendo este evento comprovado pela presença de células microgliais amebóides mitóticas (Kaur & Ling, 1991). Estas células têm uma localização topográfica específica no cérebro, na camada branca subcortical e nas regiões circumventriculares (Kaur et al., 1985).

Tem sido proposto que, em locais onde há a ocorrência natural da morte neuronal pode-se observar células microgliais durante o desenvolvimento do SNC. Então, fatores liberados na morte neuronal podem promover a migração da microglia amebóide. Esta hipótese é suportada pela coincidência cronológica da morte neuronal com a entrada de precursores microgliais no tecido nervoso (Pearson et al., 1993). Contudo, esta hipótese tem sido contestada pela presença de precursores microgliais na retina de mamíferos bem antes do período de morte celular (Ashwell, 1989) e pela ausência de microglia em algumas áreas do cérebro onde há morte celular (Zecevic et al., 1998).

A proliferação da microglia tem sido descrita *in vitro* e *in vivo* (Streit et al., 1999; Ziaja & Janeczko, 1999) como sendo estimulada por citocinas e fatores de crescimento produzidos pela própria microglia e por outros tipos celulares como astrócitos e neurônios (Elkabes et al., 1996; Streit et al., 1999).

O controle desta proliferação implica na ação de vários fatores como: os que estimulam a formação de colônias (CSF), GM-CSF e CSF-1 (Ling et al., 2001), dois mitogênicos microgliais com massa molecular de 50 e 22 kDA (Giulian et al., 1991), neurotrofina-3 (Elkabes et al., 1996), interleucina-4 (Suzumura et al., 1994) e interleucina-5 (Ringheim, 1995). Navascués et al. (2000) consideram que o desenvolvimento da célula

microglial no SNC provavelmente depende das ações combinadas de vários fatores estimuladores ou inibitórios.

Marín-Teva et al. (1999) demonstraram em retina de codorna que as células microgliais amebóides entram em mitose quando estão migrando. Com a mitose avançada, as células microgliais retraem seus pseudópodos, tornam-se arredondadas e param de migrar, enquanto ocorre a metáfase, anáfase e início da telófase. A partir deste momento, a microglia amebóide vai alternando migração e mitose.

A proliferação da microglia amebóide durante a migração parece ser um evento comum que contribui para o aumento do número e a dispersão de precursores microgliais através do SNC durante o desenvolvimento normal (Wu et al., 1996).

Várias moléculas da matriz extracelular parecem influenciar as modificações morfológicas, sendo a aquisição do fenótipo ramificado acompanhado por alterações químicas dos microtúbulos. Por outro lado, o comportamento migratório das células microgliais está relacionado a modificações no citoesqueleto (Ilschner & Brandt, 1996).

As células microgliais amebóides migram de maneira estereotípica, sugerindo que este processo é controlado por fatores específicos presentes no SNC. Citocinas como MCP-1, proteína inflamatória de macrófago ou fractalcina induzem a migração e a reorganização da actina do citoesqueleto na microglia de adultos *in vitro* (Cross & Woodroffe, 1999). Estas substâncias são liberadas em caso de injúria no cérebro imaturo (Ivacko et al., 1997).

A natureza dos fatores que promovem a diferenciação microglial tem sido extensamente estudada, principalmente *in vitro*, sendo que o ácido retinóico parece promover a ramificação destas células, enquanto o plasma sanguíneo inibe a aquisição do fenótipo ramificado (Giulian & Baker, 1986).

Os astrócitos parecem ter um papel importante na determinação do fenótipo microglial maduro. Em culturas de células microgliais com astrócitos há a produção de um grande número de células ramificadas (Tanaka et al., 1999), o que sugere que a diferenciação das células microgliais depende do seu microambiente (Perry & Gordon, 1991).

A composição da matriz extracelular e da superfície celular é bastante diferente no cérebro em desenvolvimento, no cérebro adulto normal e no que sofreu injúria. Estas diferenças podem contribuir para um comportamento específico das células microgliais em cada uma destas situações (Fawcett & Asher, 1999).

A microglia desempenha um papel importante no SNC em desenvolvimento e na manutenção de sua integridade, já que estas células eliminam restos celulares por fagocitose, associados com a morte, reabsorção e remodelamento de tratos de fibras nervosas. As células microgliais são as primeiras a responderem no caso de injúria ao cérebro, apresentando proliferação, migração, alterações morfológicas e funcionais e possivelmente exercendo papel importante na regeneração neural (Nakajima et al., 1992; Berozovskaya, et al., 1995; Navascués et al., 2000).

A microglia e os astrócitos tornam-se ativados após lesão ao SNC, proliferando e aumentando de tamanho, apresentando portanto mudanças na forma e na funcionalidade. A microglia ativada secreta produtos que regulam o crescimento e a proliferação astrogliar, sendo considerada a principal fonte de peptídeos que estimulam a astrogliar (Leme & Chadi, 2001).

Tem sido demonstrado que a célula microglial está também envolvida em distúrbios que ocorrem no início do desenvolvimento. Experimentos em ratos induzindo defeitos no tubo neural demonstraram um aumento no número de microglia amebóide. Um grande número de células foi detectado em diferentes áreas do neuroepitélio, especialmente

no telencéfalo e no diencéfalo. O aumento foi atribuído `a proliferação celular localizada, bem como a infiltração de macrófagos, pois nesta fase o neuroepitélio ainda não está completamente vascularizado (Hao et al., 2000).

Em eventos nos quais a barreira hemato-encefálica é danificada devido `a injúria traumática, hipóxia, isquemia, toxinas de bactérias, lesão em nervo periférico etc., a reação microglial pode ser eliciada por neuronofagia, neuroproteção ou remodelamento das fibras nervosas através da secreção de várias substâncias químicas e fatores de crescimento (Xu et al., 1993; Dalmau et al., 1998).

A exposição transitória de ratos `a hipóxia (Li et al., 1998; You & Kaur, 2000) eliciou reação microglial. Estas células foram envolvidas ativamente na fagocitose das células degeneradas, sendo que houve a indução da expressão de óxido nítrico sintase (NOS) e portanto a possível produção de óxido nítrico nestas células.

Em períodos pós-isquêmica tem sido evidenciado a ativação e acumulação microglial no hipocampo de ratos. Súbitas mudanças na morfologia microglial foram verificadas, caracterizadas pelo alargamento dos corpos celulares e regressão dos processos celulares. Ivacko et al. (1997) sugerem que, no cérebro em desenvolvimento, a ativação e acumulação microglial por hipoxia-isquêmica, procede mais rapidamente do que no cérebro adulto, podendo refletir propriedades distintas da microglia estágio desenvolvimental específico e diferentes papéis da microglia ativada no SNC normal em desenvolvimento.

No SNC de ratos e coelhos adultos foram marcadas seletivamente células microgliais empregando a técnica histoquímica com lectina, tanto com a isolectina B₄ biotinizada *Griffonia simplicifolia* (GSA - B₄), quanto com a lectina do tomate - *Lycopersicum esculentum*, sendo os resultados similares no emprego de ambas lectinas nas duas espécies animais. Nenhum neurônio ou outro tipo de célula glial, além da microglia

foi marcada, o que evidencia que a técnica histoquímica com lectina, para detecção de células microgliais, parece ser suficientemente seletiva, podendo ser considerada uma importante ferramenta para estudos morfológicos e neurobiológicos destas células (Boya et al., 1991).

Um estudo desenvolvido no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/BEG/CCB/UFSC, realizado por Ignácio (1998), utilizando como modelo experimental embriões de *Gallus domesticus*, também demonstrou a eficiência da metodologia acima citada. Este trabalho abordou o processo de diferenciação e alteração morfológica no caso de lesão mecânica, apontando também para a necessidade de complementar o entendimento dos processos que envolvem as células microgliais em outros tipos de injúria ao SNC. Baseado nisto, nos propomos a investigar as possíveis alterações morfológicas e estereológicas que estas células sofrem no cérebro de embriões de galinha, quando expostos ao agente químico acetato de chumbo.

2- OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Analisar a ação do acetato de chumbo no desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus* com ênfase na morfologia e organização das células microgliais do telencéfalo.

Objetivos Específicos:

- Avaliar as características morfológicas de embriões tratados com acetato de chumbo;
- Caracterizar as áreas de maior deposição do acetato de chumbo no telencéfalo de embriões nas diferentes doses e idades amostradas;
- Quantificar o número, forma, tamanho e disposição de células microgliais nos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar possíveis correlações entre a representatividade microglial e as áreas de maior deposição de acetato de chumbo.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Material Biológico de Estudo

Caracterização da espécie em estudo, de acordo com a taxonomia (Berger, 1971):

Classe : AVES

Subclasse : NEORNITHAE

Super Ordem : NEOGNATHAE

Ordem : GALLIFORMES

Família : PHASIANIDAE

Gênero : GALLUS

Espécie : *Gallus domesticus*

Neste estudo foram utilizados embriões de *Gallus domesticus*, obtidos a partir da incubação de ovos fertilizados doados pela Empresa de Frangos Macedo S/A - São José/SC .

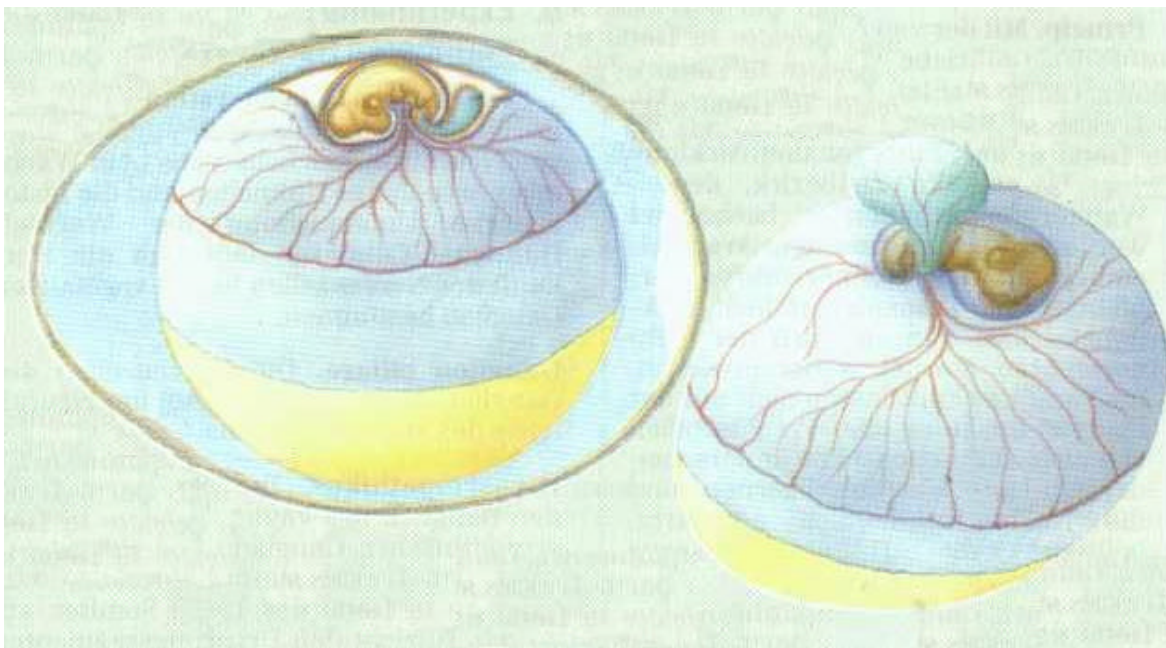


Figura 2: Esquema representando o embrião no ovo com suas membranas, com 4 e 5 dias de desenvolvimento embrionário.

3.2 Características do Ovo

Coloração: bege

Peso médio: 63g

Tipo de ovo: telolécito

Período de incubação até eclosão: 21 dias a 38°C

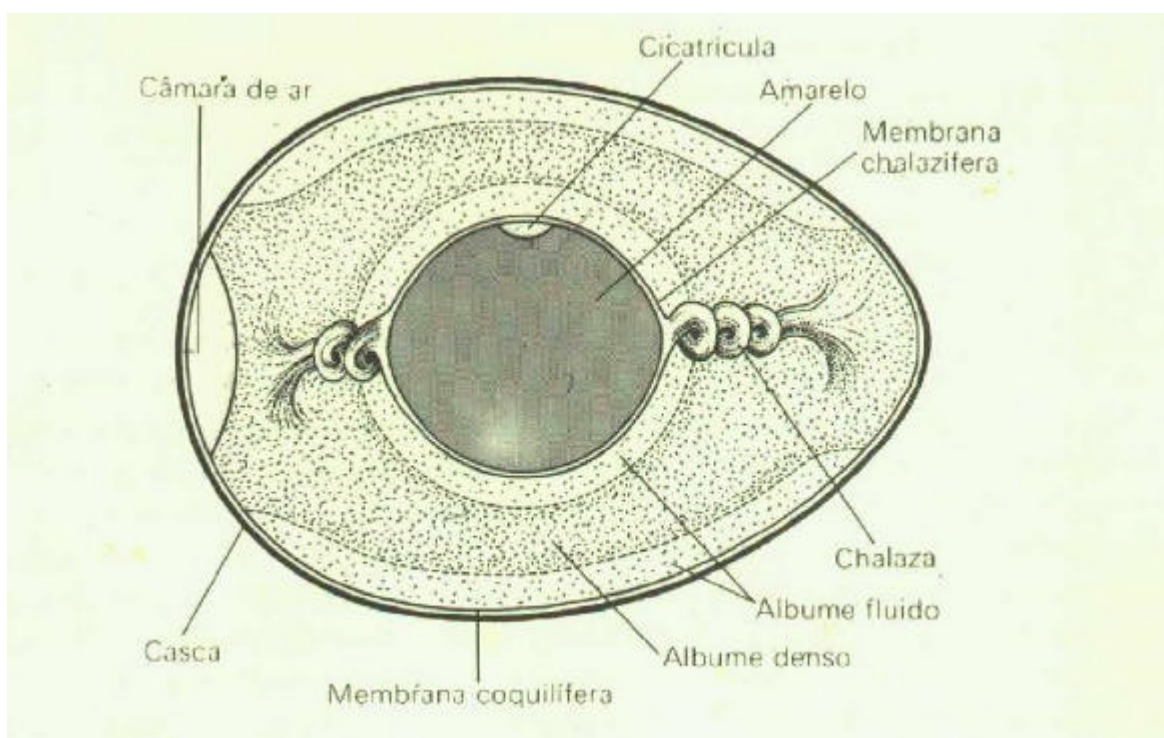


Figura 3: Desenho esquemático do ovo de *Gallus domesticus*.

3.3 - Condições de Incubação

A incubação dos ovos foi realizada em uma estufa com temperatura monitorada para que se mantivesse entre 37,5 e 38° C. Para garantir a umidade atmosférica da incubadora, foram colocados dois frascos de vidro (500 ml) com água em seu interior,

sendo esta trocada a cada três dias. Diariamente a incubadora era aberta por 3 minutos, para que assim se garantisse a renovação do ar (Magaldi, 1974; Marques, 1986).

3.4 - Grupos Experimentais

Foram manipulados um total de 82 embriões, sendo que destes, 48 mantiveram-se viáveis até o final do experimentos e foram considerados neste estudo (Figura5).

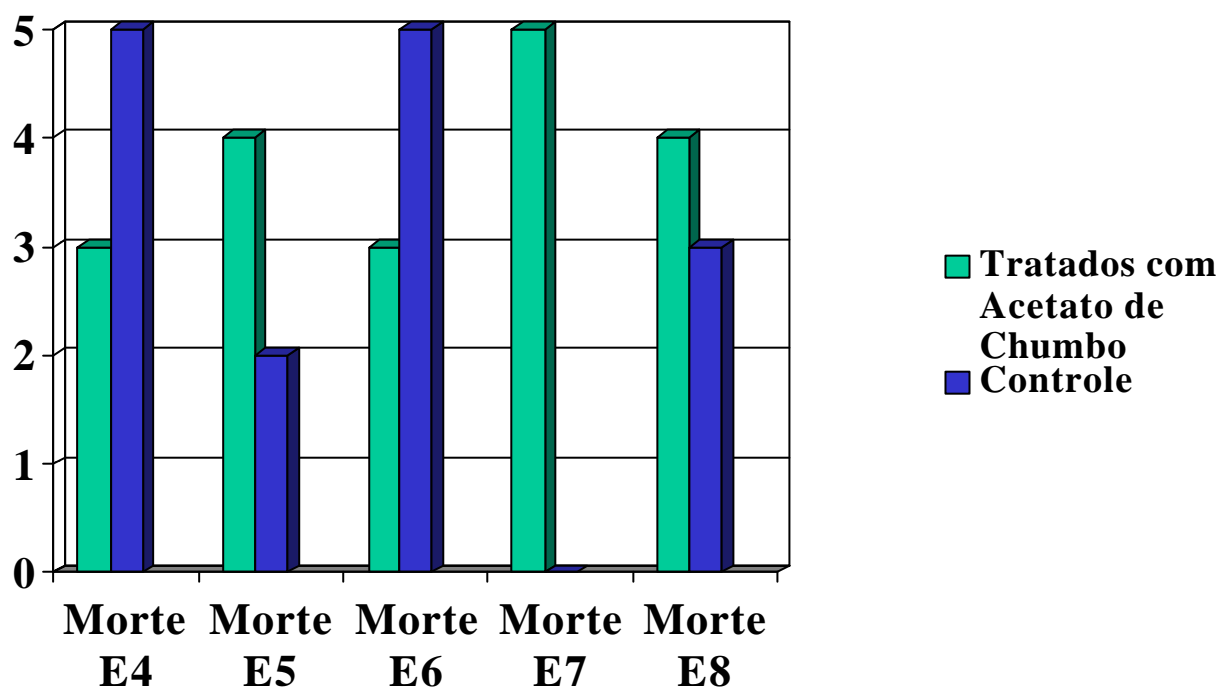


Figura 5: Dados de mortalidade do total de animais manipulados neste estudo.

Os animais submetidos ao acetato de chumbo (Reagen), (n=48) foram divididos em quatro grupos experimentais, conforme a dose e o dia que foram tratados e analisados, sendo que cada grupo era composto de 12 indivíduos.

O acetato de chumbo foi injetado na vesícula vitelínica no 3º dia do desenvolvimento embrionário (E3) (Figura 6) , com análise em E9 ou no 5º dia (E5) do desenvolvimento embrionário, com análise em E11.

Foram utilizadas duas doses, de 250 µg e de 350 µg de acetato de chumbo/0,1 ml de salina, sendo que os dois grupos receberam ambas as doses, conforme a tabela 1.

Os grupos controle (n=8) foram submetidos a mesma via de administração, no mesmo período de desenvolvimento que os embriões tratados, porém, recebendo apenas solução salina 0,9%.

TABELA 1 - Demonstrativo dos grupos experimentais, relacionando dia de tratamento, dia de análise e o número de telencéfalos submetidos às técnicas histoquímicas.

Tratamento	Dia Tratamento	Dia Análise	Nºde telencéfalos/ técnica utilizada	
			LECTINA	TIMM
250 µg/0,1ml salina (n=12)	E3	E9	06	06
250 µg/0,1ml salina (n=12)	E5	E11	06	06
350 µg/0,1ml salina (n=12)	E3	E9	06	06
350 µg/0,1ml salina (n=12)	E5	E11	06	06
0,1ml salina - Controle (n=4)	E3	E9	02	02
0,1ml salina - Controle (n=4)	E5	E11	02	02

Os animais tratados com as doses de 250 μg e com 350 μg Ac_2Pb , bem como os controles, apresentaram uma taxa de mortalidade equivalente, não sendo considerados neste estudo, pois morreram antes do término do experimento.

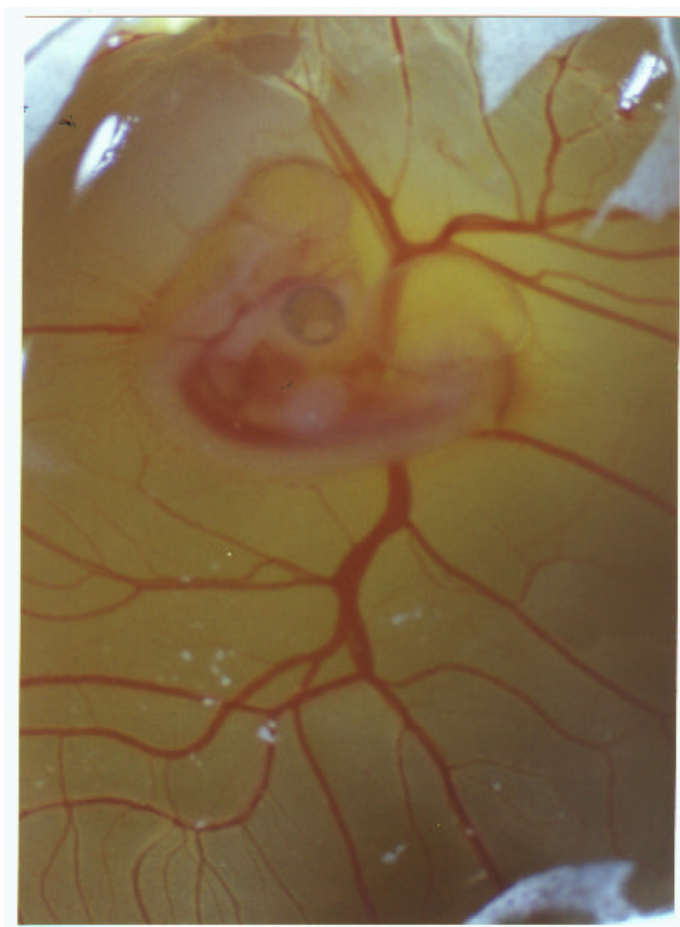


Figura 6: Vista lateral de embrião no 3º dia de desenvolvimento embrionário no ovo, envolto por suas membranas. Seta indicando o local de injeção na vesícula vitelínica.

3.5 - Procedimentos para Análise Morfológica

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 de Petri contendo solução salina. Os animais foram analisados segundo duas categorias:

I - Padrão Normal:

- padrão de desenvolvimento da espécie (tamanho, curvatura, e formação dos membros);
- fechamento adequado da região torácica e abdominal;
- organização das vesículas cerebrais;
- vascularização subcutânea e extra-embrionária.

II - Alteração do Padrão Normal:

- comprometimento de alguma das características acima.

Para a análise microscópica foram utilizados apenas os animais com aparência normal, não sendo manuseados os que apresentaram alteração do padrão normal.

3. 6 - Dissecação e Fixação dos Encéfalos

Os embriões com padrão normal foram dissecados, tendo seus encéfalos fixados, por imersão, conforme a técnica histológica ou histoquímica a que seriam submetidos:

- para técnica Histológica Hematoxilina e Eosina - Formol 10% por 24 horas e conservação em álcool 70% (Beçak & Paulete, 1976);

- para a técnica Histoquímica com Lectina - Bouin Aquoso por 24 horas e conservação em álcool 70% saturado com bicarbonato de lítio (com a finalidade de diminuir os resíduos do fixador) (Boya et al., 1991; Castellano et al., 1991) ;

- para a técnica Histoquímica de Timm - Solução Carnoy-Sulfeto por 36 horas e conservação em álcool absoluto (Danscher, 1981) .

3.6.1 Inclusão e Seção do Material:

Desidratação: realizada em série etanólica crescente (70 até 100%) por 10 minutos em cada concentração de álcool, sendo que a permanência no álcool 100% foi repetido uma vez.

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

Inclusão: três banhos de 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 frontais, os blocos foram mantidos em temperatura ambiente para solidificação da parafina .

Confecção dos Cortes: foram realizados cortes coronais com a espessura de 10 µm foram realizados em micrótomo rotativo da marca Olympus modelo CUT 4055. As lâminas foram gelatinizadas, sendo colocados 8 cortes por lâmina e foram descartados na proporção de 1:2.

Desparafinização dos Cortes: as lâminas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol por 10 minutos (± 5), seguido de álcool/xilol, hidratação em sequência decrescente de álcool absoluto até álcool 70% e em água destilada por 10 minutos cada.

3.6.2 Técnicas de Coloração Histológicas:

3.6.2.1 Hematoxilina e Eosina de Harris

Cortes dos grupos tratados com Ac₂Pb 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 durante 2 minutos;
- c) Lavar em água de torneira por 10 minutos;
- d) Lavar rapidamente em água destilada;
- e) Corar com Eosina durante 1 minuto;
- f) Lavar em água destilada;

- g) Desidratar em série etanólica crescente (70% a 100%), durante 10 minutos em cada concentração de álcool;
- h) Diafanizar em xilol/álcool por 5 minutos e xilol (2 banhos de 5 minutos cada);
- i) Montar as lâminas com Bálsamo do Canadá e lamínulas.

3.6.2.2 Histoquímica de Timm (Danscher, 1981;1984;)

As lâminas após desparafinização e hidratação foram submetidas a solução de desenvolvimento físico (Danscher et al, 1987), por 45 minutos. Sendo após submetidas ao protocolo abaixo:

- a) Lavar em água de torneira por 30 minutos, sendo feita uma troca após 15 minutos;
- b) Desidratar em álcool 70% por 30 minutos para fixação;
- c) Desidratar em série etanólica crescente sendo dado 3 banhos de 10 minutos em álcool 96%, 2 banhos de 10 minutos em álcool 99%
- d) Diafanizar em xilol e montar com lamínula e Bálsamo do Canadá .

3.6.2.3 Histoquímica com Lectina de Tomate (Acarin et al., 1994)

As lâminas após desparafinização e hidratação foram submetidas ao protocolo que segue:

Bloqueio da atividade das peroxidases endógenas: 1 banho de peróxido de hidrogênio (2%) em metanol por 15 minutos; em seguida as lâminas foram lavadas 2 vezes por 10

minutos em Solução Salina Tamponada (TBS) 0,1 M , pH de 7,4, e um banho de 10 minutos em TBS + Triton X-100 1%.

Incubação com Lectina: as lâminas foram incubadas com lectina *Lycopersicon esculentum* (Sigma Chemical, USA) conjugada à biotina, na diluição de 20 µg/ml em TBS por 16 horas à 4°C. Após a incubação com a lectina, as secções foram lavadas 1 vez por 10 minutos em TBS + Triton X-100 1% e em seguida lavadas 2 vezes por 10 minutos em TBS.

Incubação com Avidina-Peroxidase: as secções foram incubadas com avidina-peroxidase (Sigma Chemical, USA) na diluição de 50 µg/ml em TBS por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em TBS por 10 minutos cada.

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 desidratadas, diafanizadas (conforme item 4.6.2.1) e foi realizada a montagem com Bálsamo do Canadá e lamínulas.

Controle negativo da especificidade: Visando identificar se a reatividade à lectina 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 lectina e substituindo-a por TBS.

3.7 Análise das Lâminas

As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico para determinação dos locais de deposição do acetato de chumbo, bem como a localização, contagem e medida das células microgliais. A partir desta análise foram confeccionados esquemas e fotos.

Determinação dos locais de deposição do acetato de chumbo: O mapeamento destas áreas foi representado em desenho esquemático obtido em câmara clara (1,25X) com aumento de 10X (Figura 7). A padronização foi utilizada para que se realizasse uma análise qualitativa dos locais de marcação, obedecendo-se os seguintes critérios: (+) marcação fraca, (++) marcação moderada e (+++) marcação intensa.

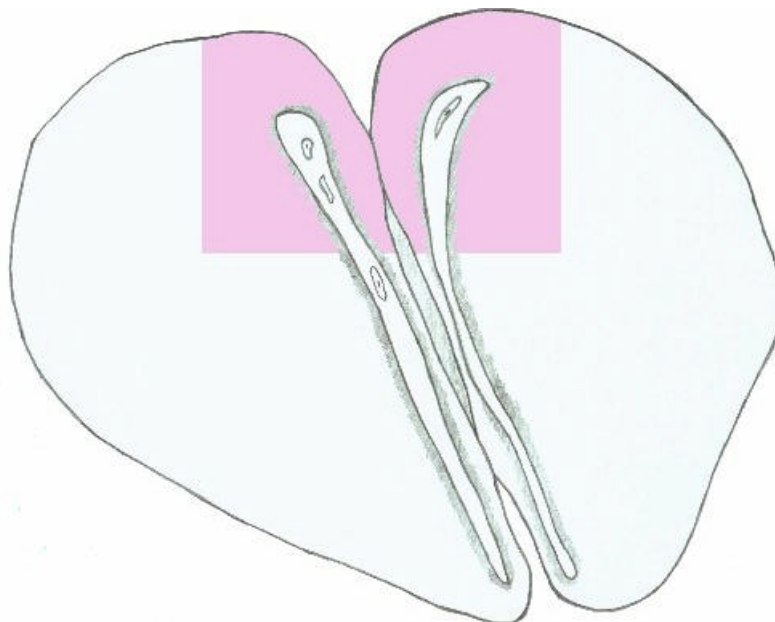


Figura 7: Desenho com câmara clara de secção coronal de telencéfalo.

Estereologia dos Cortes Histológicos: Foram realizadas contagens de células microgлияis dos cortes histológicos, com o auxílio da Grátícula de Weibel (Mandarim-de-Lacerda, 1999), acoplada ao microscópio óptico, em um aumento de 400X. Em cada lâmina foram selecionados aleatoriamente, cinco campos visuais alternados, para a contagem das células. 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 microgлияs em cada lâmina (Freere & Weibel, 1967).

Medida das Células Microgлияis: para a determinação do diâmetro das células microgлияis, escolheu-se aleatoriamente em cada lâmina 10 célula por telencéfalo/grupo experimental. As medidas dos eixos transversal e longitudinal foram obtidas através de ocular micrométrica acoplada ao microscópio óptico a 400X e 1000X. A determinação do número de microgлияs a serem medidos foi baseada na equação: $n = z \cdot s / l$, onde $z = 1,96$; s = desvio padrão da média amostral inicial; $l = 10\%$ média da amostra inicial.

3.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos referentes a medida e quantidade das células microgлияis 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 duas vias (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para tratamentos com número de amostras homogêneas (Zar, 1974).

4 – RESULTADOS

No presente estudo foram acompanhados os principais eventos do desenvolvimento embrionário e neural normal de embriões de *Gallus domesticus* (Figura 7) e de embriões submetidos ao tratamento com acetato de chumbo.

4.1 Análise Morfológica de Embriões Tratados com Acetato de Chumbo

Embriões submetidos à dose de 250 µg Ac₂Pb administrada no 3º dia de desenvolvimento (E3) apresentaram desenvolvimento normal (25%), atraso do desenvolvimento (25%) (Figuras 8) e hemorragia cefálica (50%) (Figura 9). Quando a mesma dose foi administrada no 5º dia (E5) observou-se desenvolvimento normal (66,6%) e hemorragias cefálica e lombar (33,3%).

Nos embriões tratados com a dose de 350 µg Ac₂Pb administrada no 3º dia de desenvolvimento observou-se desenvolvimento normal (16,6%), malformações (33,3%) (Figuras 11, 12, 13 e 14) e hemorragia cefálica (50%); (Figura 10) e quando administrada no 5º dia, pode ser observado desenvolvimento normal (58,3%), hemorragia cefálica e lombar (25%) e hemorragia na região extra embrionária (16,6%)

A Figura 15 demonstra os achados da análise morfológica dos grupos experimentais utilizados neste estudo.

O atraso de desenvolvimento foi caracterizado quando os embriões tratados com acetato de chumbo apresentaram tamanho inferior ao característico para a idade, primórdio da formação do bico, pele lisa e membros pouco desenvolvidos.

A hemorragias cefálica foi caracterizada pelo acúmulo excessivo de sangue na região das vesículas cerebrais, de cor avermelha a bordô; sendo que os animais controle apresentam vesículas cerebrais claras, apresentando vasos de aspecto normal.

As hemorragias cefálica e lombar caracterizaram-se por uma extensa área de acúmulo de sangue desde as vesículas cerebrais até a região caudal do embrião.

As malformações observadas referiram-se a :

1. extrusão torácica, (Figura 14) na qual os pulmões, rins e fígado encontram-se dispostos fora da cavidade abdominal.
2. extrusão cerebral, (Figuras 11 e 12) na qual as vesículas perderam seus limites e encontram-se de forma desorganizada posicionadas fora do cérebro.
3. ciclopia, (Figura 13) onde o animal apresentava apenas formação de um dos olhos.

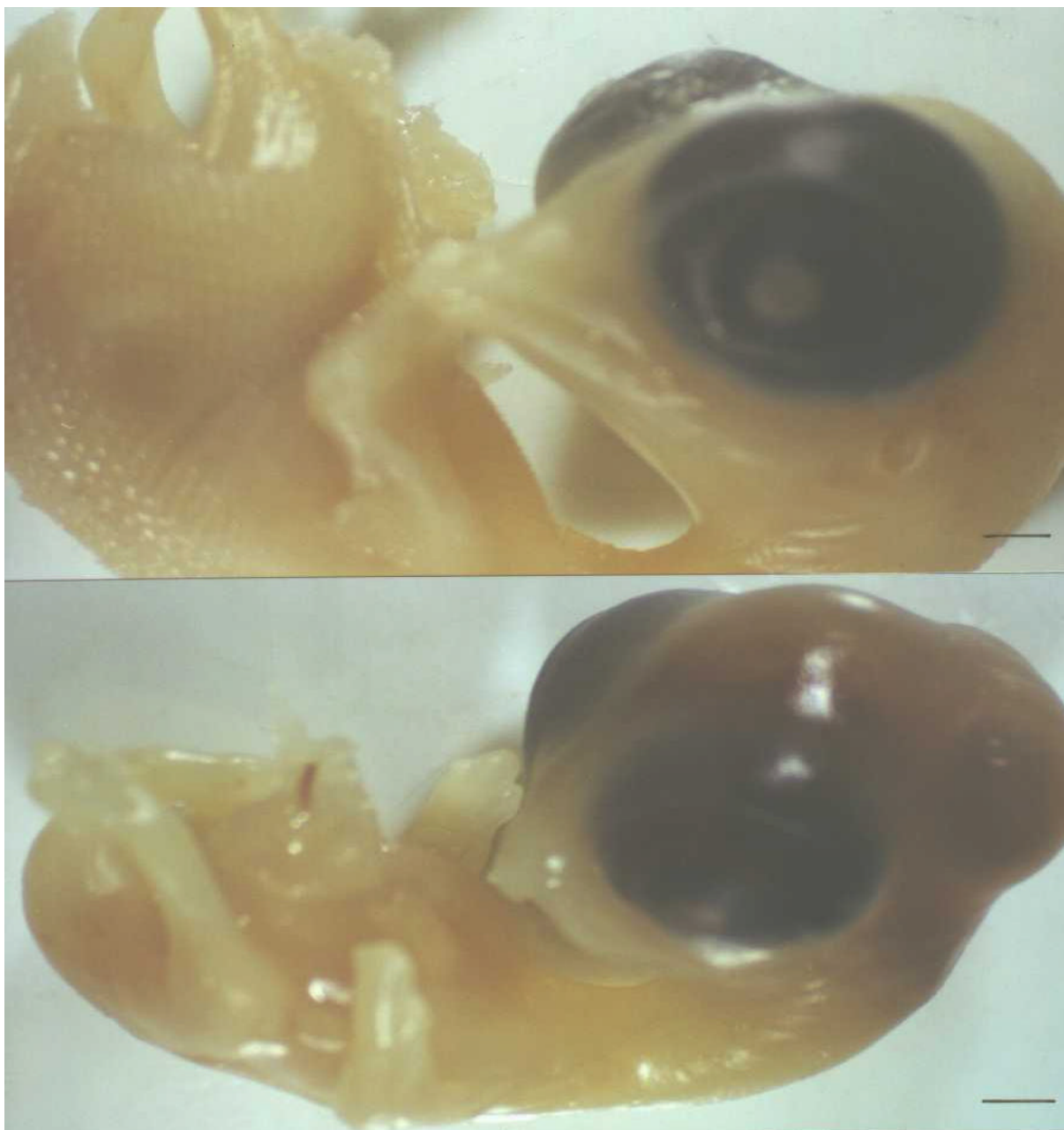


Figura 8: Embrião normal de *Gallus domesticus* no nono dia de desenvolvimento embrionário (E9). Aumento: 7x. Escala- 0,769 cm.

Figura 9: Embrião de *Gallus domesticus* no nono dia de desenvolvimento embrionário (E9), submetido ao tratamento com 250µg em E3. Apresentando atraso do desenvolvimento. Aumento: 7x. Escala- 0,769 cm.

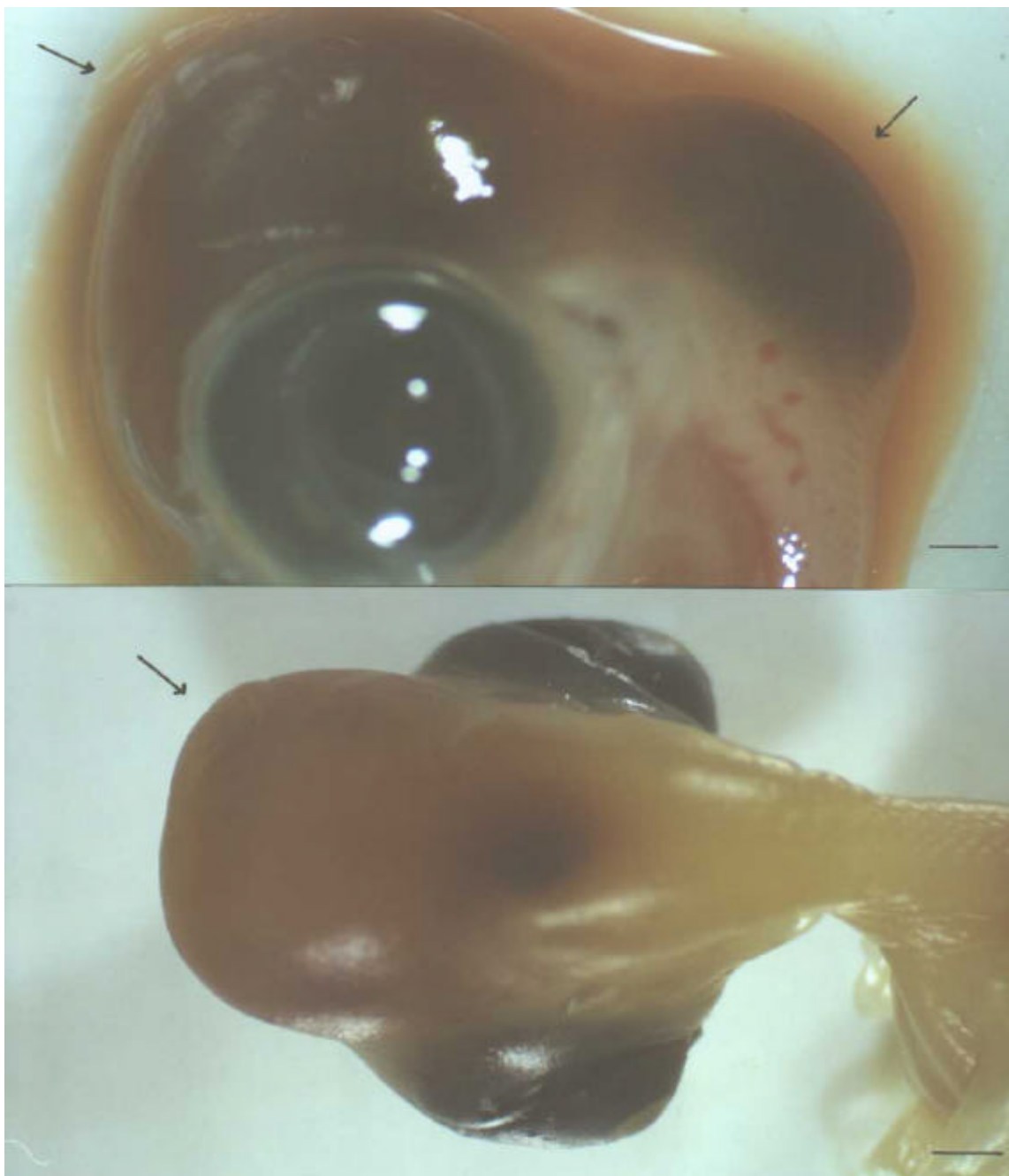


Figura 10: Embrião normal de *Gallus domesticus* no nono dia de desenvolvimento embrionário (E9) submetido ao tratamento com 250 μ g em E3. Apresentando hemorragia cefálica. Aumento: 7x. Escala- 0,769 cm.

Figura 11: Embrião de *Gallus domesticus* no nono dia de desenvolvimento embrionário (E9), submetido ao tratamento com 350 μ g em E3. Apresentando hemorragia cefálica. Aumento: 7x. Escala- 0,769 cm.

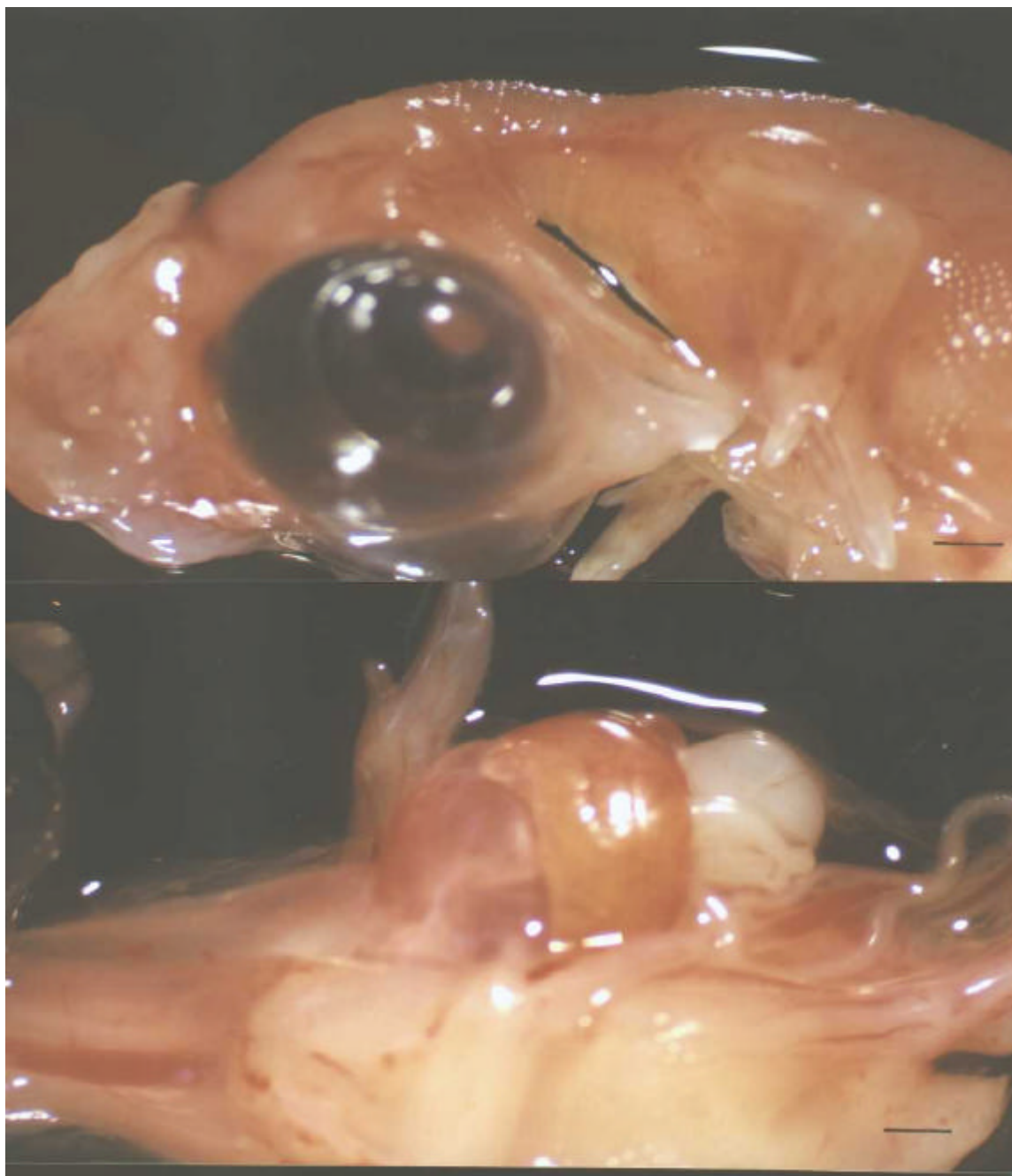


Figura 12: Embrião de *Gallus domesticus* no nono dia de desenvolvimento, submetido ao tratamento com 350 μ g em E3. Apresentando extrusão cefálica. Aumento: 7x. Escala- 0,769 cm.

Figura 13: Embrião de *Gallus domesticus* no nono dia de desenvolvimento embrionário (E9), submetido ao tratamento com 350 μ g em E3. Apresentando extrusão visceral. Aumento: 7x. Escala- 0,769 cm.

Figura 14: Embrião de *Gallus domesticus* no nono dia de desenvolvimento embrionário (E9), submetido ao tratamento com 350 μ g em E3. Apresentando malformações como ciclopia e extrusão visceral. Aumento: 7x. Escala- 0,769 cm.

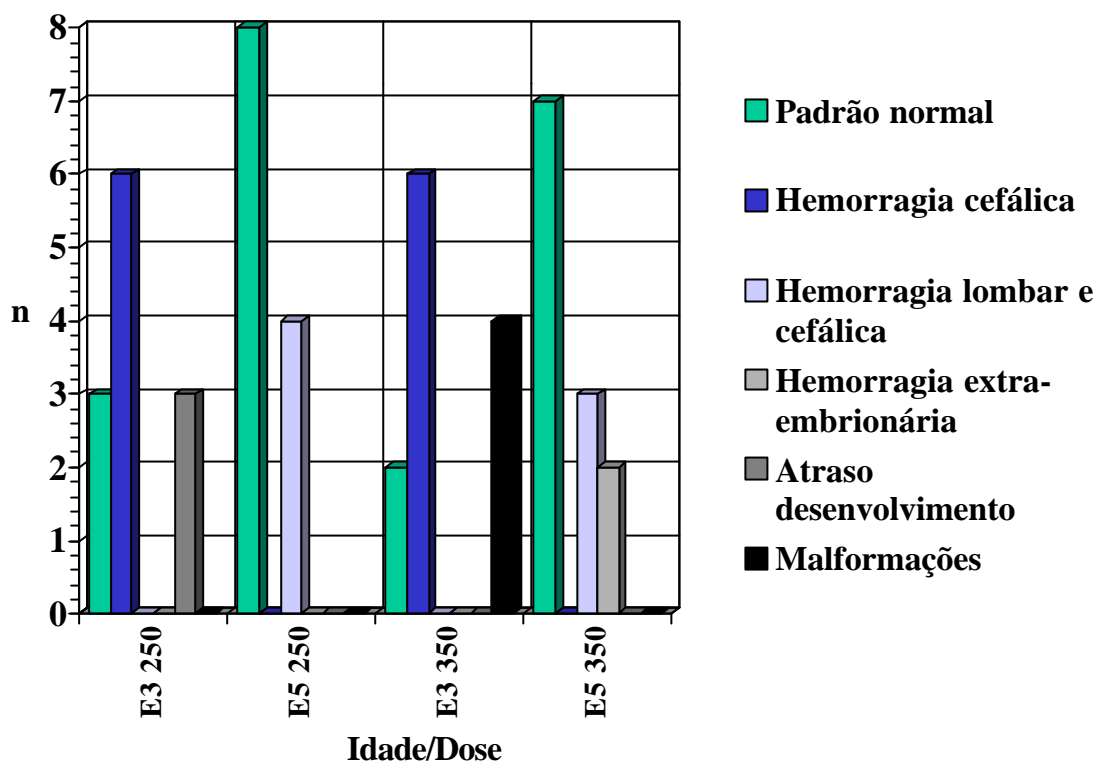


FIGURA 15: Análise morfológica dos embriões tratados com as dose de 250 e 350 μg Ac_2Pb no 3º e 5º dia de desenvolvimento embrionário.

4.2 Análise dos Locais de Deposição do Acetato de Chumbo no Telencéfalo

A análise dos telencéfalos dos animais tratados e controle para localização da deposição do acetato de chumbo, foi realizada conforme padronização anteriormente descrita.

Os animais controle não apresentaram marcação positiva para o acetato de chumbo, como pode ser evidenciado nas Figuras 16, 17 e 18 referentes ao tratamento em E3 e figuras 19, 20 e 21, do tratamento em E5.

Nos animais tratados com 250 μg Ac_2Pb em E3 (Figuras 22, 23 e 24) foi possível observar marcação intensa no septo pelúcido, na leptomeninge e no endotélio dos vasos sanguíneos.

Os animais tratados com 350 μg Ac_2Pb em E3 (Figuras 25, 26 e 27) apresentaram marcação intensa e localizada nas leptomeninges, no endotélio dos vasos sanguíneos e nas paredes dos ventrículos.

Os animais tratados com 250 μg Ac_2Pb em E5 (Figuras 28 e 29) apresentaram marcação difusa por todo o tecido cerebral, sendo a marcação mais intensa nas leptomeninges e no plexo coróide.

Os animais tratados com 350 μg Ac_2Pb em E5 (Figuras 30, 31 e 32) apresentaram marcação difusa por todo o tecido telencefálico e marcação intensa na leptomeninges e na parede dos ventrículos.

A marcação mais intensa ocorreu nos animais tratados em E5, tanto na dose de 250 quanto na dose de 350 μg Ac_2Pb . Nestes casos, além de marcar fortemente as leptomeninges, há também deposição de acetato de chumbo por todo o tecido nervoso. A marcação observada em E5 mostra-se bastante diferente nos animais tratados em E3, onde a marcação da deposição do acetato de chumbo ocorre de forma mais específica no endotélio dos vasos sanguíneos, no plexo coróide e nas leptomeninges.

Nas duas doses e nas duas idades de tratamento foi possível observar que a marcação mais intensa ocorreu no telencéfalo dos animais tratados em E5 com a dose de 350 μg Ac_2Pb , ocorrendo nestes animais maior deposição de acetato de chumbo no tecido nervoso.

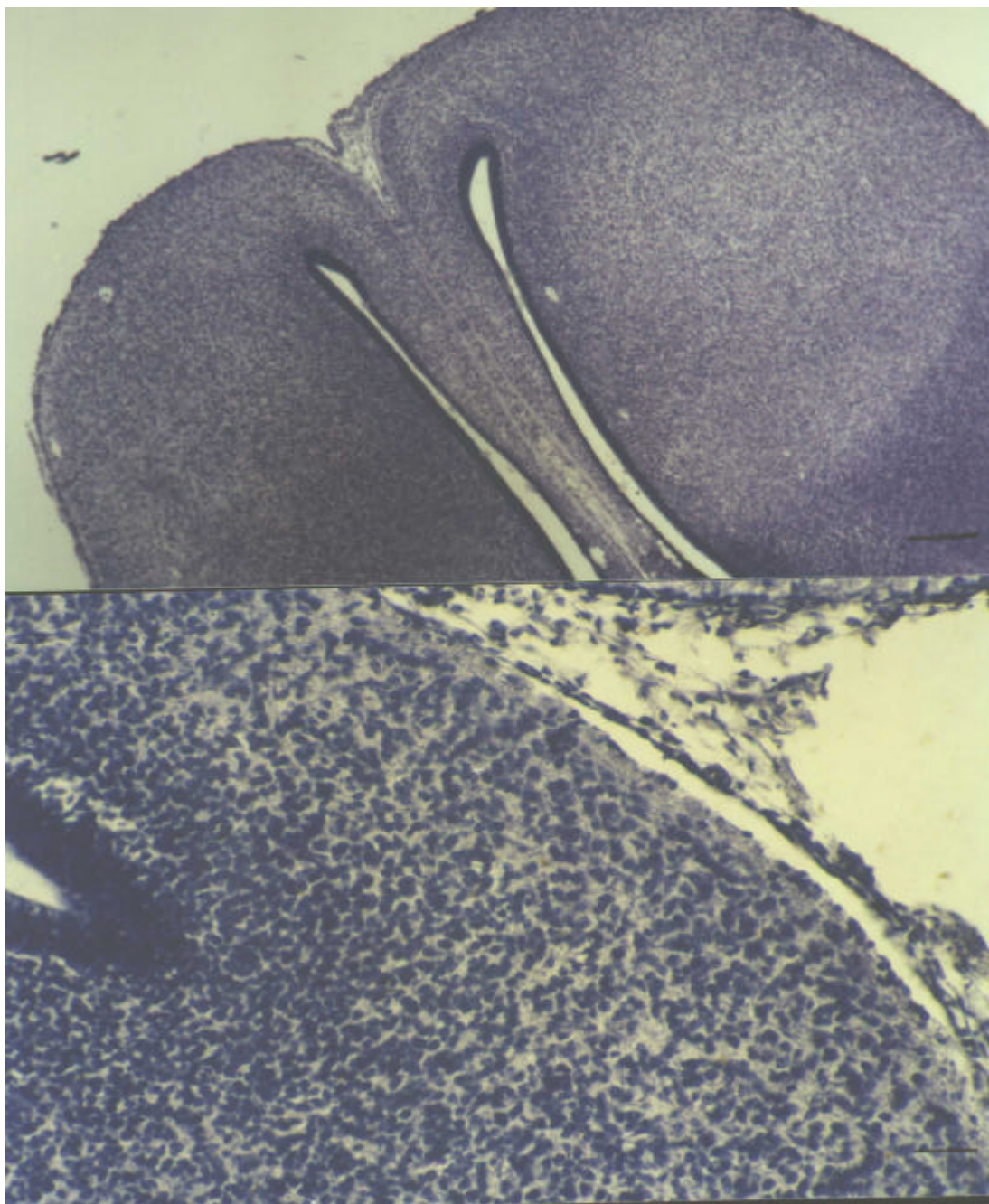


Figura 17: Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus* em E9. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 4x. Escala – 660mm.

Figura 18: Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus* em E9. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 20x. Escala – 5,4 mm.

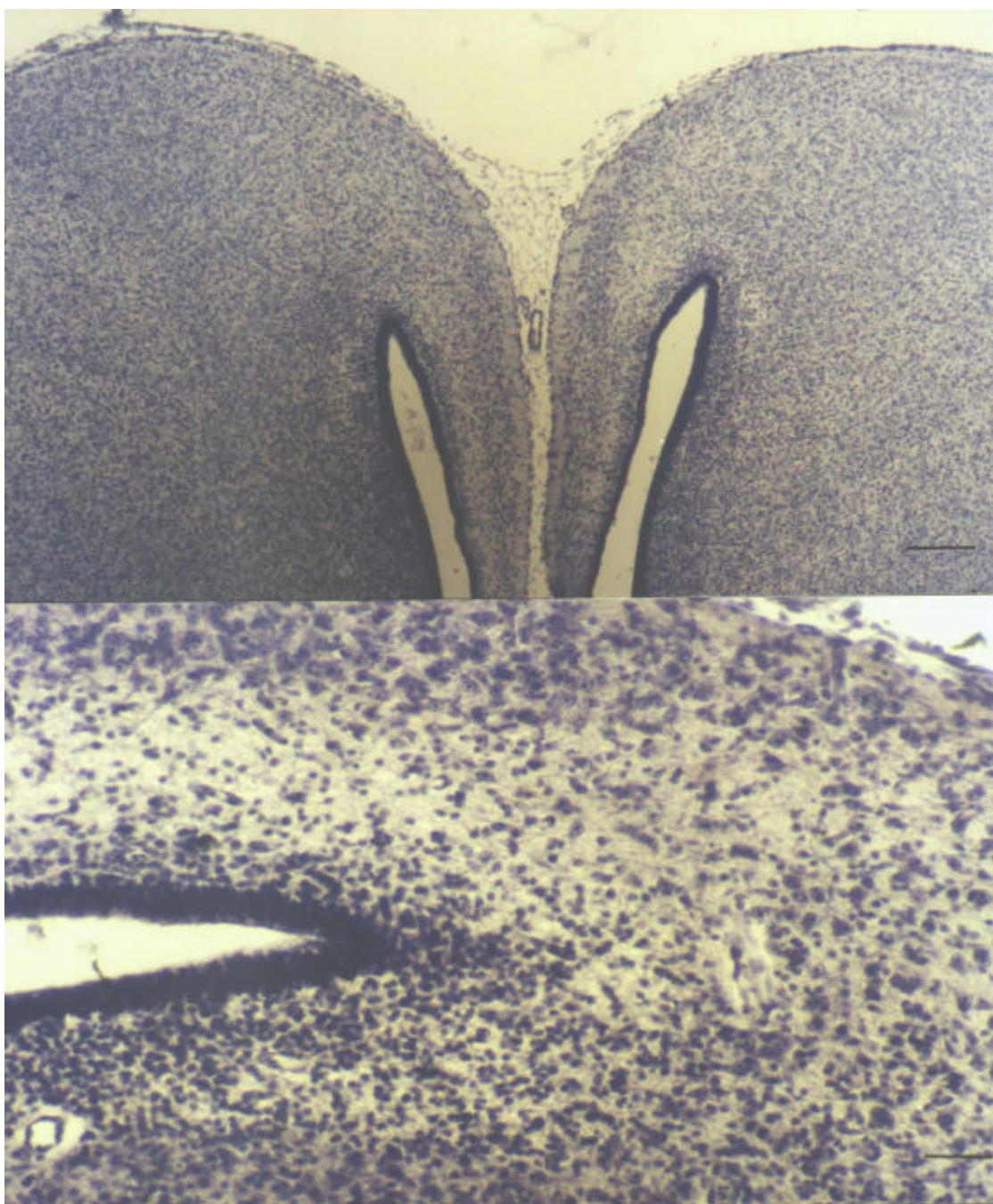


Figura 20: Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de Gallus domesticus em E11. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 4x. Escala – 660mm.

Figura 21: Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de Gallus domesticus em E9. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Aumento 20x. Escala – 5,4 mm.

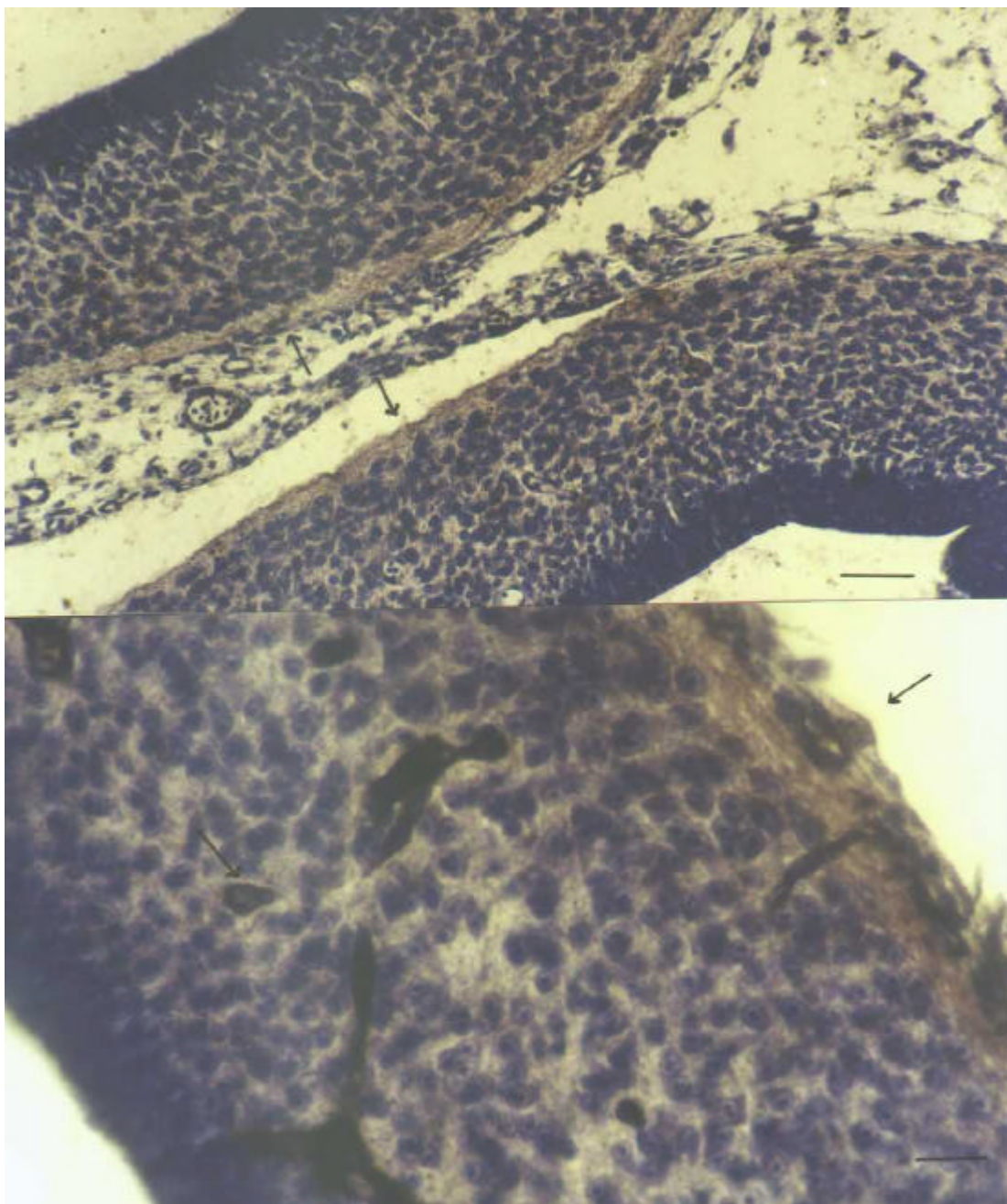


Figura 23: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 250 µg de acetato de chumbo em E3. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Setas indicam os locais de maior deposição do metal no septo pelúcido. Aumento 20x. Escala – 5,4mm.

Figura 24: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 250 µg de acetato de chumbo em E3. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Setas indicam os locais de maior deposição do metal nas leptomeninges. Aumento 40x. Escala – 0,66mm.

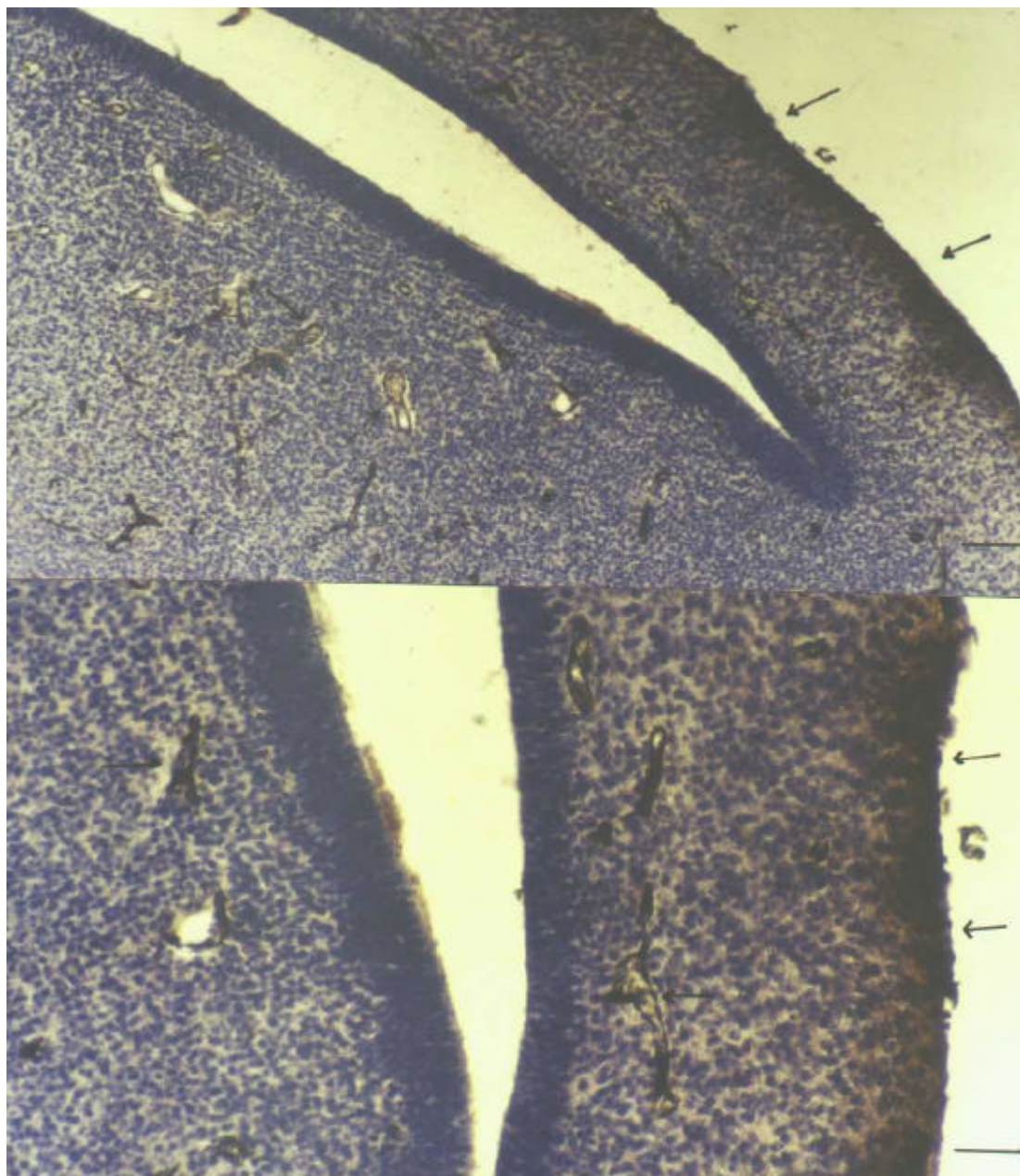


Figura 26: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 350 μg de acetato de chumbo em E3. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Setas indicam os locais de maior deposição do metal nas leptomeninges, vasos sanguíneos e plexo coróide. Aumento 10x. Escala – 2,7mm.

Figura 24: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 350 μg de acetato de chumbo em E3. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Setas indicam os locais de maior deposição do metal nas leptomeninges, vasos sanguíneos e plexo coróide. Aumento 20x. Escala – 5,4mm.

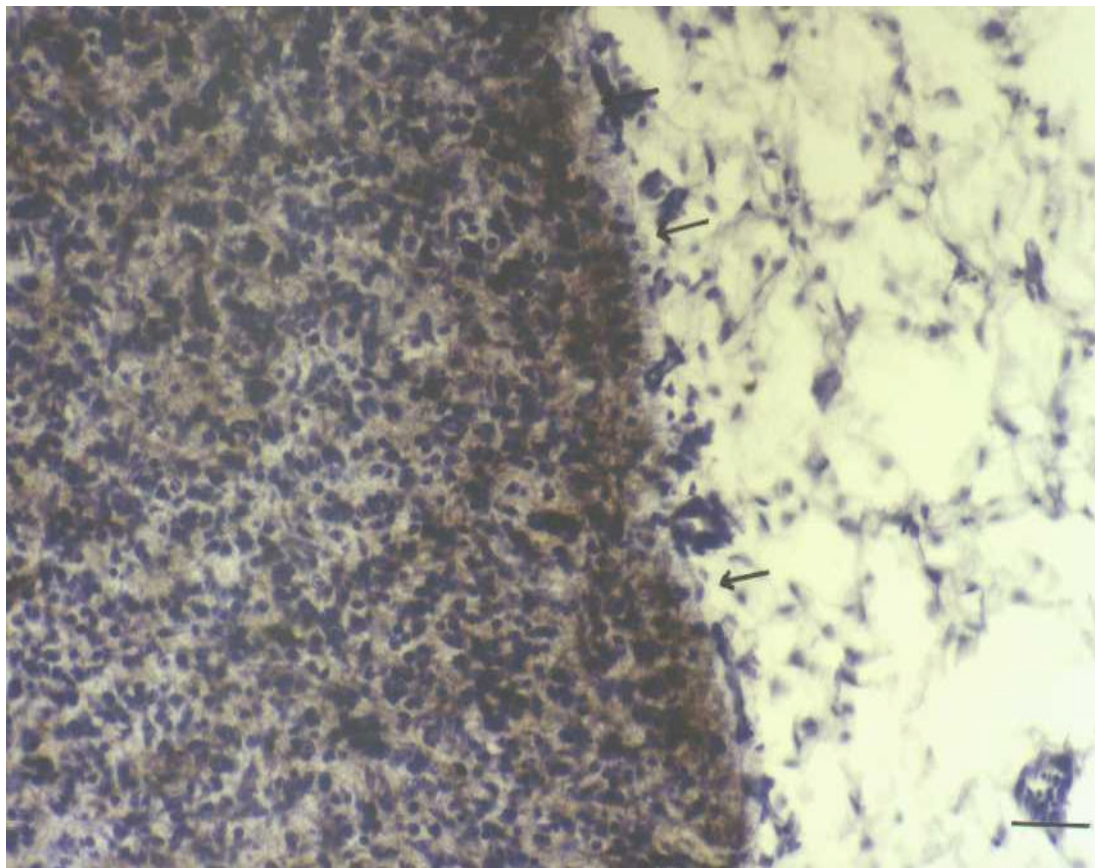


Figura 29: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 250 μg de acetato de chumbo em E3. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Setas indicam os locais de maior deposição do metal por todo tecido telencefálico. Aumento 20x. Escala – 5,4mm.

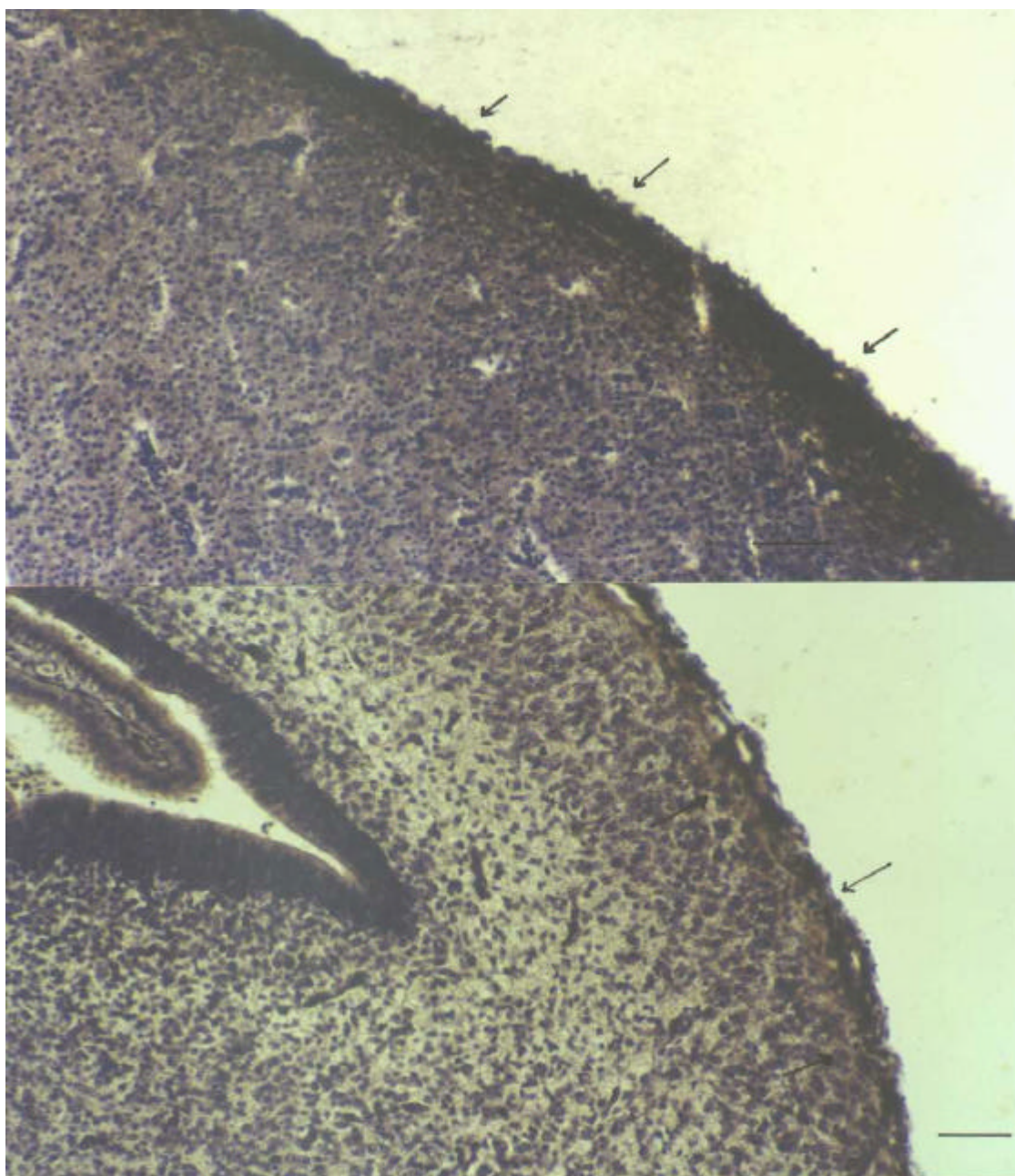


Figura 31: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 350 μg de acetato de chumbo em E5. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Setas indicam os locais de maior deposição do metal nas leptomeninges e plexo coróide. Aumento 20x. Escala – 5,4mm.

Figura 32: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 350 μg de acetato de chumbo em E5. Técnica de Timm. Coloração Hematoxilina. Setas indicam os locais de maior deposição do metal nas leptomeninges. Aumento 20x. Escala – 5,4mm.

4.3 Caracterização das Células Microgliais do Telencéfalo após Tratamento com Acetato de Chumbo

Os cortes submetidos ao controle negativo de especificidade, não foi possível observar marcação de nenhuma célula microglial (Figura 33).

Os cortes dos telencéfalos de animais controle, que receberam apenas salina, quando incubados com lectina mostraram marcação positiva para células microgliais arredondadas, mas estas se apresentaram em número bastante reduzido e organizadas de forma dispersa no tecido neural, como pode ser observado nas figuras 34 e 35.

Os cortes dos telencéfalos dos animais que foram submetidos a 250 μg Ac_2Pb no 3º dia de desenvolvimento embrionário (Figuras 36 e 37) foram marcadas positivamente para células microgliais. Estas células apresentaram a forma arredondada, eram desprovidas de prolongamentos e foram marcados fortemente, sendo observadas de forma localizada nas leptomeninges.

Os cortes dos animais tratados com 350 μg Ac_2Pb em E3 (Figuras 38, 39 e 40) apresentaram numerosas células microgliais no córtex telencefálico, sendo que também foi possível observar células microgliais por todo tecido neural e nas paredes dos ventrículos. Estas células eram arredondadas e alongadas, apresentando-se fortemente marcadas.

Os animais tratados com a dose de 250 μg Ac_2Pb em E5 apresentaram numerosas células microgliais distribuídas por todo córtex telencefálico, no septo pelúcido e em menor quantidade nas paredes dos ventrículos (Figuras 41 e 42). Estas células microgliais eram em sua maioria de formato amebóide e com núcleo fortemente marcado (Figuras 43 e 44).

Os animais tratados com a dose de 350 μ g Ac₂Pb em E5 (Figuras 45 e 46) apresentaram células microgliais de formato amebóide dispersas pelo córtex telencefálico e nas paredes dos ventrículos. As células apresentavam o formato amebóide e mostravam-se fortemente marcadas.

As células microgliais se localizaram distribuídas principalmente na região cortical do telencéfalo e nas paredes dos ventrículos, em ambas as doses e idades.

Estas células variaram sua forma de arredondada, alongada a amebóide, não apresentando prolongamentos em nenhuma das idades estudadas. Pode-se observar que os animais tratados em E3 apresentaram principalmente células arredondadas, enquanto que os tratados em E5 apresentaram microglias arredondadas e amebóides.

Pode-se observar que as maiores células foram encontradas nos animais tratados em E5 com a dose de 350 μ g Ac₂Pb, quando comparadas as demais doses e idades estudadas.

Animais tratados com acetato de chumbo apresentaram um maior número de células microgliais quando comparados aos seus controles.

4.3.1 Análise Estereológica das Células Microgliais

Os grupos controle apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados aos grupos tratados, sendo que o número de células nos grupos tratados sempre foi superior aos controles.

Os grupos controle não apresentaram diferenças significativas entre si.

A análise estereológica das células microgliais mostrou uma diferença significativa entre os grupos analisados (Tabela 2).

Os animais tratados em E3 tanto com a dose de 250 quanto com 350 μg Ac_2Pb não apresentaram diferenças estatísticas quanto ao número de células microgliciais presentes no telencéfalo.

Os animais tratados em E3 e em E5 com a dose de 350 μg Ac_2Pb diferiram entre si no número de células microgliciais no telencéfalo, as quais estavam em maior quantidade no grupo tratado em E5 em relação ao controle.

Os animais tratados em E5 tanto com a dose de 250 quanto com 350 μg Ac_2Pb apresentaram diferenças significativas entre si, sendo que houve um aumento no número de células, no tratamento com a dose mais elevada.

Tabela 2: Estereologia das células microgliciais presentes no telencéfalo de embriões expostos ao acetato de chumbo.

Dia análise/Tratamento (μg Ac_2Pb /0,1 ml salina)	Número de células Microgliciais
E3 CNT (n=10)	5 (± 2) ^d
E5 CNT (n=10)	6 (± 2) ^d
E3 250 (n=10)	10 (± 1) ^a
E3 350 (n=10)	11 (± 2) ^a
E5 250 (n=10)	17 (± 3) ^b
E5 350 (n=10)	21 (± 4) ^c

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre a quantidade de células microgliciais nos grupos de tratamento ($p \leq 0,05$); (n) corresponde ao número de telencéfalos analisados em cada grupo. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

4.3.2 Análise Morfométrica das Células Microgliais

A análise do diâmetro das células microgliais dos animais submetidos ao tratamento com acetato de chumbo e dos animais controle está evidenciada na Tabela 3.

Os animais tratados em E3 com 250 μg Ac_2Pb apresentaram células com medida longitudinal mínima e máxima de 4,45 e 9,54 μm e transversal de 4,45 e 9,32 μm , enquanto que os tratados com a dose de 350 μg Ac_2Pb apresentaram variação mínima e máxima de medida longitudinal igual a 5,72 e 11,02 μm e transversal de 5,72 a 10,6 μm .

Os animais tratados em E5 com 250 μg Ac_2Pb apresentaram variação mínima e máxima do eixo longitudinal de suas células microgliais de 5,3 e 10,81 μm e no eixo transversal de 4,66 e 9,96 μm . Quando tratados com 350 μg Ac_2Pb foi possível observar que as células tiveram variação mínima e máxima no eixo longitudinal de 2,33 e 10,38 μm e no eixo transversal de 3,81 a 10,81 μm .

Os animais controle em E3 apresentaram células com medidas mínima e máxima que variaram longitudinalmente entre 4,24 e 6,36 μm e transversalmente entre 4,45 e 6,36 μm . Os animais controle em E5 apresentaram células com medidas mínima e máxima que variaram longitudinalmente entre 5,72 e 8,05 μm e transversalmente entre 5,72 e 8,26 μm .

Os dados obtidos demonstram que houve um crescimento regular da célula nos eixos longitudinal e transversal.

Na análise dos animais submetidos em E3 as duas doses de Ac_2Pb e do controle, pode-se observar que houve um aumento significativo no tamanho das células microgliais ($p \leq 0,05$).

Foi verificado que os animais submetidos em E5 ao acetato de chumbo nas duas doses, não apresentaram diferença significativa entre si, quando avaliado o tamanho das células microgliais.

Tabela 3: Valores médios dos eixos longitudinal e transversal das células microgliais de *Gallus domesticus* tratados com Ac₂Pb.

Dia Análise/Tratamento ($\mu\text{g Ac}_2\text{Pb}/0,1 \text{ ml salina}$)	Eixo longitudinal (μm)	Eixo Transversal (μm)
E3 CNT (n=20)	5,72 \pm 0,30	5,19 \pm 0,45 ^c
E5 CNT (n=20)	7,52 \pm 0,75	7,42 \pm 0,60 ^{ab}
E3 250 (n=50)	7,03 \pm 0,30	5,93 \pm 0,90 ^a
E3 350 (n=50)	7,52 \pm 0,45	6,46 \pm 0,45 ^b
E5 250 (n=50)	7,73 \pm 0,15	6,89 \pm 0,75 ^b
E5 350 (n=50)	7,95 \pm 0,15	7,20 \pm 0,30 ^b

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre a quantidade de células microgliais nos grupos de tratamento ($p \leq 0,05$); (n) corresponde ao número de células microgliais analisadas em cada grupo. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

Figura 33: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 250µg de acetato de chumbo em E3. Controle Negativo de Especificidade. Histoquímica com TBS. Aumento 4x. Escala 660 mm.

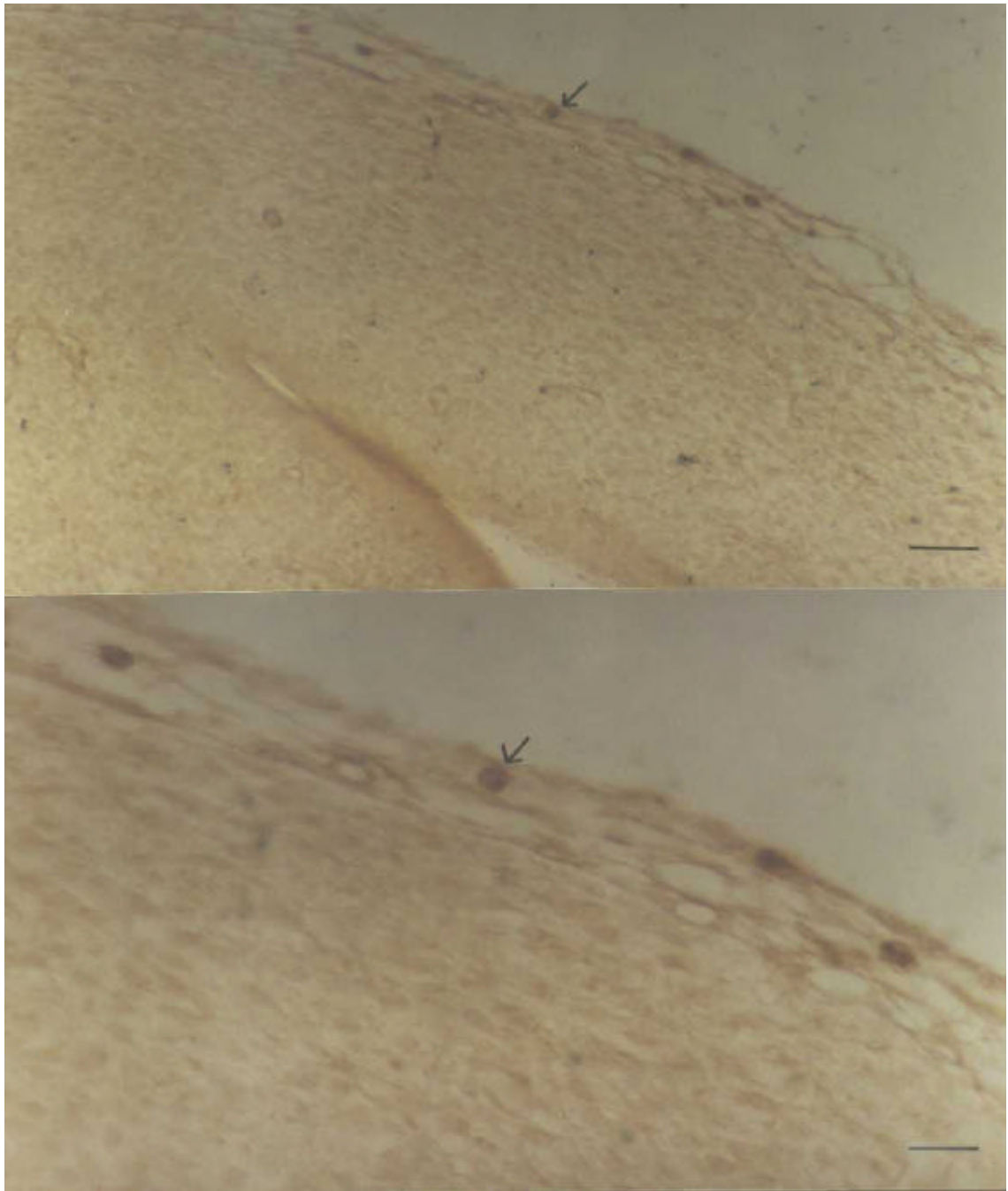


Figura 34: Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus*. Histoquímica com Lectina. Setas indicam poucas células microgliais dispostas nas leptomeninges. Aumento 20x. Escala 5,4 mm.

Figura 35: Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus*. Histoquímica com Lectina. Seta indica células microgliais nas leptomeninges. Aumento 40x. Escala 0,66 mm.

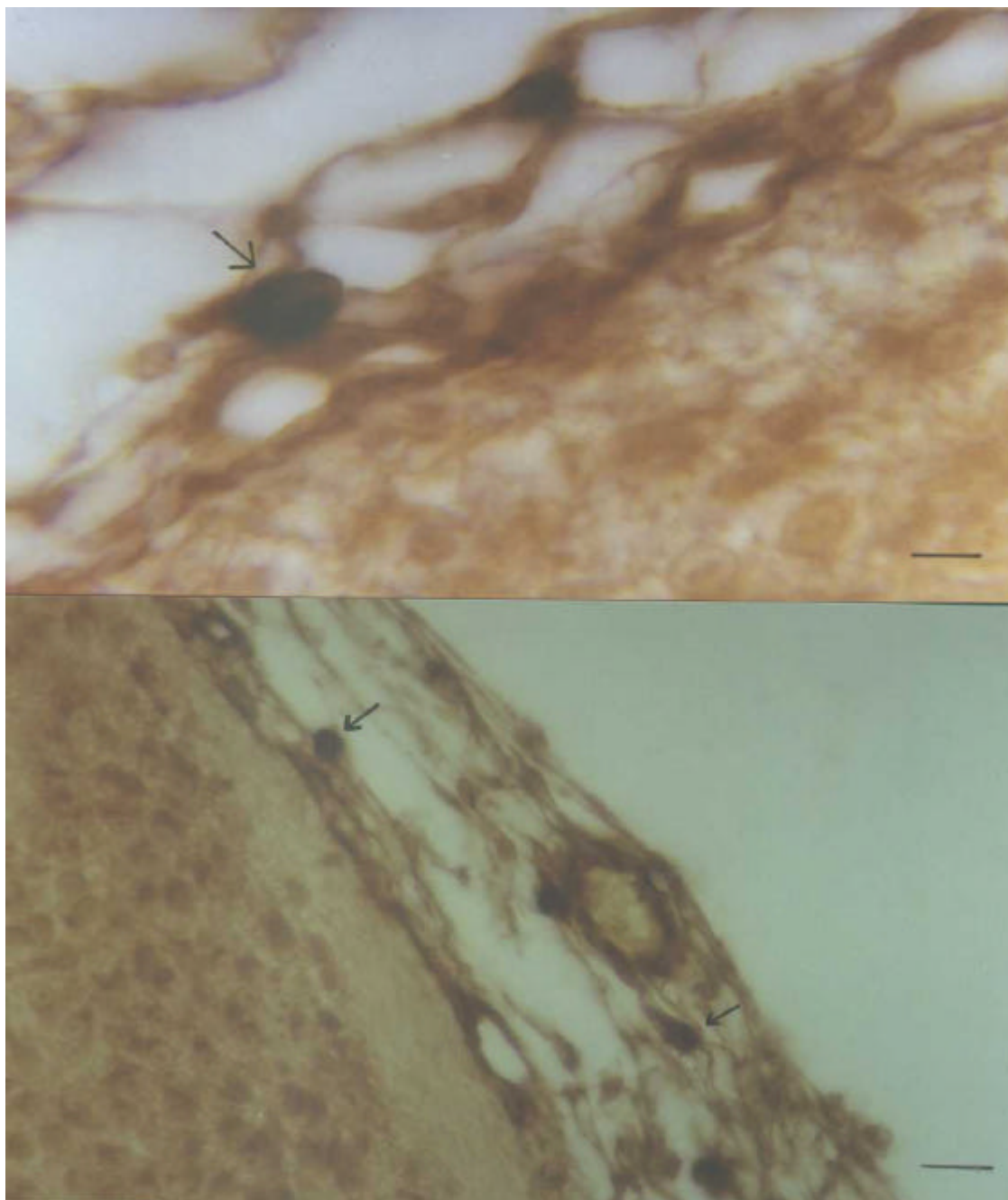


Figura 36: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 250 μg de acetato de chumbo em E3. Demonstrando marcação de células microgliais no tecido telencefálico. Histoquímica com Lectina. nas leptomeninges. Aumento 100x. Escala 0,27 mm.

Figura 37: Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus* em E9, submetido a 350 μg de acetato de chumbo em E3. Histoquímica com Lectina. Seta indica marcação positiva de células microgliais nas leptomeninges. Aumento 40x. Escala 0,66 mm.

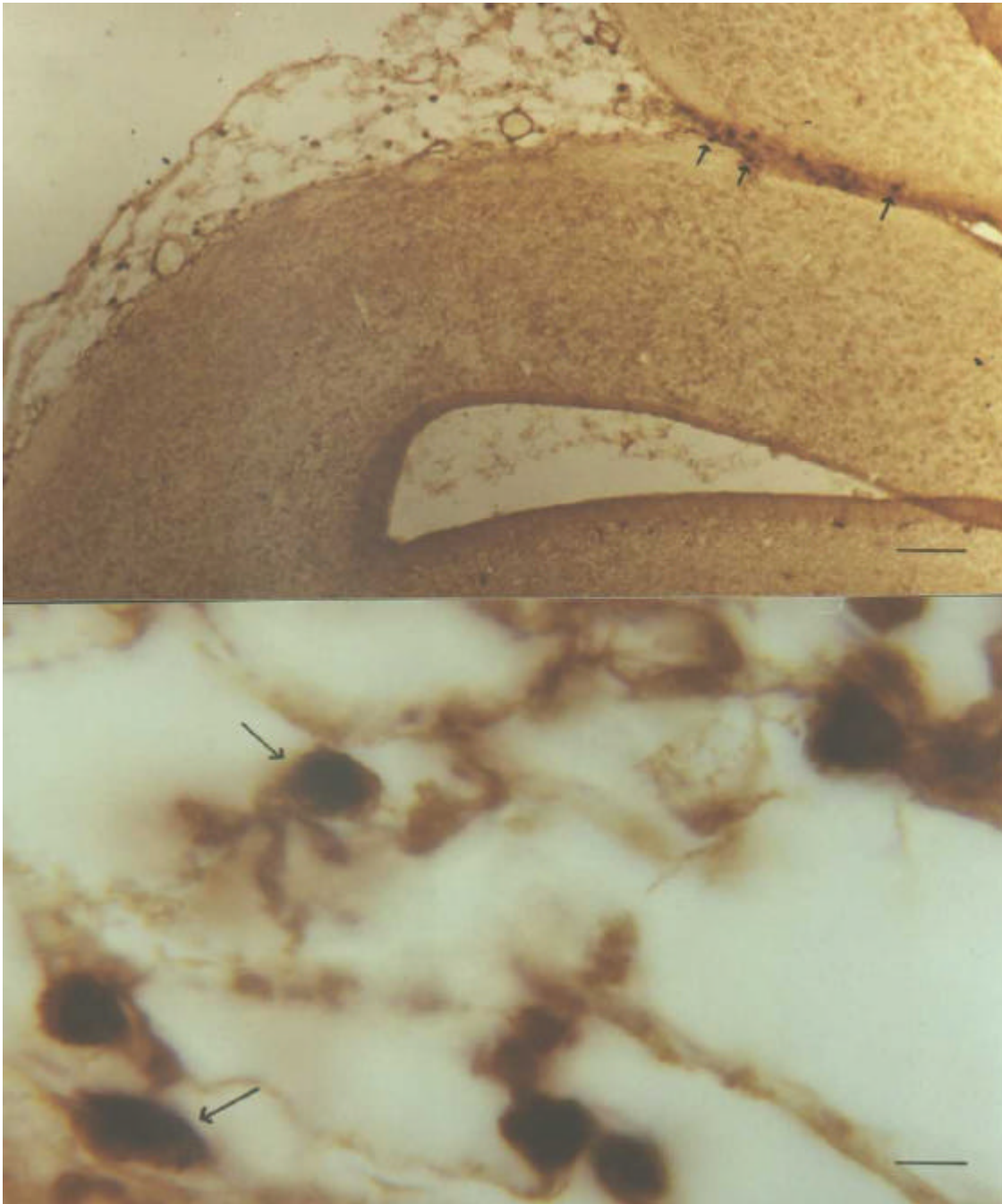


Figura 38: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 250 μg de acetato de chumbo em E3. Demonstrando marcação de células microgliais no tecido telencefálico. Histoquímica com Lectina. nas leptomeninges. Aumento 10x. Escala 270 μm .

Figura 39: Secção histológica de telencéfalo de embrião normal de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 350 μg de acetato de chumbo em E3. Histoquímica com Lectina. Seta indica marcação positiva de células microgliais nas leptomeninges. Aumento 100x. Escala 27 μm .

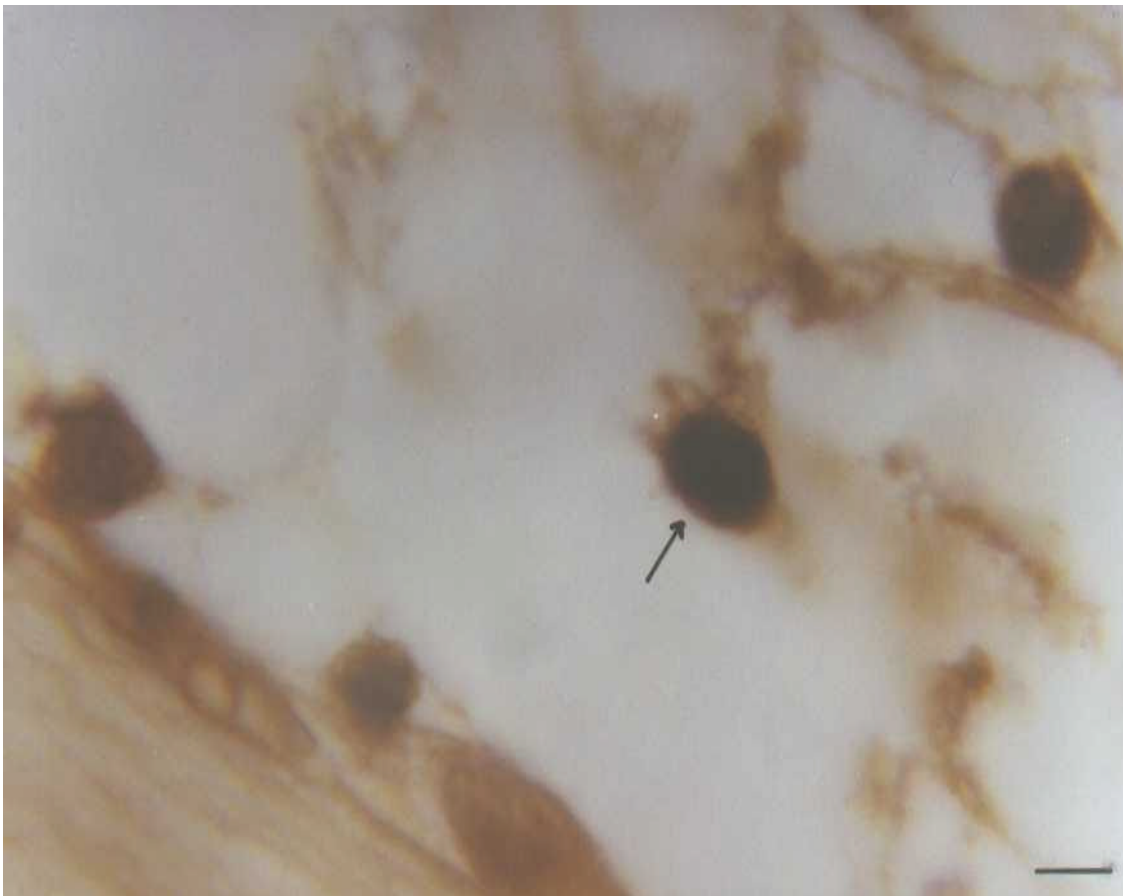


Figura 40: Secção histológica de telencéfalo de embrião de *Gallus domesticus* em E11, submetido a 350 µg de acetato de chumbo em E5. Histoquímica com Lectina. Seta indica marcação positiva de células microgliais nas leptomeninges. Aumento 100x. Escala 0,27 mm.

5 - DISCUSSÃO

Os embriões de *Gallus domesticus* passam por rápidas modificações, tendo em vista que desde o início da incubação até o momento da eclosão decorrem apenas 21 dias. No 9º dia de desenvolvimento (E9) o embrião começa a ter aparência própria da espécie, considerando que o bico, apêndices superiores e inferiores e pigostílio encontram-se bastante diferenciados. No 11º dia de desenvolvimento o corpo e pescoço assumem a forma característica das aves, a cabeça é mais proporcional ao tamanho do corpo e o embrião está coberto por uma penugem fina (Gonzales, 1994).

Neste estudo os animais controle apresentaram características idênticas as acima descritas. Nos animais tratados com acetato de chumbo pode-se observar embriões com aparência normal, e embriões com alterações neste padrão de desenvolvimento, o que indica que o acetato de chumbo é capaz de alterar o padrão de desenvolvimento normal de *Gallus domesticus*, bem como sua morfogênese externa.

Pérez-Coll et al. (1988) trataram embriões do anfíbio *Bufo arenarum* com diferentes concentrações de nitrato de chumbo (0.12 a 32 mg/L) sendo que os achados mais expressivos foram obtidos com concentração abaixo de 1 mg/L. Dois diferentes efeitos foram observados, primeiro: alta incidência de malformações (neurulação parcial, microcefalia, atraso do desenvolvimento). Segundo, um aumento gradual da teratogênese e da letalidade, sendo que os animais submetidos ao metal apresentaram desenvolvimento anormal quanto ao fechamento do blastóporo, desordens durante o processo de neurulação e cauda bífida.

A suscetibilidade do sistema nervoso a danos após a exposição a contaminantes ambientais, como metais pesados e pesticidas, tem sido bastante estudada e parece estar relacionada à idade do indivíduo no momento da contaminação. O grau de comprometimento dos sistemas é dependente do contato ter ocorrido no período embrionário, fetal, na fase de jovem ou na fase adulta (Rice & Barone, 2000).

A ação de sais de chumbo nos estágios precoces do desenvolvimento de embriões de aves, de acordo com os estudos de Catizone & Gray (1941), produzem lesões no SNC. Estas lesões consistem no não fechamento do tubo neural, e/ou crescimento retardado da cabeça com necrose cefálica e do tubo neural.

Nossos resultados indicam que *Gallus domesticus*, assim como *Bufo arenarum* são suscetíveis aos sais de chumbo nos estágios precoces do desenvolvimento, tendo em vista que em ambos foi evidenciado atraso do desenvolvimento, alterações no padrão do sistema nervoso, malformações e em alguns casos letalidade. Isto nos indica que, além do acetato de chumbo ser capaz de influenciar o desenvolvimento normal, atrasando-o, em etapas precoces parece influenciar a formação de sistemas e órgãos, podendo inclusive inviabilizar a eclosão.

O desenvolvimento normal do sistema nervoso requer a concomitante e coordenada ocorrência de proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, gliogênese, mielinização e apoptose, que ocorre de forma diferenciada temporal e regionalmente. Interferências nestes processos durante o desenvolvimento podem resultar em consequência irreversíveis que afetam a estrutura e a função do sistema nervoso (Barone et al., 2000).

Nossos achados demonstram que o acetato de chumbo parece ser realmente capaz de interferir no desenvolvimento estrutural do sistema nervoso, tendo em vista que foi observada

ocorrência de hemorragia cefálica e malformações dos hemisférios cerebrais, onde se pode visualizar o não fechamento da calota craniana e extrusão das vesículas.

Nossos achados corroboram os resultados de Narbaitz et al. (1985), tendo em vista que uma das maiores alterações observadas nos embriões tratados com acetato de chumbo foi a ocorrência de hemorragia intra e extra embrionária, sugerindo que a hemorragia pode constituir a lesão primária produzida pelos sais de chumbo.

Holtzman et al. (1984) em seus experimentos tratando diferentes tipos de embriões com sais de chumbo, observaram grandes áreas de necrose cerebral e concluíram que esta pode ser um resultado direto da inibição do metabolismo aeróbico celular. Esta alteração no metabolismo da célula seria resultado do seu contato com os sais de chumbo nos eritrócitos.

Chai & Webb (1988) submeteram ratos a sais de chumbo e observou alteração na responsividade cardiovascular e elevação da pressão sistólica sangüínea. Estes achados evidenciariam que há alteração no mecanismo celular que regula a concentração de cálcio intracelular e isto pode contribuir para a função vascular anormal induzida pelo chumbo.

Yasuyuki & Toshiyuki (1999) testaram os possíveis efeitos que o chumbo acarretaria na proliferação de células endoteliais vasculares. Seus achados sugerem que o chumbo inibe a proliferação de células endoteliais vasculares por induzir uma diminuída resposta ao fator de crescimento do fibroblasto através da supressão da síntese de heparina sulfatase.

O acetato de chumbo, segundo Watts et al. (1995) pode causar contração muscular dos vasos, de maneira cálcio dependente, sugerindo que o aumento da contratibilidade muscular induzida pelo chumbo tem um papel importante na hipertensão induzida pelo metal pesado .

Estes resultados descritos, quanto as alterações vasculares, evidenciam que o acetato de chumbo parece influenciar e alterar a permeabilidade e integridade dos vasos sangüíneos, já

que neste estudo também foi possível observar alterações na angiogênese normal nos animais submetidos ao metal pesado.

Bowden et al. (1993) realizaram experimentos submetendo embriões de ratos à hormônios sexuais naturais e sintéticos (estradiol, etinilaestradiol, dietilestilboestrol e progesterona), podendo observar que estes provocaram retardo do desenvolvimento embrionário e um aumento da incidência de malformações.

Dias & Muller (1999) submeteram embriões de *Gallus domesticus* à insulina de suíno e pode observar que esta desencadeou um padrão de malformações e foi capaz de retardar o ritmo do desenvolvimento, comprometendo-os.

Nossos resultados demonstram que o acetato de chumbo, assim como os hormônios sexuais e a insulina são agentes capazes de alterar o desenvolvimento embrionário normal, sugerindo que outras substâncias além dos sais de chumbo são capazes de influenciar a organogênese destes embriões, gerando alterações estruturais e precoces.

Quando embriões de aves tem contato com sais de chumbo após o terceiro dia de incubação, há a ocorrência de um tipo característico de lesão (Karnofsky & Ridgway, 1952). Foram observadas múltiplas hemorragias no tecido nervoso seguido por extravasamento do sangue para os ventrículos cerebrais e o espaço subaracnóide. Após a hemorragia cessar e ter sido reabsorvida, os embriões que não morreram, apresentaram destruição massiva do tecido nervoso e grande dilatação dos ventrículos cerebrais.

Nos embriões tratados em E3, nas duas doses, foi possível observar deposição do acetato de chumbo localizada na região cortical do telencéfalo, nos vasos sanguíneos e na parede dos ventrículos. Já nos animais tratados em E5, nas duas doses, além da deposição intensa e localizada, também apresentaram deposição de forma difusa por todo tecido nervoso.

Quando comparados os grupos experimentais, pode-se constatar que a deposição do acetato de chumbo ocorreu de forma mais intensa naqueles que foram tratados em E5 com a dose mais elevada.

Estes achados indicam que realmente o acetato de chumbo é capaz de se acumular e causar danos no tecido cerebral, sendo que os locais de acúmulo dependem da etapa do desenvolvimento em que se encontrava o embrião no momento do contato com o metal.

As diferentes doses também parecem interferir no acúmulo e na absorção do metal, sendo que os danos causados ao embrião podem estar diretamente relacionados a ela, já que foi possível observar tanto diferenças morfológicas, quanto estereológicas e morfométricas nos embriões tratados com as diferentes doses.

As células microgliais correspondem de 5 a 12% do total de células encontradas no SNC (Fedoroff, 1995), estas células encontram-se distribuídas de forma diferenciada nas diferentes regiões do cérebro, e esta organização depende de variações cinéticas e do estado fisiológico do sistema nervoso (Lawson et al., 1990).

A atividade da microglia durante o desenvolvimento do SNC pode ser dividida em três categorias. Primeiro a microglia teria o papel de fagocitar, removendo os corpos apoptóticos abundantes no desenvolvimento normal do SNC (Egensperger et al., 1996). Segundo, a microglia poderia estar diretamente envolvida na causa da apoptose (Frade & Barde, 1998). Por último, a microglia desempenharia um papel importante na formação dos vasos sanguíneos (Sorokin et al., 1992).

Nossos achados demonstraram que as células microgliais estão presentes no telencéfalo de *Gallus domesticus* normais, sendo que foi possível visualizá-las de forma bastante dispersa

pelo tecido nervoso, em pequena quantidade, e com formato redondo. Isto nos sugere que quando o SNC encontra-se em estado fisiológico normal a necessidade de proliferação destas células é mais restrita e nenhuma alteração morfológica é observada.

Quando o cérebro sofre injúria ou é afetado por alguma doença, as células microgliais são geralmente observadas passando por ativação e por proliferação próximo ao local afetado e migram com função de defesa, fagocitose, gliose e reparo (Nakajima & Koshaka, 1993).

Streit (2001) aponta duas possibilidades quanto ao papel da microglia no dano induzido por neurotoxinas. Primeiro a microglia responderia ao dano neuronal com ativação e aparente alteração histológica. Segundo as substância neurotóxicas ao desenvolvimento afetariam a microglia diretamente, podendo resultar em dano neuronal devido ao prejuízo no funcionamento da célula microglial ou estimulando a neurotoxicidade microglial.

Charleston et al. (1994) observaram que córtex cerebral de macacos submetidos ao metilmercúrio apresentaram evidências estereológicas de proliferação microglial.

Nossos achados demonstram que os animais submetidos ao acetato de chumbo no início do desenvolvimento (E3) não apresentam alteração no padrão de proliferação das células microgliais.

Andjelkovic et al. (1998) realizaram um estudo com embriões humanos abortados, onde era evidenciado através da marcação com lectina do tomate, as regiões de acúmulo das células microgliais entre 4.5 e 13.5 semanas de desenvolvimento. Os autores constataram que células lectina + foram observadas no início do desenvolvimento, em 4.5 semanas, sendo que estavam localizadas nas leptomeninges ao redor do tubo neural, e raras no parênquima do SNC. Com 5.5 semanas as células lectina + encontravam-se mais distribuídas no parênquima

nervoso, e nas semanas seguintes por todo córtex, sendo que passaram a adquirir a morfologia microglial típica.

Nossos resultados evidenciam que as regiões de acúmulo das células microgliais parecem depender da idade analisada. Em embriões humanos pode-se constatar que com o passar do tempo os locais onde as células foram encontradas se alterou, bem como em embriões de *Gallus domesticus* onde pudemos constatar que, conforme a idade de análise, as células apresentavam-se acumuladas em regiões distintas. Em animais tratados em E3 estas células foram encontradas predominantemente na região cortical do telencéfalo e no embriões E5 distribuídas por todo córtex e no plexo coróide.

A proliferação de células microgliais é estimulada por citocinas e fatores de crescimento produzidos pela própria microglia e por outros tipos de células do tecido nervoso (Streit et al., 1999). A interleucina-3 (IL-3) é uma citocina produzida na microglia estimulada, sendo um fator mitogênico das células microgliais (Ganter et al., 1992). Giulian et al. (1994) observaram que os fatores estimulantes de colônias, GM-CSF, são produzidos em locais de injúria no cérebro, sendo um dos mais potentes agentes mitogênicos para a microglia.

Nossos achados sugerem que em E3 estes fatores que regulam a proliferação de células microgliais durante o desenvolvimento sejam pouco produzidos, ou a célula microglial ainda não tenha desenvolvido receptores para eles. Nos animais tratados mais tardiamente (E5), já é possível observar um aumento significativo no número de células microgliais, indicando que estas células parecem estar mais aptas a sofrerem alterações no padrão proliferativo neste momento do desenvolvimento.

As células microgliciais tem sido distinguidas no cérebro normal por apresentarem duas formas: a microglia ramificada encontrada no cérebro maduro ou que sofre injúria e a células amebóide presente perinatalmente (Graeber & Streit, 1990).

Uma das características mais marcantes das células microgliciais é sua ativação rápida em resposta a mudanças patológicas no SNC. A ativação é um fator chave de defesa do parênquima neural contra doenças degenerativas, inflamações, injúria tóxica e neurodegeneração. A microglia ativada pode fagocitar microorganismos invasores, remover debris potencialmente deletérios, promover o reparo tecidual por secretar fatores de crescimento e por conseqüência facilitar o retorno da homeostase tecidual (Kreutzberg, 1996).

No nosso trabalho um dos objetivos foi analisar células microgliciais em diferenciação durante o desenvolvimento embrionário, onde o corpo celular da célula microglial redonda e amebóide apresentará um diâmetro sempre maior nos dois eixos do que a células microglial reativa ou ramificada, tendo em vista seu próprio formato.

Nossos experimentos demonstraram que quando comparamos animais E3 normais com os dos grupos tratados, e com os controles de E5, as células microgliciais apresentaram diferenças significativas no tamanho, indicando que o processo de alteração morfológica da célula deva ser influenciado tanto pela dose do acetato de chumbo a que foi submetido, quanto ao momento do desenvolvimento em que o animal teve contato com o agente tóxico.

Por outro lado, neste estudo foi possível evidenciar que as células microgliciais não apresentaram diferenças significativas no tamanho, em animais E5 controle e tratados em ambas as doses. Este achado nos sugere que neste momento do desenvolvimento provavelmente estas células não estejam susceptíveis a alterações morfológicas induzidas pelo acetato de chumbo, já que foram submetidas a duas diferentes concentrações do metal.

Resultados de experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* (Kaur & Ling, 1991) têm demonstrado que a microglia ramificada do adulto possa ser derivada da transformação da microglia amebóide.

As células microgliais amebóides podem servir como um importante sistema de defesa do cérebro em desenvolvimento antes da maturação da barreira sangue - cérebro, sendo evidente que elas podem sofrer influência direta e constante de substâncias presentes na circulação, incluindo hormônios como cortisona e melatonina (Kaur & Ling, 1999) e citocinas como interferon- γ e interleucina-3 (Htain et al., 1998).

Experimentos utilizando injeção de cortisona e dexametasona têm demonstrado não somente a redução da população de células microgliais amebóides mas também a maturação precoce das células para ramificadas (Kaur et al., 1994). Este experimento demonstra que as alterações morfológicas sofridas pelas células são controladas por fatores produzidos e liberados no tecido neural (Ling et al., 2001) .

Nossos resultados demonstram que as células microgliais sofreram proliferação e alteração morfológica de redonda para amebóide. Isto nos indica que mesmo o SNC sofrendo injúria tóxica, estas células não foram capazes de passar por alteração morfológica para reativa e ramificada. Provavelmente neste momento do desenvolvimento ela não seja capaz de sofrer esta alteração, tendo em vista a variação de seus antígenos de superfície e expressão de receptores.

Por outro lado, Hao et al. (2000) induziram defeitos no tubo neural com uma injeção de ciclofosfamida em ratas prenhas observando um aumento significativo no número de microglias amebóides contendo elementos degenerados do cérebro fetal. Este experimento nos sugere que as células microgliais não sofrem alteração morfológica para ramificada e reativa

todas as vezes que sofrem injúria, pois provavelmente o tipo de injúria tenha um papel central nesta alteração.

Nossos resultados sugerem que, no momento do desenvolvimento (E3 e E5) em que os embriões de *Gallus domesticus* foram submetidos ao acetato de chumbo, ou o tecido cerebral ainda não apresentava os fatores necessários à alteração morfológica, ou a célula microglial ainda não era capaz de reconhecê-los.

Novas perspectivas de trabalho podem ser vislumbradas com o conhecimento dos efeitos do acetato de chumbo em dois diferentes momentos do desenvolvimento, assim como os locais de maior acúmulo do SNC de *Gallus domesticus*. A realização de estudos que possam mapear outras regiões do SNC após exposição ao metal, seriam muito importantes para o aprofundamento do conhecimento destes efeitos. Trabalhos que investiguem os efeitos do acetato de chumbo para os embriões de *Gallus domesticus* em diferentes doses também seriam de fundamental importância.

6 - CONCLUSÕES

Embriões de *Gallus domesticus* tratados com acetato de chumbo no 3º e 5º dias de incubação apresentaram comprometimento no seu padrão de desenvolvimento.

O tratamento com diferentes doses de acetato de chumbo, influenciou alterações morfológicas e microgliais em embriões de *Gallus domesticus*.

A análise morfológica evidenciou que o acetato de chumbo foi capaz de alterar o desenvolvimento normal de um número expressivo de embriões de *Gallus domesticus*, onde foi observado desde atraso do desenvolvimento até malformações graves.

Utilizando técnicas histoquímicas para marcação do acetato de chumbo, pode-se observar que este metal se depositou principalmente na região mais externa do telencéfalo, entre os hemisférios e nos vasos sanguíneos.

Com a utilização da técnica histoquímica com lectina do tomate, pode-se evidenciar que as células microgliais apresentaram modificações nos padrões morfométricos e estereológicos, possivelmente decorrentes do tratamento com acetato de chumbo. Estas modificações parecem estar relacionadas à dose utilizada e também com a vulnerabilidade do sistema nervoso no início do desenvolvimento.

A realização de estudos que possam mapear outras áreas do SNC expostas ao acetato de chumbo são importantes para a caracterização das regiões de maior deposição do metal. Outros trabalhos que investiguem os efeitos do acetato de chumbo no desenvolvimento de embriões de *Gallus domesticus*, em diferentes idades e doses também parece ser de fundamental importância.

A utilização de outras técnicas imunohistoquímicas e bioquímicas para averiguar as modificações das células gliais, bem como os efeitos do acetato de chumbo no sistema nervoso destes embriões complementariam os resultados obtidos neste estudo.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ACARIN, L.; VELA, J. M.; GONZÁLEZ, B. & CASTELLANO, B. 1994. Demonstration of Poly-N-acetyl lactosamine residues in ameboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, **42**:1033-1041.

ALI, S. F. & BONDY, S. C. 1989. Triethyllead-induced peroxidative damage in various regions of the rat brain. **Journal of Toxicology Environmental Health**, **26**: 235-242.

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

ANDJELKOVIC, A. V.; NIKOLIC, B. PACHTER, J. S. & ZECEVIC, N. 1998. Macrophages/microglial cells in human central nervous system during development: na immunohistochemical study. **Brain Research**, **814**:13-25.

ANGLE, C. R. 1993. Childhood lead poisoning and its treatment. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, **32**: 409-434.

ASHWELL, K. 1989. Development of microglia in the albino rabbit retina. **Journal of Comparative Neurology**, **287**: 286-301.

ASHWELL, K. 1991. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. **Developmental Brain Research**, **58**:1-12.

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

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

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

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

BEROZOVSKAYA, O.; MAYSINGER, D. & FEDOROFF, S. 1995. The hematopoietic cytokine, colony-stimulating factor 1, is also a growth factor in the CNS: Congenital absence of CSF-1 in mice results in abnormal microglial response and increased neurons vulnerability to injury. **International Journal of Developmental Neuroscience**, **13**: 285-299.

BOWDEN, H. C.; TESH, J. M. & ROSS, F. W. 1993. Effects of female sex hormones in whole embryo culture. **Toxicology in Vitro**, **7**: 799-802.

BOYA, J.; CALVO, J. L.; CARBONELL, A. L. & BORREGÓN, A. 1991. A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. **Journal of Anatomy**, **175**: 229-236.

BROWDER, L. W.; ERICKSON, C. A. & JEFFERY, W. R. **Developmental Biology**. 3 ed. Ed. Saunders College, Philadelphia. 1991. 695 pp.

CASTELLANO, B.; GONZÁLEZ, B., DALMAU, I. & VELA, J. M. 1991. Identification and distribution of microglial cells in the cerebral cortex of the lizard: histochemical study. **Journal of Comparative Neurology**, **311**: 115-130.

CATIZONE, O. & GRAY, P. 1941. Experiments on chemical interference with early morphogenesis of the chick. **Journal of Experimental Zoology**, **87**: 71-82.

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

CHAI, S. S. & WEBB, R. C. 1988. Effects of lead on vascular reactivity. **Environmental Health Perspectives**, **78**: 85-89.

CHARLESTON, J. S. ; BOLENDER, R. P.; MOTTET, K. N.; BODY, R. L.; VAHTER, M. E. & BURBACHER, T. M. 1994. Increases in the number of reactive glia in the visual cortex of *Macaca fascicularis* following subclinical long-term methyl mercury exposure. **Toxicology Applied Pharmacology**, **129**: 196-206.

COLE, W. A. & TRASLER, D. G. 1980. Gene - teratogen interaction in insulin - induced mouse exencephaly. **Teratology**, **22**: 125-139.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Contaminação ambiental por chumbo em torno da indústria FAÉ S/A - Indústria e Comércio de Metais, Caçapava - SP. São Paulo, 1993. 20 pp. Relatório técnico.

COOK, C. M.; SGARDELIS, S. P. PANTIS, J. D. & LANARAS, T. 1994. Concentrations of lead, zinc and copper in *Taraxacum* spp. in relation to urban pollution. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, **53**: 204-201.

CORDEIRO, R.; FILHO, E. C. L. & SALGADO, P. T. 1996. Reajustando o limite de tolerância biológica aplicado à plumbemia no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, **12**: 1-8.

CROSS, A. K. & WOODROOFE, 1999. Chemokines induce migration and changes in actin polymerization in adult rat brain microglia and a human fetal microglial cells line in vitro. **Journal of Neuroscience Research**, **55**:17-23.

CUADROS, M. A.; RODRIGUEZ-RUIZ, J.; CALVENTE, R.; ALMENDROS, A.; MARÍN-TEVA, J. L. & NAVASCUÉS, J. 1997. Microglia development in the quail cerebellum. **Journal of Comparative Neurology**, **389**: 390-401.

CUADROS, M. A. & NAVASCUÉS, J. 1998. The origin and differentiation of microglial cells during development. **Progress in Neurobiology**, **56**:175-189.

CUADROS, M. A.; MARTIN, D.; PÉREZ-MENDOZA, D.; NAVASCUÉS, J. & CLARKE, P. G. H. 2000. Response of macrophage/microglial cells to experimental neuronal degeneration in the avian isthmo-optic nucleus during development. **Journal of Comparative Neurology**, **423**: 659-669.

CUADROS, M. A. & NAVASCUÉS, J. 2001. Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. **Progress in Brain Research**, **132**:51-59.

DALMAU, I.; FINSEN, B.; TONDER, N.; ZIMMER, J.; GONZÁLES, B. & CASTELLANO, B. 1997. Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. **The Journal of Comparative Neurology**, **377**: 70-84.

DALMAU, I.; VELA, J. M.; GONZÁLEZ, B. & CASTELLANO, B. 1997. Expression of LFA-1 alpha and ICAM-1 in the developing rat brain: A potential mechanism for the recruitment of microglia cell precursors. **Developmental Brain Research**, **103**:163-170.

DALMAU, I.; FINSEN, B.; ZIMMER, J.; GONZÁLEZ, B. & CASTELLANO, B. 1998. Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. **Hippocampus**, **8**:458-474.

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

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

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

DEPABLO, F. & DELAROSA, E. J. 1995. The developing CNS: A scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. **TINS**, **18** : 143-150.

DIAS, P.F. & MÜLLER, Y.M.R..1998. Características do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*, em temperaturas e períodos diferentes de incubação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, **35**: 233-235.

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

DONALDSON, W. E. & KNOWLES, S. O. 1993. Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes? **Comparative Biochemical Physiology**, **104**: 377-379.

EGENSPERGER, R.; MASLIM, J.; BISTI, S. HOLLANDER, H. & STONE, J. 1996. Fate of DNA from retinal cells dying during development: uptake by microglia and macroglia (Müller cells). **Developmental Brain Research**, **97**:1-8.

EKLUND, M. 1995. Cadmium and lead deposition around a swedish battery plant as recorded in Oak tree rings. **Journal of Environmental Quality**, **24**: 126-131.

ELKABES, S. DICICCO-BLOOM, E. M. & BLACK, I. B. 1996. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. **Journal of Neuroscience**, **16**:2508-2521.

EYAL-GILAD, H.; DEBBY, H. & HAREL, N. 1992. The posterior section of the chick area pellucida and its involvement in hipoblast na primitive streak formation. **Development**, **116**: 819-830.

FAWCETT, J. W. & ASHER, R. A. 1999. The glial scar and central nervous system repair. **Brain Research Bulletin**, **49**:377-391.

FEDOROFF, S. Development of microglia. In: KETTENMANN, H. & RANSOM, B. R. **Neuroglia**. New York, 1995. p. 162-181.

FEDOROFF, S. ZHAI, R. & NOVAK, J. P. 1997. Microglia and astroglia have a common progenitor cells. **Journal of Neuroscience Research**, **50**:477-486.

FRADE, J.M. & BARDE, Y. A. 1998. Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. **Neuron**, **20**: 35-41.

FRANKLIN, C. A.; INSKIP, M. J.; BACCANALE, C. L. EDWARDS, C. M.; MANTON, W. L.; EDWARDS, E. & O'FLABERTY, E. J. 1997. Use of sequentially administered stable lead isotopes to investigate changes in blood lead during pregnancy in nonhuman primate (*Macaca fascicularis*). **Fundamental Applied Toxicology**, **39**: 109-119.

FREERE, R. H., WEIBEL, E. R. 1967. Stereologic techniques in microscopy. **Journal of Royal Microscopy Society**, **87**: 25-34.

FUJIMOTO, E.; MIKI, A. & MIZOGUTI, H. 1987. Histochemical studies of the differentiation of microglial cells in the cerebral hemispheres of chick embryos and chicks. **Histochemistry**, **87**: 209-216.

FUJITA, S. & KITAMURA, T. 1975. Origin of brain macrophages and the nature of the so-called microglia. **Acta Neuropathology**, **6**: 291-296.

GANTER, S.; NORTHOFF, H.; MANNEL, D. & GEBICKE-HAERTER, P. J. 1992. Growth control of cultured microglia. **Journal of Neuroscience Research**, **33**: 218-230.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. Massachusetts: Sinauer, 2000. 749 p.

GIULIAN, D. & BAKER, T. J. 1986. Peptides released by ameboid microglia regulate astroglial proliferation. **Journal of Cell Biology**, **101**: 2411-2415.

GIULIAN, D.; JOHNSON, B.; KREBS, J. F.; GEORGE, J. K. & TAPSCOTT, M. 1991. Microglial mitogens are produced in the developing and injured mammalian brain. **Journal of Cell Biology**, **112**: 323-333.

GIULIAN, D.; LI, J.; LI, X.; GEORGE, J. & RUTECKI, P. A. 1994. The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS. **Development of Neuroscience**, **16**: 128-136.

GOMES, F. C. A.; PAULIN, D. & NETO, V. M. 1999. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, **32**: 619-631.

GONZALES, E. Embriologia e Desenvolvimento Embrionário. In: APINCO. **Manejo da Incubação**. São Paulo, 1994. p . 43-59.

GOODRUM, G. R. & JACOBSON, A. G. 1981. Cephalic flexure formation in the chick embryo. **Journal of Experimental Zoology**, **216**: 339-408.

GRAEBER, M. B. & STREIT, W. J. 1990. Microglia: immune network in the CNS. **Brain Pathology**, **1**:2-5.

GRUNDT, I. K.; RISE, M. & NYLAND, H. 1995. Defence mechanisms protecting glial cell cultures against the toxicity of lead. **ATLA**, **23**: 513-520.

GULSON, B.; JAMESON, C.; MAHAFFEY, K. MIZON, K. KORSCH, M. & VIMPANI, G. 1997. Pregnancy increases mobilization of lead from maternal skeleton. **Journal of Laboratory Clinical Medical**, **130**: 51-62.

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

HAO, A. J.; DHEEN, S. T. & LING, E. A. 2000. Response of amoeboid microglia to neural tube defect induced by cyclophosphamide in rat embryo. ABSTRACT. **7th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference**, Singapore.

HENRETIG, 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. 1998. **Goldfrank's Toxicology Emergence**. Townford Connecticut: Appleton & Lange, 6^a edição, Chapter 79.

HOLTZMAN, D.; DEVRIES, C.; NGUYEN, H.; OLSON, J. & BENCH, K. 1984. Maturation of resistance to lead encephalopathy: cellular and subcellular mechanisms. **Neurotoxicology**, **5**: 97-124.

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

HTAIN, W. W.; LEONG, S. K. & LING, E. A. 1998. Effects of interleukin-3 injection on supraventricular amoeboid microglial cells in neonatal BALB/c and athymic mice. **Neuroscience Letters**, **251**:133-136.

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

ILSCHNER, S. & BRANDT, R. 1996. The transition of microglia to a ramified phenotype is associated with the formation of stable acetylated and detyrosinated microtubules. **Glia**, **18**: 129-140.

IVACKO, J. ; SZAFLARSKI, J.; MALINAK, C.; FLORY, C.; WARREN, J. S. & SILVERSTEIN, F. S. 1997. Hypoxic-ischemic injury induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in neonatal rat brain. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, **17**: 759-770.

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

JOHNSTON, M. V.& GOLDSTEIN, G. W. 1998. Selective vulnerability of the developing brain to lead. **Current Opinion in Neurology**, **11**: 689-693.

KARNOFSKY , D. A. & RIDGWAY, L. P. 1952. Production of injury to the central nervous system of the chick embryo by lead salts. **Journal of Pharmacology**, **104**: 176-186.

KAUR, C.; LING, E. A. & WONG, W. C. 1985. Transformation of amoeboid microglial cells into microglia in the corpus callosum of postnatal rat brain. An electron microscopical study. **Archives Histology Japanese**, **48**: 17-25.

KAUR, C. & LING, E. A. 1991. Study of the transformation of amoeboid microglial cells into microglia labeled with the isolectin Griffonia simplicifolia in postnatal rats. **Acta Anatomica**, **142**: 118-125.

KAUR, C.; WU, C. H.; WEN, C. Y. & LING, E. A. 1994. Studies of the effects of subcutaneous injections of glucocorticoids on amoeboid microglia in postnatal rat brain. **Archives of Histology Cytology**, **57**:449-459.

KAUR, C. & LING, E. A. 1999. Effects of melatonin on macrophages/microglia in postnatal rat brain. **Journal of Pineal Research**, **26**:158-168.

KAUR, C.; HAO, A. J.; WU, C. H. & LING, E. A. 2001. Origin of microglia. **Microscopy Research and Technique**, **54**: 2-9.

KIESOW, L. A.; SHAPIRO, S.; LINDSLEY, B. F. & BLESS, J. W. 1977. Consumption coagulopathy induction by hyperbaric oxygen and enhancement by lead acetate. **Tromb. Haemost**, **37**: 170-176.

KLAASSEN, C. D. 1996. Heavy metals and heavy-metal antagonists. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Orgs. HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G. & LIMBIRD, L. E. p. 1649-1671. McGraw-Hill, New York.

KREUTZBERG, G. W. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neuroscience**, **19**: 312-318.

LASLEY, S. M. 1992. Regulation of dopaminergic activity, but not tyrosine hydroxylase, is diminished after chronic inorganic lead exposure. **Neurotoxicology**, **13**: 625-635.

LAWSON, L. J.; PERRY, V. H. DRI, P. & GORDON, S. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, **39**: 151-170.

LAWTON, L. J. & DONALDSON, W. E. 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. **Biological Trace Element Research**, **28**: 83-97.

LEME, R. J. A. & CHADI, G. 2001. Distant microglial and astroglial activation secondary to experimental spinal cord lesion. **Archives Neuro-Psiquiatric**, **59**: 355-368.

LI, Y. B.; KAUR, C. & LING, E. A. 1998. Neuronal degeneration and microglial reaction in the fetal and postnatal rat brain after transient maternal hypoxia. **Neuroscience Research**, **32**: 137-148.

LING, E. A.; KAUR, C. & WONG, W. C. 1982. Light and electron microscopic demonstration of non-specific esterase in amoeboid microglial cells in the corpus callosum in postnatal rats: A cytochemical link to monocytes. **Journal of Anatomy**, **135**:385-394.

LING, E. A. & WONG, W. C. 1993. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia - a historical review and current concepts. **Glia**, **7**:9-18.

LING, E. A.; NG, Y. K.; WU, C. H. & KAUR, C. 2001. Microglia: its development and role as a neuropathology sensor. **Progress in Brain Research**, **132**: 61-79.

LOCKITCH, G. 1993. Perspectives on lead toxicity. **Clinical Biochemistry**, **26**: 371-381.

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

MARIN-TEVA, J. L.; CUADROS, M. A.; CALVENTE, R. ALMENDROS, A. & NAVASCUÉS, J. 1999. Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. **Journal of Comparative Neurology**, **412**: 255-275.

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

MARTIN, J. H. & JESSEL, T. M. Development as a guide to the regional anatomy of the brain. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H. & JESSEL, T. M. **Principles of Neural Science**. 3. ed. U.S.A.: Prentice-Hall International Inc., 1991. p. 296-308.

MATOS, A.T.; FONTES, M.P. F.; COSTA, L. M. & MARTINEZ, M. A. 2001. Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristics of Brazilian soils. **Environmental Pollution**, **111**:429-435.

MODZELEWSKI, P.; SZAMATOVICZ, J.; LAUDANSKI, T.; MONIUSZKO, J. J. & AKERLUND, M. 1986. The influence of lead ions on uterine activity in the rat. **International Journal Obstetric Gynecology**, **2**: 169-174.

NAKAJIMA, K.; SHIMOJO, M.; HAMANOUE, M.; ISHIURA, S.; SUGITA, H. & KOHSAKA, S. 1992. Identification of elastase as a secretory protease from cultured rat microglia. **Journal of Neurochemistry**, **58**: 1401-1408.

NAKAJIMA, K. & KOHSAKA, S. 1993. Functional roles of microglia in the brain. **Neuroscience Research**, **17**: 187-203.

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

NAVASCUÉS, J.; MOUJAHID, A.; ALMENDROS, A.; MARÍN-TEVA, J. L. & CUADROS, M. A. 1995. Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglia precursors during development. **The Journal of Comparative Neurology**, **354**:209-228.

NAVASCUÉS, J.; CALVENTE, R.; MARÍN-TEVA, J. L. & CUADROS, M. A. 2000. Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. **Annual Academy Brazilian Ciencia.**, **72**:91-102.

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

OKADA, I.; SAKUMA, A.; MAIO, F.; DOVIDAUSKAS, S. & ZENEON, O. 1997. Avaliação dos níveis de chumbo e cádmio em leite em decorrência da contaminação ambiental na região do Vale do Paraíba, Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, **31**: 1-8

ORRENIUS, S. & NICOTERA, P. 1992. Calcium ion and oxidative cell injury. **Annual Neurology Supplement**,: 33-42.

PATTEN, B. M. Early embryology of the chick. 4. ed. Philadelphia: Blakiston, 1951.244p.

PEARSON, H. E.; PAYNE, B. R. & CUNNINGHAM, T. J. 1993. Microglial invasion and activation in response to naturally occurring neuronal degeneration in the ganglion cell layer of the postnatal cat retina. **Developmental Brain Research**, **76**: 249-255.

PÉREZ-COLL, C. S.; HERKOVITS, J. & SALIBIAN, A. 1988. Embryotoxicity of lead on *Bufo arenarum*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, **41**: 247-252.

PERRY, V. H. & GORDON, S. 1991. Macrophages and the nervous system. **International Review of Cytology**, **125**:203-244.

RICE, D. & BARONE, S. 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, **108**: 511-533.

RINGHEIM, G. E. 1995. Mitogenic effects of interleucine-5 on microglia. **Neuroscience Letters**, **201**: 131-134.

RODIER, P. M. 1995. Developing brain as a target of toxicity. **Environmental Health Perspectives**, **103**: 73-76.

RODRIGUES, A. L. S.; ROCHA, J. B. T.; MELLO, C. F. & SOUZA, D. O. G. 1996. Effect of perinatal lead exposure on rat behavior in open field and two way avoidance tasks. **Pharmacology and Toxicology**, **79**: 150-156.

SALAZAR, C. E. H. **Manual de Neuroembriologia**. Universidade de los Andes. Venezuela: Consejo de Publicaciones, 1992. 273p.

SARAFIN, T. & VERITY, M. A. 1991. Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity. **International Journal Development Neuroscience**, **9**: 147-153.

SCHOENWOLF, G. C. & YUAN, S. 1995. Experimental analyses of the rearrangement of ectoderm cells during gastrulation and neurulation in avian embryos. **Cell Tissue Research**, **280**: 243-251.

SHOSTAK, S. **Embryology: an introduction to developmental biology**. Ed. Harper-Collins, New York, 1991. 778pp.

SOROKIN, S. P.; HOYT Jr, R. F.; BLUNT, D. G. & McNELLY, N. A. 1992. Macrophage development, II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver, and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker. **The Anatomical Record**, **232**:527-550.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A. & PENNELL, N. A. 1999. Reactive microgliosis. **Progress in Neurobiology**, **57**:562-581.

STREIT, W. J. 2001. Microglia and macrophages in the developing CNS. **Neurotoxicology**, **22**:619-624.

SUZUMURA, A.; SAWADA, M.; ITOH, Y. & MARUNOUCHI, T. 1994. Interleucina-4 induces proliferation and activation of microglia but suppress their induction of class II major histocompatibility complex antigen expression. **Journal Neuroimmunology**, **53**: 209-218.

TANAKA, J.; TOKU, K.; SAKANAKA, M. & MALDA, N. 1999. Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes. **Neuroscience Research**, **34**: 207-215.

TORRES-SANCHEZ, L. E.; BERKOWITZ, G.; CARRILLO, L. L.; ARREOLA, L. T.; RIOS, c. & CERVANTES, M. L. 1999. Intrauterine lead exposure and preterm birth. **Environmental Research**, **81**: 297-301.

VODELA, J. K.; LENZ, S. D.; RENDEN, J. A.; MCELHENNEY, W. H. & KEMPPAINEN, B. W. 1997. 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.

YASUYUKI, F. & TOSHIYUKI, K. 1999. Possible mechanism for lead inhibition of vascular endothelial cell proliferation: a low response to basic fibroblast growth factor through inhibition of heparan sulfate synthase **Toxicology**, **133**: 147-157.

YOU, Y. & KAUR, C. 2000. Expression of induced nitric oxide synthase in amoeboid microglia in postnatal rats following an exposure to hypoxia. **Neuroscience Letters**, **279**: 101-104.

WATTS, S. W.; CHAI, S. & WEBB, R. C. 1995. Lead acetate-induced contraction in rabbit mesenteric artery: interaction with calcium and protein kinase C. **Toxicology**, **99**: 55-65.

WEST, W.; KNIGHT, E.; EDWARDS, C. MANNING, M. SPURLOCK, B. & JAMES, H. 1994. Maternal low level lead and pregnancy outcomes. **The Journal of Nutrition**, **124**: 981-986.

WINDEBANK, A. J. Metal Neuropathy. In: DYCK, P. J. & THOMAS, P. K. **Peripheral Neuropathy**. Philadelphia, 1993. p. 1549-1570.

WU, C. H.; WANG, C. C.; SHIEH, J. Y.; WEN, C. Y. & LING, E. A. 1996. Immunohistochemical study of amoeboid microglial cells in fetal rat brain. **Journal of Anatomy**, **189**: 567-574.

XU, J. KAUR, C. & LING, E. A. 1993. Variation with age in the labelling of amoeboid microglial cells in rats following an intraperitoneal or intravenous injection of a fluorescent dye. **Journal of Anatomy**, **182**:55-63.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New York: Prentice Hall, 1974. 620p.

ZECEVIC, N.; ANDJELKOVIC, A.. MATTHIEU, J. M. & TOSIC, M. 1998. Myelin basic protein is expressed in the human embryonic CNS. **Developmental Brain Research**, **105**: 97-108.

ZIAJA, M. & JANECKO, J. 1999. Spatiotemporal patterns of microglial proliferation in rat brain injured at the postmitotic stage of postnatal development. **Journal of Neuroscience Research**, **58**:379-386.