



SETAC – Brazil

## Ação do Acetato de Chumbo sobre o Padrão de Desenvolvimento de Embriões de *Gallus domesticus*

L. B. D. RIVERO, J. C. SCHATZ, M. S. L. CARVALHO,  
M. C. DE CARVALHO & Y. M. RAUH MÜLLER\*

Mestrado em Neurociências, Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, BEG,  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC

### RESUMO

A contaminação causada pelo chumbo tem sua origem principalmente nas emissões atmosféricas, sendo o ar considerado uma das principais vias de transporte e distribuição deste metal pesado no ambiente. A toxicidade do chumbo em embriões e indivíduos jovens é bastante expressiva, podendo comprometer o padrão estrutural e funcional das espécies. Estudos têm demonstrado que em embriões de galinha somente uma exposição ao chumbo, dependendo da dose ingerida, pode resultar em malformações de face e membros, hidrocefalia e redução da taxa de eclosão. O objetivo deste trabalho foi analisar embriões de *Gallus domesticus* expostos ao acetato de chumbo para verificar o comprometimento do padrão embrionário, bem como a ação teratogênica deste metal. Foram realizados estudos no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/UFSC, onde 143 embriões de *Gallus domesticus* foram expostos ao acetato de chumbo nas seguintes doses: 150 µg, 250 µg, 350 µg e 450 µg. O grupo controle (n = 47) recebeu 0,1 ml de solução salina nos mesmos dias. Os embriões foram tratados no 3º ou no 5º dia e monitorados durante 6 dias, quando foi avaliada a integridade das estruturas embrionárias. Do total de indivíduos tratados com acetato de chumbo, 27 apresentaram o padrão normal, 34 morreram e 82 apresentaram alteração no padrão de desenvolvimento (retardo de desenvolvimento (3), malformações (14), alterações hemorrágicas (65)). Nossos estudos mostram que nas doses utilizadas o acetato de chumbo modifica o processo de morfogênese, causando alterações morfológicas características, assim, deve haver controle de seu uso e liberação no ambiente.

*Palavras-chave:* chumbo, toxicidade, desenvolvimento embrionário, *Gallus domesticus*, alterações morfológicas.

### ABSTRACT

#### Lead acetate action in embryonic developmental pattern of *Gallus domesticus*

The contamination for lead has its origin mainly in the atmospheric emissions, being the air considered one of the main ways of transport and distribution of this heavy metal in the environment. Lead toxicity in embryos and young individuals is very expressive, and can commitment the structural and functional pattern of species. Studies have demonstrated that only one exposition to lead in chick embryos, depending on the ingested dose, can result in malformations of face and limbs, hydrocefaly and reduction in the eclosion rate. The objective of this work was analized embryos of *Gallus domesticus* exposed to lead acetate in order to verify the commitment of the embryonic pattern as well as the teratologic actions of the metal. Studies in the Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/UFSC had been carried through, where 143 embryos of *Gallus domesticus* had been exposed to lead acetate in the doses: 150 µg, 250 µg, 350 µg and 450 µg. The control group (n = 47) has received 0.1 ml saline solution in the same days. The embryos had been treated in 3<sup>rd</sup> or in 5<sup>th</sup> day, monitorated during six days, when the integrity of the embryonic structures was evaluated. Of the total of individuals treated with lead acetate, 27 presented the normal pattern, 34 died and 82 had alteredated the developmental pattern

\*Corresponding author: Yara Maria Rauh Müller, e-mail: yararm@ccb.ufsc.br.

(developmental delay (3), malformations (14), hemorrhagic alterations (65)). Our studies show that the lead acetate in the doses utilized modified the morphogenesis processes, causing characteristic morphological alterations, awareing to the use and the release of this metal in the environment.

*Key words:* lead, toxicity, embrionic development, *Gallus domesticus*, morphological alterations.

## INTRODUÇÃO

O chumbo é virtualmente onipresente no meio ambiente como resultado de sua ocorrência natural e de sua utilização industrial. Como todo metal pesado, degrada-se lentamente no ambiente, persistindo durante décadas no solo e no leito dos rios, e não é metabolizado pelos animais, ocorrendo o processo de bioacumulação (EPA, 2001). Desde tempos remotos, quando a espécie humana começou a fazer uso das técnicas de metalurgia, a produção desses metais aumentou significativamente e seus efeitos tóxicos geraram problemas permanentes, tanto para seres humanos como para o meio ambiente. O chumbo e seu sulfato são pouco absorvidos e praticamente inócuos, no entanto, os sais solúveis de chumbo, como cloreto, nitrato e acetato, são considerados venenos muito ativos (Cole & Lee, 1997).

O chumbo é uma toxina letal comprovadamente carcinogênica, teratogênica (causa malformações estruturais no feto, baixo peso e/ou disfunções metabólicas e biológicas) e tóxica para o sistema reprodutivo (causa disfunções sexuais, abortos e infertilidade) (EPA, 2001). Estudos comprovam que o chumbo apresenta ação deletéria sobre o desenvolvimento das espécies a ele expostas, tais como ratos (Antônio *et al.*, 1999; Dearth *et al.*, 2002), aves (Narbaitz *et al.*, 1985; Anwer *et al.*, 1988) e humanos (Zarembski *et al.*, 1983; Rothemberg *et al.*, 1999).

Durante o período embrionário, os eventos de proliferação e diferenciação celular e o processo de sinaptogênese são muito intensos, de modo que a intoxicação pelo chumbo nesse período acarretará graves conseqüências ao padrão estrutural e funcional do corpo dos indivíduos (Moreira *et al.*, 2001).

Os embriões de aves e, em especial, o de galinha são utilizados freqüentemente como modelo em embriologia experimental devido ao fato de os ovos serem de fácil manuseio, volumosos e ricos em vitelo, de os embriões desenvolverem-se apenas na região superior do ovo e de o processo ser relativamente curto e poder ser acompanhado diariamente em laboratório, permitindo assim avaliar a ação de agentes exógenos, como o acetato de chumbo, e as alterações induzidas por eles durante o período embrionário. Embriões de galinha expostos ao chumbo e ao zinco no sétimo dia de desenvolvimento e analisados no vigésimo dia apresentavam microftalmia, hidrocefalia e deformidades no bico, membros e tronco (Anwer *et al.*, 1988), e quando expostos apenas ao chumbo, hemorragias intra e extra-embrionárias e necrose cefálica (Narbaitz *et al.*,

1985). O propósito deste estudo foi analisar a ação do acetato de chumbo sobre o desenvolvimento embrionário de *Gallus domesticus* expostos no terceiro e quinto dias e analisados após seis dias, a fim de verificar se esse metal é capaz de comprometer o desenvolvimento normal da espécie.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Ovos fertilizados de *Gallus domesticus* foram incubados em estufa (38°C), com a umidade atmosférica sendo mantida por 500 ml de água trocada a cada 3 dias. No terceiro (E3) ou quinto (E5) dia de incubação, em ambiente asséptico, efetuou-se na face mediana do ovo uma abertura de cerca de 1 cm de diâmetro, para observação do embrião e administração do acetato de chumbo (n = 143) nas doses de 150 µg, 250 µg, 350 µg e 450 µg, diluídas em 0,1 ml de solução salina. Com o auxílio de uma agulha hipodérmica, essas doses foram injetadas na vesícula vitelínica, próxima ao embrião, a uma profundidade de até 1,0 mm (Takamatsu & Fujita, 1971). O grupo controle (n = 47) recebeu 0,1 ml de solução salina nos mesmos dias. Após o tratamento, os orifícios foram cobertos com fita adesiva transparente e os ovos recolocados na estufa e observados diariamente durante seis dias. Decorrido esse tempo (E9 e E11, respectivamente), os ovos foram colocados 10 minutos em um refrigerador (4°C) para dessensibilizar os embriões e posteriormente retirados os anexos embrionários para proceder à análise macroscópica e estereoscópica (10X) da integridade das estruturas embrionárias, de acordo com as descrições de Hamburger & Hamilton (1951) e republicação de Sanes (1992).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise morfológica dos embriões tratados com o acetato de chumbo permitiu caracterizar três grupos distintos:

Grupo 1 – embriões aparentemente normais (Figura 1A).

Grupo 2 – embriões com hemorragias visíveis, caracterizadas por extravasamento sanguíneo nas vesículas cerebrais (hemorragia cefálica) (Figura 1B), hemorragias cefálica e lombar (extensa área de acúmulo de sangue desde as vesículas cerebrais até a região caudal do corpo do embrião) e hemorragia extra-embrionária (localizada na região fora do corpo).

Grupo 3 – embriões com alterações do padrão normal, como extrusão visceral (com órgãos dispostos fora da cavidade abdominal) (Figuras 1D), extrusão cerebral (as vesículas encontram-se de forma desorganizada posicionadas fora da caixa craniana), malformações da face, ciclopia, hidrocefalia e atraso de desenvolvimento (tamanho inferior ao esperado para a idade, primórdio de formação do bico, pele lisa e membros pouco desenvolvidos) (Figura 1C).

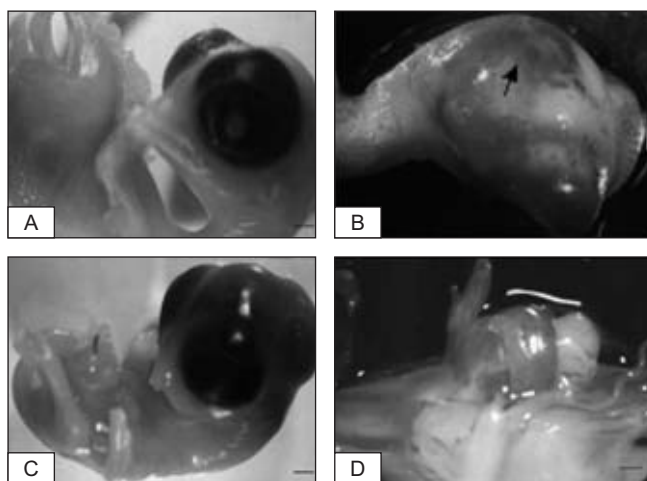
Os embriões tratados apenas com salina (controle) apresentaram pequenos focos hemorrágicos, não mostrando, porém, alterações das características morfológicas da espécie (Tabela 1 e Figuras 2 e 3). De acordo com Rodier (1995), o processo de desenvolvimento embrionário está normalmente sujeito a erros; entretanto, a repetição e representatividade das alterações morfológicas e malformações expressam a interferência de um fator exógeno, como o acetato de chumbo, sobre o padrão normal de desenvolvimento da espécie.

De acordo com os nossos resultados (Tabela 1) foram observadas alterações hemorrágicas na região cefálica (HC) ou nas regiões cefálica e lombar (HC + HL) tanto em indivíduos tratados com acetato de chumbo quanto nos indivíduos controle. Contudo, o número de indivíduos que apresentaram estas alterações é significativamente maior nos grupos tratados, o que mostra a interferência do acetato de chumbo sobre a morfogênese embrionária. Narbaitz *et al.* (1985) administraram uma única dose de nitrato de chumbo na câmara de ar de ovos de galinha no décimo dia de incubação e observaram, vinte e quatro horas depois, pequenos e múltiplos focos de hemorragia intra e extra-embrionária na maioria dos embriões analisados, evidenciando que alterações hemorrágicas são características

da ação do chumbo, independente da dose utilizada e da idade embrionária avaliada.

Quanto ao padrão de desenvolvimento, os animais tratados no terceiro dia com 350 µg de acetato de chumbo foram os que apresentaram maior alteração do padrão (25%), quando comparados aos demais grupos (Tabela 1). Considerando que Anwer *et al.* (1988) afirmam que 50 µg de chumbo injetado em E7 são suficientes para causar grande comprometimento das estruturas embrionárias, nas concentrações utilizadas em nossos estudos seria esperada a ocorrência de malformações. De acordo com Pérez-Coll *et al.* (1988), embriões de anfíbio *Bufo arenarum*, submetidos a diferentes concentrações de nitrato de chumbo (0,12 a 32 µg/L), apresentaram alta incidência de alterações morfológicas (neurulação parcial, atraso do desenvolvimento e microcefalia), principalmente os embriões tratados nas concentrações abaixo de 1 µg/L. Nas concentrações mais altas houve aumento gradual da teratogênese e letalidade.

Nossos resultados, como os dos autores citados, demonstraram que *Gallus domesticus*, nos estágios precoces de desenvolvimento embrionário, são muito suscetíveis à exposição a agentes tóxicos. O acetato de chumbo, nas doses utilizadas, pode ser caracterizado como um agente teratogênico multipotente, capaz de alterar o desenvolvimento embrionário normal – interferindo nos mecanismos de formação de vários sistemas orgânicos e causando efeitos adversos, como atraso no desenvolvimento, alterações no padrão do sistema nervoso e malformações –, podendo inclusive levar à morte. Este estudo alerta para a necessidade de maior conscientização a respeito do uso e da liberação de poluentes dessa natureza no meio ambiente.

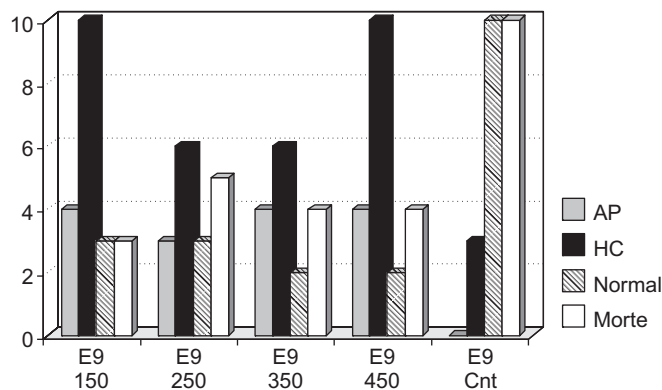


**Figura 1** — Embriões de *Gallus domesticus*. A: E9 – controle, padrão normal de desenvolvimento; B: E9 – 150 µg, alterações hemorrágicas; C: E9 – 250 µg, atraso do desenvolvimento; e D: E9 – 350 µg, extrusão visceral. Escala – 0,769 cm.

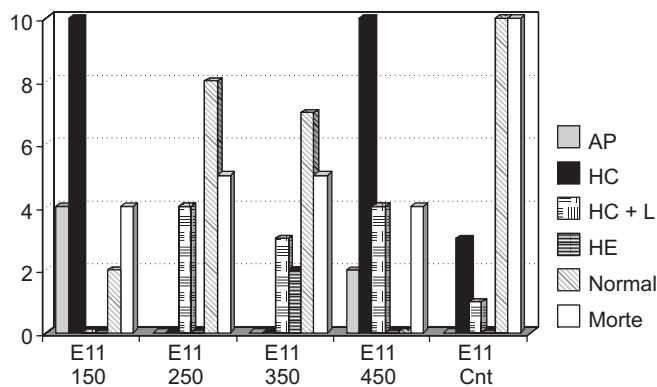
**Tabela 1** — Análise comparativa dos embriões de *Gallus domesticus* submetidos a diferentes doses de acetato de chumbo e indivíduos controle.\*

Embrões	Acetato de chumbo (µg)								Controle	
	150		250		350		450		E9	E11
	E9 (N = 21)	E11 (N = 20)	E9 (N = 17)	E11 (N = 17)	E9 (N = 16)	E11 (N = 17)	E9 (N = 20)	E11 (N = 20)	(N = 23)	(N = 24)
AP	23,8%	20%	17,6%		25%		20%	10%		
HC	47,6%	50%	35,3%		37,5%		50%	50%	13%	12,5%
HC + L				23,5%		17,6%		20%		4,2%
HE						11,8%				
Normal	14,3%	10%	17,6%	47,1%	12,5%	41,2%	10%		43,5%	41,6%
Morte	14,3%	20%	29,4%	29,4%	25%	29,4%	20%	20%	43,5%	41,6%

2. AP = alterações do padrão normal, HC = hemorragia cefálica, HC + L = hemorragia cefálica + lombar, HE = hemorragia extra-embriónica.



**Figura 2** — Análise morfológica dos embriões tratados com acetato de chumbo em E3 com as diferentes doses e analisados em E9. Alteração do padrão (AP), hemorragia cefálica (HC).



**Figura 3** — Análise morfológica dos embriões tratados com acetato de chumbo em E5 com as diferentes doses e analisados em E11. Alteração do padrão (AP), hemorragia cefálica (HC), hemorragia cefálica + lombar (HC + L), hemorragia extra-embriónica (HE).

*Agradecimentos* — Empresa Macedo, Koerich S/A, São José/SC, pela doação dos ovos utilizados neste estudo.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTÔNIO, M. T., CORPAS, I. & LERET, M. T., 1999, Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicol. Letters*, 104: 1-9.
- ANWER, J., ALI, S. & MEHROTRA, N. K., 1988, Antagonistic effect of zinc in lead treated developing chick embryos. *Drug Chem. Toxicol.*, 11(1): 85-95.
- COLE, G. J. & LEE, J., 1997, Immunocytochemical localization of a novel radial glial intermediate filament protein. *Develop. Brain Res.*, 101(1-2): 225-238.
- DEARTH, R. K., HINEY, J. K., SRIVASTAVA, V., BURDICK, S. B., BRATTON, G. R. & DEES, W. L., 2002, Effects of lead (Pb) exposure during gestation and lactation on female pubertal development in the rat. *Reproduc. Toxicol.*, 16: 343-352.
- DIAS, P. F. & MÜLLER, Y. M. R., 1999, Ação da insulina na morfogênese de embriões de *Gallus domesticus*. *Rev. Brasil. Biol.*, 59(2): 343-350.
- EPA-U.S., 2001, *Alternative technologies for surface finishing: clear technologies for printed wiring board manufacturers*. Environmental Protection Agency. Disponível em: [http://www.epa.gov/dfe/pubs/pwb/tech\\_rep/Surface\\_Finishing.pdf](http://www.epa.gov/dfe/pubs/pwb/tech_rep/Surface_Finishing.pdf).
- HAMBURGER, V. & HAMILTON, H., 1951, A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphology*, 88: 49-92.
- KARNOFSKY, D. A. & RIDGWAY, L. P., 1952, Production of injury to the central nervous system of the chick embryo by lead salts. *J. Pharmacology*, 104: 176-186.
- MOREIRA, E. G., VASSILIEFF, I. & VASSILIEFF, V. S., 2001, *Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term*. *Neurotoxicol. and Teratol.*, 23: 489-498.
- NARBAITZ, R., MARINO, I. & SARKAR, K., 1985, Lead-induced early lesions in the brain of chick embryo. *Teratol.*, 32: 389-396.
- PÉREZ-COLL, C. S., HERKOVITS, J. & SALIBIAN, A., 1988, Embryotoxicity of lead on *Bufo arenarum*. *Bulletin Environ. Contaminant Toxicol.*, 41: 247-252.
- RODIER, P. M., 1995, Developing brain as a target of toxicology. *Env. H. Perspectives*, 18-19: 73-75.
- ROTHERBERG, S. J., MANOLO, M., JIANG, J., KHAN, F., CUELLAR, R., REYES, S., SANCHEZ, M., REYNOSO, B., AGUILAR, A., DIAS, M., ACOSTA, S., JÁUREGUI, M. & JOHNSON, C., 1999, Maternal blood lead level during pregnancy in South Central Los Angeles. *Arch. Environ. Health*, 54(3): 151-157.
- SANES, J. R., 1992, On the republication of de Hamburger-Hamilton stages series. *Dev. Dyn.*, 195: 229-230.
15. TAKAMATSU, T. & FUJITA, S., 1971, Growth of notochord and formation of cranial and mesencephalic flexures in culture of chick embryo fibroblasts infected with newcastle disease Virus. *J. Antibiotics*, 24: 785-794.
- ZAREMBSKI, P. M., GRIFFITHS, P. D., WALKER, J. & GOODALL, H. B., 1983, Lead in neonates and mothers. *Clin. Chim. Acta*, 134: 35-49.

