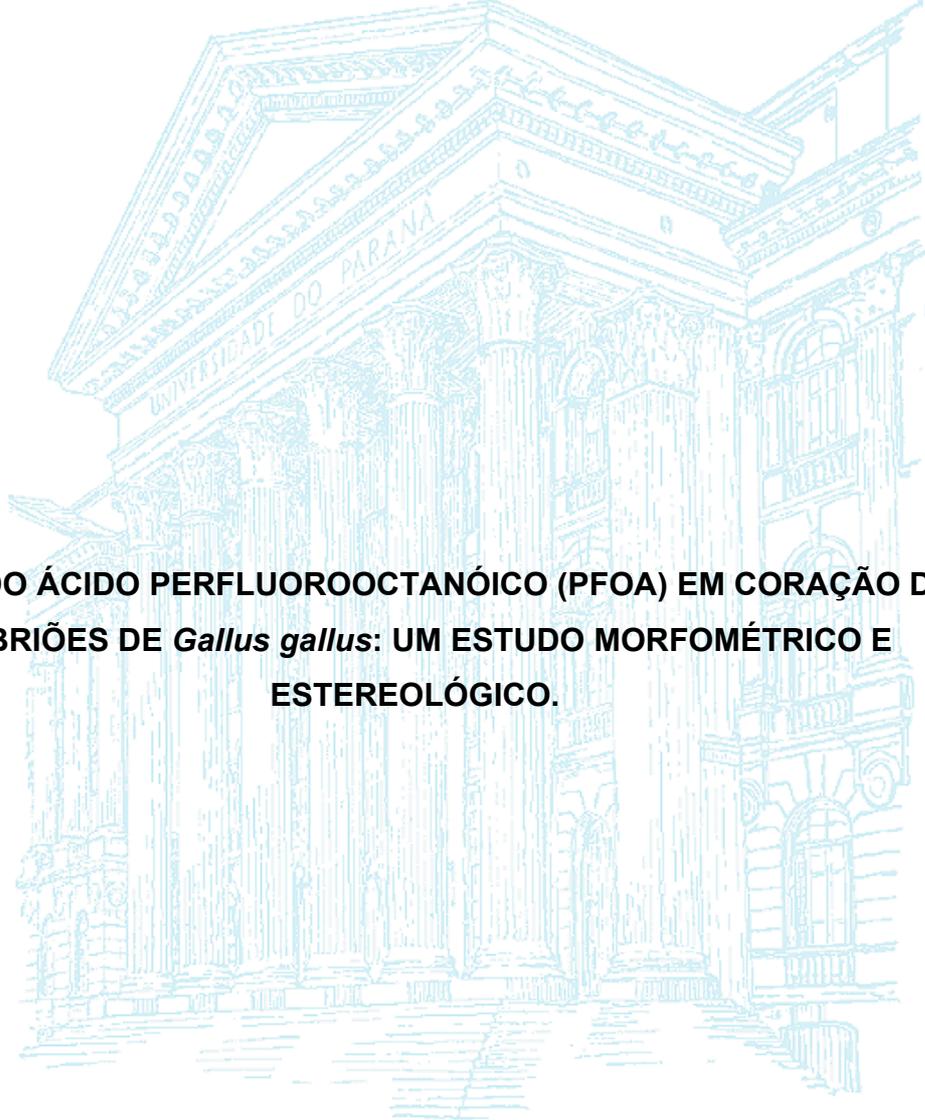


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA MAGALHÃES DA SILVA



**AÇÃO DO ÁCIDO PERFLUOROCTANÓICO (PFOA) EM CORAÇÃO DE
EMBRIÕES DE *Gallus gallus*: UM ESTUDO MORFOMÉTRICO E
ESTEREOLÓGICO.**

CURITIBA

2016

LARISSA MAGALHÃES DA SILVA

**AÇÃO DO ÁCIDO PERFLUOROOCETANÓICO (PFOA) EM CORAÇÃO DE
EMBRIÕES DE *Gallus gallus*: UM ESTUDO MORFOMÉTRICO E
ESTEREOLÓGICO.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Federal do Paraná como
requisito à obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina e avaliação da disciplina
TCC-II.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Feijó
Ortolani-Machado

Coorientadora: Profa. Dra. Djanira
Aparecida da Luz Veronez

CURITIBA

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda força a mim dada e por sempre estar cuidando dos detalhes da minha vida.

À minha família, que eu amo muito, por sempre me apoiar e me dar forças para continuar. Sem vocês não chegaria até aqui. Obrigada por toda dedicação, incentivo e paciência.

A todos os meus amigos, mas principalmente às minhas companheiras de caminhada Anna, Brenda, Camila, Débora e Paula, pela amizade, cumplicidade e por todos os momentos até aqui compartilhados.

À Universidade Federal do Paraná, por todo apoio que me ofereceu como aluna e também pelo crescimento que me proporcionou como pessoa.

A todos os mestres que passaram pela minha formação, principalmente à minha orientadora professora Claudia Feijó Ortolani-Machado e à minha coorientadora professora Djanira Aparecida da Luz Veronez, por toda paciência, compreensão, disposição e ajuda oferecida em todo ano.

Às minhas amadas colegas do laboratório de Embriotoxicologia, pela convivência, suporte e amparo proporcionados. Agradeço por terem disponibilizado seu tempo para me ensinar e me auxiliar sempre que precisei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade e por todo suporte durante o intercâmbio pelo programa Ciências sem Fronteiras, modalidade graduação sanduíche.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Embriões de galinha (*Gallus gallus*) são amplamente utilizados na pesquisa referente ao desenvolvimento embrionário e à toxicologia, por possuir algumas vantagens, como sua semelhança ao desenvolvimento dos mamíferos e sua suscetibilidade a interferências químicas. O ácido perfluorooctanoico (PFOA) é um contaminante ambiental persistente, que não ocorre naturalmente e é capaz de ultrapassar a barreira placentária. É detectável no soro da maioria da população humana adulta dos países industrializados e pode atuar como desregulador endócrino e metabólico, além de afetar o coração. O desenvolvimento do sistema cardiovascular é um processo complexo e sensível a agentes externos, uma vez que depende de inúmeras sinalizações. Assim, nosso trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis impactos da exposição ao PFOA no coração de embriões de *Gallus gallus* com 7 dias de incubação. Os embriões foram divididos em 4 grupos: grupo controle veículo (administrado 20 µL de soro fisiológico), e grupos contaminados 1, 2 e 3 (PFOA 5 ng/mL, PFOA 50 ng/mL e PFOA 250 ng/mL, respectivamente). Os corações foram preparados histologicamente e analisados por meio de técnicas morfoquantitativas de estruturas anatômicas: morfometria e estereologia. A morfometria possibilitou mensurar a parede dos ventrículos direito e esquerdo e a estereologia a obtenção das densidades volumétrica e numérica dos cardiomiócitos a partir de cortes bidimensionais. A comparação estatística dessas variáveis entre os grupos não mostrou diferença significativa ($P > 0,05$). Sendo assim, esses resultados sugerem que o PFOA não interfere na espessura da parede dos ventrículos e nem nas densidades numérica e volumétrica dos cardiomiócitos dos embriões de ave com sete dias de incubação.

Palavras-chaves: Embrião de ave. PFOA. Embriotoxicologia. Cardiomiócitos. Parede ventricular.

ABSTRACT

Chicken embryo (*Gallus gallus*) are widely used in embryo development and toxicology research because they have some advantages, such as their similarity to the development of mammals and their susceptibility to chemical interferences. Perfluorooctanoic acid (PFOA) is a persistent environmental contaminant, which does not occur naturally and is capable of overcoming a placental barrier. It is detectable in the serum of most human population of the industrialized countries and can act as an endocrine and metabolic disruptor, affecting the heart. The development of the cardiovascular system is a complex and sensitive process to external agents, so the aimed of our work is evaluate the impacts of PFOA on the heart of *Gallus gallus* embryos with 7 days of incubation, which were divided into 4 groups: Control group (administered 20 μ l of saline) and contaminated groups 1, 2 and 3 (PFOA 5 ng/mL, PFOA 50 ng/mL and PFOA 250 ng/mL, respectively). The hearts were prepared histologically and analyzed by morpho-quantitative techniques of anatomical structures: morphometry and stereology. Morphometry measured the wall thickness of the right and left ventricles and stereology evaluated the volume density (V_v) and the numerical density (N_v) of cardiomyocytes from two-dimensional cuts. The statistic between the groups showed no significant difference ($P > 0,05$). Therefore, the results suggest that PFOA does not interfere with a wall thickness of the ventricles or with a numerical and volumetric density of the cardiomyocytes of embryos with seven days of incubation.

Keywords: Chicken embryo. PFOA. Embryotoxicology. Cardiomyocytes. Ventricular wall.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2.OBJETIVOS	8
2.1. OBJETIVO GERAL	8
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1. TOXICOLOGIA E ECOTOXICOLOGIA.....	8
3.2. EMBRIOTOXICOLOGIA	9
3.3. AVE COMO MODELO EXPERIMENTAL.....	9
3.4. COMPOSTOS PERFLUORADOS – PFC’S	11
3.5. ÁCIDO PERFLUOROOCTANÓICO (PFOA)	11
3.6. O CORAÇÃO COMO ÓRGÃO	13
3.6.1ASPECTOS ANATÔMICOS E MICROSCÓPICOS	13
3.7. O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO CORAÇÃO	15
3.8. O CORAÇÃO DE GALLUS GALLUS.....	16
3.9. CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PELO PFOA	17
3.10. MORFOMETRIA E ESTEREOLOGIA	18
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. MODELO ANIMAL	19
4.2. DESENHO EXPERIMENTAL	19
4.3. CONCENTRAÇÕES E QUANTIDADES	20
4.4. EXPOSIÇÃO DO CONTAMINANTE	20
4.4.1.INJEÇÃO DOS OVOS.....	21
4.5. HISTOLOGIA	22
4.5.1. FIXAÇÃO	22
4.5.2.INCLUSÃO	23
4.6. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E ESTEREOLÓGICAS	25
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIA.....	35

1. Introdução

A preocupação sobre o impacto de poluentes no ecossistema e na saúde humana atinge a comunidade mundial, uma vez que existe um número cada vez maior de intervenções ambientais por fatores, principalmente, antropogênicos (MOORE, 2002). Dentre essas intervenções, os poluentes orgânicos persistentes (POP's) chamam atenção pelo fato de permanecerem no ambiente por um grande período. Podem ser transportados por longas distâncias e bioacumular, causando efeitos adversos tanto no ambiente como na saúde. Estão entre esses compostos os bifenispoliclorados (PCB's), o diclorodifeniltricloroetano (DDT), o hexaclorobenzeno (HCB) e o ácido perfluorooctanóico (PFOA) (DE BOER et al., 2008). Em 2015 foi proposto pela União Europeia que o PFOA fosse incluído em uma das três categorias de substâncias da Convenção de Estocolmo sobre POP's (PFOA, 2015). Esta convenção teve como objetivo proteger o ecossistema dos poluentes persistentes, listando-os em três categorias: as substâncias que requerem eliminação (Anexo A), as que requerem restrição ao seu uso (Anexo B) e as substâncias que requerem redução na sua liberação não deliberada (Anexo C) (WÖHRNSCHIMMEL et al., 2016). Este fato deixa claro a atual importância da investigação das consequências que o PFOA poderá trazer para o ambiente e, principalmente, para os seres que nele vivem.

O PFOA é um composto perfluorado que não ocorre naturalmente, e é formado por uma cadeia de fluorcarboneto com um grupo funcional adicional, a carboxila (STEENLAND; FLETCHER; SAVITZ, 2010). Ligações carbono-flúor como essas são conhecidas como uma das ligações mais fortes da química orgânica, e por isso o PFOA apresenta uma alta resistência à degradação. Devido a sua persistência é encontrado no soro da população em geral (LAU et al., 2007) indicando riscos para a saúde de adultos e de organismos em desenvolvimento.

Em 2008, numa análise feita por Anderson-Mahoney et al., verificou-se um aumento do aparecimento de problemas cardiovasculares em adultos residentes próximos a água potável contaminada com PFOA. Já Jiang et al. (2012) observaram alterações da morfologia e da função do coração em embriões de galinha com 19 dias de desenvolvimento e nascidos. Estes estudos indicam possíveis consequências dos efeitos do PFOA sobre o sistema cardiovascular.

Os embriões de galinha (*Gallus gallus*) são modelos ideais para estudos de desenvolvimento e de toxicidade, pois são conhecidos por serem suscetíveis a interferências químicas, além de se poder extrapolar para efeitos tóxicos em embriões humanos, uma vez que o desenvolvimento cardiovascular de aves e mamíferos é semelhante.

Visto que o PFOA ocasiona diversos tipos de alterações em modelos animais, está presente no soro humano e possivelmente afeta o coração, este trabalho investigou seus efeitos no desenvolvimento inicial do coração de embriões de galinha.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos do PFOA (três concentrações) em coração de embriões de *Gallus gallus*, com 7 dias de incubação.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar os efeitos do PFOA sobre a espessura da parede dos ventrículos, por meio da morfometria.
- Analisar a ação do PFOA sobre as densidades volumétrica e numérica dos cardiomiócitos, por meio da estereologia.

3. Revisão bibliográfica

3.1. TOXICOLOGIA E ECOTOXICOLOGIA

A toxicologia e a ecotoxicologia têm como princípio compreender e explicar quais são os impactos causados pelas substâncias químicas, seus processos bioquímicos e fisiológicos, a sensibilidade dos diferentes tipos de organismos e a relativa toxicidade dos compostos químicos e suas classes (CHAPMAN, 2002). Essas duas ciências utilizam-se dos biomarcadores e bioindicadores para explicar seus resultados. Os primeiros, com definição do *National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group*, são características biológicas que podem ser

objetivamente medidas e avaliadas como um indicador de processos normais biológicos, processos patogênicos ou respostas farmacológicas para uma intervenção terapêutica (GROUP, 2001). Já os bioindicadores são processos biológicos, espécies ou comunidades que são usados para avaliar a qualidade do ambiente e sua alteração ao longo do tempo (HOLT; MILLER, 2010).

3.2. EMBRIOTOXICOLOGIA

O desenvolvimento embrionário é um período considerado crítico aos efeitos tóxicos de substâncias, pois sabe-se da ocorrência da alta taxa de proliferação e diferenciação celular e de seu imaturo sistema de desintoxicação e defesa, tornando, assim, o embrião/feto mais vulnerável a agentes externos. Indícios sugerem que a exposição precoce a substâncias químicas pode prejudicar o organismo diretamente, e também indiretamente, predispondo o indivíduo a doenças como diabetes, síndrome metabólica, doença de Alzheimer ou de Parkinson (GUPTA, 2011; WELLS et al. 2010). Assim, é de extrema importância conhecer os efeitos dos xenobióticos sobre o desenvolvimento embrionário de vertebrados usando modelos animais como alternativa, possibilitando desta forma uma extrapolação desses efeitos para embriões humanos.

O chumbo, cobre, arsênio e cádmio são alguns exemplos de inúmeras substâncias que tem sua toxicidade testada em embriões de ave, demonstrando alterações morfológicas (RIVERO et al., 2006; STEIL, 2013; STUPAK et al., 2012), no peso e no tamanho, defeitos na angiogênese (ALI LAGHAR et al., 2014) e na parede do corpo, bem como morte celular por apoptose em células dos somitos, placa lateral da mesoderme e tubo neural (THOMPSON et al., 2005). Já com o PFOA foram observados efeitos neurotóxicos (PINKAS et al., 2010) e também alterações em parâmetros estruturais e funcionais do coração (JIANG et al., 2012).

3.3. AVE COMO MODELO EXPERIMENTAL

O uso de ave como modelo animal experimental perdura anos, com registros desde os egípcios, passando por Aristóteles e chegando aos dias atuais (STERN, 2005).

A galinha (*Gallus gallus*) (FIGURA 1) é uma das espécies mais utilizadas nos estudos da embriologia comparada e biologia do desenvolvimento (DeRUITER; DOTY, 2011), mas tem sido usada também como modelo para estudos de agentes tóxicos, já que são sensíveis à ação de agentes químicos (VODELA et al., 1997; YAMAMOTO et al., 2012).

Alguns aspectos favorecem o uso dos embriões de ave como modelo de estudo em toxicologia: (1) Baixo custo. Os ovos fertilizados são relativamente baratos em relação a outros modelos animais e o único equipamento necessário para seu desenvolvimento é uma incubadora com temperatura e umidade controlada (STERN, 2005); (2) Acessibilidade. O desenvolvimento embrionário é independente da mãe, permitindo seu acompanhamento diário em laboratório (SCHOENWOLF, 1999); (3) Estádios de desenvolvimento bem descritos. Em 1951, Hamburger e Hamilton descreveram a sequência de estádios de desenvolvimento do embrião de ave, criando seu “*HH-staging*” e viabilizando a reprodutibilidade dos experimentos realizados por diferentes grupos de pesquisa; (4) O embrião de ave é eticamente mais aceito, pois não há necessidade da eutanásia materna, fator positivo em relação aos mamíferos placentários.

Assim, tais vantagens fazem do embrião de ave um excelente modelo tanto para observar e estudar o início da formação do coração (KAIN et al., 2014) como também para avaliar os efeitos de agentes químicos tóxicos no desenvolvimento embrionário, dependendo dos estádios avaliados, fazendo importantes relações com os mamíferos.

FIGURA 1 – INDIVIDUO ADULTO E OVO DE *Gallus gallus*.



FONTE: Chckns (2015).

3.4. COMPOSTOS PERFLUORADOS – PFC'S

Os compostos perfluorados (*PFC's- Perfluorinated compounds*) são estáveis a altas temperaturas, não inflamáveis e não voláteis, além de não serem degradados por ácidos e bases fortes, ou agentes oxidantes (LAU et al., 2007). Esta resistência à degradação contribui para que sejam incluídos na categoria de poluentes orgânicos persistentes (*POP's*), substâncias conhecidas por sua permanência no ambiente, com propriedades tóxicas, de bioacumulação e de propensão a percorrer longas distâncias, apresentando uma distribuição global (MUNSCHY et al., 2016).

Os PFCs não são encontrados naturalmente, sendo sintetizados para produtos comerciais e processos industriais há mais de 60 anos (LINDSTROM et al., 2011). Apesar de estarem presentes no ambiente há um tempo considerável seus efeitos tóxicos ainda não são totalmente conhecidos, o que os caracterizam como poluentes emergentes, por isso muitas vezes ainda não estão inclusos em programas de monitoramento ou de regulamentação por agências de controle ambiental (GLASSMEYER, 2007; SORENSEN et al., 2015)

Geralmente os PFC's depositam-se no ar e pó, em águas superficiais e subterrâneas, sedimentos e até em lugares mais remotos como o ártico e o oceano. Sua principal utilização é a proteção de superfícies, tais como tratamentos de carpetes, vestuário, revestimentos para papel e papelão e revestimento de recipientes alimentares como caixas de pizza, embalagens de hambúrguer e de pipoca de microondas (ATSDR, 2015; ATSDR, 2013). Dentre esses compostos, o ácido perfluorooctanóico (PFOA) é um dos mais encontrados em níveis elevados no ambiente.

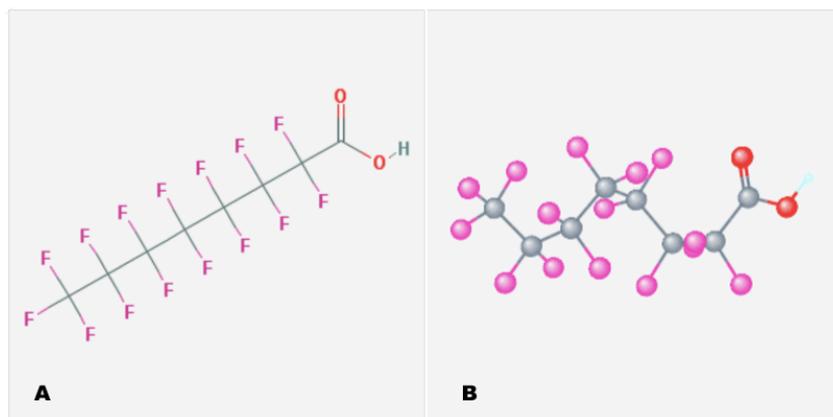
3.5. ÁCIDO PERFLUOROOCTANÓICO (PFOA)

O ácido perfluorooctanóico é um composto químico sintético com fórmula molecular $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_6\text{COOH}$ (FIGURA 2). Possui uma cadeia carbônica fluorada que contribui para as características hidrofóbicas e oleofóbicas da molécula, além de um grupo funcional carregado, a carboxila, doando sua característica hidrofílica. Por suas fortes ligações carbono-flúor não está sujeito a quebras naturais, resistindo ao calor e a reações químicas, como a fotólise, bioacumulando no ambiente (STEENLAND; FLETCHER; SAVITZ, 2010; POST; COHN; COOPER, 2012;

VAALGAMAA et al., 2011). É usado na produção da maioria dos fluoropolímeros, como o politetrafluoretileno (PTFE), que está presente, principalmente, em revestimentos antiaderentes em utensílios de cozinha (KNEPPER; LANGE, 2012). Apesar do PFOA ser em grande parte removido ou reciclado no final da produção dos produtos que contêm esses fluoropolímeros, segundo a *Society of the Plastics Industry, Inc. (SPI)*, a principal preocupação é o destino que se dá aos dejetos da produção (MOORE, 2007).

Pode ser encontrado na biota e no soro da população humana no geral. Nos Estados Unidos, por exemplo, entre 2003 e 2004, a concentração média de PFOA no soro da população era de 3,9 µg/L, entretanto, em áreas contaminadas o nível estimado de exposição pode ser ainda maior (CALAFAT et al., 2013).

FIGURA 2 – FÓRMULA ESTRUTURAL (A) E CONFORMAÇÃO 3D (B) DO PFOA.



FONTE: Open ChemistryDatabase (2016).

A contaminação humana pode ocorrer por vários meios, como inalação, alimentação e ingestão de água. Uma vez no organismo, o PFOA permanece inalterado por longos períodos, com uma meia-vida de aproximadamente quatro anos (ATSDR, 2015). Possui uma alta absorção por meio do sistema gastrointestinal, com distribuição pelo sangue, ligando-se a albumina sérica, rins e, principalmente, fígado. Porém, sua taxa de eliminação é baixa. Em modelos animais atua como desregulador endócrino e metabólico, e foi associado ao câncer no fígado, pâncreas e testículo (OLSEN et al., 1998; BIEGEL et al., 2001; LAU et al., 2007; ANDERSEN et al., 2008; SHABALINA et al., 2015).

É demonstrado que a maioria dos poluentes persistentes orgânicos, e neles inclui-se o PFOA, atravessam a barreira placentária (PORPORA et al., 2013).

Avaliando-se sua concentração no sangue da mãe e no cordão umbilical foi encontrada uma transferência de aproximadamente 76-86% para o feto (MONROY et al., 2008; LEE et al., 2013).

Sobre a toxicidade do PFOA durante o desenvolvimento embrionário, há relatos de um aumento na mortalidade, retardo no desenvolvimento, na abertura dos olhos e no crescimento dos pelos em camundongos com exposições de PFOA durante toda a gestação (WOLF et al., 2007). Em experimentos com o *zebrafish* o PFOA causou anormalidades estruturais, como edema de pericárdio e coluna vertebral malformada (ZHENG et al., 2011). Já em embriões de ave foi observada uma alta mortalidade e uma diminuição no sucesso da eclosão do ovo (YANAI et al., 2008), alterações neurocomportamentais (PINKAS et al., 2010) e cardiotoxicidade (JIANG et al., 2012).

A partir de resultados como estes, a agência de proteção ambiental dos EUA (USEPA) entrou em acordo com os principais produtores de PFOA e estabeleceu um programa de gestão para eliminar gradualmente as suas emissões e a sua presença em produtos (USEPA, 2006). Porém, sua conhecida persistência no ambiente e sua longa meia-vida no organismo humano indica que ainda haverá exposição por um tempo considerável (JIANG et al., 2015).

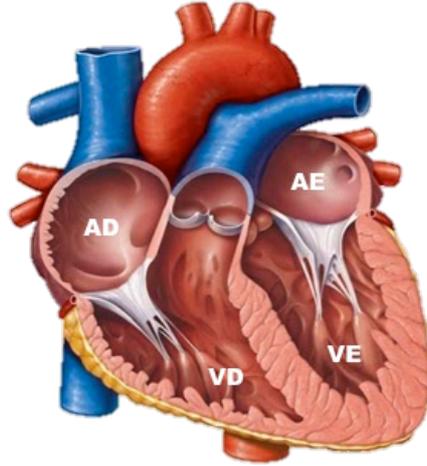
3.6. O CORAÇÃO COMO ÓRGÃO

3.6.1. Aspectos anatômicos e microscópicos

O coração humano é um órgão muscular com forma de um cone truncado, localizado dentro da cavidade torácica, que se contrai ritmicamente bombeando o sangue para todo corpo por meio dos vasos sanguíneos. Localiza-se sobre o diafragma e inferiormente aos dois pulmões, e é envolvido por uma membrana protetiva chamada pericárdio. Possui 4 câmaras ocas (FIGURA 3): 2 átrios, que formam sua base, e 2 ventrículos, que formam seu ápice. Os átrios recebem o sangue continuamente das veias e bombeiam para os ventrículos, por meio das válvulas atrioventriculares. Como o sangue segue com baixa pressão suas paredes, em comparação com as paredes dos ventrículos, são mais finas. O átrio direito recebe sangue rico em CO_2 e o átrio esquerdo recebe sangue rico em O_2 . Já o ventrículo direito ejeta o sangue rico em CO_2 para os pulmões e o ventrículo

esquerdo sangue rico em O₂ para o restante do corpo (BERNE; LEVY, 2001; HALL; GUYTON, 2011).

FIGURA 3 – CORAÇÃO

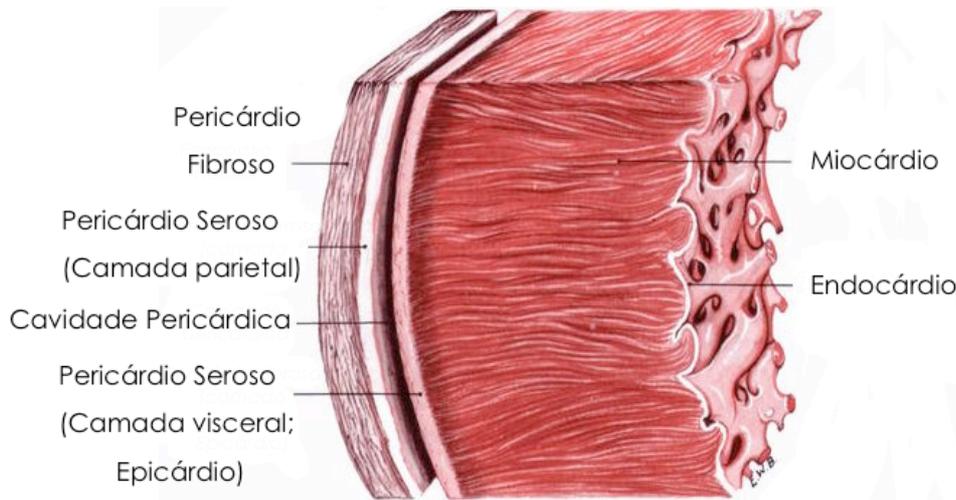


Átrio direito (AD); Átrio esquerdo (AE); Ventrículo direito (VD); Ventrículo esquerdo (VE).

FONTE: Humandiagram (2015).

As paredes do coração são constituídas de três túnicas: o endocárdio (camada interna), o miocárdio (camada média) e o epicárdio (camada mais externa) (FIGURA 4). Tem-se, ainda, a região central fibrosa do coração, conhecida também como esqueleto cardíaco, formado por tecido conjuntivo denso que estrutura o coração. Esta estrutura forma o septo atrioventricular que separa os átrios dos ventrículos, dá apoio para as válvulas e serve como ponto de inserção para as células musculares cardíacas. O endocárdio é constituído por endotélio, e uma camada subendotelial de tecido conjuntivo frouxo que contém fibras elásticas e colágenas e algumas células musculares lisas. O miocárdio é a camada mais espessa e é composta por tecido muscular estriado cardíaco organizado de forma complexa. Esta camada é formada pelos cardiomiócitos, que possuem um núcleo central, oval e bastante pálido e são conectados por meio de discos intercalares, que permitem também a passagem do impulso elétrico. Externamente, o coração está coberto por um epitélio pavimentoso simples que se apoia em uma fina camada de tecido conjuntivo constituindo o epicárdio, que corresponde ao folheto visceral do pericárdio (folheto seroso que envolve o coração) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; HILL, 2016).

FIGURA 4 – MODELO ESQUEMÁTICO DAS TRÊS CAMADAS HISTOLÓGICAS DO CORAÇÃO.



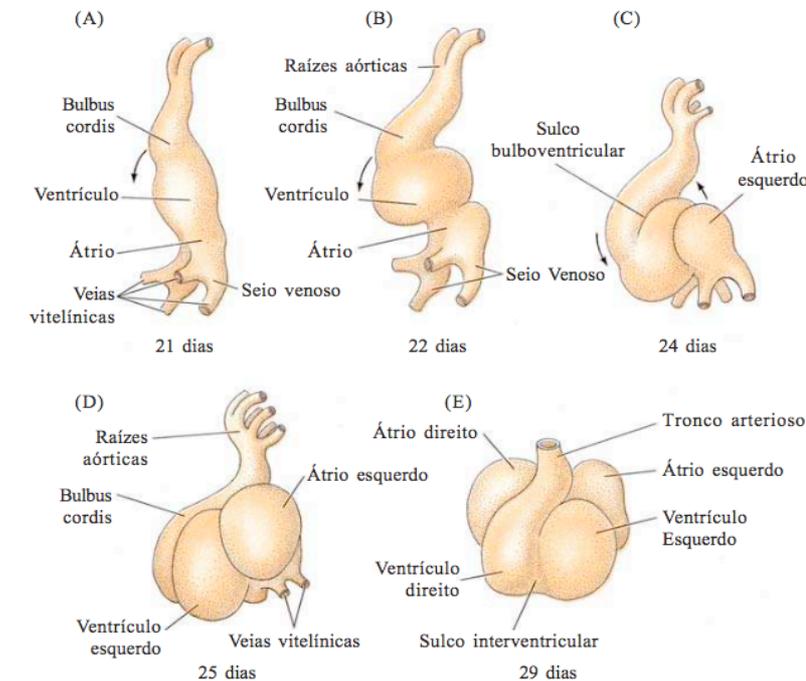
FONTE: histologyolm (2009).

3.7. O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO CORAÇÃO

O desenvolvimento do sistema cardiovascular é um processo complexo que ocorre muito cedo, na mesoderme esplâncnica, controlado por uma cascata de genes reguladores e moléculas sinalizadoras. É considerado a primeira unidade a entrar em funcionamento no embrião em formação, e conseqüentemente, o coração, o primeiro órgão (MOORE; PERSAUD, 2013).

Inicialmente o coração é um tubo de duas câmaras, um átrio e um ventrículo, de função contrátil e parede dupla constituída de um endocárdio interno, um epimiocárdio externo e separando esses dois tipos celulares uma matriz extracelular, chamada geleia cardíaca. O endocárdio irá formar o revestimento interno do coração e a camada mais externa formará o músculo cardíaco que pulsará por toda a vida. Logo, esse coração tubular se contorce formando uma estrutura em forma de S, seguindo-se o processo de convergência, que se caracteriza pela migração anterior do átrio comum e do seio venoso sobre os ventrículos, há ainda a formação do colchão endocárdico que divide o tubo nos canais atrioventriculares direito e esquerdo. O terceiro evento marca o posicionamento dos coxins do tronco arterial entre as valvas do canal atrioventricular, conhecido como encaixamento em cunha (FIGURA 5) (SADLER, 2013; GALO, 2015; KLOESEL; DINARDO; BODY, 2016).

FIGURA 5 – FORMAÇÃO DA CÂMARA CARDÍACA EM HUMANO



FONTE: GILBERT, 2003.

Chegando a este ponto encontramos um órgão mais complexo. A formação de um coração com as quatro câmaras cardíacas é acompanhado pelo estabelecimento da circulação coronária, formação de válvulas, septação e surgimento do sistema de condução e finalmente a formação do coração completamente funcional (OLIVEIRA, 2011).

3.8. O CORAÇÃO DE *Gallus gallus*

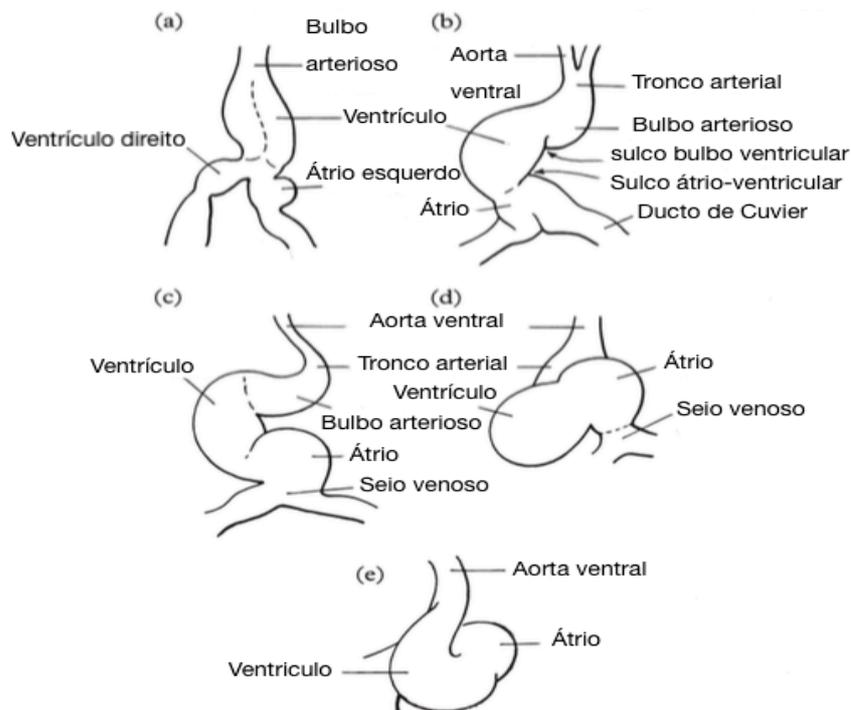
O desenvolvimento do coração de embrião de ave (FIGURA 6) possui uma conhecida similaridade com o desenvolvimento do coração humano, assim, são empregados como modelos experimentais para a ciência cardiovascular (RUIJTENBEEK et al., 2002).

O coração de ave provém de duas regiões simétricas do embrião, derivadas da mesoderme esplâncnica, começando a se desenvolver a partir dos estádios 9 (29-33 horas de incubação) ou 10 (33-38 horas de incubação) da classificação de Hamburger e Hamilton (1951). Uma vez formado, o coração inicialmente possui a forma de um tubo com duas camadas visíveis: o endocárdio (camada mais interna) e o epimiocardio (camada externa). Posteriormente, essas duas camadas se tornam o endocárdio, miocárdio e o epicárdio. Logo curva-se num formato de “S”, onde

primeiramente o tronco arterioso (vaso sanguíneo) e o ventrículo se tornam visíveis, em seguida o átrio e por último o seio venoso. O processo de dobramento do coração ocorre dos estádios 9 a 34 (8 dias), dividido em fase inicial (HH 9-24) e fase final da septação cardíaca (HH 24-34), e a circulação está bem estabelecida no estágio 16 (51-56 horas de incubação). A formação e o desenvolvimento do coração duram até as fases posteriores a eclosão do ovo (BELLAIRS; OSMOND, 2005; MARTINSEN, 2005).

O desenvolvimento cardíaco do embrião de galinha (*in vivo*) foi descrito pela primeira vez por Al Naieb et al. (2013), que caracterizou o coração no final da sístole e da diástole entre os estádios 12 (2º dia de incubação, caracterizado por um tubo cardíaco relativamente reto e contrações miocárdicas precoces) e 35 (9º dia de incubação, caracterizado por um coração com suas quatro câmaras formadas) da classificação de Hamburger-Hamilton (1951).

FIGURA 6 – FORMAÇÃO DA CÂMARA CARDÍACA EM *Gallus gallus*



FONTE: BELLAIRS; OSMOND, 2005

3.9. CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PELO PFOA

O desenvolvimento cardiovascular é conhecido como um processo complexo e delicado. Sendo assim, tal processo pode ser afetado pela exposição a

diversos elementos exógenos, como patógenos, drogas e poluentes ambientais, como o PFOA (JIANG et al., 2012; ZILE, 2010).

Foram observadas, alterações de vários parâmetros estruturais e funcionais do coração, incluindo uma diminuição da espessura da parede do ventrículo esquerdo, em embriões de ave com 19 dias de incubação (JIANG et al., 2012). Tal fato sugere uma cardiotoxicidade do PFOA, que pode chegar ao nível dos cardiomiócitos.

Apesar de não ser um dos primeiros sistemas afetados pela toxicidade do PFOA, foi encontrado também um aumento na incidência de doenças cardiovasculares (incluindo infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e angina) em adultos expostos ao PFOA em sua água potável (ANDERSON-MAHONEY et al., 2008).

3.10. MORFOMETRIA E ESTEREOLOGIA

A morfometria e estereologia são técnicas de medições e quantificações de estruturas biológicas, que possibilitam a comparação entre condições anatômicas e patológicas (PARDINI, ASSIS, 2005).

A morfometria é um método quantitativo bidimensional que utiliza uma ferramenta de calibração para a medição de objetos finos sob observação microscópica, determina comprimentos, perímetros e áreas. Já a estereologia é uma técnica que pode ser definida como um conjunto de procedimentos geométricos e estatísticos que permitem obter informações tridimensionais, a partir de medidas realizadas em imagens bidimensionais, como aquelas obtidas em cortes histológicos preparados para a microscopia de luz e eletrônica. Estima densidades como: densidade de volume (V_v), densidade de comprimento (L_v), densidade de superfície (S_v) e densidade numérica (N_v) (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

Pereira et al. (1998) comprovaram por meio dos estudos morfométricos e estereológicos que a inibição da síntese do óxido nítrico provoca modificações miocárdicas, analisando o peso cardíaco, as densidades de volume de cardiomiócitos e interstício cardíaco, densidade numérica e área transversal dos cardiomiócitos. Xavier-Vidal e Madi (1999) constataram, também por esses dois

métodos, que não há diferenças significativas nas estruturas miocárdicas dos ventrículos direito e esquerdo durante o 3º trimestre gestacional humano.

Desse modo assume-se que a morfometria e a estereologia apresentam dados quantitativos confiáveis sobre os componentes dos tecidos, sendo uma importante ferramenta para avaliar e determinar modificações miocárdicas, auxiliando a pesquisa na área cardíaca.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), sob os números 1006 e 23075.150528/2016-26.

4.1. MODELO ANIMAL

Os ovos fertilizados de galinha (*Gallus gallus*) foram fornecidos por uma empresa de avicultura localizada na região metropolitana de Curitiba. Foram selecionados ovos que estivessem entre 57g e 65g. Após, foram higienizados com etanol 70% e separados em seus devidos grupos experimentais.

4.2. DESENHO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos em 4 grupos (QUADRO 1): grupo controle veículo (soro fisiológico), e grupos contaminados 1, 2 e 3 (PFOA 5, 50 e 250 ng/mL, respectivamente). Estudos em desenvolvimento em nosso laboratório (Laboratório de Embriotoxicologia do Departamento de Biologia Celular da UFPR) mostram que não há diferença significativa entre os controles fechado (não injetado) e veículo (injetado com soro fisiológico). Assim, o controle fechado não foi usado por motivos éticos, reduzindo o número de indivíduos utilizados no experimento. Desta forma foram utilizados 5 embriões por grupo experimental, totalizando 20 ovos.

QUADRO 1 - GRUPOS EXPERIMENTAIS.

Grupos Experimentais	Ovos
Grupo Controle (C)	Injetados com 20 µL de soro fisiológico
Grupo Contaminado I (Ct-I)	Injetados com 20 µL de solução de PFOA 5 ng/mL
Grupo contaminado II (Ct-II)	Injetados com 20 µL de solução de PFOA 50 ng/mL
Grupo contaminado III (Ct-III)	Injetados com 20 µL de solução de PFOA 250 ng/mL

FONTE: A autora (2016).

QUADRO 2 - NÚMERO DE OVOS, PESO MÉDIO E DOSE MÉDIA INJETADA POR GRUPO EXPERIMENTAL.

Grupos Experimentais	Ovos	Média dos pesos (g)	Média da dose (g de contaminante/ g de ovo)
Grupo Controle (C)	5	61,580	---
Grupo Contaminado I (Ct-I)	5	61,024	$1,64 \times 10^{-12}$
Grupo contaminado II (Ct-II)	5	60,314	$1,65 \times 10^{-11}$
Grupo contaminado III (Ct-III)	5	61,502	$8,13 \times 10^{-11}$

FONTE: A autora (2016).

4.3. CONCENTRAÇÕES E QUANTIDADES

As concentrações utilizadas do PFOA foram definidas a partir de estudos que revelaram sua concentração no cordão umbilical humano, reproduzindo uma possível exposição pré-natal. Foi encontrada uma variação entre 0,36 a 5,44 ng/mL de PFOA no sangue fetal (MONROY et al., 2008; ARBUCKLE et al., 2013; HANSSEN et al., 2013; LEE et al., 2013; LIEN et al., 2013).

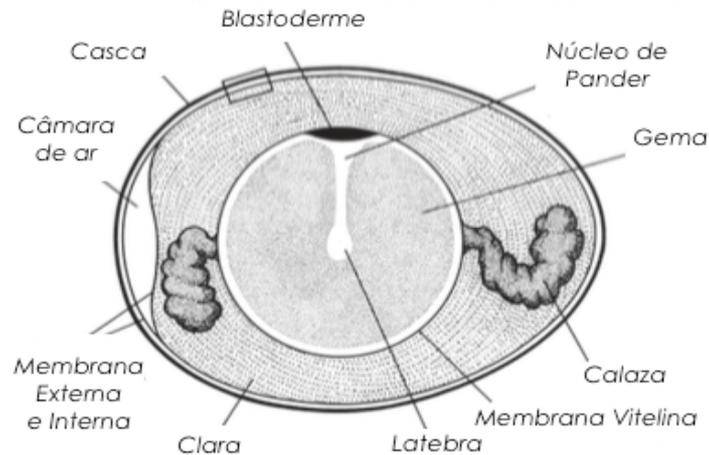
A quantidade de 20 µL injetada no ovo foi determinada basendo-se em um projeto de pesquisa em andamento no laboratório, respeitando a continuidade da metodologia empregada para PFOA.

4.4. EXPOSIÇÃO DO CONTAMINANTE

4.4.1. Injeção dos ovos

O ovo (FIGURA 7) tem sua casca revestida por uma membrana interna e uma membrana externa, entre elas está localizada a câmara de ar (BALÁŽ, 2014).

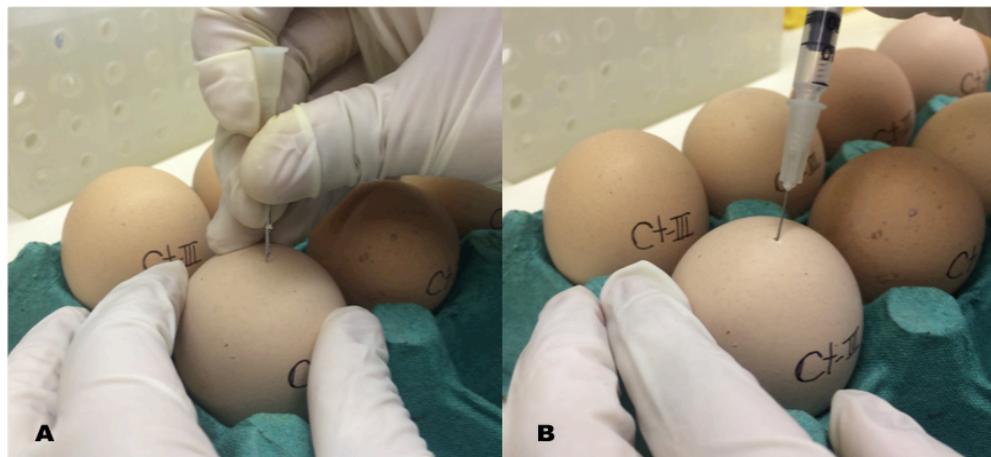
Figura 7 - CORTE SAGITAL DO OVO E SEUS COMPONENTES.



FONTE: BELLAIRS; OSMOND, 2005.

Os embriões foram expostos ao contaminante no fluxo laminar (no tempo E0 – anteriormente à incubação – para simular ao máximo a situação de exposição no ambiente), através de injeção, nas concentrações pré-estabelecidas, diretamente na câmara de ar (FIGURA 8), local que permite melhor dispersão do contaminante no embrião (YAMAMOTO et al., 2012).

FIGURA 8– INJEÇÃO DOS OVOS.



A: Abertura de um orifício para a entrada do contaminante com uma agulha mais grossa. B: Injeção do contaminante na câmara de ar do ovo, com agulha de insulina.

FONTE: A autora (2016)

Após a injeção, o orifício foi selado com fita adesiva e os ovos incubados em incubadora BOD (SL-224, SOLAB Científica) (FIGURA 10), em posições aleatórias,

com a câmara de ar voltada para cima, à $\pm 38^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 65 a 75%, por 7 dias. Os materiais utilizados na injeção do contaminante foram esterilizados no fluxo laminar, pela exposição à luz ultravioleta.

FIGURA 9 - POSICIONAMENTO ALEATÓRIO DOS OVOS INCUBADOS EM BOD



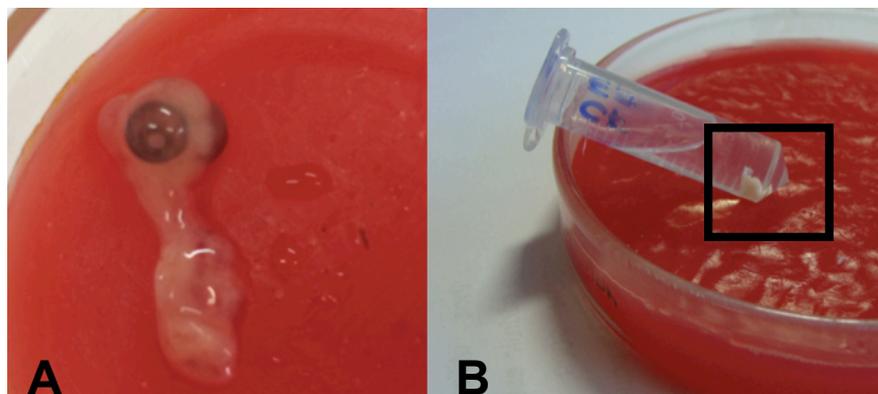
FONTE: A autora (2016).

4.5. HISTOLOGIA

4.5.1. Fixação

No sétimo dia de exposição, os ovos foram abertos e cuidadosamente os embriões removidos, suas membranas rapidamente rompidas (FIGURA 11A) e os corações excisados, lavados em solução salina 0,9% e fixados por 24h em solução fixadora (formalina 10%, neutra, tamponada). Após, os corações foram novamente lavados em solução salina e armazenados em álcool etílico 70% (FIGURA 11B), para a amostragem do tecido e realização das análises morfométricas e estereológicas.

FIGURA 10 – EMBRIÃO E CORAÇÃO DE *Gallus gallus*



(A) Embrião de *Gallus gallus* com 7 dias de incubação.
 (B) Eppendorf com o coração armazenado no álcool 70%.

FONTE: A autora (2016).

4.5.2. Inclusão

O processamento histológico dos corações (desidratação, diafanização e impregnação) ocorreu por um processador de tecidos automático (Thermo Scientific – Microm STP 120), (QUADRO 3). O material foi processado inteiro, na posição horizontal, com a parte ventral para cima.

QUADRO 3 - REAGENTES E SEUS TEMPOS USADOS NO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.

PASSO	ESTÁGIO	REAGENTE	DURAÇÃO
1	Desidratação	Álcool 70 %	Pernoite
2	Desidratação	Álcool 80 %	2 h.
3	Desidratação	Álcool 90 %	2 h.
4	Desidratação	Álcool 95 %	2 h.
5	Desidratação	Álcool 100 % - I	1,5 h.
6	Desidratação	Álcool 100 % - II	1,5 h.
7	Desidratação	Álcool 100 % - III	1,5 h.
8	Desidratação	Álcool 100 % + Xilol	1,5 h.
9	Clarificação	Xilol – I	40 min.
10	Clarificação	Xilol – II	30 min.
11	Clarificação	Xilol – III	15 min.
12	Impregnação	Paraplast – I	2 h.
13	Impregnação	Paraplast – II	2 h.

FONTE: A autora (2016).

Cada coração emblocado em Paraplast foi encaminhado à empresa RNA Consultoria Científica, onde foi submetido à microtomia para obtenção dos cortes

histológicos. Com uma avaliação prévia da altura ideal para as análises, os primeiros 100 cortes a partir do material foram dispensados. Em seguida, foram distendidos na lâmina 20 cortes consecutivos com 5 µm de espessura, corados com Hematoxilina-Eosina (H/E).

QUADRO 4 - REAGENTES E SEUS TEMPOS USADOS NA COLORAÇÃO DAS LÂMINAS

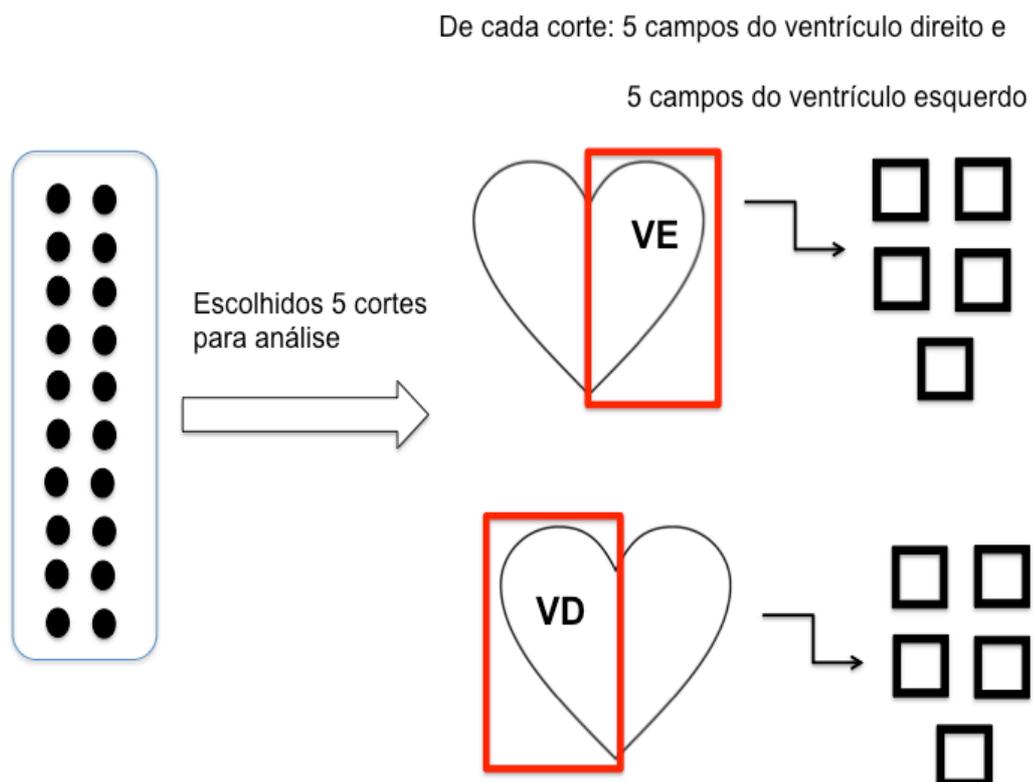
PASSO	DESCRIÇÃO	REAGENTE	DURAÇÃO
1	Submersão das lâminas	Xilol puro	6 min.
2	Submersão das lâminas	Álcool 100%	6 min.
3	Submersão das lâminas	Álcool 90 %	3 min.
4	Submersão das lâminas	Álcool 80 %	3 min.
5	Submersão das lâminas	Álcool 70%	3 min.
6	Lavar por técnica de imersão	Água destilada	2 vezes.
7	Submersão das lâminas	Hematoxilina de Harris	2 min.
8	Lavar	Água corrente	10 min.
9	Lavar por técnica de imersão	Água destilada	2 vezes.
10	Submersão das lâminas	Eosina	30 seg.
11	Submersão das lâminas	Álcool 95 %	3 min.
12	Submersão das lâminas	Álcool 100 % - I	3 min.
13	Submersão das lâminas	Álcool 100 % - II	3 min.
14	Submersão das lâminas	Álcool 100 % + Xilol	3 min.
15	Submersão das lâminas	Xilol - I	3 min.
14	Submersão das lâminas	Xilol - II	3 min.

FONTE: A autora (2016).

4.6. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E ESTEREOLÓGICAS

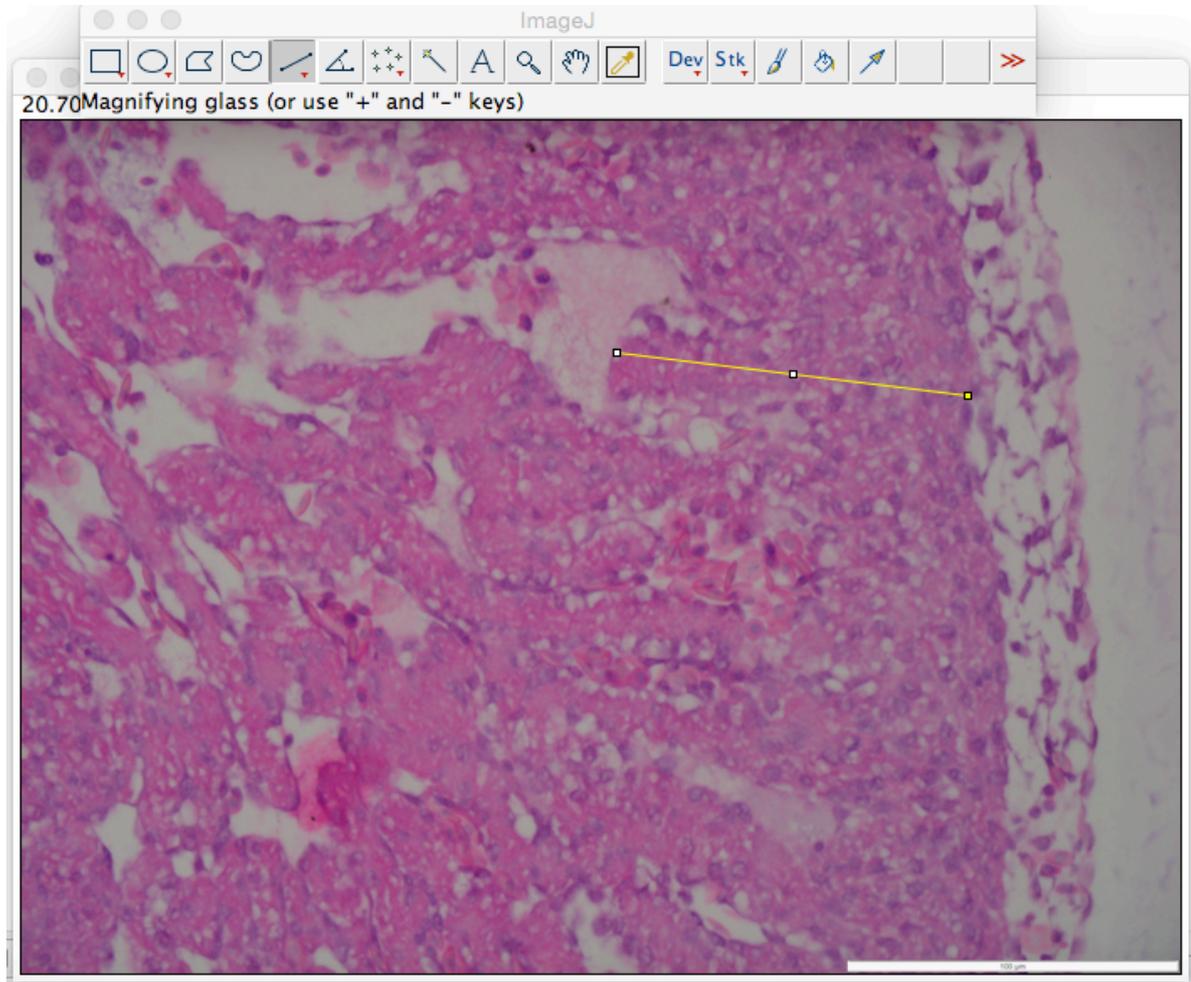
As imagens para as análises foram obtidas em aumento de 400 vezes, utilizando o microscópio BX51 (Olympus System Microscopes), equipado com o software de captura Cell[^]F (2008, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH), modelo de câmera acoplado DP72. De cada lâmina foram fotodocumentados com escala métrica 5 campos aleatórios do ventrículo direito e 5 campos aleatórios do ventrículo esquerdo de 5 cortes (FIGURA 12).

FIGURA 11 – ESQUEMA DA FOTODOCUMENTAÇÃO DOS CORTES



Para a morfometria, as imagens foram calibradas e a espessura das paredes do ventrículo direito e esquerdo analisadas por meio do programa computacional ImageJ (FIGURA 13). Assim, se obteve a média de 5 medidas da espessura da parede de um campo do ventrículo direito e um campo do ventrículo esquerdo de cada animal.

FIGURA 12- ANÁLISE MORFOMÉTRICA

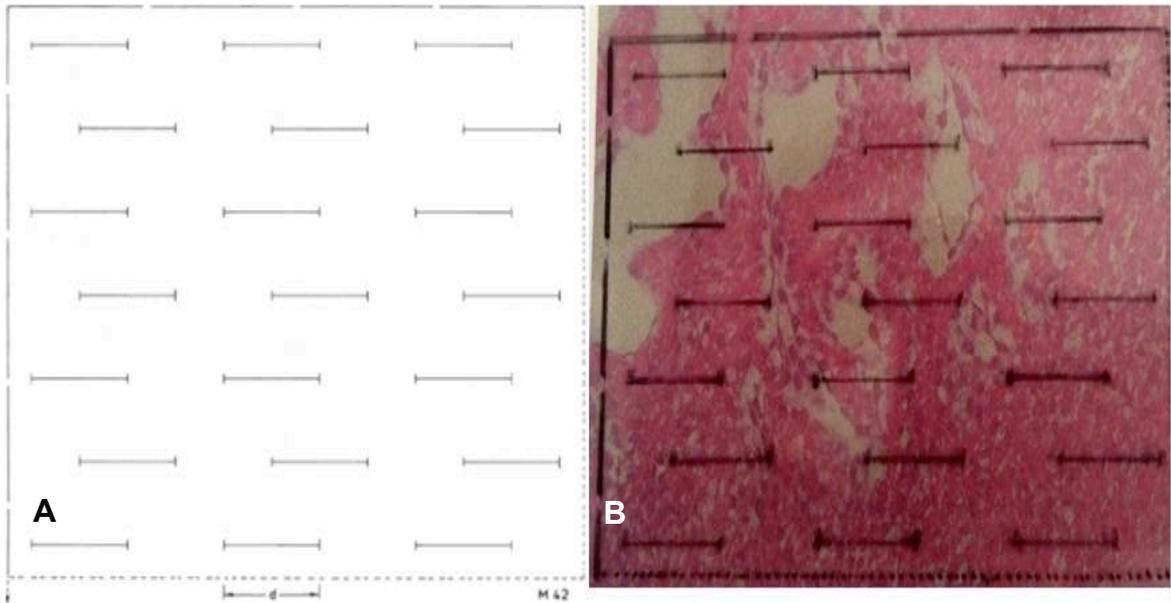


Medida da espessura da parede do ventrículo por meio de um segmento de reta do programa computacional ImageJ.

FONTE: A autora (2016).

Para determinar a tridimensionalidade do coração foi utilizado o método de contagem de pontos e de intersecções-teste, o sistema teste M42 (FIGURA 14), que apresenta 42 pontos-teste e 21 segmentos de reta, medindo a linha-teste 15 mm e a área-teste 5.100 mm² (Mandarim-de-Lacerda, 2003). Este sistema é superposto à imagem histológica para a contagem dos núcleos dos cardiomiócitos. O núcleo foi a estrutura escolhida para a contagem por sua melhor visualização na lâmina. Foram utilizadas as 5 imagens do ventrículo direito e as 5 imagens do ventrículo esquerdo de cada corte, sendo analisados 5 cortes por animal.

FIGURA 13- SISTEMA-TESTE M42.



(A) Modelo de grade utilizada na contagem dos cardiomiócitos.
 (B) Grade superposta à imagem histológica.

FONTE: A autora (2016).

Posteriormente, as imagens capturadas foram utilizadas para obtenção dos parâmetros estereológicos densidade volumétrica e densidade numérica dos cardiomiócitos.

A densidade de volume calcula a fração de volume ocupado pela estrutura de interesse em relação ao volume total. Para estimar a densidade de volume dos cardiomiócitos foi utilizada a equação:

$$Vv[\text{cardiom}] = \frac{Pp[\text{cardiom}]}{Pt}$$

Sendo Vv [cardiom] a densidade de volume; Pp [cardiom] o número de pontos sobre os cardiomiócitos e Pt o número total de pontos das estruturas. O resultado da análise Vv [cardiom] foi multiplicado por 100 para expressão em porcentagem.

A densidade numérica dos núcleos dos cardiomiócitos foi estimada pelo método disector, que é utilizado em quantificações estereológicas de cardiomiócitos (ÁQUILA et al., 1998).

A densidade numérica (Nv [cardiomiócito]) foi obtida por meio da soma dos núcleos dos cardiomiócitos na área teste, vistos no plano superior do corte ($\Sigma Q -$) obtido pela somatória dos volumes do disector (Vol (disector)).

O volume de cada disector representa a área-teste do plano superior ($A_t = 15.625 \mu\text{m}^2$) pela espessura de microtomia ($e = 5\mu\text{m}$).

$$Nv[\text{cardiom}] = \frac{\Sigma Q - A[\text{cardiom}]}{\text{Vol}[\text{disector}]}$$

$$\text{Vol}[\text{disector}] = e \cdot A_t$$

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística os dados coletados foram tabulados e analisados pelo software GraphPadPrism 7.0. Foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade e homogeneidade de variância das variáveis. Para identificar as diferenças estatísticas entre os grupos estudados, utilizou-se a análise de variância (ANOVA). O nível de significância adotado para todos os testes estatísticos foi 5% ($p < 0,05$).

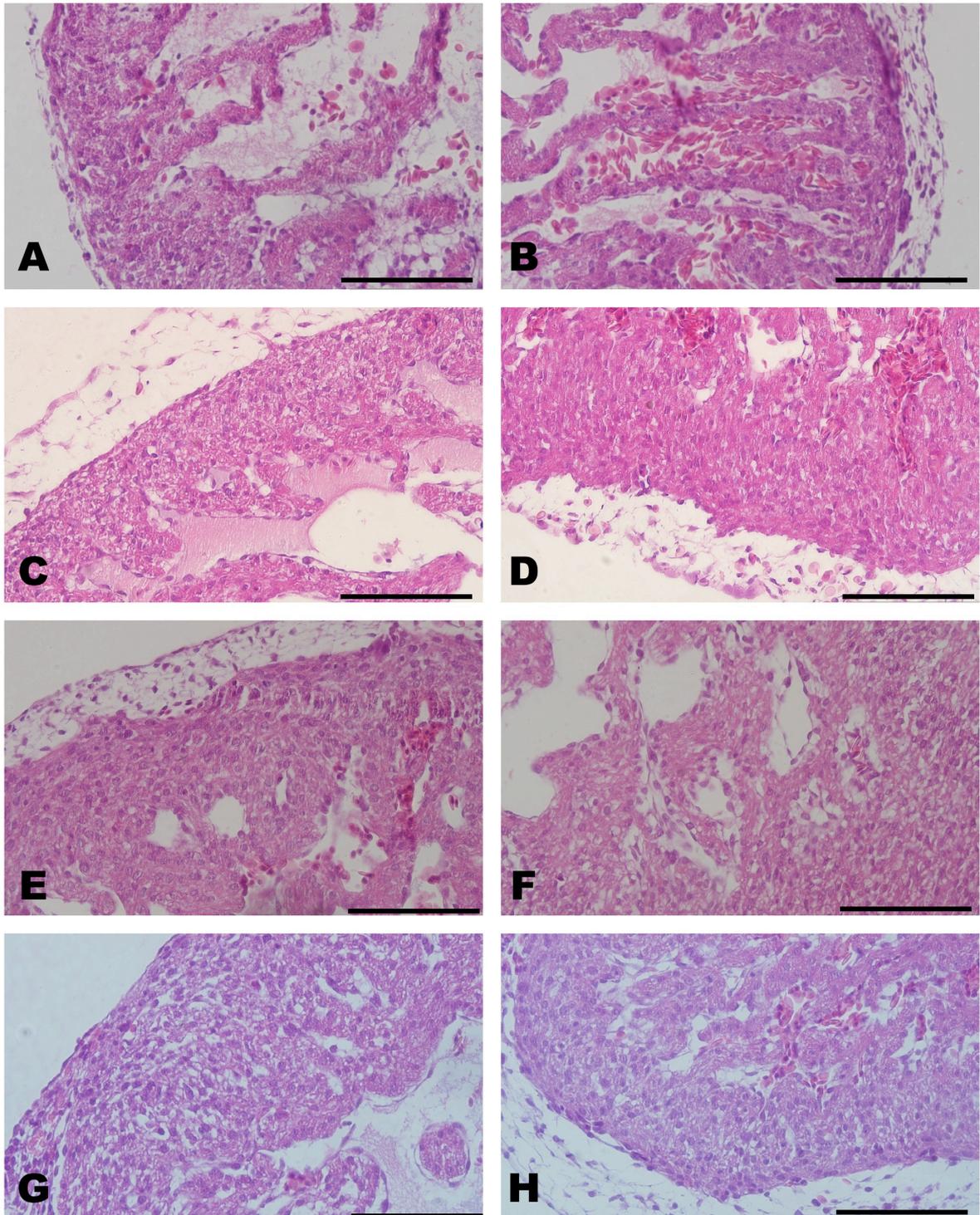
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de desenvolvimento embrionário da galinha e de eclosão do ovo apresentam períodos considerados críticos podendo ser influenciados por fatores endógenos e exógenos (DEWITT; MEYER; HENSHEL, 2005). Assim, a injeção de contaminantes como o PFOA pode trazer consequências para o organismo. No presente trabalho, a exposição ao PFOA foi realizada bem no início do desenvolvimento (fase de blastodisco), simulando ao máximo a situação no ambiente onde o contaminante está presente ininterruptamente desde a concepção até seu nascimento.

Os embriões de galinha são modelos de estudo muito utilizados por suas conhecidas vantagens, como facilidade de obtenção, praticidade na realização de experimentos e seu monitoramento, desenvolvimento curto (21 dias) e com períodos comparáveis ao desenvolvimento humano, como por exemplo, a formação do coração (RUIJTENBEEK, 2002; AL NAIEB, 2013). Essa similaridade é que torna o embrião de galinha um modelo promissor para explorar os efeitos de contaminantes no período embrionário e sua extrapolação à toxicidade humana (STERN, 2005). Porém, apesar destas vantagens, ocorreram certas dificuldades com o manuseio dos corações dos embriões de 7 dias, como sua dissecação e emblocagem devido a seu tamanho reduzido. Assim, é aconselhado a utilização de embriões em fases mais adiantadas do desenvolvimento para uma melhor avaliação dos efeitos do PFOA no coração.

A distribuição dos cardiomiócitos nos cortes histológicos do ventrículo direito e esquerdo dos embriões dos 4 grupos estudados, corados pela hematoxilina-eosina, pode ser visto na figura 15. Não foram observadas alterações morfológicas do coração entre os grupos controle e tratados.

FIGURA 14 – FOTOMICROGRAFIAS DOS VENTRICULOS DIREITO E ESQUERDO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.



A e B – Grupo controle: ventrículo direito e esquerdo, respectivamente; C e D – Grupo contaminado I (5 ng/mL): ventrículo direito e esquerdo, respectivamente; E e F – Grupo contaminado II (50 ng/mL): ventrículo direito e esquerdo, respectivamente; G e H – Grupo contaminado III (250 ng/mL): ventrículo direito e esquerdo, respectivamente. H&E, Barra: 100µm.

FONTE: A autora (2016).

As tabelas 1 e 2 mostram o resultado das medidas da espessura da parede

dos ventrículos direito e esquerdo, respectivamente, de cada grupo e a figura 16 os gráficos correspondentes. Nelas se observam que a média da espessura da parede dos ventrículos dos animais controle se encontra maior em relação ao coração dos contaminados, independente da concentração do contaminante. Porém, não houve diferença significativa entre os grupos.

TABELA 1– ESPESSURA DA PAREDE DO VENTRÍCULO DIREITO (MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA) (μm), O N UTILIZADO E O VALOR DO P ESTATÍSTICO.

ESPESSURA DA PAREDE DO VENTRÍCULO DIREITO						
Elemento histológico	Controle	PFOA 5 ng/mL	PFOA 50 ng/mL	PFOA 250 ng/mL	N	P
Músculo cardíaco – Ventrículo direito	106,4 ± 17,21	101,7 ± 12,42	103,7 ± 6,074	98,32 ± 8,161	5	0,9194

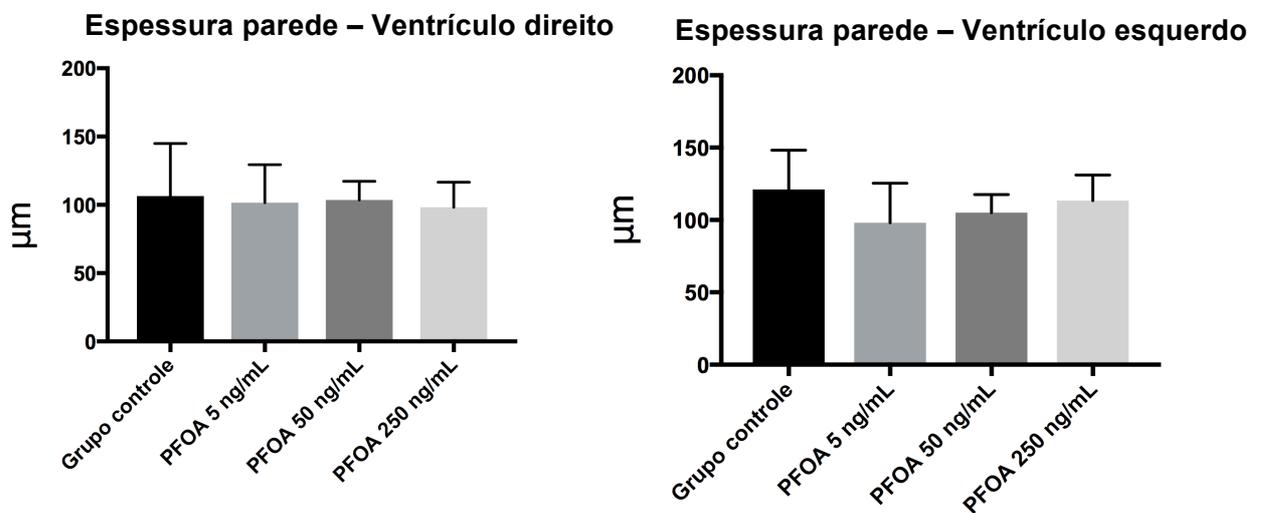
FONTE: A autora (2016).

TABELA 2 – ESPESSURA DA PAREDE DO VENTRÍCULO ESQUERDO (MÉDIA ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA) (μm), O N UTILIZADO E O VALOR DO P ESTATÍSTICO.

ESPESSURA DA PAREDE DO VENTRÍCULO ESQUERDO						
Elemento histológico	Controle	PFOA 5 ng/mL	PFOA 50 ng/mL	PFOA 250 ng/mL	N	P
Músculo cardíaco – Ventrículo esquerdo	121,1 ± 12,12	98,04 ± 12,21	104,8 ± 5,647	113,5 ± 7,861	5	0,4989

FONTE: A autora (2016).

FIGURA 15 - GRÁFICOS DA ESPESSURA DA PAREDE DOS VENTRÍCULOS DIREITO E ESQUERDO DO CORAÇÃO DE EMBRIÕES DE GALINHA COM 7 DIAS



Média e erro padrão dos 5 animais de cada grupo.

FONTE: A autora (2016).

As tabelas 3 e 4 mostram o resultado da análise da densidade de volume dos cardiomiócitos do ventrículo direito e esquerdo, demonstrando que não houve uma variação significativa da média entre os grupos experimentais.

TABELA 3- DENSIDADE DE VOLUME (%) DOS CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO DIREITO (MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA), O N UTILIZADO E O VALOR DO P ESTATÍSTICO.

DENSIDADE VOLUMÉTRICA (V_v) DO VENTRÍCULO DIREITO						
Elemento histológico	Controle	PFOA 5 ng/mL	PFOA 50 ng/mL	PFOA 250 ng/mL	N	P
Músculo cardíaco – Ventrículo direito	50,73 \pm 2,133	50,03 \pm 1,256	46,68 \pm 1,242	48,91 \pm 0,175	5	0,8540

FONTE: A autora (2016).

TABELA 4 - DENSIDADE DE VOLUME (%) DOS CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO (MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA), O N UTILIZADO E O VALOR DO P ESTATÍSTICO

DENSIDADE VOLUMÉTRICA (V_v) DO VENTRÍCULO ESQUERDO						
Elemento histológico	Controle	PFOA 5 ng/mL	PFOA 50 ng/mL	PFOA 250 ng/mL	N	P
Músculo cardíaco – Ventrículo esquerdo	49,29 \pm 2,136	49,98 \pm 1,256	53,33 \pm 1,242	51,10 \pm 0,175	5	0,0996

FONTE: A autora (2016).

Já as tabelas 5 e 6 mostram o resultado da análise da densidade numérica dos cardiomiócitos. Estes mesmos resultados são evidenciados sob a forma de gráficos na figura 17.

TABELA 5 - DENSIDADE NUMÉRICA (1/mm³) DOS CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO DIREITO (MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA), O N UTILIZADO E O VALOR DO P ESTATÍSTICO

DENSIDADE VOLUMÉTRICA (V_v) DO VENTRÍCULO DIREITO						
Elemento histológico	Controle	PFOA 5 ng/mL	PFOA 50 ng/mL	PFOA 250 ng/mL	N	P
Músculo cardíaco – Ventrículo direito	58050 \pm 5653	60829 \pm 1920	61192 \pm 2482	61192 \pm 1945	5	0,1242

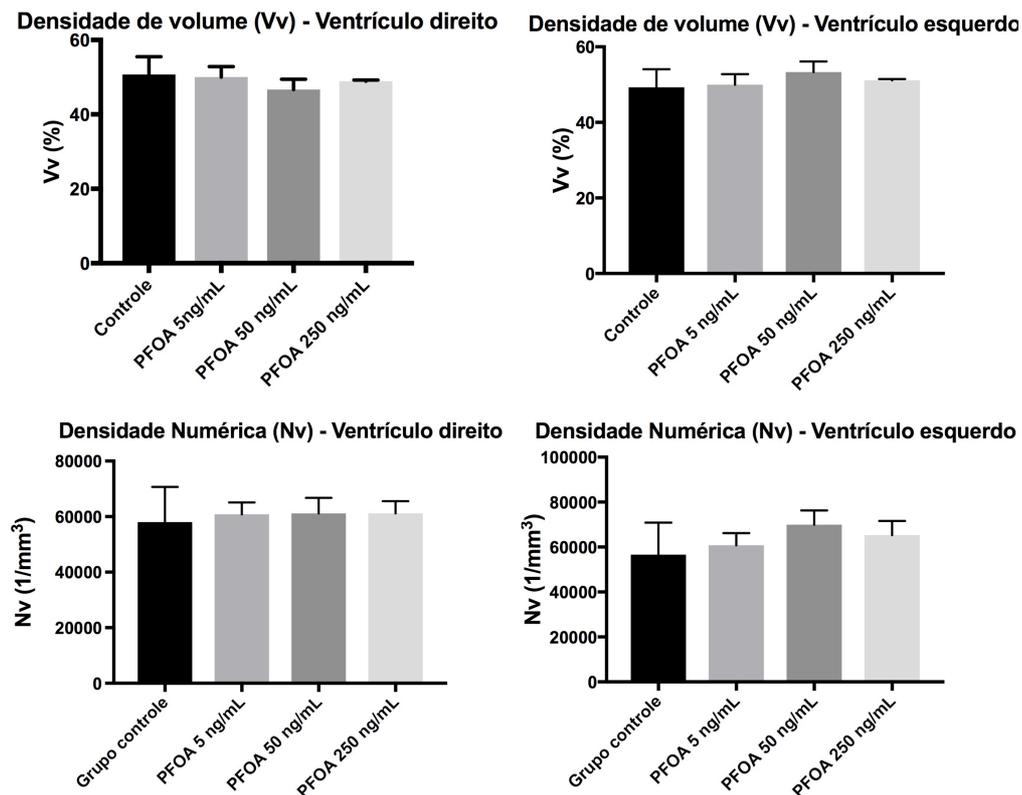
FONTE: A autora (2016).

TABELA 6 - DENSIDADE NUMÉRICA ($1/\text{mm}^3$) DOS CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO (MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA), O N UTILIZADO E O VALOR DO P ESTATÍSTICO

DENSIDADE VOLUMÉTRICA (Vv) DO VENTRÍCULO ESQUERDO						
Elemento histológico	Controle	PFOA 5 ng/mL	PFOA 50 ng/mL	PFOA 250 ng/mL	N	P
Músculo cardíaco – Ventrículo esquerdo	56661 \pm 6370	60829 \pm 2403	69925 \pm 2860	65294 \pm 2848	5	0,1242

FONTE: A autora (2016).

FIGURA 16– GRÁFICOS DA DENSIDADE VOLUMÉTRICA (Vv) E DENSIDADE NUMÉRICA (Nv) DE CARDIOMIÓCITOS NO CORAÇÃO DE EMBRIÕES DE GALINHA COM 7 DIAS DE INCUBAÇÃO



FONTE: A autora (2016).

Em um dos poucos trabalhos encontrados relacionando o PFOA com alterações no coração de ave foi observada uma diminuição da espessura da parede ventricular direita e uma hipertrofia na parede ventricular esquerda (Jiang et al., 2012). Há, porém, uma dificuldade em comparar tais resultados com os encontrados

neste trabalho devido a diferenças no estágio de desenvolvimento do embrião (19 dias X 7 dias), da dose utilizada (0,5 a 2 mg/kg X $1,64 \cdot 10^{-12}$ a $8,13 \cdot 10^{-11}$ g/g) e da metodologia aplicada (análise morfométrica por meio do Adobe Photoshop e ultrassom X análise morfométrica por meio do ImageJ e análise estereológica).

Assim, a dose injetada de PFOA (considerada baixa em relação a alguns trabalhos), o curto tempo de incubação - 7 dias - (que pode ter ocultado possíveis efeitos do PFOA sobre o coração), e o pequeno número de indivíduos (para a análise estatística) podem ter contribuído com o fato de não terem sido encontradas diferenças significativas sobre a medida da espessura da parede dos ventrículos e nem sobre as densidades volumétrica e numérica dos cardiomiócitos do grupo controle e dos contaminados pelo PFOA. Apesar disso, não se pode excluir o possível efeito tóxico do PFOA, ressaltando a necessidade de maiores investigações para entender suas consequências sobre o coração e o organismo como um todo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sobre os efeitos da ação do ácido perfluorooctanóico (PFOA) em coração de embriões de *Gallus gallus*, com 7 dias de incubação, permitiram concluir que:

- Até essa fase de desenvolvimento, o PFOA não interferiu na espessura da parede dos ventrículos, bem como na densidade volumétrica e numérica dos cardiomiócitos.
- Há a necessidade de pesquisas adicionais para investigar os efeitos do contaminante PFOA no sistema cardiovascular dos organismos em fases mais avançadas do desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for perfluoroalkyls**. Atlanta, 2015. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp200.pdf>>. Acesso em: 04/04/2016.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Health consultation: exposure investigation report Perfluorochemical serum sampling in the vicinity of Decatur, Alabama Morgan, Lawrence, and Limestone Counties**. Atlanta, 2013. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/pha/Decatur/Perfluorochemical_Serum%20Sampling.pdf>. Acesso em: 02/10/2016.

AL NAIEB, S.; HAPPEL, C. M.; YELBUZ, T. M. A detailed atlas of chick heart development *in vivo*. **Annals of Anatomy**, volume 195, p. 324–341, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0940960212001665>>. Acesso em: 10/04/2016.

ALI LAGHAR et al. Effect of Arsenic on early chick development. **International Journal of Sciences: Basic and Applied Research**, v.0, n.1. 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/271199046_Effect_of_Arsenic_on_Early_Chick_Development>. Acesso em: 05/11/2016.

ANDERSEN, M. E. et al. Perfluoroalkyl acids and related chemistries-toxicokinetics and modes of action. **Toxicol Sci**, v. 102, n. 1, p. 3-14, Mar 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18003598>>. Acesso em: 20/03/2016.

ANDERSON-MAHONEY, P. et al. Self-reported health effects among community residents exposed to perfluorooctanoate. **New Solut**, v. 18, n. 2, p. 129-43, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511391>>. Acesso em: 15/03/2016.

ÁQUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; APFEL, M. I. R. Estereologia do miocárdio de ratos jovens e idosos. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 70, n. 2, p. 105-109, 1998. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abc/v70n2/3369.pdf>>. Acesso em: 10/10/2016.

ARBUCKLE, T. E. et al. Umbilical cord blood levels of perfluoroalkyl acids and polybrominated flame retardants. **Int J Hyg Environ Health**, v. 216, n. 2, p. 184-94, Mar 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22494936>>. Acesso em: 20/05/2016.

BALÁŽ, M. Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. **Acta Biomater**, v. 10, n. 9, p. 3827-43, Sep 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681370>>. Acesso em: 20/05/2016.

BELLAIRS, R; OSMOND, M. Heart, Blood Vessels and Lymphatics. In: **The Atlas of Chick Development**. Londres, Reino Unido: Elsevier Academic Press, 2005, p. 45-58.

BERNE R. M; LEVY M. N. **Cardiovascular Physiology**. 8^a edição. Mosby, 2001.

BIEGEL, L. B. et al. Mechanisms of extrahepatic tumor induction by peroxisome proliferators in male CD rats. **Toxicol Sci**, v. 60, n. 1, p. 44-55, Mar 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222872>>. Acesso em: 18/05/2016.

CALAFAT, A. M. et al. Polyfluoroalkyl Chemicals in the U.S. Population: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003–2004 and Comparisons with NHANES 1999–2000. **Environmental Health Perspectives**, Atlanta, USA, v.115, n.11, p.1596-1602, Novembro 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2072821/pdf/ehp0115-001596.pdf>>. Acesso em: 26/04/2016.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. **Mar Pollut Bull**, v. 44, n. 1, p. 7-15, Jan 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11883685>>. Acesso em: 10/02/2016.

CHCKNS - making chickens cool again!. Disponível em: <<http://chckns.com/wp-content/uploads/2015/06/chicken-vs-egg-prices-690x690.jpg>>. Acesso em: 20/11/2016.

DE BOER, J. et al. United Nations Environment Programme Capacity Building Pilot Project--training and interlaboratory study on persistent organic pollutant analysis under the Stockholm Convention. **Anal Chim Acta**, v. 617, n. 1-2, p. 208-15, Jun 2008. ISSN 1873-4324. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486660>>. Acesso em: 15/02/2016.

DeRUITER, C.; DOTY, M. Gastrulation in *Gallus gallus* (Domestic Chicken). **Embryo Project Encyclopedia**. Arizona State University: School of Life Sciences. Center for Biology and Society, 2011. Disponível em: <<http://embryo.asu.edu/handle/10776/2282>>. Acesso em: 18/05/2016.

DEWITT, J. C.; MEYER, E. B.; HENSHEL, D. S. Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of injection day. *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 48, n. 2, p. 270–7, 2005.

GALO, A. L. M. **Projeto de extensão Da Célula ao Sistema – uma abordagem interdisciplinar entre Embriologia, Biologia Celular e Molecular**. Universidade Federal Fluminense no Polo Universitário de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://www.dacelulaaosistema.uff.br/?p=602>>. Acesso em: 13/11/2016.

GILBERT, S.F. **Biologia do desenvolvimento**. 5. ed. - Ribeirão Preto, SP:FUNPEC Editora, 2003.

GLASSMEYER, S.T. The cycle of emerging contaminants. *Water resources impact*, v. 9, n.3, p. 5-7, 2007.

GROUP., B. D. W. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clin Pharmacol Ther**, v. 69, n. 3, p. 89-95, Mar 2001.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11240971>>. Acesso em: 02/04/2016.

GUPTA, C. R. **Reproductive and Developmental Toxicology**. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123820327100013>>. Acesso em 15/04/2016.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. Tratado de Fisiologia Médica. 12.ed, Rio de Janeiro. Elsevier, 2011.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of morphology**, v. 88, n. 1, 1951. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1304821>>. Acesso em: 10/03/2016.

HANSSEN, L. et al. Partition of perfluoroalkyl substances (PFASs) in whole blood and plasma, assessed in maternal and umbilical cord samples from inhabitants of arctic Russia and Uzbekistan. **Sci Total Environ**, v. 447, p. 430-7, Mar 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410865>>. Acesso em: 20/06/2016.

HILL, M. A. Embryology Cardiovascular System - Heart Histology. October 30, 2016. Disponível em: <https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Cardiovascular_System_-_Heart_Histology>. Acesso em: 15/10/2016.

HISTOLOGYOLM. **Histology of the Heart Wall**. 2009. Ilustração. Disponível em: <<http://histologyolm.stevegallik.org/node/347>>. Acesso em: 13/11/2016.

HOLT, E. A; MILLER, S. W. Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. **Nature Education Knowledge**. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/bioindicators-using-organisms-to-measure-environmental-impacts-16821310>>. Acesso em: 10/04/2016.

HUMANDIAGRAM. **Heart Diagram**. July, 2015. Ilustração. Disponível em: <<http://humandiagram.info/using-simple-heart-diagram-learning-medium-for-kids/>>. Acesso em: 13/11/2016.

JIANG, Q. et al. Perfluorooctanoic acid induces developmental cardiotoxicity in chicken embryos and hatchlings. **Toxicology**, v. 293, n. 1-3, p. 97-106, Mar 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273728>>. Acesso em: 05/02/2016.

JIANG, Q. et al. Perfluorooctanoic acid-induced toxicity in primary cultures of chicken embryo cardiomyocytes. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 11, p. 1580-1590. Jun 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26098785>>. Acesso em: 05/02/2016.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. Sistema circulatório. In:_____. **Histologia Básica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 199-216.

KAIN, K. H. et al. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. **Developmental Dynamics**, v. 253, n. 2, p. 216-228. Feb 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4164046/pdf/nihms-553475.pdf>>. Acesso em: 19/07/2016.

KLOESEL, B; DINARDO J, A; BODY S. C. Cardiac Embryology and Molecular Mechanisms of Congenital Heart Disease – A Primer for Anesthesiologists. **AnesthAnalg**, v. 123, n. 3, p. 551-569. Set 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27541719>>. Acesso em: 13/11/2016.

KNEPPER, T. P.; LANGE, F.T. **Polyfluorinated chemicals and transformation products**. Vol 17. 2012. Disponível em: <<http://dlib.bpums.ac.ir/multiMediaFile/20774365-4-1.pdf#page=40>>. Acesso em: 10/04/2016.

LAU, C. et al. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. **Toxicol Sci**, v. 99, n. 2, p. 366-94, Oct 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17519394>>. Acesso em: 13/04/2016.

LEE, Y. J. et al. Concentrations of perfluoroalkyl compounds in maternal and umbilical cord sera and birth outcomes in Korea. **Chemosphere**, v. 90, n. 5, p. 1603-9, Feb 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990023>>. Acesso em: 24/05/2016.

LIEN, G. W. et al. Neonatal-maternal factors and perfluoroalkyl substances in cord blood. **Chemosphere**, v. 92, n. 7, p. 843-50, Aug 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23689097>>. Acesso em: 21/06/2016.

LINDSTROM, A. B.; STRYNAR, M. J.; LIBELO, E. L. Polyfluorinated compounds: past, present, and future. **Environ Sci Technol**, v. 45, n. 19, p. 7954-61, Oct 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21866930>>. Acesso em: 28/04/2012.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 4, p. 469-86, Dec 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14605681>>. Acesso em: 14/06/2016.

MARTINSEN, B. J. Reference Guide to the Stages of Chick Heart Embryology. **Developmental dynamics**, v. 233, p. 1217-1237, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.20468/epdf>>. Acesso em: 10/04/2016.

MONROY, R. et al. Serum levels of perfluoroalkyl compounds in human maternal and umbilical cord blood samples. **Environ Res**, v. 108, n. 1, p. 56-62, Sep 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18649879>>. Acesso em: 20/03/2016.

MOORE, B. Overview Of Perfluorooctanoic Acid. **Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy**, v. 12, Article 32, 2007. Disponível em: <<http://scholarworks.umass.edu/soilsproceedings/vol12/iss1/32>>. Acesso em: 24/11/2016.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Embriologia básica. 8ª Edição. Elsevier, 2013

MOORE, M. N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. **Aquat Toxicol**, v. 59, n. 1-2, p. 1-15, Sep 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088630>>. Acesso em: 11/05/2016.

MUNSCHY, C. et al. Persistent Organic Pollutants in *albacore tuna (Thunnus alalunga)* from Reunion Island (Southwest Indian Ocean) and South Africa in relation to biological and trophic characteristics. **Environ Res**, v. 148, p. 196-206, Apr 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27084988> >. Acesso em: 7/03/2016.

OLSEN, G. W. et al. An epidemiologic investigation of reproductive hormones in men with occupational exposure to perfluorooctanoic acid. **J Occup Environ Med**, v. 40, n. 7, p. 614-22, Jul 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9675720> >. Acesso em: 19/02/2016.

OLIVEIRA, B de. **Estudo do potencial vascular de precursores de vasos coronários em sítio adulto**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

OPEN CHEMISTRY DATABASE: Perfluorooctanoic acid. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pentadecafluorooctanoic_acid#section=Top>. Acesso em: 22/05/2016.

PARDINI, L. C.; ASSIS G F. Metodologia Básica: Morfometria e Estereologia (Conhecimentos Básicos). **Rev. Bras Teleodonto**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 17-24, jan./fev., 2005. Disponível em: <

https://www.researchgate.net/publication/242643408_Metodologia_Basica_Morfometria_e_Estereologia_Conhecimentos_Basicos_BasicMethodologyMorphometryStereologyBasicsKnowledges>. Acesso em: 20/11/1993.

PEREIRA, L. M. M; VIANNA, G. M. M; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Morfologia e Estereologia do Miocárdio em Ratos Hipertensos. Correlação com o Tempo de Inibição da Síntese do ÓxidoNítrico. **Arq. Bras Cardiol**, v. 70, n. 6, p. 397-402, 1998. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/abc/v70n6/3315.pdf>>. Acesso em: 20/06/16.

PINKAS, A. et al. Neurobehavioral teratogenicity of perfluorinated alkyls in an avian model. **Neurotoxicol Teratol**, v. 32, n. 2, p. 182-6, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945530> >. Acesso em: 15/08/2016.

PFOA PROPOSED FOR LISTING UNDER THE STOCKHOLM CONVENTION. 01/09/2015. Disponível em: <https://www.thereachcentre.com/site/chemtrac_alerts.php?article=390>. Acesso em: 15/04/2016.

PORPORA, M. G. et al. Placental transfer of persistent organic pollutants: a preliminary study on mother-newborn pairs. **Int J Environ Res Public Health**, v. 10, n. 2, p. 699-711, Feb 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435591> >. Acesso em: 12/05/2016.

POST, G. B.; COHN, P. D.; COOPER, K. R. Perfluorooctanoic acid (PFOA), an emerging drinking water contaminant: a critical review of recent literature. **Environ Res**, v. 116, p. 93-117, Jul 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22560884> >. Acesso em: 20/05/2016.

RIVERO, L. B. D. et al. Ação do Acetato de Chumbo sobre o Padrão de Desenvolvimento de Embriões de *Gallus domesticus*. **J. Braz. Soc. Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, 2006.

RUIJTENBEEK, K.; DE MEY, J. G.; BLANCO, C. E. The chicken embryo in developmental physiology of the cardiovascular system: a traditional model with new possibilities. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 283, n. 2, p. 549 - 550, Aug 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12162280>>. Acesso em: 25/05/2016.

SADLER, Thomas W. **Langman embriologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

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

SHABALINA, I. G. et al. The Environmental Pollutants Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorooctanoic Acid Upregulate Uncoupling Protein 1 (UCP1) in Brown-Fat Mitochondria Through a UCP1-Dependent Reduction in Food Intake. **Toxicol Sci**, v. 146, n. 2, p. 334-43, Aug 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26001964> >. Acesso em:19/04/2016.

SORENSEN, J. P. R.; LAPWORTH, D. J.; NKHUWA, D. C. W.; STUART, M. E.; GODDY, D. C.; BELL, R. A.; CHIRWA, M.; KABIKA, J.; LIEMISA, M.; CHIBESA, M.; PEDLEY, S. Emerging contaminants in urban groundwater sources in Africa. *Water research*, v. 72, p. 51-63, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135414005569>>. Acesso em: 20/09/2016.

STEENLAND, K.; FLETCHER, T.; SAVITZ, D. A. Epidemiologic evidence on the health effects of perfluorooctanoic acid (PFOA). **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 8, p. 1100-8, Aug 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20423814>>. Acesso em: 15/04/2016.

STEIL, G. J. Teratogênese e estresse oxidativo em embriões de gallusgallus expostos ao cádmio. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

STERN, C. D. The chick; a great model system becomes even greater. **Dev Cell**, v. 8, n. 1, p. 9-17, Jan 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15621526>>. Acesso em: 10/04/2016.

STUPAK, C. et al. O cobre e seus efeitos sobre o desenvolvimento embrionário de ave. 2012. Disponível em: <http://www.infoteca.inf.br/ecotox/smarty/templates/arquivos_template/upload_arquivos/acervo/docs/526.pdf>. Acesso em: 13/06/2016.

THOMPSON, J.; HIPWELL, E.; LOO, H. V.; BANNIGAN, J. Effects of cadmium on cell death and cell proliferation in chick embryos. *Reproductive Toxicology*, v. 20, p. 539- 548, 2005.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **PFOA Stewardship Program Commitments**. Washington, 25, Jan. 2006. 2f.

VAALGAMAA, S; VÄHÄTALO, A. V; PERKOLA, N; HUHTALA S. Photochemical reactivity of perfluorooctanoic acid (PFOA) in conditions representing surface water. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 16, p. 3043 – 3048, 2011. Disponível em:<http://ac.elscdn.com/S0048969711003937/1s2.0S0048969711003937main.pdf?_tid=990626d6b2a011e68efb00000aacb362&acdnat=1480031531_4875f7aa44d852e105c527a910b020b5>. Acesso em: 24/11/2016.

VODELA, J. K. Drinking water contaminants (arsenic, cadmium, lead, benzene and trichloroethylene). 2. Effects on reproductive performance, egg quality, and embryo toxicity in broiler breeders. **Poultry Science**, v. 76, n.11, p. 1474 – 1492, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9355140>>. Acesso em: 12/09/2016.

XAVIER-VIDAL, R.; MADI, K. Comparação entre os Miocárdios Ventrículos Direito e Esquerdo durante Período Fetal Humano. Uma Avaliação Estereológica. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 72, n. 5, p. 581-586, 1999. Disponível em: <<http://publicacoes.cardiol.br/abc/1999/7205/72050005.pdf>>. Acesso em: 20/06/16.

WELLS, P. G.; LEE, C. J.; MCCALLUM, G. P.; PERSTIN, J. HARPER, P. A. Receptor- and reactive intermediate-mediated mechanisms of teratogenesis. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 196, p.131–162, 2010.

WOLF, C. J. et al. Developmental toxicity of perfluorooctanoic acid in the CD-1 mouse after cross-foster and restricted gestational exposures. **Toxicol Sci**, v. 95, n. 2, p. 462-73, Feb 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098816>>. Acesso em: 18/03/2016.

WÖHRNSCHIMMEL, H. et al. Ten years after entry into force of the Stockholm Convention: What do air monitoring data tell about its effectiveness?. **Environ Pollut**, Mar 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27015905>>. Acesso em: 18/06/2016.

YAMAMOTO, F. Y. et al. Cadmium effects on early development of chick embryos. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 34, n. 2, p. 548-55, Sep 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22824502>>. 10/06/2016.

YANAI, J. et al. Exposure of developing chicks to perfluorooctanoic acid induces defects in prehatch and early posthatch development. **J Toxicol Environ Health A**, v. 71, n. 2, p. 131-3, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18080903>>. Acesso em: 10/05/2016.

ZHENG, X. M. et al. Effects of perfluorinated compounds on development of zebrafish embryos. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 19, n. 7, p. 2498-505, Aug 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22828880>>. Acesso em: 15/05/2016.

ZILE, M. H. Vitamin A-not for your eyes only: requirement for heart formation begins early in embryogenesis. **Nutrients**, v. 2, n. 5, p. 532-50, May 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254040>>. Acesso em: 13/06/2016.