

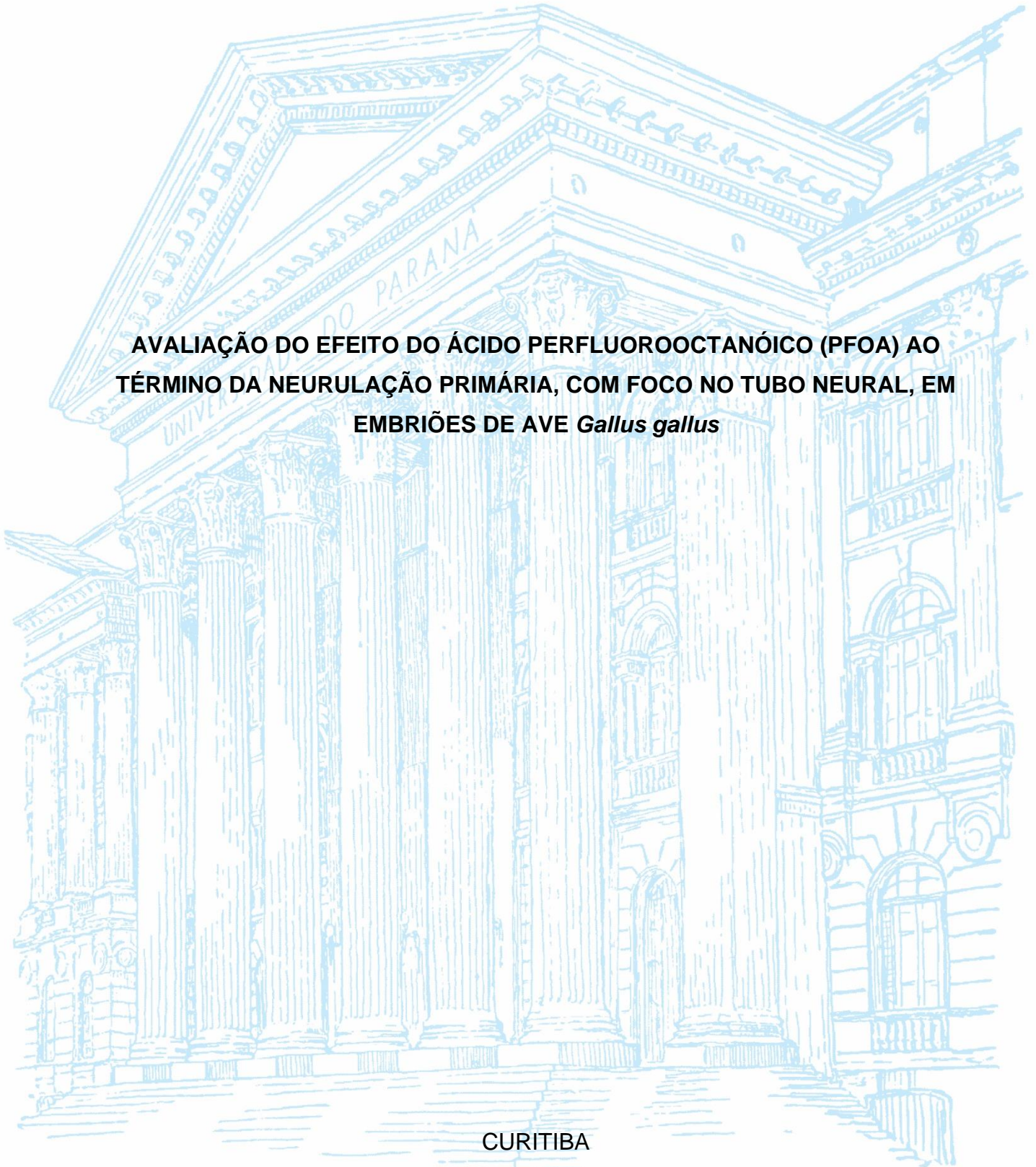
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAÍS PEREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO PERFLUOROCTANÓICO (PFOA) AO
TÉRMINO DA NEURULAÇÃO PRIMÁRIA, COM FOCO NO TUBO NEURAL, EM
EMBRIÕES DE AVE *Gallus gallus***

CURITIBA

2021



THAÍS PEREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO PERFLUOROOCETANÓICO (PFOA) AO
TÉRMINO DA NEURULAÇÃO PRIMÁRIA, COM FOCO NO TUBO NEURAL, EM
EMBRIÕES DE AVE *Gallus gallus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Claudia Feijó Ortolani-Machado

Coorientador(a): Ms. Melyssa Kmecick

CURITIBA

2021

TERMO DE APROVAÇÃO

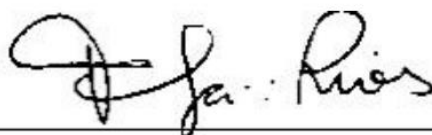
THAÍS PEREIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO PERFLUOROCTANÓICO (PFOA) AO TÉRMINO DA NEURULAÇÃO PRIMÁRIA, COM FOCO NO TUBO NEURAL, EM EMBRIÕES DE AVE *Gallus gallus*.

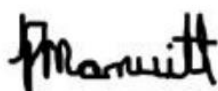
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina, pela seguinte banca examinadora:



Profa. Dra. Claudia F. Ortolani-Machado



Profa. Dra. Flavia Sant'Anna Rios



Dra. Patricia Elena Manuitt Brito

Curitiba, 15 de dezembro de 2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todo amparo e graça a mim concedidos, dia após dia.

Agradeço aos meus pais, que deram todo apoio e tempo necessários para que eu descobrisse o que de fato gostaria de fazer na minha vida. Por terem dedicado seu tempo para me dar carinho e atenção quando precisei e até mesmo por terem aguentado minhas crises durante todos esses anos de graduação. Obrigada por terem entendido o quão importante era eu passar noites, finais de semana e feriados estudando, hoje sabem com toda certeza que tudo valeu a pena.

Ao meu irmão quero agradecer por sempre estar disposto a me ajudar no que fosse preciso, por tentar me distrair nos momentos que estavam puxados e por toda parceria.

Agradeço aos amigos da vida, que sempre entenderam todas as loucuras e correrias da faculdade, mas que mesmo assim não deixaram de estar ao meu lado, me escutando, dando força e apoio em cada decisão importante tanto no curso, quanto na vida; agradeço por sempre estarem presentes.

Em cada instante da faculdade eu tive um tipo de ajuda, que veio de lugares muitas vezes inesperados, e esse agradecimento eu dedico aos meus colegas e amigos que tive a chance de fazer durante esses anos. Aos professores que foram exemplo de profissionais, mas também de ótimas pessoas, que me ensinaram tudo o que eu sei hoje e que me mostraram o quão fantástico é você se dedicar àquilo que ama. Agradeço também às coordenadoras e ao secretário do curso de Biomedicina, que de alguma forma sempre me atenderam gentilmente, tentando encontrar uma solução para todas as questões que eu levei.

Agradeço a professora Claudia por ter aceito ser minha orientadora, por todos os ensinamentos e por seu exemplo. Agradeço, especialmente, a Melyssa, minha coorientadora, pela força, incentivo e cuidado.

Agradeço ao pessoal do laboratório de Embriotoxicologia, pela oportunidade de participar de cada etapa. Todos se preocuparam em me ensinar de forma enriquecedora todas as etapas e cada um dos porquês que eu levantei. Obrigada, Mariliza, por todo carinho e ajuda.

Esse trabalho não teria sido possível sem a participação de cada um de vocês. Agradeço com todo meu CORAÇÃO!

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós,
não nos deixam sós. Deixam um pouco de
si, levam um pouco de nós.”*

- Antoine de Saint Exupéry

RESUMO

O ácido perfluorooctanóico (PFOA) é um composto presente no ambiente, persistente e bioacumulável. A exposição a esse contaminante durante o período de desenvolvimento embrionário pode levar a diversas malformações. A literatura nos fornece subsídios para assumir que o PFOA pode interferir nos processos de neurulação e, assim, originar alterações no tubo neural (TN). Sendo assim, estudar os possíveis efeitos neurotóxicos do PFOA no desenvolvimento é de grande importância. Por essa razão, esse estudo visou avaliar o efeito do PFOA ao término da neurulação primária, com foco no TN, em embriões de ave (*Gallus gallus*). Foram utilizados quatro grupos experimentais, sendo um controle (solução salina) e três grupos expostos ao PFOA, nas concentrações de 0,5 ng.ml⁻¹, 5 ng.ml⁻¹ e 50 ng.ml⁻¹. O contaminante foi inserido na câmara de ar e os ovos incubados até atingirem o estágio HH18, quando a neurulação primária já finalizou. Em seguida, os embriões foram coletados, estadiados, fixados, emblocados em historesina, cortados, corados com hematoxilina e eosina e analisados. Em todos os grupos expostos, foram visualizadas alterações no TN, como malformações estruturais, presença de células apoptóticas e fragmentos celulares, no neuroepitélio e no lúmen do TN na região do tronco e na região das vesículas encefálicas. Além disso, foi observada uma relação entre a exposição ao PFOA e as alterações encontradas no TN do tronco dos embriões ao fim da neurulação primária. Devido a isso, o foco de pesquisa é muito promissor, pois, a partir dos resultados aqui apresentados, é possível planejar a próxima etapa para desvendar molecularmente quais processos celulares podem estar sendo afetados devido a exposição a este contaminante.

Palavras-chave: Compostos Perfluorados. Malformações. Embriotoxicologia.

ABSTRACT

Perfluorooctanoic acid (PFOA) is a persistent and bioaccumulative environmental pollutant. Exposure to this contaminant during the embryonic development period can lead to various malformations. Previous research show evidence that PFOA can interfere with neurulation processes and, thus, lead to changes in the neural tube (TN). Therefore, investigating the possible neurotoxic effects of PFOA on development is of great importance. For this reason, this study aimed to evaluate the effect of PFOA at the end of primary neurulation, focusing on TN, in avian embryos (*Gallus gallus*). Four experimental groups were tested, one control (saline solution) and three groups exposed to PFOA, at concentrations of 0.5 ng.ml⁻¹, 5 ng.ml⁻¹, and 50 ng.ml⁻¹. The contaminant was inserted into the air chamber and the eggs were incubated until reaching the HH18 stage when the primary neurulation had already ended. Then, the embryos were collected, staged, fixed, embedded in historesin, sectioned, stained with hematoxylin and eosin, and analyzed. In all of the exposed groups, changes in the TN were visualized, such as structural malformations, presence of apoptotic cells and cell fragments, in the neuroepithelium and in the lumen of the TN in the region of the trunk and in the region of the brain vesicles. Therefore, it shows that PFOA exposure leads to developmental neurotoxicity, with alterations in the TN the trunk of embryos, which can be observed at the end of primary neurulation. Due to this, the research focus is very promising, since, based on these results, presented here, it is possible to plan the next step to molecularly unveil which cellular processes may be affected due to exposure to this contaminant.

Keywords: Perfluored Compounds. Malformations. Embryotoxicology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: NEURULAÇÃO PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA	13
FIGURA 2: NEURULAÇÃO PRIMÁRIA - SECÇÕES TRANSVERSAIS	14
FIGURA 3: PLACA NEURAL.....	15
FIGURA 4: FLEXÃO DA PLACA NEURAL	16
FIGURA 5: FUSÃO DAS PREGAS NEURAIS	17
FIGURA 6: ORGANIZAÇÃO CELULAR NO TUBO NEURAL	18
FIGURA 7: ESTÁDIOS E O FECHAMENTO DO TN.....	20
FIGURA 8: VESÍCULAS ENCEFÁLICAS	21
FIGURA 9: ESTRUTURA QUÍMICA DO PFOA	22
FIGURA 10: COLETA DOS EMBRIÕES	28
FIGURA 11: ANÁLISE DA VIABILIDADE DOS EMBRIÕES	29
FIGURA 12: EMBRIÃO DE <i>GALLUS GALLUS</i> NO ESTÁDIO HH18 E SUAS ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS ESPECÍFICAS	30
FIGURA 13: PROCESSAMENTO E EMBLOCAGEM.....	31
FIGURA 14: MENSURAÇÃO DO COMPRIMENTO DOS EMBRIÕES.....	32
FIGURA 15: MICROTOMIA EM MICRÓTOMO SEMIAUTOMÁTICO	32
FIGURA 16: TESTE COM AZUL DE TOLUIDINA.....	33
FIGURA 17: ORIENTAÇÃO DOS CORTES NAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS.....	34
FIGURA 18: VESÍCULAS ENCEFÁLICAS - EMBRIÃO CONTROLE	37
FIGURA 19: FRAGMENTOS CELULARES E NUCLEARES NO DIENCÉFALO.....	38
FIGURA 20: TUBO NEURAL.....	39
FIGURA 21: MALFORMAÇÕES NA ESTRUTURA DO TUBO NEURAL DO TRONCO	40
FIGURA 22: PRESENÇA DE CÉLULAS APOPTÓTICAS NO TUBO NEURAL.....	41
FIGURA 23: CÉLULAS APOPTÓTICAS NO LÚMEN DO TUBO NEURAL DO TRONCO	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	26
TABELA 2: VOLUMES INJETADOS	27
TABELA 3: ALTERAÇÕES OBSERVADAS NOS EMBRIÕES.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 EMBRIÃO DE AVE <i>GALLUS GALLUS</i> COMO MODELO ANIMAL	11
2.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO.....	12
2.2.1 <i>Neurulação</i>	12
2.2.2 <i>Neurulação Primária</i>	13
2.2.3 <i>Tube Neural (TN)</i>	18
2.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ÁCIDO PERFLUOROOCETANÓICO - PFOA	21
2.4 EFEITOS DO PFOA NO DESENVOLVIMENTO	23
2.5 NEUROTOXICIDADE NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	23
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	25
3.1 JUSTIFICATIVA	25
3.2 OBJETIVOS	25
3.2.1 <i>Objetivo Geral</i>	25
3.2.2 <i>Objetivo Específico</i>	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 MODELO BIOLÓGICO DE ESTUDO.....	26
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL	26
4.3 EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES	27
4.4 COLETA DOS EMBRIÕES E ESTADIAMENTO	27
4.5 EMBLOCAGEM EM HISTORESINA.....	30
4.6 MICROTOMIA DOS BLOCOS E COLORAÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS	32
4.7 ANÁLISE DAS LÂMINAS	34
5 RESULTADOS	36
6 DISCUSSÃO	45
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
8 CONCLUSÕES	52
9 REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A expansão da industrialização aumentou a liberação de poluentes para o ecossistema e, com isso, surgiu a preocupação com as consequências da exposição a esses compostos, tanto no ambiente quanto à saúde animal e humana. Dessa forma, os possíveis efeitos tóxicos de poluentes ambientais se tornaram objeto de muitos estudos que evidenciaram os efeitos deletérios de diversas substâncias aos organismos vivos. Estudos epidemiológicos, por exemplo, passaram a descrever uma possível relação entre o aparecimento de malformações congênitas e a exposição a contaminantes ambientais durante o desenvolvimento pré-natal. Esses estudos provêm subsídio para a elaboração de leis que regulamentem o uso e liberação desses compostos no ambiente.

O ácido perfluorooctanóico (PFOA) foi desenvolvido para potencializar o poder industrial devido às suas características físico-químicas (LEHMLER, 2005). Porém, essas características fizeram com que ele se tornasse um agente tóxico persistente e que bioacumula nos organismos, a partir da exposição pelas vias alimentar e respiratória (STEENLAND; BARRY; SAVITZ, 2018), principalmente. O PFOA é considerado um poluente emergente que, entre outras alterações, pode perturbar o processo de desenvolvimento embrionário do sistema nervoso devido a sua capacidade de atravessar a barreira placentária (RASHTIAN; CHAVKIN; MERHI, 2019).

Como as alterações teciduais provenientes da toxicidade do PFOA ainda não foram bem elucidadas em embriões e as malformações induzidas durante esse processo foram pouco estudadas, esse assunto ainda precisa ser mais bem explorado para que seus efeitos nas fases iniciais de desenvolvimento fiquem claros.

O embrião de galinha como modelo biológico é interessante, pois apresenta vantagens em relação a outros modelos, como compatibilidade morfológica, no estágio filotípico, com os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário humano (IRIE; KURATANI, 2014), ser dependente apenas dos nutrientes do ovo e de ajustes ambientais, como temperatura e umidade constantes, para se desenvolver, dispensando a presença da progenitora.

Sendo assim, o objetivo do estudo foi analisar quais são as possíveis alterações causadas pelo PFOA na organização histológica do tubo neural (TN), ao término da neurulação primária, em embriões de *ave Gallus gallus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EMBRIÃO DE AVE *Gallus gallus* COMO MODELO ANIMAL

A Biologia do Desenvolvimento há muito aproveita as espécies ovíparas para acessar os estágios embrionários iniciais e estudar a maturação embrionária *in ovo* (HILLIER; MILLER; BIRNEY, 2004). O ovo é autossuficiente e seu desenvolvimento normal (desde que, com temperatura e umidade controladas) garante uma viabilidade consistente dos animais. Dentro do ovo, o embrião é um modelo altamente controlado e acessível, no qual a fisiologia, patologia e manipulação experimental podem ser analisadas (KAIN et al., 2014). O embrião de *Gallus gallus* é um modelo de escolha para o estudo embriológico e fornece informações cruciais sobre o desenvolvimento e a organogênese (RASHIDI; SOTTILE, 2009; FLENTKE; SMITH, 2018). Sua alta semelhança a outros vertebrados, incluindo humanos, durante alguns períodos do desenvolvimento ocorre pois, parcialmente, os genes de aves são paralelos aos dos humanos. No que diz respeito às funções desses genes, o embrião de galinha possui uma sequência homóloga altamente conservada em humanos (WU et al., 2018). Apesar de sua aparência final amplamente divergente, durante o período filotípico os vertebrados passam por uma fase de desenvolvimento intermediária e morfologicamente conservada, que engloba os processos de gastrulação e neurulação. Posteriormente, são definidas as complexas estruturas anatômicas que diferenciam as formas adultas. Sendo assim, a similaridade do embrião de ave em relação aos mamíferos se dá tanto molecular quanto morfologicamente (IRIE; KURATANI, 2014). Ademais, os estádios do desenvolvimento de *Gallus gallus* foram bem descritos por Hamburger e Hamilton (1951) em 46 estádios morfologicamente distintos.

A embriotoxicologia busca modelos de estudo que possam servir como base para analisar aspectos gerais do desenvolvimento, possibilitando, assim, o estudo de efeitos dos agentes ambientais externos no desenvolvimento do embrião. Peixes (TRIGUEIRO et al., 2020; SIMÉON et al., 2021), anfíbios (SLABY et al., 2019; YOUNG et al., 2020) e mamíferos (BATSCHAUER et al., 2021) são modelos comumente empregados na embriotoxicologia. O uso do embrião de galinha (WU et al., 2018; MATTSSON et al., 2019; JIANG et al., 2020) na toxicologia é mais recente

e tem se mostrado um bom modelo, pois seu desenvolvimento externo evita que determinadas análises, como a exposição a contaminantes, possam sofrer alterações devido a ligação do embrião com a progenitora (BJØRNSTAD et al., 2015; MATTSSON et al., 2015).

2.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO

No início do desenvolvimento, todos os embriões de vertebrados são formados por três folhetos embrionários, a partir dos quais todos os tecidos e órgãos serão originados. O ectoderma é a camada mais externa, que formará a epiderme, os tecidos neurais e alguns tecidos esqueléticos e conjuntivos da cabeça. O endoderma, camada mais interna, formará principalmente o revestimento do trato digestório, do sistema respiratório e dos órgãos associados à digestão. Entre essas duas camadas, há uma população de células denominada mesoderma, que formará a maioria dos músculos, tecidos esqueléticos, sistema urogenital, coração e vasos sanguíneos (DE LAHUNTA; GLASS; KENT, 2016).

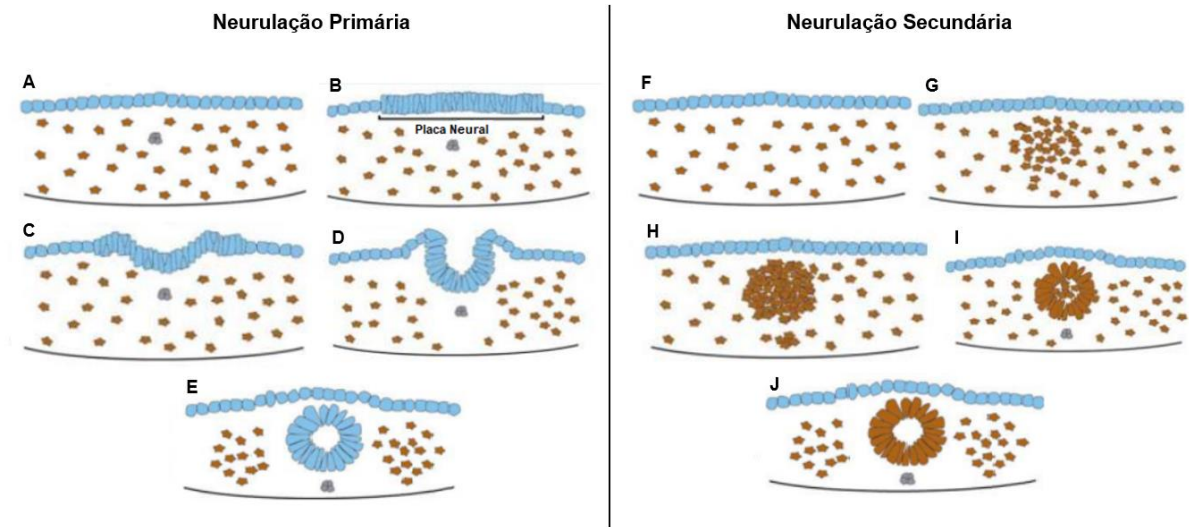
O desenvolvimento do sistema nervoso, apesar de começar no início do período embrionário chamado neurulação, é o último sistema corporal a terminar sua formação (MOINI; PIRAN, 2015).

2.2.1 Neurulação

A neurulação é definida como o conjunto de movimentos morfogenéticos que resultam na formação do tubo neural (TN), que posteriormente dará origem ao sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal) e das células da crista neural, que darão origem a diversos tipos celulares (LOWERY; SIVE, 2004). Esse processo é complexo e requer a coordenação de muitos eventos celulares e moleculares (WILDE; PETERSEN; NISWANDER, 2014).

Em amniotos, o TN é formado por dois mecanismos de neurulação: a primária (Figura 1 A-E) e a secundária (Figura 1 F-G). Na neurulação primária, o TN é formado a partir de uma camada de células epiteliais que se estende do cérebro para a região cervicotorácica (região anterior). Já a neurulação secundária é oriunda de células mesenquimais indiferenciadas existentes na região caudal do embrião (LOWERY; SIVE, 2004).

FIGURA 1: NEURULAÇÃO PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA

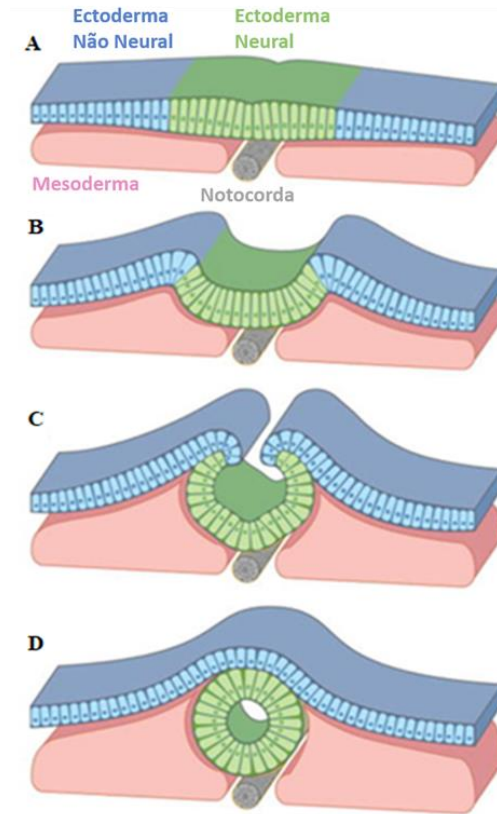


Esquema representando as etapas da neurulação primária (A-E) e secundária (F-J) que levam à formação do tubo neural. **A)** Ectoderma inicial, **B)** Espessamento do ectoderma formando a placa neural, **C)** Modelagem da placa neural, **D)** Flexão da placa neural, **E)** Formação do TN, **F)** Mesênquima inicial disperso, **G)** Mesênquima passa a se condensar, **H)** Formação de um cordão de células, **I)** Cavitação e **J)** Formação do TN. Ectoderma: representado em azul, Mesoderma: representado em marrom. FONTE: Adaptado de LOWERY e SIVE (2004).

2.2.2 Neurulação Primária

A neurulação primária é o processo pelo qual o TN fecha a partir da placa neural que inicialmente é induzida a diferenciar (Figura 2 A), sofre flexão para criar as dobras neurais (Figura 2 B), que se elevam em direção à linha média dorsal (Figura 2 C) e, finalmente, se fundem para completar o TN (Figura 2 D). Essa sequência de eventos de neurulação ocorre ao longo do eixo do corpo do embrião, fechando o TN de forma progressiva (fazendo um movimento de “zíper”) (NIKOLOPOULOU et al., 2017).

FIGURA 2: NEURULAÇÃO PRIMÁRIA - SECÇÕES TRANSVERSAIS



Esquema representando as etapas da neurulação primária. **A)** Placa neural plana, **B)** Formação do ponto de dobradiça e elevação das dobras neurais, **C)** Aposição das pregas neurais com o ectoderma neural coberto pelo ectoderma não neural, **D)** Remodelação do ectoderma neural e do ectoderma não neural (ENN) para formar o TN fechado, coberto por uma única camada de ENN. FONTE: Adaptado de WILDE; PETERSEN; NISWANDER (2014).

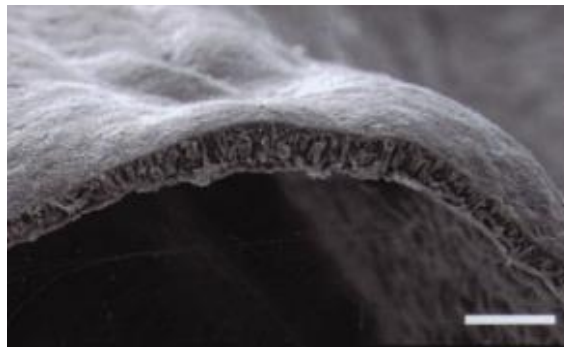
Nas aves, a neurulação primária começa na futura região do cérebro e progride rostrocaudalmente (estabelecendo e fechando o neuróporo caudal) e cauda-rostralmente (fechando o neuróporo craniano), sendo que no embrião de galinha este fechamento ocorre a partir de dois pontos localizados no futuro mesencéfalo. Assim, as quatro etapas da neurulação (formação, modelagem e flexão da placa neural e fusão das dobras neurais) ocorrem simultaneamente com diferentes estágios ao longo dos diversos níveis rostral-caudal do embrião neurulante (SCHOENWOLF; SMITH, 2000).

A formação da placa neural consiste de um ectoderma espessado, disposto em epitélio pseudoestratificado colunar. Sua formação requer dois tipos de interações indutivas: interação vertical entre o endoderma e o mesoderma subjacentes ao ectoderma da placa neural e interação horizontal ou plana entre o nó

de Hensen e a placa neural circundante (SCHOENWOLF; SMITH, 2000). O nó de Hensen é uma área do blastoderma localizada na extremidade rostral da linha primitiva, responsável pela indução neural. Moléculas secretadas por ele agem no ectoderma, alterando seu destino para que ocorra, assim, o espessamento (SCHOENWOLF, 2018).

Após a formação da placa neural (Figura 3), ocorre sua modelagem. Durante a modelagem a placa neural passa por três eventos: (1) o eixo rostro-caudal se alonga como resultado do crescimento da região caudal do embrião (extensão), que continua durante todo o período de fechamento do TN; (2) o eixo mediolateral se estreita (convergência) e (3) as células adquirem polaridade com alongamento basal e constrição apical, necessária para o dobramento da placa neural para dar início ao fechamento do TN. A extensão convergente ocorre devido a intercalação celular na linha média levando ao estreitamento medial-lateral e alongamento rostro-caudal do eixo do corpo (GREENE; COPP, 2009).

FIGURA 3: PLACA NEURAL

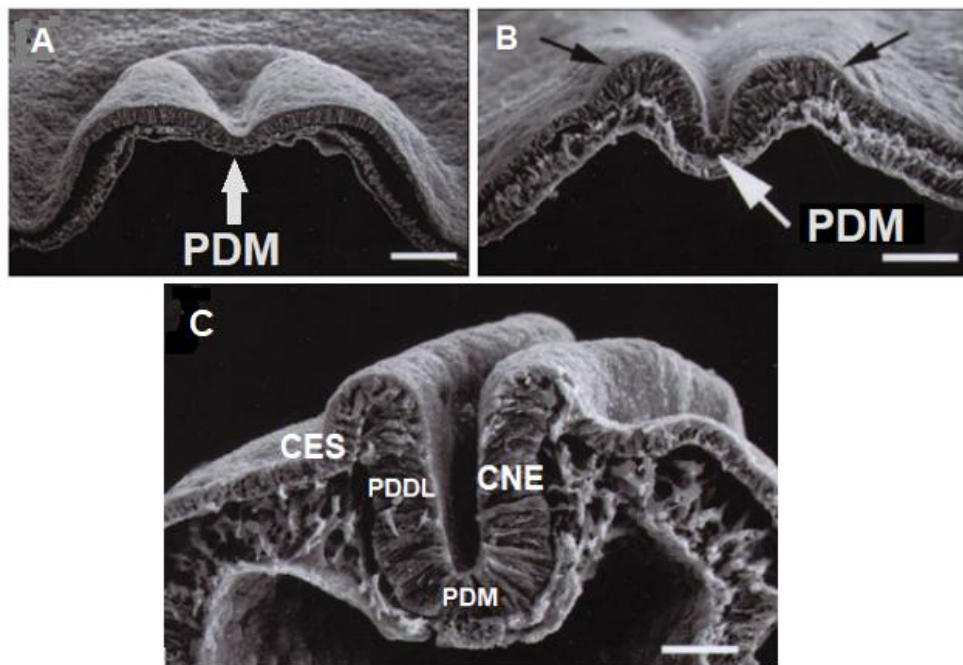


Microscopia eletrônica de varredura da secção transversal do blastoderme de embrião de ave, mostrando a formação da placa neural. Barra = 180µm. FONTE: Adaptado de SMITH e SCHOENWOLF (1997).

A flexão da placa neural envolve pelo menos três eventos morfogenéticos importantes: formação dos pontos de articulação/dobradiça, formação das dobras neurais e dobramento da placa neural. Dois tipos de pontos de dobradiça se formam durante a flexão, o mediano (PDM - *Median Hinge Point*) (Figura 4 A-B) e o dorsolateral (PDDL - *Dorsolateral Hinge Point*) (Figura 4 C e 5). À medida que os pontos de dobradiça estão se formando, uma dobra bilaminar é estabelecida em cada lado da placa neural. Essas são as pregas neurais e cada uma consiste em uma camada interna da placa neural (Camada Neuroepitelial da prega neural - CNE)

e uma camada externa de ectoderma epitelial (Camada Ectodérmica Superficial da prega neural - CES). A flexão subsequente envolve dobrar a placa neural em torno dos pontos de articulação, estabelecer o sulco neural e colocar as dobras neurais em posição na linha média onde ocorre a fusão. A formação dos pontos de articulação envolve alterações extracelulares e intracelulares. As alterações extracelulares são mediadas pela matriz na adesão celular entre a placa neural e os tecidos adjacentes, enquanto que as intracelulares são mediadas por bandas apicais circulares de microfilamentos durante a constrição apical das células da placa neural (SCHOENWOLF; SMITH, 2000).

FIGURA 4: FLEXÃO DA PLACA NEURAL

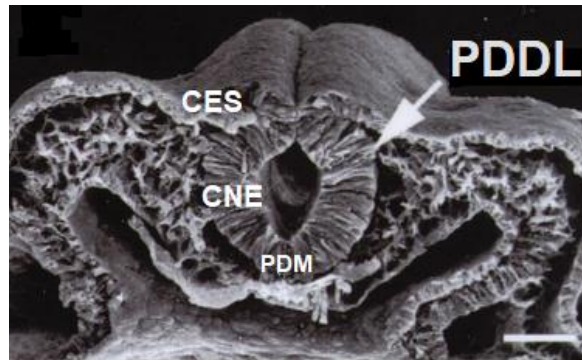


A - C) Eletromicrografias de varredura de seções transversais do blastoderme de embrião de ave, mostrando os eventos principais para a ocorrência da flexão da placa neural. PDM: Ponto de Dobradiça Mediano. CES: Camada Ectodérmica Superficial da prega neural. CNE: Camada Neuroepitelial da prega neural. PDDL: Ponto de Dobradiça Dorsolateral. Setas pretas: modelagem das pregas neurais. Barra = 180µm. FONTE: Adaptado de SMITH e SCHOENWOLF (1997).

O estágio final da neurulação primária é a fusão das pregas neurais. Como resultado da flexão, as dobras neurais são colocadas em posição na linha média, onde aderem inicialmente devido a presença de macromoléculas de superfície celular, até que mais contatos celulares permanentes possam ser estabelecidos (SADLER, 1978; COPP; GREENE; MURDOCH, 2003), fechando funcionalmente o sulco neural. A fusão subsequente das dobras neurais fecha anatomicamente o

sulco neural e estabelece o teto do TN, o ectoderma epidérmico sobreposto e a crista neural. As células da crista neural participam na formação do sistema nervoso periférico e de uma variedade de outras células (melanócitos) e estruturas (ossos e cartilagens da face) (SCHOENWOLF; SMITH, 2000).

FIGURA 5: FUSÃO DAS PREGAS NEURAIS



Secção transversal do blastoderme de embrião de ave, vista na microscopia eletrônica de varredura. Observa-se a fusão das pregas neurais. PDDL: Ponto de Dobradiça Dorsolateral. CES: Camada Ectodérmica Superficial da prega neural. CNE: Camada Neuroepitelial da prega neural. PDM: Ponto de Dobradiça Mediano. Barra = 180µm. FONTE: Adaptado de SMITH e SCHOENWOLF (1997).

A formação e modelagem da placa neural resultam de alterações no comportamento das células que a compõem, como alongamento basal, constrição apical, intercalação célula-célula e orientação da divisão celular, devido a uma indução dos tecidos laterais, como a notocorda e a mesoderme cefálica. Para a flexão da placa neural há a cooperação especialmente do ectoderma de superfície, que faz com que a placa neural sofra uma expansão medial resultante de alterações no comportamento de suas células, como intercalação célula-célula e divisão celular orientada. Além disso, a interface da prega neural desempenha um papel importante nos eventos finais do fechamento do sulco neural, fornecendo substrato para a expansão do tecido. Dessa forma, a neurulação é resultado de eventos celulares que ocorrem tanto intrinsecamente ao neuroepitélio quanto extrinsecamente a ele nos tecidos laterais (SCHOENWOLF, 2018).

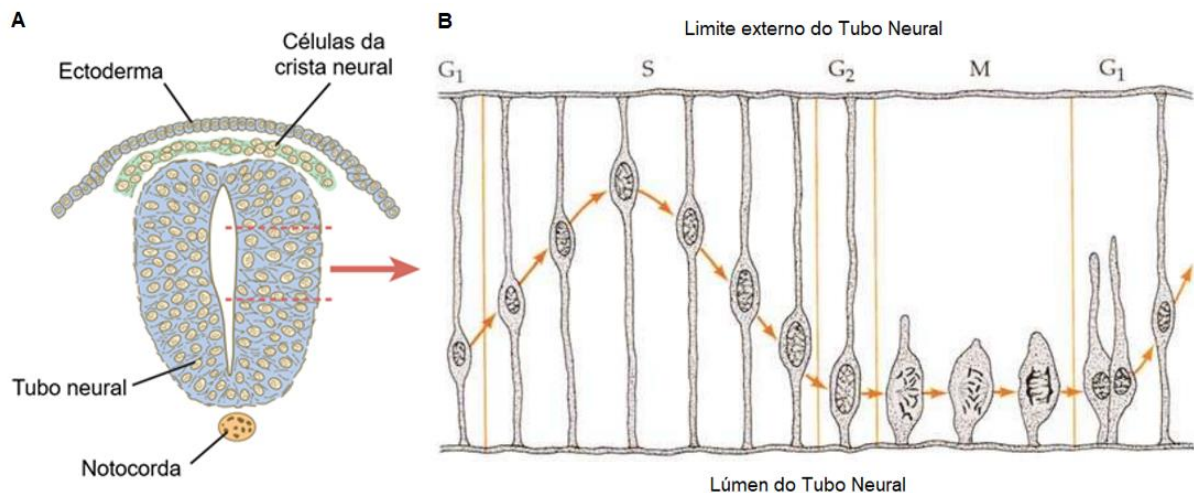
Durante a neurulação primária, a fusão do TN ocorre ao longo do eixo dorsal e culmina com o fechamento final no neuróporo posterior. Uma série de funções biológicas celulares são essenciais para que isso ocorra corretamente. Dessa forma, a exposição a contaminantes neste período pode gerar defeitos no citoesqueleto, ciclo celular e regulação molecular da viabilidade celular (COPP; GREENE, 2010),

comprometendo essas funções e levando a ocorrência de malformações no fechamento do TN.

2.2.3 Tubo Neural (TN)

O TN é composto de um neuroepitélio embrionário, formado por uma camada de células colunares contínuas, da borda luminal até a borda externa. Como seus núcleos estão em diferentes alturas, tem-se a impressão de que são diversas camadas celulares (GILBERT, 2003), sendo classificado, então, como um epitélio pseudoestratificado colunar (SADLER, 2018). O posicionamento dos núcleos das células neuroepiteliais é dependente do seu estágio no ciclo mitótico e por isso variam em localização dentro da célula. Durante a síntese de DNA os núcleos se localizam próximos à membrana basal do TN e à medida que se preparam para entrar em mitose migram dentro do citoplasma em direção ao lúmen do TN e sofrem divisão (Figura 6) (CARLSON, 2014).

FIGURA 6: ORGANIZAÇÃO CELULAR NO TUBO NEURAL



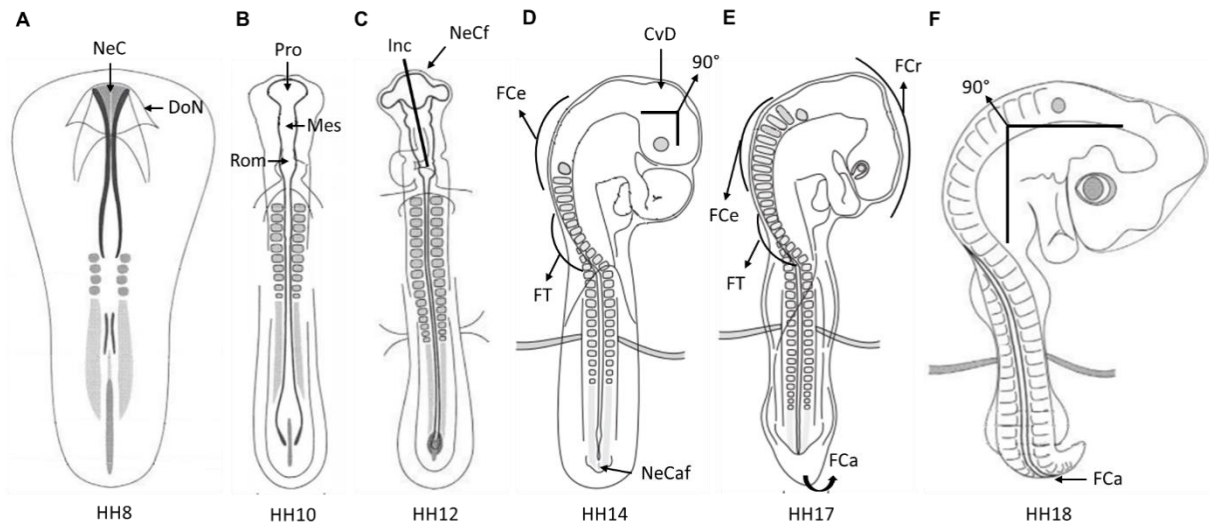
A) Representação esquemática da secção do TN, **B)** Secção esquemática do TN, mostrando o posicionamento dos núcleos celulares em função do ciclo celular; sendo que nas células mitóticas são encontrados próximos ao lúmen do TN. As células cujos núcleos localizam-se próximos ao limite externo do TN estão em fase S e quando eles se movimentam em direção ao lúmen do TN, passam pelo ciclo celular, finalizando a mitose ao chegarem à margem interna. FONTE: **A)** Adaptado de CARLSON (2014); **B)** Adaptado de GILBERT (2003).

Enquanto as células próximas ao lúmen fazem a divisão, existem células que migram e formam uma segunda camada ao redor do tubo neural original. Posteriormente, essas células da segunda camada vão se diferenciar em neurônios

que fazem conexões entre si e projetam axônios se afastando do lúmen e células gliais que cobrem muitos desses axônios com bainha de mielina e dão sustentação necessária (GILBERT, 2003).

No embrião de ave *Gallus gallus* o desenvolvimento do TN inicia-se no estágio HH7 e HH8, com o fechamento ocorrendo do estágio HH9 ao HH14 e no estágio HH18 as vesículas encefálicas apresentam subdivisões evidentes. Inicialmente, no estágio HH7 as dobras neurais são visíveis na região da cabeça e no estágio HH8 (Figura 7 A) se encontram ao nível do mesencéfalo. No estágio HH10 (Figura 7 B) há a primeira indicação de flexão craniana e é possível visualizar as três vesículas encefálicas primárias (prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo). Já no estágio HH11 ocorre uma ligeira flexão craniana e o neuróporo craniano inicia seu fechamento, sendo que o completo fechamento ocorre por volta do estágio HH12 (Figura 7 C), bem como a lateralização da cabeça. No estágio HH13 a cabeça está parcialmente virada e no HH14 (Figura 7 D) está totalmente virada para a direita. Além disso, há a formação de um ângulo reto entre o prosencefalo e o rombencefalo (flexura craniana), um início de curvatura cervical, uma flexura do tronco e o fechamento do neuróporo caudal. Nos estádios HH15, HH16 e HH17 (Figura 7 E) ocorre uma acentuação das flexuras e curvaturas. Por fim, no estágio HH18 (Figura 7 F) a flexura cervical forma um ângulo de 90°, o mesencefalo (telencefalo e diencefalo) apresenta-se aumentado e torna-se claramente marcado posteriormente a partir do rombencefalo (metencefalo e mielencefalo), a flexura do tronco está localizada na região lombar e há uma rotação da parte posterior do corpo do embrião. É neste estágio que ocorre a completa formação e fechamento do TN (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; BELLAIRS; OSMOND, 2014).

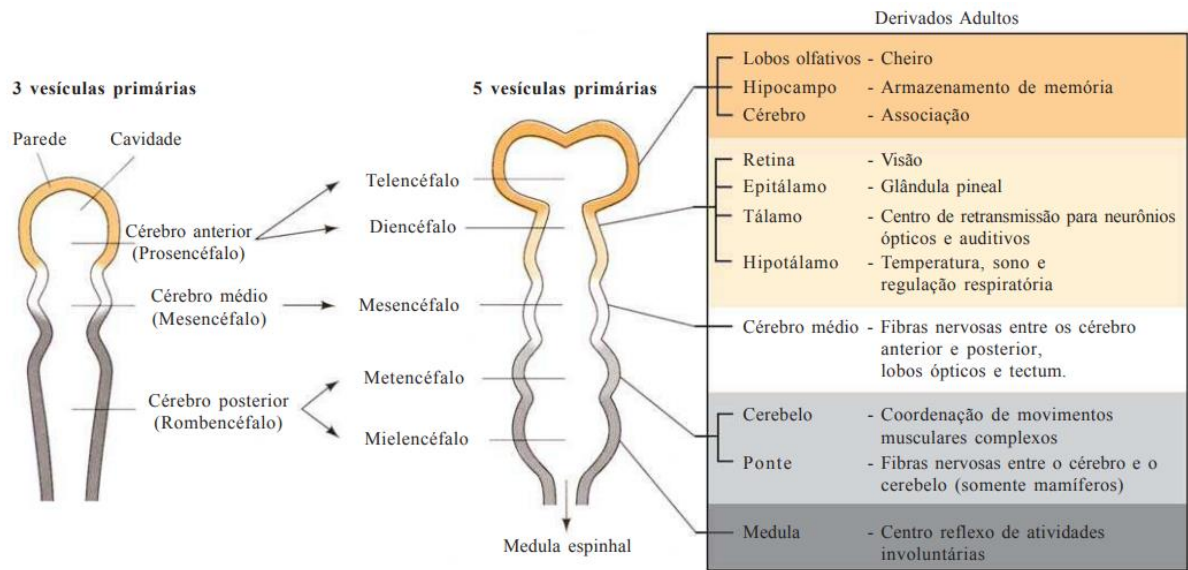
FIGURA 7: ESTÁDIOS E O FECHAMENTO DO TN



Esquemas dos estádios do embrião de ave *Gallus gallus* e o fechamento do TN. **A)** Estádio HH8 (26 - 29 horas): início do fechamento do TN; **B)** Estádio HH10 (33 - 38 horas): se inicia a flexura craniana e já é possível visualizar três vesículas encefálicas; **C)** HH12 (45 - 49 horas): fechamento do neuróporo craniano; **D)** Estádio HH14 (50 - 53 horas): a cabeça do embrião está completamente virada para a direita e há flexura craniana; **E)** Estádio HH17 (52 - 64 horas): acentuação das flexuras e curvaturas; **F)** Estádio HH18 (65 - 69 horas): fechamento completo do TN, flexura cervical possui um ângulo de 90°. NeC: Neuróporo craniano; DoN: Dobra neural; Pro: Prosencéfalo; Mes: Mesencéfalo; Rom: Rombencéfalo; NeCf: Neuróporo craniano fechado; Inc: Inclinação da cabeça; CvD: Cabeça virada para direita; FCe: Flexura cervical; FT: Flexura do tronco; NeCaf: Neuróporo caudal fechado; FCr: Flexura craniana; FCa: Flexura caudal. FONTE: Adaptado de BELLAIRS e OSMOND (2014).

O desenvolvimento inicial do cérebro embrionário de aves e humanos se assemelha. Em ambos os casos, o cérebro se expande e se diferencia na extremidade anterior do TN, que se divide inicialmente em três vesículas, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (XU et al., 2010). Posteriormente, estas estruturas vão se subdividir em cinco partes, o prosencéfalo forma os hemisférios cerebrais do telencéfalo e o diencefalo, o mesencéfalo não se altera, mas sofre a flexura cervical e tem seu tamanho aumentado e o rombencéfalo forma o metencéfalo e o mielencéfalo (CARLSON, 2014) (Figura 8).

FIGURA 8: VESÍCULAS ENCEFÁLICAS



Desenvolvimento das vesículas encefálicas. Inicialmente há três vesículas primárias, que com o passar do desenvolvimento se subdividem e possuem funções e atividades específicas. FONTE: GILBERT (2003).

Sendo assim, o processo de neurulação é complexo e depende de eventos celulares e moleculares coordenados para que ocorra o fechamento adequado do TN (WILDE; PETERSEN; NISWANDER, 2014; BROWN et al., 2020) e a formação das estruturas derivadas. Quando isso não ocorre, originam-se as malformações. A craniorraquisquise é a forma mais grave de defeito no TN, em que tanto o cérebro quanto a medula espinhal permanecem abertos em graus variados; já a anencefalia pode ocorrer quando há alterações no mesencéfalo (meroanencefalia) ou em lesões que se estendem para o cérebro posterior (holoanencefalia); ainda, a falha do fechamento final no neuróporo posterior produz espinha bífida, na qual o limite superior pode ser de nível axial variável (WU et al., 2011).

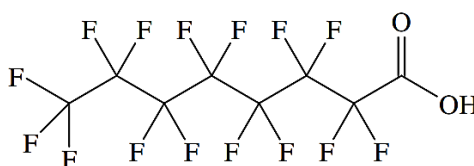
2.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ÁCIDO PERFLUOROOCETANÓICO - PFOA

Nas últimas décadas, a acelerada urbanização, industrialização e o rápido desenvolvimento econômico resultaram no aumento da emissão de poluentes (DONG; ZHANG; QUAN, 2020), como os compostos perfluorados (PFCs). Esses produtos químicos sintéticos são produzidos por fluorinação eletroquímica (LEC) e telomerização e utilizados há mais de 60 anos. Devido às suas propriedades físico-

químicas exclusivas, incluindo estabilidade química e térmica, baixa energia livre de superfície e propriedades de superfície ativa (LEHMLER, 2005), abrangem um grande número de químicos úteis nas indústrias têxteis, na produção de surfactantes, lubrificantes, fluoropolímeros para o revestimento antiaderente de utensílios de cozinha e embalagens de alimentos (SERGI, 2019), e até em alguns produtos de cuidados pessoais, como xampus e cosméticos (MACEDO, 2015). O uso generalizado resultou na liberação dos PFCs e seus derivados no meio ambiente por fontes diretas, que consistem da fabricação e do uso dos PFCs, e indiretas, que são impurezas de reações químicas ou produto da degradação de outras substâncias (PREVEDOUROS et al., 2006).

O ácido perfluorooctanóico (PFOA) (Figura 9) pertence à classe dos compostos perfluorados e é um dos produtos finais de degradação ambiental de PFCs de cadeia mais longa (LINDSTROM; STRYNAR; LIBELO, 2011). Seu principal uso foi a produção de fluoropolímeros para a composição do Teflon (STEENLAND; FLETCHER, SAVITZ, 2010). Sua presença foi detectada em uma variedade de matrizes ambientais e amostras biológicas em todo o mundo (LAU et al., 2007), o que reflete a grande disseminação da poluição com esse composto. Devido a sua persistência no ambiente, por ter um potencial bioacumulável e ser tóxico, foi identificado como um poluente orgânico persistente (POP) (VIERKE et al., 2012). Por essa razão, é um contaminante de preocupação pública (WU et al., 2012).

FIGURA 9: ESTRUTURA QUÍMICA DO PFOA



FONTE: LEHMLER (2005).

Vários PFCs foram encontrados no soro humano, no líquido seminal, no leite materno e até no cordão umbilical, sugerindo uma exposição ao longo da vida, desde os estágios embrionários/fetais até a vida adulta (RASHTIAN; CHAVKIN; MERHI, 2019). Em particular, o PFOA é um dos derivados presentes em maior concentração em seres humanos (CALAFAT et al., 2007; STARLING et al., 2014). Uma vez absorvido pelo corpo via inalação ou ingestão, acumula-se nos rins e

fígado (STEENLAND; BARRY; SAVITZ, 2018). De acordo com Seals e colaboradores (2011) a meia-vida do PFOA no corpo humano é de 2,3 a 3,8 anos; sendo que a concentração no sangue do cordão umbilical é em torno de 0,31 a 7,06 ng.ml⁻¹ (CARIOU et al., 2015).

2.4 EFEITOS DO PFOA NO DESENVOLVIMENTO

O período embrionário e fetal, animal e humano, é uma janela crítica do desenvolvimento. Dessa forma, a exposição a produtos químicos ambientais tem uma influência significativa no crescimento e desenvolvimento, com consequências para o nascimento, desenvolvimento infantil, funções cognitivas e comportamentais (OULHOTE; BELLINGER, 2020).

Em modelos animais, com exposição pré-natal, foi demonstrado que o PFOA pode induzir graves efeitos, incluindo déficits de desenvolvimento cerebral (LAU et al., 2007), alteração no comportamento motor (GOULDING et al., 2017), desregulação endócrina (RASHTIAN; CHAVKIN; MERHI, 2019), atraso no desenvolvimento e redução do peso ao nascer (WOLF et al., 2007), além de induzir malformações no TN, alterações encefálicas e problemas no fechamento da parede do corpo (KMECICK et al., 2019).

Em humanos, Stein e colaboradores (2014) relatam uma associação entre a exposição pré-natal a diferentes concentrações do PFOA e ocorrência de malformações do TN e hidrocefalia. Outros estudos trazem resultados acerca de nascimentos prematuros, baixo peso ao nascer e natimortos (WU et al., 2012), interferências no crescimento gestacional e pós-natal (CAO et al., 2018), além de associação a um risco aumentado de transtorno do espectro autista (TEA) e transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (SKOGHEIM et al., 2021).

2.5 NEUROTOXICIDADE NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

O desenvolvimento do sistema nervoso é sensível a agentes externos porque depende do surgimento temporal e regional de processos críticos de evolução como proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose. A exposição a poluentes ambientais durante o desenvolvimento pode levar à neurotoxicidade, sendo o período pré-natal e a infância os mais críticos para a vulnerabilidade a essas exposições (RICE; BARONE, 2000).

A contaminação ambiental, de forma geral, acaba distribuindo-se tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos. Por essa razão, a neurotoxicidade pode acometer organismos vivos como um todo (SUJA; PRAMANIK; ZAIN, 2009). Diferentes estudos realizados com o *zebrafish* (*Danio rerio*) comprovaram que alguns contaminantes podem causar problemas neurotóxicos durante o desenvolvimento desses animais, afetando a neurotransmissão do sistema nervoso central, o comportamento locomotor e inibindo a atividade da acetilcolinesterase (SHI et al., 2018). Outras complicações neurais advindas da exposição causada por contaminantes são a redução da taxa de sobrevivência, prejuízo na atividade locomotora e na atividade autofágica que protege o organismo e age contra os efeitos causados pelos contaminantes (LIU et al., 2019). Já os trabalhos realizados com aves demonstraram que a neurotoxicidade no desenvolvimento pode se manifestar com o aparecimento de anomalias congênitas, como falha no fechamento do corpo e déficits no comportamento motor (MÜLLER et al., 2008). Os roedores também são afetados pela exposição ao PFOA, o que gera problemas no desenvolvimento da prole (BLAKE et al., 2020), ou por outros componentes tóxicos que causam prejuízo da aprendizagem e da memória (AMOS-KROOHS et al., 2017, BATSCHAUER et al., 2021).

Nos mamíferos, a exposição a substâncias neurotóxicas pode se iniciar já no período da vida uterina por transferência placentária, podendo alcançar a circulação fetal. A exposição pré-natal a contaminantes pode ter implicações para a saúde do embrião/feto, pois eles são mais vulneráveis devido à imaturidade do sistema imunológico e dos mecanismos de detoxificação (VIZCAINO et al., 2014). Além disso, a exposição intrauterina pode repercutir no período neonatal e até predispor a efeitos deletérios tardios na infância e vida adulta (BOEKELHEIDE et al., 2012).

Estudos que avaliaram a relação entre a exposição ao PFOA e a ocorrência de neurotoxicidade, avaliaram que o PFOA é um componente neurotóxico capaz de causar a redução de neurotransmissores, como a dopamina (FOGUTH et al., 2019), causar hiperatividade comportamental (JOHANSSON; FREDRIKSSON; ERIKSSON, 2008; GABALLAH et al., 2020), além de afetar o comportamento locomotor e de inibir a regeneração neuronal (ZHANG et al., 2020).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 JUSTIFICATIVA

A disseminação crescente de poluentes no meio ambiente é prejudicial à saúde humana e de outros animais. O PFOA é uma substância que se mostra amplamente distribuída no globo e está presente na vida dos seres vivos devido a sua grande utilização na indústria. Seus efeitos afetam negativamente diferentes sistemas, incluindo o desenvolvimento do sistema nervoso e gera malformações no TN e estruturas derivadas. No entanto, essas alterações ainda não foram descritas histologicamente e os processos que as originam ainda não são claros. Dentro dessa temática, o estágio HH18 do embrião de galinha foi escolhido, pois é o primeiro estágio a apresentar o TN totalmente formado e permite a avaliação histológica dos efeitos do PFOA sobre essa estrutura. Além disso, devido à semelhança no desenvolvimento do embrião de ave e humano nos estádios iniciais, é possível, com ponderação, fazer uma extrapolação dos resultados para malformações encontradas em seres humanos. Assim, esse estudo procura trazer respostas ainda não exploradas, que possam complementar trabalhos anteriores realizados com montagem total e instigar novas perguntas para estudos futuros.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do PFOA em embriões de *Gallus gallus* no estágio HH18, com foco na neurulação primária.

3.2.2 Objetivo Específico

Avaliar as possíveis alterações histológicas induzidas pelo PFOA na estrutura do tubo neural, durante a neurulação primária.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente Trabalho de Conclusão de Curso foi desenvolvido em colaboração com o projeto de doutorado em andamento de Melyssa Kmecick, intitulado: “Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico no desenvolvimento do sistema nervoso de embriões de ave *Gallus gallus*”. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), sob o certificado de número 1098, processo 23075.192793/2017-62.

4.1 MODELO BIOLÓGICO DE ESTUDO

Os ovos embrionados de aves (*Gallus gallus*) foram fornecidos por uma empresa especializada, localizada na região metropolitana de Curitiba-PR. No laboratório, os ovos íntegros (sem danos aparentes na casca) foram higienizados com papel toalha umedecido com álcool 70% e pesados (peso anotado na casca do ovo).

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os ovos foram separados aleatoriamente em 4 grupos experimentais (Tabela 1), sendo o grupo controle injetado com solução salina (NaCl 0,9%, pH 7,4) e os expostos injetados com PFOA (Sigma-Aldrich) diluído em solução salina, em diferentes concentrações. A escolha das diferentes concentrações foi baseada em Kmecick et al. (2019).

TABELA 1: GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupo	Concentrações Injetadas
Controle Veículo	NaCl 0,9%
Exposto I	0,5 ng.ml ⁻¹
Exposto II	5 ng.ml ⁻¹
Exposto III	50 ng.ml ⁻¹

FONTE: A autora (2021).

4.3 EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES

Em fluxo laminar, os contaminantes foram injetados na câmara de ar dos ovos, pois este é o local que permite melhor dispersão dos contaminantes no embrião (YAMAMOTO et al., 2012). Através de um orifício feito com uma agulha (1,00x30mm), as soluções foram inseridas com a utilização de uma micropipeta e o volume foi correspondente ao peso do ovo, de acordo com o protocolo estabelecido por Kmecick (2018) no Laboratório de Embriotoxicologia da UFPR, visto que os pesos dos ovos eram muito variados. Assim, foi necessário adaptar os volumes de contaminante para cada intervalo de peso (Tabela 2).

TABELA 2: VOLUMES INJETADOS

Peso do Ovo	Volume Injetado
40 - 44,99 g	13 µl
45 - 49,99 g	15 µl
50 - 54,99 g	17 µl
55 - 59,99 g	18 µl
60 - 64,99 g	20 µl
65 - 69,99 g	21 µl
70 - 74,99 g	23 µl
75 - 79,99 g	25 µl

FONTE: KMECICK (2018).

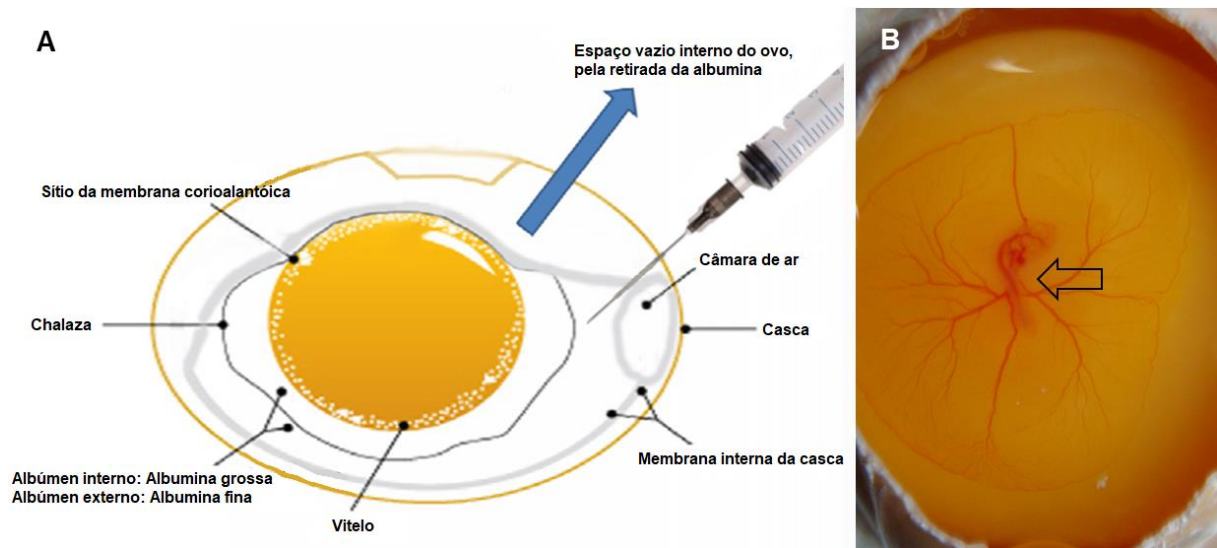
Posteriormente, o orifício foi selado com fita adesiva e os ovos foram incubados randomicamente, na posição vertical (com a câmara de ar voltada para cima), em incubadora BOD (SL-224, SOLAB Científica) com temperatura de 38°C (\pm 0,5), umidade e ventilação constantes. Os ovos foram incubados por 72 horas.

4.4 COLETA DOS EMBRIÕES E ESTADIAMENTO

Após o tempo de incubação, os ovos foram colocados na posição horizontal na incubadora por 5 minutos, para que o embrião se posicionasse na parte superior do ovo, possibilitando sua visualização e coleta. Essa movimentação para a parte superior é devido à presença da chalaza (estrutura formada por albumina espessa que está ligada à membrana vitelínica do ovo, mantendo o vitelo centralizado) que constitui um eixo de rotação, mantendo o embrião para cima (RAHMAN et al., 2007).

Os embriões foram coletados utilizando o método da janela (KORN; CRAMER, 2007). Inicialmente uma fita adesiva larga foi colocada na porção superior da casca do ovo, depois com o auxílio de uma seringa foi retirado aproximadamente 5 ml de albúmen (Figura 10 A) e, em seguida, com tesoura cirúrgica de ponta fina foi aberta uma janela de aproximadamente 3x3 cm, que possibilitou a visualização do embrião *in ovo* (Figura 10 B).

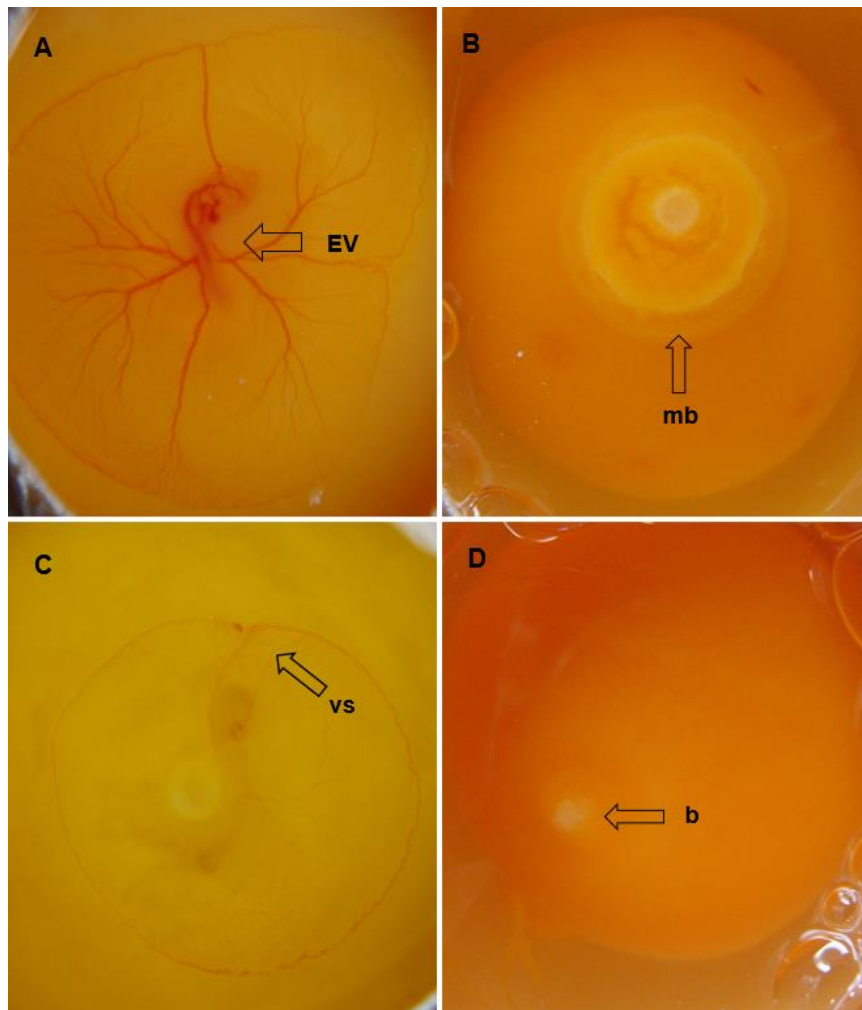
FIGURA 10: COLETA DOS EMBRIÕES



A) Retirada do albúmen com auxílio de uma seringa; **B)** Após abertura da casca do ovo foi possível a visualização do embrião de ave *Gallus gallus* (seta) *in ovo* (3 dias de desenvolvimento). FONTE: **A:** LOPES (2009); **B:** A autora (2021).

No momento da abertura do ovo a viabilidade dos embriões foi determinada. Os mortos foram descartados e os vivos coletados para as análises posteriores. Os embriões foram considerados vivos quando apresentaram coloração rósea e brilhante, batimentos cardíacos e vasos sanguíneos extraembrionários íntegros (Figura 11 A); mortos quando o disco embrionário se apresentava mais desenvolvido que no momento da postura, com características de que o desenvolvimento foi retomado na incubação, porém foi interrompido antes da coleta, apresentando a membrana vitelínica numa coloração esbranquiçada e opaca (Figura 11 B), ausência de batimentos cardíacos e vasos sanguíneos extraembrionários não íntegros (Figura 11 C). Além disso, alguns embriões foram classificados como não tendo o seu desenvolvimento retomado com a incubação (Figura 11 D) (DA COSTA, 2018).

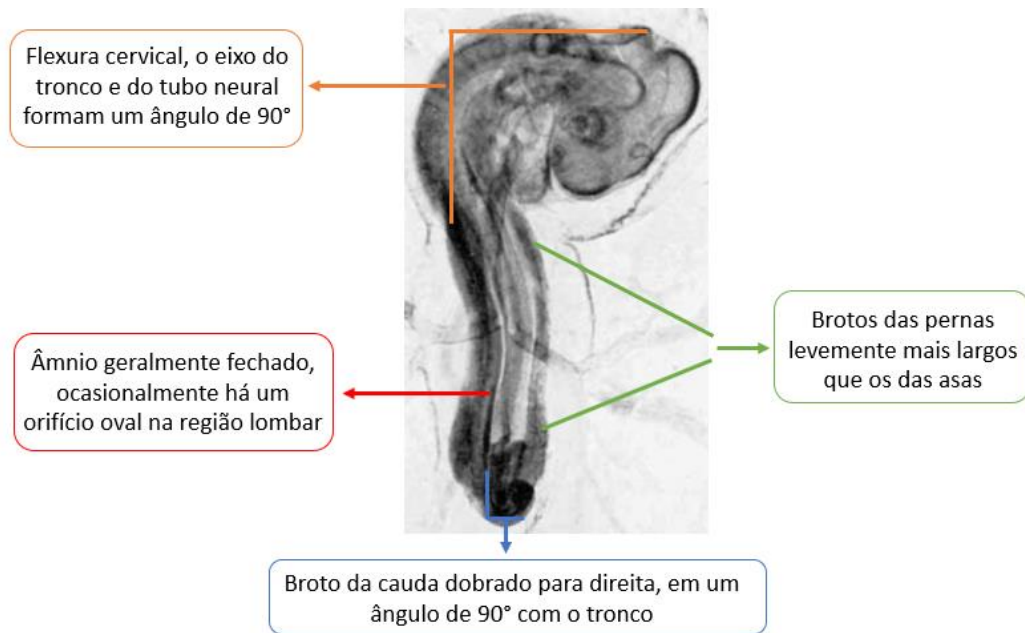
FIGURA 11: ANÁLISE DA VIABILIDADE DOS EMBRIÕES



A) Embrião viável (EV); **B e C)** Embriões mortos, sendo que em B a membrana vitelínica (mb) possui coloração creme, e em C destacam-se os vasos sanguíneos (vs) extraembrionários não íntegros após morte do embrião. **D)** Não houve retomada do desenvolvimento durante a incubação. Blastoderme (b). FONTE: A autora (2021).

A coleta dos embriões viáveis foi feita através do recorte na membrana vitelínica que circunda o embrião e esses foram transferidos cuidadosamente para uma placa de Petri contendo PBS 1X (solução salina tamponada com fosfato). Sob o estereomicroscópio, as membranas extraembrionárias foram retiradas e o estadiamento embrionário foi realizado através das análises da morfologia geral e das estruturas embrionárias específicas do estágio HH18 (Figura 12). Os embriões foram estadiados de acordo com os critérios descritos por Hamburger e Hamilton (1951), que relacionam o surgimento de determinadas estruturas embrionárias com o tempo de incubação. O estágio HH18 foi selecionado para este trabalho, pois nessa fase a neurulação primária já se completou.

FIGURA 12: EMBRIÃO DE *Gallus gallus* NO ESTÁDIO HH18 E SUAS ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS ESPECÍFICAS



Principais estruturas embrionárias presentes no embrião de ave *Gallus gallus* no estágio HH18, que ajudam a identificá-lo. Visualização do embrião em estereomicroscópio. FONTE: Adaptado de HAMBURGER e HAMILTON (1951).

Após o estadiamento, os embriões foram fixados em uma solução de paraformaldeído 2% (PFA) por, pelo menos, 24 horas, para impedir que ocorresse a autólise inerente aos tecidos biológicos, evitando sua deformação e preservando o material (OLIVEIRA RIBEIRO, 2012). Os embriões que não retomaram o desenvolvimento ou morreram durante o processo foram descartados. Os embriões que se encontravam em outros estádios de desenvolvimento e/ou apresentaram alterações intensas que impediam seu estadiamento, porém estavam viáveis, foram fixados e armazenados para estudos futuros.

Foram utilizados 5 embriões de cada grupo experimental, totalizando 20 embriões.

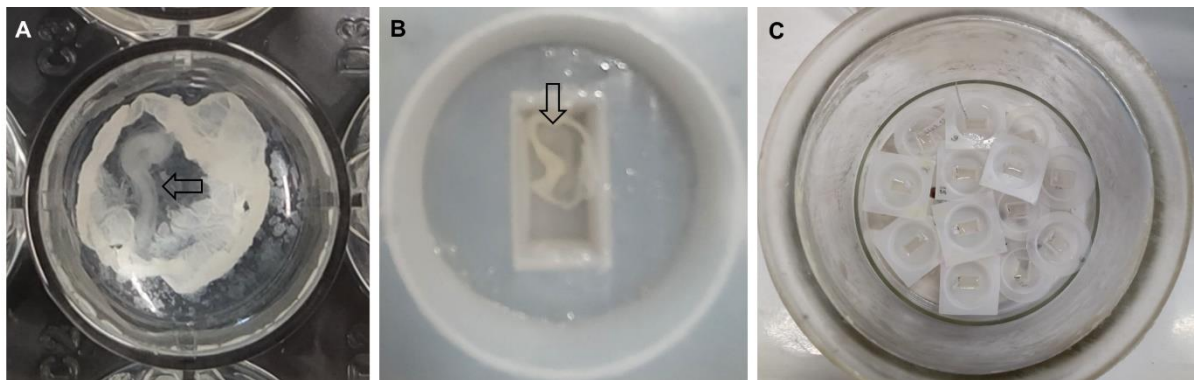
4.5 EMBLOCAGEM EM HISTORESINA

Os embriões foram retirados do fixador (PFA 2%), colocados por 2 horas em placa de 24 poços com PBS 1X, desidratados em série crescente de etanol (25%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% I e 100% II) e, posteriormente, infiltrados em historesina, conforme protocolo fornecido no kit de Historesina (Leica Biosystems®).

Para o preparo da solução de uso, diluiu-se 5 g do pó ativador (peróxido de dibenzoíla) em 50 ml de resina básica (hidroxietil metacrilato). Os embriões, já desidratados, foram imersos na solução de pré-infiltração, composta de uma proporção de 1:1 de solução de uso e etanol 100%, por 2 horas. Após, os embriões foram transferidos para a solução de infiltração, constituída apenas por solução de uso, por, pelo menos, 12 horas (Figura 13 A).

Em seguida, foram emblocados em solução de emblocagem (15 ml da solução de uso e 1 ml do endurecedor). Os embriões foram posicionados e orientados nos moldes plásticos (Figura 13 B), previamente identificados, com o auxílio de uma pinça e recobertos com 600 µl da solução de emblocagem. Para obter uma polimerização rápida dos blocos, os moldes foram mantidos em dessecador a vácuo, com sílica, em temperatura ambiente por, no mínimo, 48 horas (Figura 13 C).

FIGURA 13: PROCESSAMENTO E EMBLOCAGEM

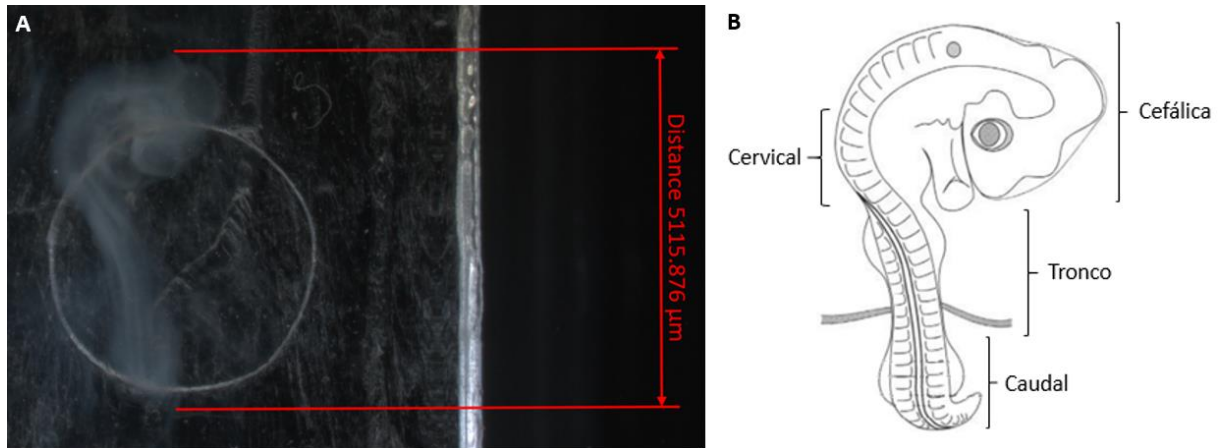


A) Embriões na solução de infiltração de historesina; **B)** Embrião no molde com solução de emblocagem em historesina; **C)** Blocos com embriões polimerizando em dessecador a vácuo. Seta: Embrião. FONTE: A autora (2021).

Após a polimerização, os blocos foram retirados dos moldes, fotografados em câmera (Axiocam 503, Zeiss) acoplada ao estereomicroscópio (Discovery.V12, Zeiss) e o tamanho dos embriões emblocados foi mensurado no *software* Zen pro 2.6 (Zeiss). Essa medida foi realizada para guiar a etapa de microtomia, determinando o número de cortes a serem desprezados. O embrião foi medido, utilizando o *software*, a partir da região cefálica até a região caudal (como demonstrado pela linha em vermelho na figura 14 A). Assim, buscou-se obter, de forma representativa, o tamanho das regiões de interesse nos embriões (Figura 14

B). Posteriormente, os blocos foram armazenados em frascos com sílica para evitar o emborrachamento da resina.

FIGURA 14: MENSURAÇÃO DO COMPRIMENTO DOS EMBRIÕES



A) Mensuração do comprimento do embrião emblocado em historesina; **B)** Esquema das regiões de interesse analisada nos embriões. *Software Zen pro 2.6 (Zeiss)*. FONTE: **A:** A autora (2020) e **B:** Adaptado de BELLAIRS e OSMOND (2014).

4.6 MICROTOMIA DOS BLOCOS E COLORAÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS

Para a realização da microtomia foi utilizado um micrótomo semiautomático (Leica RM 2145) no qual o bloco de historesina foi fixado no suporte próprio do micrótomo (Figura 17).

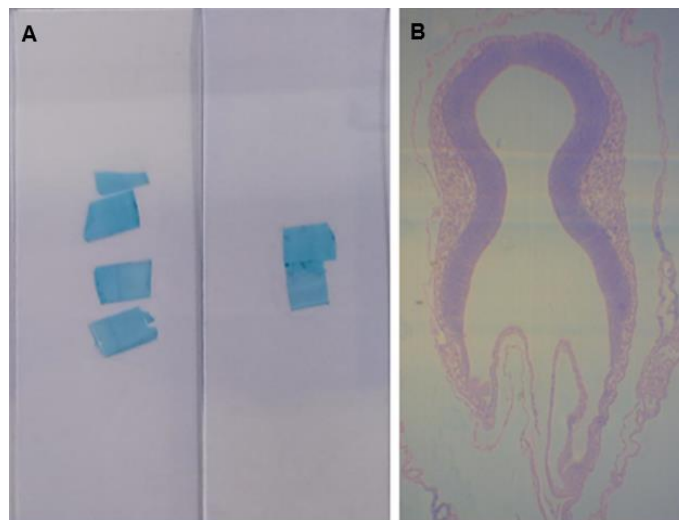
FIGURA 15: MICROTOMIA EM MICRÓTOMO SEMIAUTOMÁTICO



Bloco de historesina posicionado diretamente no micrótomo semiautomático. Embrião indicado pela seta. FONTE: A autora (2021).

Foram confeccionadas 10 lâminas, para cada embrião utilizado nos grupos experimentais, em triplicata (totalizando 30 lâminas), contendo 12 cortes por lâmina. Inicialmente, os blocos foram desbastados com os cortes iniciando na porção mais anterior para posterior até atingirem o embrião. Após seccionado, os cortes testes foram corados com azul de toluidina 0,5% (Figura 15 A) e foi avaliada a presença de estruturas embrionárias coradas em roxo azuladas (Figura 15 B), indicando o início do embrião. A partir desse ponto se iniciou a microtomia e as lâminas foram confeccionadas com cortes de 5 μm .

FIGURA 16: TESTE COM AZUL DE TOLUIDINA

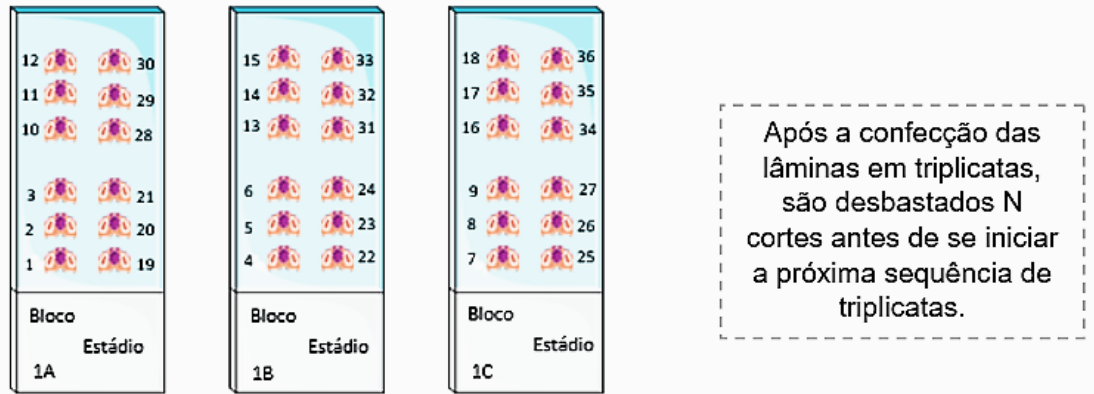


A) Cortes corados com azul de toluidina; **B)** Visualização do embrião no microscópio, corado em roxo azulado estão as células embrionárias. FONTE: A autora (2020).

Para se ter uma representatividade de diferentes níveis axiais do corpo do embrião, abrangendo as regiões cefálica, cervical, do tronco e caudal e obtendo-se a mesma quantidade total de lâminas por embrião, o número de cortes desprezados foi calculado a partir do comprimento total do corpo embrionário, como descrito no item 4.5. Ou seja, após atingir o embrião, os primeiros 36 cortes eram dispostos nas lâminas 1A, 1B e 1C (Figura 16), depois era desbastada uma quantidade de cortes específica de cada embrião (como cada embrião era único, esses números podiam variar), para então iniciar os próximos 36 cortes que foram dispostos nas lâminas 2A, 2B e 2C, e assim sucessivamente o processo era repetido até o final do embrião, nas lâminas 10A, 10B e 10C. Dessa forma, o número de lâminas (níveis axiais) para cada região de interesse foi: primeira à quarta lâmina - regiões cefálica e cervical (devido a flexura do embrião); quinta à sétima lâmina - região do tronco; e oitava à

décima lâmina - região caudal. O posicionamento dos cortes foi feito sobre gotas de água na lâmina histológica e distendidos em placa aquecida. Os cortes foram dispostos em lâmina de vidro seguindo a orientação mostrada na figura 16.

FIGURA 17: ORIENTAÇÃO DOS CORTES NAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS



Representação esquemática da disposição dos cortes nas lâminas. A orientação da sequência dos cortes na lâmina foi feita de baixo para cima (iniciando próximo a parte fosca da lâmina) e da esquerda para a direita, ou seja, inicia-se na parte de baixo do lado esquerdo (cortes 1, 4 e 7) e finaliza-se na parte superior direita (cortes 30, 33, 36). FONTE: A autora (2020).

Posteriormente, as lâminas A foram coradas em HE (Hematoxilina de Harris e Eosina aquosa 1%), secas ao ar e montadas com meio de montagem Entellan (Merk) e lamínula. Algumas lâminas B e C foram utilizadas para auxiliar no entendimento dos cortes das lâminas A e as demais utilizadas com outras colorações e não foram incluídas neste trabalho.

4.7 ANÁLISE DAS LÂMINAS

Foram avaliados qualitativamente 5 embriões por grupo experimental, totalizando 200 lâminas analisadas. Os cortes dos embriões foram documentados utilizando o microscópio (Olympus BX40), com câmera DP 71 acoplada e *software* de captura DPControler, do Laboratório de Ficologia da UFPR (Departamento de Botânica), para observar regiões específicas do tecido embrionário e com maior detalhamento. As imagens também foram capturadas em estereomicroscópio (Discovery.V12, Zeiss) quando foi necessário obter uma visualização ampla e integral do corte do embrião. A morfologia e as estruturas embrionárias, com enfoque no TN, foram identificadas com o auxílio do Atlas de Desenvolvimento do Embrião de Galinha (*The Atlas of Chick Development*) de Bellairs e Osmond (2014);

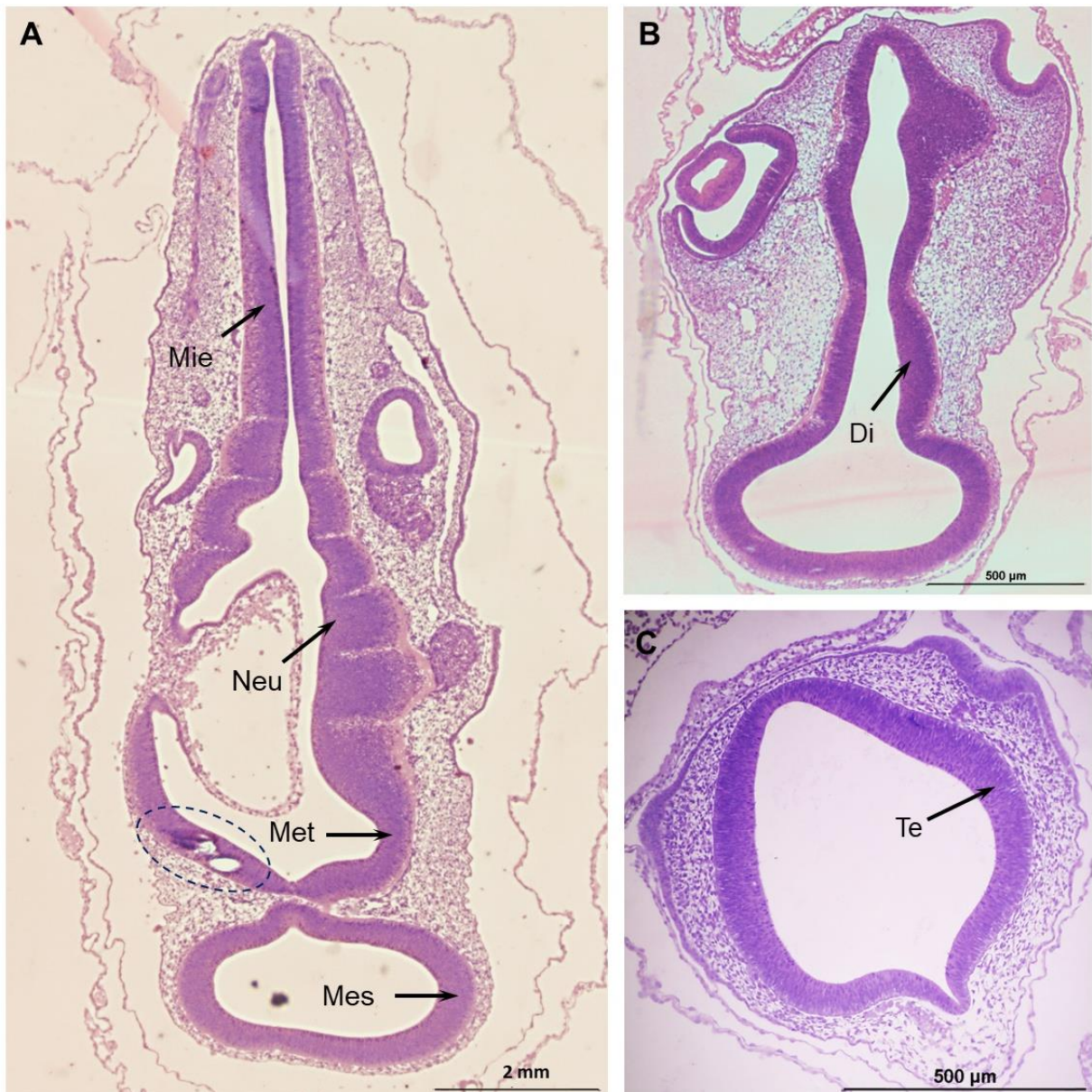
Atlas de Embriologia Descritiva (*Atlas of Descriptive Embryology*) de Schoenwolf e Mathews (2003); e Estudos de Laboratório de Embriões de Vertebrados e Invertebrados (*Laboratory studies of vertebrate and invertebrate embryos*) de Schoenwolf (1995). Foram analisadas as regiões cefálica, cervical, do tronco e o início da caudal, até o nível dos brotos das pernas.

5 RESULTADOS

As análises foram realizadas através da visualização de secções transversais dos embriões em microscópio de luz. A principal estrutura avaliada no presente estudo foi o tubo neural (TN) e as vesículas encefálicas, após a conclusão da neurulação primária.

As primeiras secções visualizadas foram regiões do TN que originam as vesículas encefálicas do embrião, que são formadas a partir do ectoderma embrionário. Devido à flexura cervical, já presente no estágio HH18, foram observados o mielencéfalo e seus neurômeros, o metencéfalo e o mesencéfalo (Figura 18 A), seguido do diencéfalo (Figura 18 B) e do telencéfalo (Figura 18 C). A distribuição celular dessas estruturas, como são originadas do TN, é de um epitélio pseudoestratificado colunar, com a divisão celular ocorrendo próximo ao lúmen das vesículas. Nessas regiões não foram visualizadas malformações estruturais graves, pois os embriões que apresentavam alterações cefálicas extensas e não puderam ser estadiados, não foram incluídos nesse estudo; no entanto, esses embriões estão sendo estudados pelo do grupo de pesquisa do laboratório.

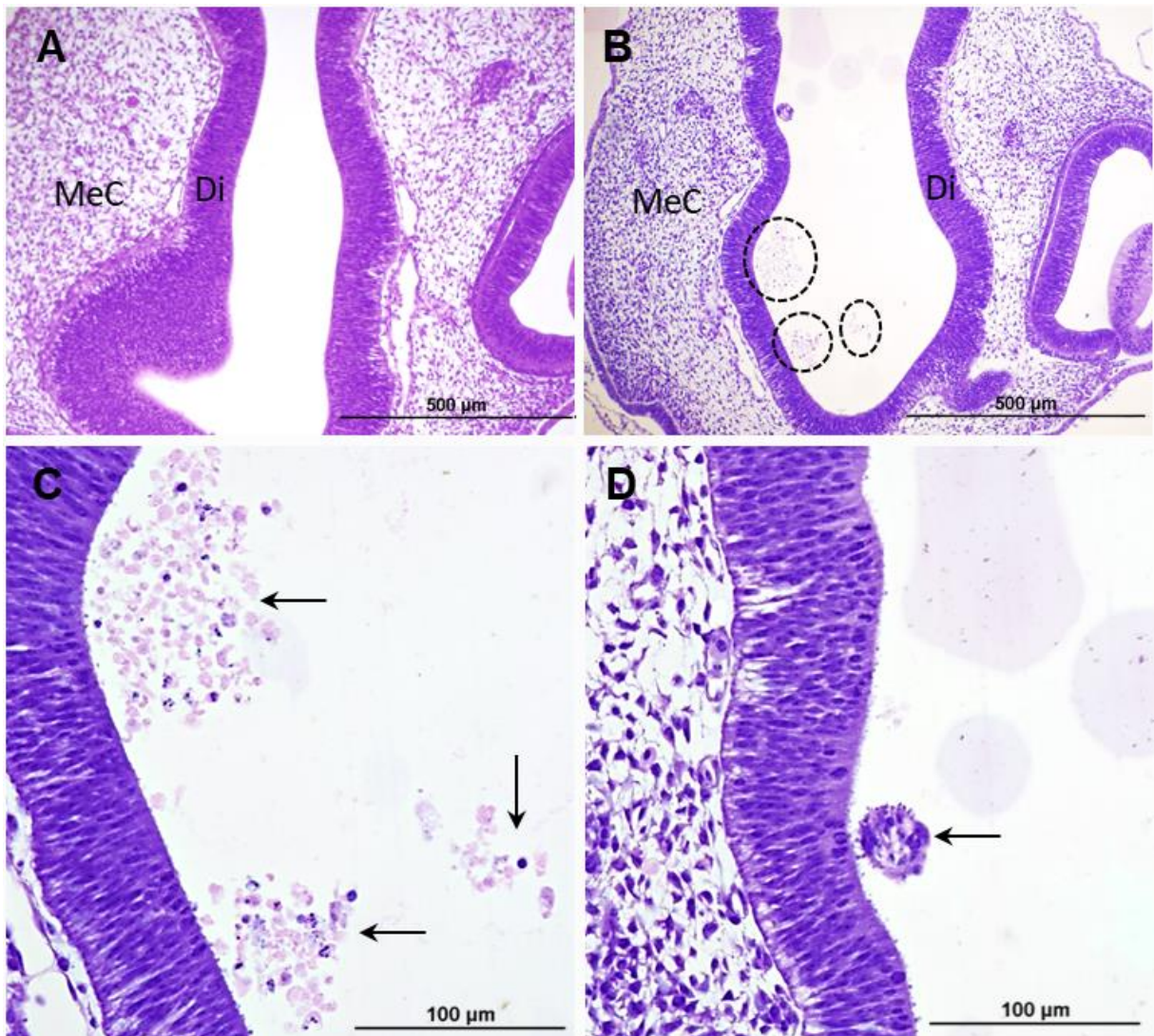
FIGURA 18: VESÍCULAS ENCEFÁLICAS - EMBRIÃO CONTROLE



A - C) Visualização das estruturas das vesículas encefálicas do grupo controle. **A e B)** Visualização das estruturas em estereomicroscópio e **C)** Visualização em fotomicroscópio. Mie: mielencéfalo, Neu: neurômeros do mielencéfalo, Met: Metencéfalo, Mes: Mesencéfalo, Di: Diencefalo, Te: Telencéfalo, Tracejado: Local danificado pela navalha. FONTE: A autora (2021).

Normalmente, um embrião sem alterações (Figura 19 A) não apresenta fragmentos celulares no lúmen do TN na região das vesículas encefálicas. Porém, observou-se que um embrião do grupo controle e um do grupo exposto II (PFOA na concentração de 5 ng.ml^{-1}) (Figura 19 B-D), apresentaram aglomerados celulares e fragmentos celulares característicos de células apoptóticas (núcleos fragmentados e picnóticos) desprendidas e no interior do TN das vesículas encefálicas, mais precisamente na região do diencefalo.

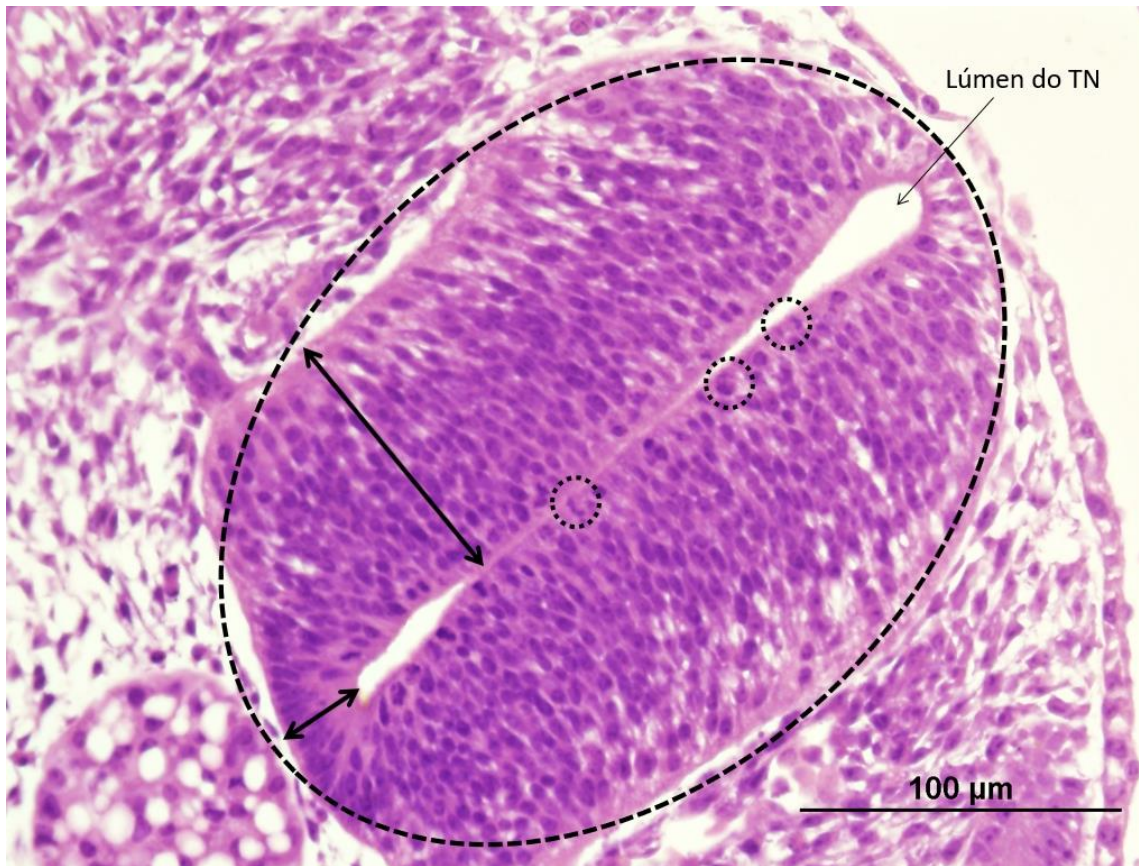
FIGURA 19: FRAGMENTOS CELULARES E NUCLEARES NO DIENCÉFALO



A) Embrião grupo controle. **B)** Embrião grupo exposto II (PFOA 5 ng.ml⁻¹) que apresentou no lúmen da vesícula encefálica a presença de células fragmentadas (tracejado em **B** e seta em **C**) e células com núcleo fragmentado (seta). **C** e **D**) aumento da figura B. Di: Diencefalo, MeC: Mesênquima cefálico. FONTE: A autora (2021).

A porção do TN, que origina a medula espinhal, quando estabelecido corretamente, exibe um formato elíptico, em secção transversal, com lúmen característico. As paredes laterais são mais espessas do que as paredes posterior e anterior; nesse processo, o lúmen é comprimido lateralmente, formando uma fenda vertical (Figura 20). Além disso, foi possível analisar o epitélio pseudoestratificado colunar e a distribuição dos núcleos, bem como células em diferentes etapas da mitose.

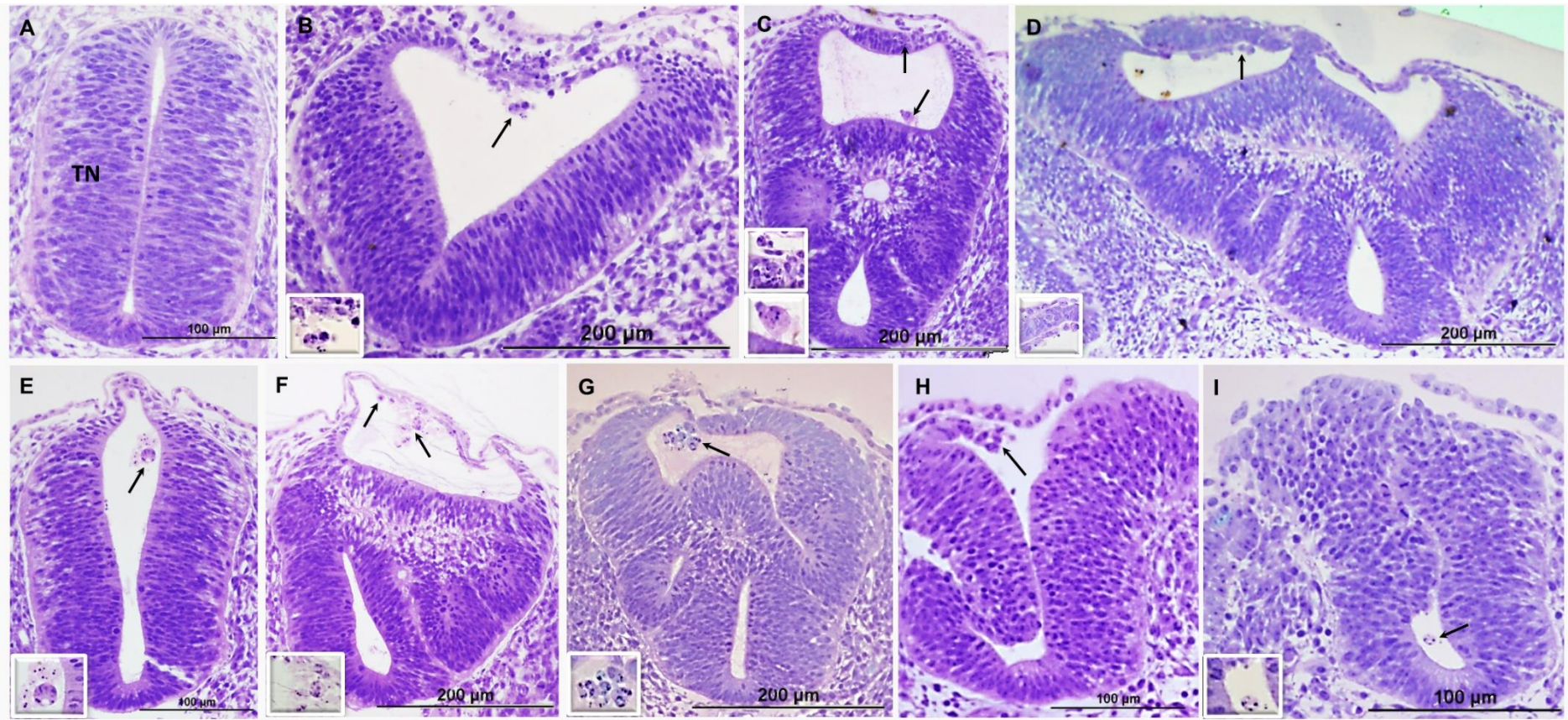
FIGURA 20: TUBO NEURAL



Visualização do TN do tronco do grupo controle. O TN possui um formato elíptico (tracejado), com as laterais mais largas do que a porção superior e inferior (setas duplas). Epitélio pseudoestratificado colunar, com núcleos em divisão mais próximos ao lúmen do TN (pontilhado). FONTE: A autora (2021).

Comparando-se morfológicamente o TN do grupo controle (Figura 21 A) com o TN de cada um dos grupos expostos (na região do tronco), notou-se a interferência do PFOA, em todas as concentrações, no desenvolvimento dessa estrutura, com o surgimento de diferentes malformações. Dentre elas, a ocorrência de múltiplos tubos (Figura 21 C, D, F, G), TN aberto (Figura 21 H, I) e outras alterações na forma (Figura 21 B, E), que se localizavam na região do tronco.

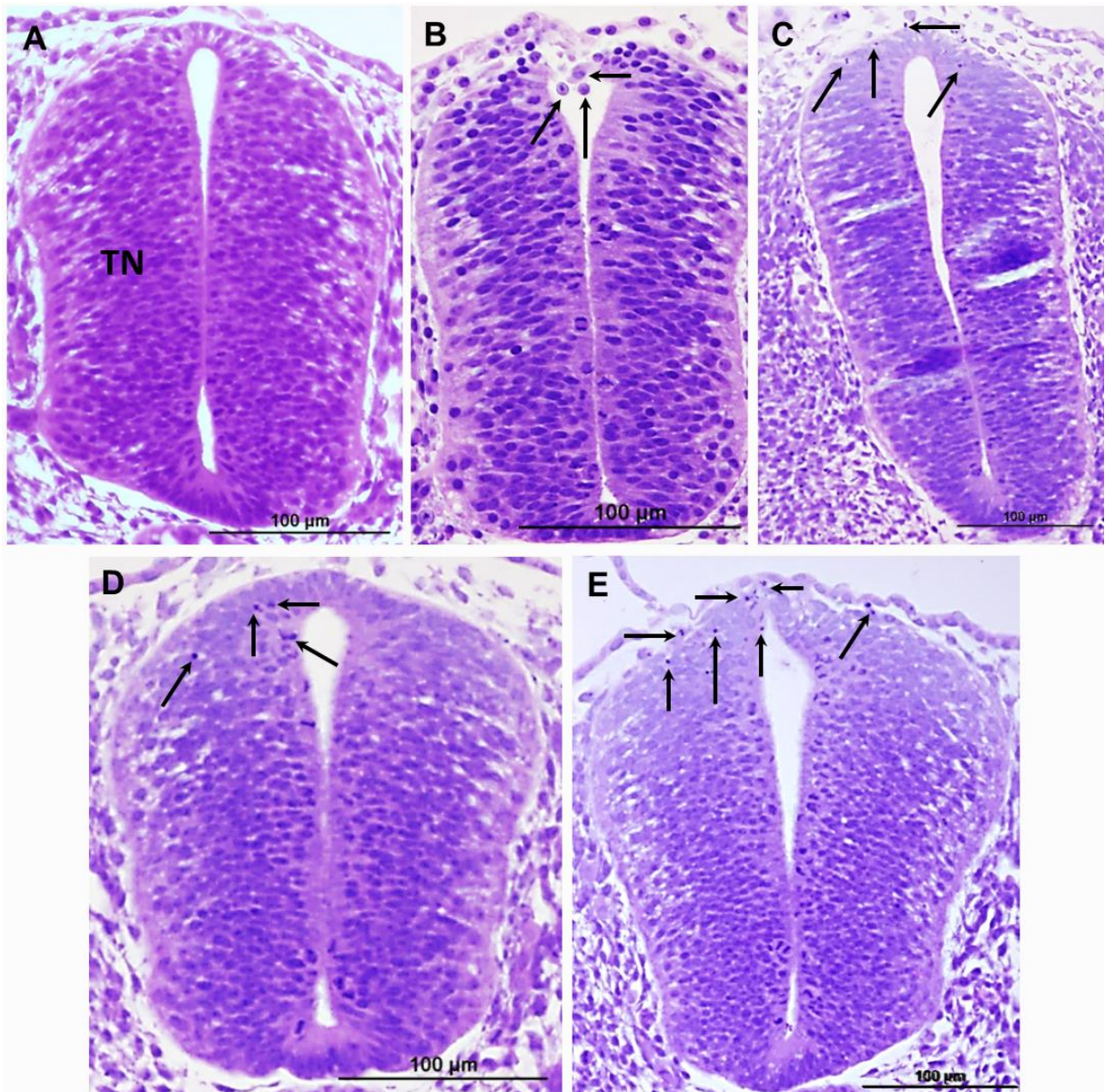
FIGURA 21: MALFORMAÇÕES NA ESTRUTURA DO TUBO NEURAL DO TRONCO



A) Embrião do grupo controle; TN do tronco com estrutura normal. **B - D)** Embriões do grupo exposto I (PFOA $0,5 \text{ ng.ml}^{-1}$), **E - G)** Embriões do grupo exposto II (PFOA 5 ng.ml^{-1}) e **H - I)** Embriões do grupo exposto III (PFOA 50 ng.ml^{-1}). Em cada um deles é possível visualizar os diferentes graus de malformações apresentadas, desde uma pequena na camada de células dorsais do TN até modificações extremas. Além disso, também são visualizadas células apoptóticas (setas). TN: tubo neural. TNm: tubo neural malformado. FONTE: A autora (2021).

Nos embriões controle não foram observadas células apoptóticas no TN na região do tronco (Figura 22 A), no entanto, essas células foram visualizadas nos embriões expostos ao PFOA nas duas maiores concentrações (5 e 50 ng.ml⁻¹) (Figura 22 B-E). Além disso, foi detectada agregação dos componentes celulares, visualizados com coloração mais intensa, núcleos com a cromatina mais condensada (picnóticos), núcleos fragmentados e presença de corpos apoptóticos na região cefálica (Figura 22C) e do tronco (Figura 22 B, D, E). Essas alterações foram observadas principalmente na porção dorsal do TN.

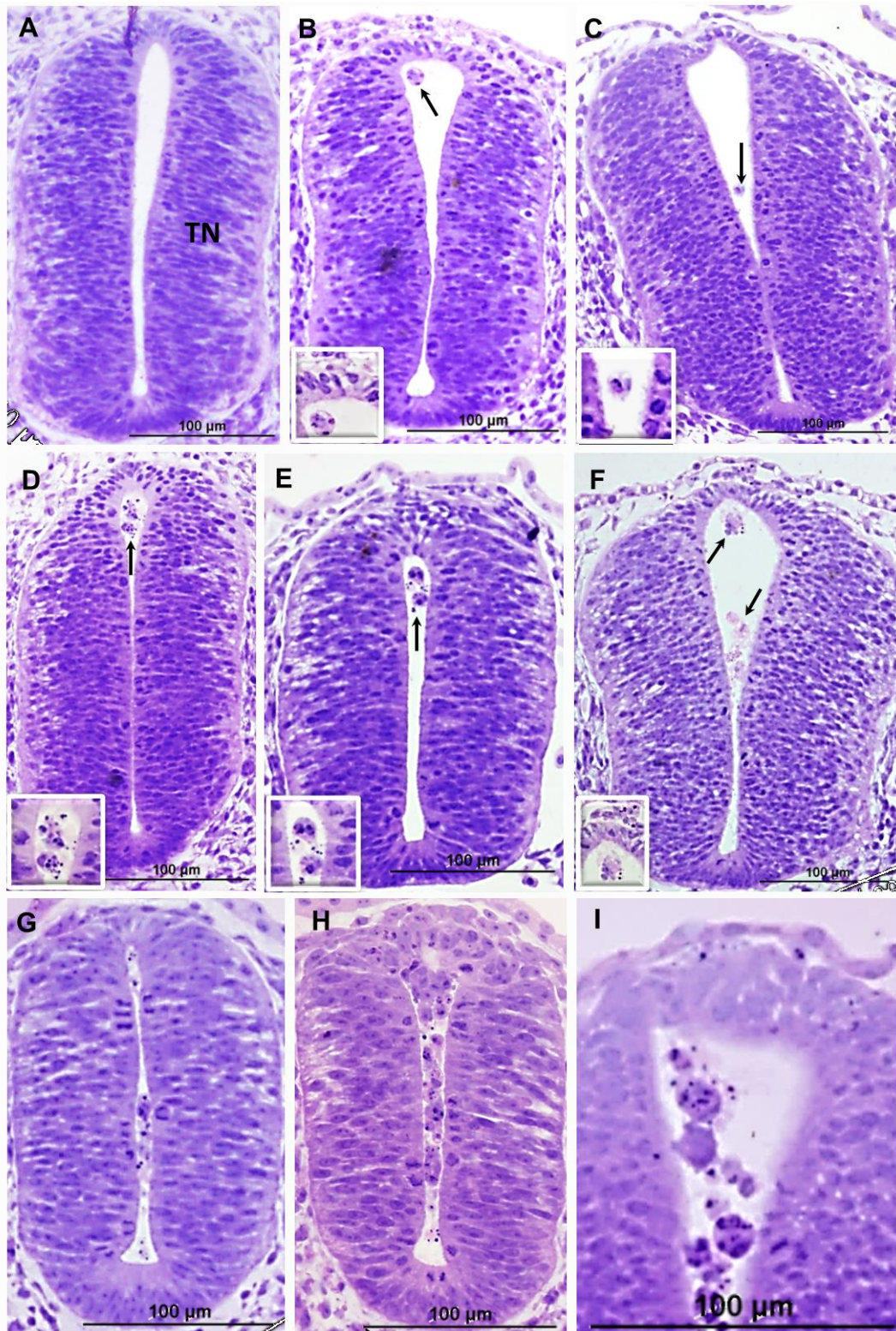
FIGURA 22: PRESENÇA DE CÉLULAS APOPTÓTICAS NO TUBO NEURAL



A) Embrião do grupo controle; TN do tronco sem alterações. **B e C)** Embriões do grupo exposto II (PFOA 5 ng.ml⁻¹); **D e E)** Embriões do grupo exposto III (PFOA 50 ng.ml⁻¹). Em cada um deles há a presença de células apoptóticas (setas). TN: tubo neural. FONTE: A autora (2021).

No lúmen do TN, do tronco, dos embriões controle (Figura 23 A) não foram encontrados fragmentos celulares e/ou células apoptóticas, porém estavam presentes nos embriões dos grupos expostos (PFOA 0,5, 5 e 50 ng.ml⁻¹) (Figura 23 B-I). O número de células apoptóticas no TN, do tronco, e desprendidas no lúmen foram variáveis, desde apenas uma célula (Figura 23 B e C) até grandes aglomerados (Figura 23 H e I).

FIGURA 23: CÉLULAS APOPTÓTICAS NO LÚMEN DO TUBO NEURAL DO TRONCO



A) Embrião do grupo controle; sem alterações no TN do tronco. **B e C)** Embriões do grupo exposto I (PFOA 0,5 ng.ml⁻¹), **D - F)** Embriões do grupo exposto II (PFOA 5 ng.ml⁻¹) e **G - I)** Embriões do grupo exposto III (PFOA 50 ng.ml⁻¹). Observar a presença de fragmentos celulares e células apoptóticas desprendidas no lúmen do TN do tronco, apresentando núcleo fragmentado (setas). TN: tubo neural. FONTE: A autora (2021).

A região do tronco apresentou mais alterações, porém não se observou qualquer alteração na região cervical. A extensão das alterações variou entre os embriões, sendo observadas alterações em um até quatro níveis axiais distintos, ao longo da extensão rostrocaudal do embrião. Também foi possível visualizar alterações em dois, dos cinco, embriões controles analisados.

De modo geral, ao analisar os resultados obtidos, foi possível observar que os embriões expostos a concentração de 5 ng.ml⁻¹ de PFOA, foram os que exibiram mais alterações no TN da região do tronco.

Com relação a extensão das malformações no TN do tronco, dos 15 embriões expostos avaliados, nas diferentes concentrações, destes 46,66% (7 embriões) apresentaram malformações no TN, sendo que esse tipo alteração foi encontrado em diferentes níveis axiais ao longo do eixo rostrocaudal do embrião. Ainda, 57,14% dos embriões alterados (4 embriões), exibiram essa alteração em mais de um nível axial, ou seja, foram alterações mais extensas. As células apoptóticas na estrutura do TN foram visualizadas em 7 embriões (46,66%) em até quatro níveis axiais diferentes. Já as células apoptóticas presentes no lúmen do TN foram observadas em 10 embriões (66,66%) e ocorreu em um até quatro níveis axiais.

A tabela 3 resume o número de embriões com alterações encontradas nas vesículas encefálicas e TN do tronco de cada grupo experimental.

TABELA 3: ALTERAÇÕES OBSERVADAS NOS EMBRIÕES

	Controle			Exposto I			Exposto II			Exposto III		
	RCf	RCe	RT	RCf	RCe	RT	RCf	RCe	RT	RCf	RCe	RT
Vesículas encefálicas (VE)	1	*	*		*	*	1	*	*		*	*
Tubo neural (TN)												
Alterações na forma/estrutura			2			3			3			1
Células apoptóticas na luz			1			3			3			4
Células apoptóticas no neuroepitélio						2	1		3			2

Número de embriões alterados em cada estrutura analisada, por grupo experimental. Controle = solução de NaCl 0,9%; Exposto I = 0,5 ng.ml⁻¹; exposto II = 5 ng.ml⁻¹ e exposto III = 50 ng.ml⁻¹. RCf: região cefálica, RCe: região cervical e RT: região do tronco. *: estruturas não encontradas na RCe e RT. FONTE: A autora (2021).

6 DISCUSSÃO

O trabalho realizado por Kmecick e colaboradores (2019), utilizando a análise por montagem total com embriões de ave *Gallus gallus* expostos, encontrou evidências de que o PFOA induz malformações no tubo neural (TN). Essas malformações eram visíveis anatomicamente, não sendo possível avaliar como impactavam histologicamente na estrutura do TN. Por isso, optou-se por desenvolver este trabalho com foco em uma análise morfológica mais aprofundada, utilizando a histologia. No entanto, ao se buscar bases bibliográficas voltadas à histologia de embriões de galinha, notou-se uma escassez de informações, sendo necessário, portanto, novas descrições acerca do assunto.

A histologia fornece aspectos mais detalhados a respeito do tecido e a utilização desta ferramenta ampliou o conhecimento microscópico das partes que compõe o corpo humano (CALADO, 2019) e diferentes organismos. Já se sabe que os tecidos alcançam sua complexa organização espacial por meio de interações de regulação da expressão gênica no controle da organização celular, comunicações celulares e interações físicas mediadas por forças mecânicas (ABDEL FATTA et al., 2021). Sendo assim, é possível analisar como a exposição a agentes ambientais tóxicos interferem na formação, modelagem e manutenção da morfologia tecidual dos embriões. Com base nisso, o foco principal de análise deste trabalho se voltou para as possíveis alterações que a exposição ao PFOA poderia causar na organização estrutural do TN em embrião de ave *Gallus gallus* no estágio HH18.

Inicialmente, foi observado que dois dos cinco embriões controles, mesmo não tendo sido expostos ao PFOA, apresentaram malformações estruturais do TN. Porém, sabe-se que durante o desenvolvimento embrionário podem ocorrer perturbações que levam a malformações (CARLSON, 2014), mesmo sem exposição a contaminantes. Entretanto, a repetição e representatividade do padrão da malformação é que irá diferenciar o processo normal do patológico (SCHATZ, 2003). Em embriões de ave *Gallus gallus*, a presença de malformações nos grupos controle se encontram em torno de 24% dos casos, aproximadamente (YAMAMOTO et al., 2012; KMECICK et al., 2019; DA COSTA et al., 2021), no entanto, neste trabalho foi encontrado uma porcentagem de 40%; essa diferença talvez seja por conta do tamanho da amostra utilizado.

Nas estruturas da região cefálica, principalmente as vesículas encefálicas, não foram encontradas alterações expressivas, apesar de terem sido observadas malformações significativas nessa região pela análise em montagem total (KMECICK et al., 2019). Isso, talvez, tenha ocorrido, pois para se fazer uma análise específica do estágio HH18, foi necessário que houvesse a determinação adequada deste estágio. Entretanto, isso só era possível quando o embrião possuía a formação correta das vesículas encefálicas, ou seja, sem nenhum impedimento morfológico, uma vez que essas estruturas são determinantes para a definição do estágio embrionário. Isso, portanto, justifica o não aparecimento dessas alterações estruturais significativas. Porém, foi observada a presença de células apoptóticas e fragmentos celulares no lúmen da região do diencéfalo, em um embrião exposto e um embrião controle. A presença de células e fragmentos celulares no lúmen da região cefálica também foi investigada por Yasui et al. (1994), em embriões de *Suncus murinus* (musaranho), sendo observadas em todos os embriões do estudo e classificada como frequente. Nesse trabalho, os fragmentos foram observados tanto no grupo exposto ao PFOA, quanto no grupo controle, em mesmo número de embriões, portanto, não se pode inferir que isso se deve a exposição ao PFOA. Para verificar a interferência do PFOA no aumento da frequência de ocorrência dessa alteração seria necessário analisar mais embriões controle e expostos.

Com relação ao TN, suas malformações são um grupo heterogêneo de defeitos congênitos estruturais que surgem de um conjunto complexo de múltiplos fatores, como genéticos e ambientais, que afetam a estrutura e função do cérebro e da medula espinhal; além disso, os defeitos espinhais são clinicamente mais comuns do que os cranianos (BLOUNT et al., 2019). Nossos resultados corroboram essa afirmação, uma vez que a grande maioria das alterações encontradas se deu na região do tronco. Ademais, existem situações nas quais a ocorrência dessa malformação se dá no local em que há uma transição entre o final da neurulação primária e o início da neurulação secundária, uma etapa denominada neurulação juncional (EIBACH et al., 2016). Nesse trabalho, foi possível notar que, em determinados casos, as malformações estruturais se estendem para a região caudal mostrando que essa interposição das neurulações é uma região sensível a perturbações exteriores, como a exposição ao PFOA.

Nessas malformações, observou-se a ocorrência de alteração na camada dorsal, que fez com que a faixa dorsal do TN da região do tronco se encontrasse

mais fina sem danos no epitélio dorsal, conferindo um aspecto de TN aberto. Nesses casos, portanto, percebe-se a interferência na biomecânica do tecido, que levou a um posicionamento incorreto das células. Os principais *insights* sobre a dinâmica celular e molecular subjacente ao processo de fusão epitelial necessário para o correto fechamento do TN se baseiam na participação do citoesqueleto com os filamentos de actomiosina (GALEA et al., 2017), além de adesão entre as células epiteliais através da ativação mediada por integrinas e ancoragem focal da membrana basal rica em fibronectina (MOLÈ et al., 2020). Outra contribuição dessa dinâmica celular é com relação aos filamentos de actina (GREENE; COPP, 2009), que participam nas modificações celulares para que ocorra a constrição apical (SCHOENWOLF; SMITH, 2000; SCHOENWOLF, 2018) das células que formam o TN. Sendo assim, o surgimento expressivo de múltiplos tubos observados nesse trabalho podem ser devido a uma alteração no padrão de organização dessas células e desses filamentos, bem como na indução realizada pelos tecidos adjacentes. Esse combinado de alterações pode ser o responsável por ocasionar o dobramento e fechamento incorreto do TN, comprometendo a estrutura como um todo.

O controle do número de células é um mecanismo morfogenético importante no desenvolvimento normal do sistema nervoso central (SNC) e que é responsável por determinar a citoarquitetura tecidual, de modo que o crescimento e a maturação do SNC são resultados do equilíbrio entre dois processos fundamentais, a proliferação celular e a morte celular (KOBUS, 2007). O comprometimento da proliferação celular durante o desenvolvimento pode afetar a neurulação dos embriões, resultando em defeitos do TN (AVAGLIANO et al., 2016b). Observou-se um desequilíbrio na proliferação celular, o que modificou a arquitetura tecidual e ocasionou o aparecimento de camadas celulares muito finas ou muito espessas, quando comparados com o controle. Porém, apesar de ser um parâmetro importante, neste trabalho ela não foi mensurada e somente com a histologia não foi possível observar alterações expressivas nos embriões tratados. Outro ponto importante é o evento de morte celular programada por apoptose, que também ocorre durante o desenvolvimento (BUSS; SUN; OPPENHEIM, 2006) e que tem papel crucial no estabelecimento do sistema nervoso e na homeostase do tecido (MATSUMOTO et al., 2020). Este tipo de morte celular é um processo ativo, geneticamente programado, regulado por genes pró e anti-apoptóticos, que se

perturbados, podem resultar numa variedade de doenças e patologias (KOBUS, 2007). A presença de células apoptóticas e fragmentos celulares presentes no lúmen do TN, do tronco, dos embriões encontradas neste trabalho, que também foram visualizadas em trabalhos anteriores como de Bancroft e Bellairs (1975), parecem consistir de corpos degenerados que foram ejetados do neuroepitélio. Isso demonstra o possível desequilíbrio em manter a estruturação adequada do tecido devido a interferência do PFOA utilizado neste trabalho. Pela análise qualitativa realizada, notou-se a ocorrência de mais morte celular nos grupos expostos ao PFOA do que nos grupos controles. Avagliano e colaboradores (2016b) avaliaram comparativamente a proliferação e morte celular em níveis lombares do TN com malformação e observaram uma redução significativa da proliferação celular e, concomitantemente, um aumento significativo na morte celular. Isto mostra que um desbalanço desse equilíbrio causado pela interferência externa, como a exposição a contaminantes, pode fazer com que o tecido perca a capacidade de se formar corretamente. Dessa forma, sugere-se que a exposição ao PFOA perturbou esse equilíbrio, causando um acúmulo de células apoptóticas na luz do TN das vesículas encefálicas e do TN do tronco.

O PFOA causa interferência no desenvolvimento de embriões de ave *Gallus gallus* durante o processo de neurulação primária, impactando diretamente na estruturação do TN, bem como nos processos celulares essenciais para a manutenção correta dessa morfologia. Devido à similaridade morfológica entre os embriões de aves e humanos, no período que abrange desde a gastrulação até a etapa de neurulação (IRIE; KURATANI, 2014), se torna possível realizar uma extrapolação, com cautela, dos resultados observados nas alterações estruturais no TN do tronco, e assim relacioná-las com malformações já descritas. Dentre elas, podemos citar as malformações disgráficas espinhais, que se desenvolvem devido a uma interferência causada durante o estabelecimento da neurulação primária, e essa interferência pode levar a ocorrência de mielomeningocele, meningocele e cranioraquisquise (EIBACH et al., 2016).

A mielomeningocele, a forma mais comum de espinha bífida aberta (AVAGLIANO et al., 2016a), leva a um tecido neural exposto e/ou meninges com um acúmulo de líquido que se projeta no nível vertebral afetado; esta condição pode causar vários déficits neurológicos e complicações que dependem do local vertebral envolvido (ALRUWAILI; M DAS, 2021). Neste caso, de acordo com os resultados

obtidos, as malformações que se enquadram nesta descrição seriam as das figuras 21 (H e I), que apresentam TN aberto na região do tronco e que podem levar a complicações nas regiões dependentes dessa parte do tecido nervoso.

A meningocele, espinha bífida fechada (AVAGLIANO et al., 2016a), é a projeção das meninges e líquido para o tecido subcutâneo por meio de um defeito na coluna vertebral. As manifestações neurológicas das meningocelos dependem de seu tamanho e localização, incluindo dor nas costas, bexiga neurogênica, parestesia (dormência ou formigamento de alguma parte do corpo) e paraparesia (incapacidade de mover parcialmente os membros inferiores) (NETHI; ARYA, 2021). A figura 21 F poderia ser um exemplo de acúmulo de líquido para o tecido subcutâneo, no entanto, neste caso não ocorre uma projeção das meninges; sendo assim, não é possível afirmar que realmente seja um caso de meningocele, apesar de esta ser uma das possíveis alterações que ocorrem devido a defeitos na região do tronco.

A craniorraquisise é uma das formas mais graves de defeitos do TN (COSKUN; KIRAN; OZDEMIR, 2009), que resulta na ausência da maior parte do crânio e do cérebro (anencefalia), combinada com uma medula espinhal aberta (espinha bífida) (ALGHAMDI et al., 2017). Como para determinar o estadiamento dos embriões do HH18 foi necessária a completa formação da região cranial dos embriões, não foi possível determinar a ocorrência de craniorraquisise neste trabalho. Porém, como neste trabalho foi visualizado o TN aberto na região do tronco e no trabalho de Kmecick (2019) foram visualizadas a ausência parcial ou total das vesículas encefálicas, se torna possível, mesmo assim, interpretar que a ocorrência de craniorraquisise é uma das preocupações que devem ser abordadas.

Além da extrapolação morfológica dos efeitos observados nos embriões de aves *Gallus gallus* para os humanos, é possível inferir sobre o risco de exposição pré-natal dos embriões humanos às concentrações de PFOA testadas. A concentração de PFOA encontrada no sangue do cordão umbilical de recém nascidos é de aproximadamente 0,31 a 7,06 ng.ml⁻¹ (CARIOU et al., 2015). Baseado nisso e na extrapolação alométrica (DA COSTA et al., 2021) dessas concentrações para o embrião de ave *Gallus gallus*, foram determinadas as concentrações utilizadas neste trabalho. Dessa forma, a concentração do grupo exposto II, de 5 ng.ml⁻¹, corresponde a um valor médio das concentrações encontradas no sangue de cordão; a do grupo exposto I (0,5 ng.ml⁻¹) é 10 vezes menor, porém ainda é realista, e a do exposto III (50 ng.ml⁻¹) é 10 vezes maior. Sendo assim, essas

concentrações foram consideradas realistas para a exposição humana, o que torna possível uma extrapolação dos efeitos dessas concentrações de PFOA para o desenvolvimento embrionário humano.

No trabalho de Kmecick e colaboradores (2019), a ocorrência de malformações no TN foi significativa em todas as concentrações de PFOA utilizadas (0,5 ng.ml⁻¹, 5 ng.ml⁻¹, 50 ng.ml⁻¹ e 250 ng.ml⁻¹). Neste trabalho também foram encontradas alterações em todas as concentrações, no entanto, a de 5 ng.ml⁻¹ de PFOA teve um maior número de embriões alterados. Considerando o número amostral reduzido e que foi realizada apenas uma avaliação qualitativa no presente trabalho, não se pode afirmar que a concentração de 5 ng.ml⁻¹ é a mais crítica para o desenvolvimento.

De forma geral, nossas observações demonstraram que o PFOA é capaz de interferir na organização tecidual do TN do tronco, principalmente na região do tronco de embriões de ave *Gallus gallus*, durante o período de desenvolvimento, e, com a histologia, quais são as possíveis alterações morfológicas que podem ser observadas após a exposição a esse contaminante. Como ainda não se tem descrições a respeito dessas alterações histológicas após a formação do TN, ressalta-se a importância da realização de estudos futuros que complementem os resultados aqui observados. Além disso, ficam algumas questões a serem respondidas futuramente, como quais componentes biomecânicos do tecido se encontram mais afetados e quão comprometido estava o equilíbrio entre proliferação e morte celular.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos nesse trabalho, foi possível constatar que o PFOA é tóxico nos estágios iniciais de desenvolvimento do embrião de galinha (*Gallus gallus*), levando a alterações morfológicas e teciduais. Apesar de se observar, sutilmente, um desbalanço entre proliferação e morte celular, são necessários mais estudos para confirmar esse desequilíbrio e entender outros possíveis mecanismos envolvidos. Até o momento, os dados auxiliam no entendimento dos danos microscópicos causados pela exposição ao PFOA e podem nortear futuros estudos sobre os mecanismos celulares da exposição a este contaminante durante o desenvolvimento embrionário.

8 CONCLUSÕES

O PFOA alterou a organização celular do TN durante o estabelecimento da neurulação primária, sendo a região do tronco a mais afetada. Além disso, as três concentrações utilizadas foram capazes de interferir no desenvolvimento do TN do tronco de embriões de *Gallus gallus* do estágio HH18.

9 REFERÊNCIAS

- ABDEL FATTAH, A. R. et al. Actuation enhances patterning in human neural tube organoids. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2021.
- ALGHAMDI, M. A. et al. A detailed musculoskeletal study of a fetus with anencephaly and spina bifida (craniorachischisis), and comparison with other cases of human congenital malformations. **Journal of Anatomy**, v. 230, n. 6, p.842–858, 2017.
- ALRUWAILI, A. A.; M DAS, J. Myelomeningocele. **StatPearls [Internet]**. PMID: 31536302, Bookshelf ID: NBK546696, 2021.
- AMOS-KROOHS, R. M. et al. Developmental manganese neurotoxicity in rats: Cognitive deficits in allocentric and egocentric learning and memory. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 59, p. 16–26, 2017.
- AVAGLIANO, L. et al. Histopathology of Neural Tube Defects. In: **Histopatology**. SMGroup, 2016a.
- AVAGLIANO, L. et al. Cell death and cell proliferation in human spina bifida. **Birth Defects Research**, v. 106, n. 2, p. 104–113, 2016b.
- BANCROFT, M.; BELLAIRS, R. Differentiation of the neural plate and neural tube in the young chick embryo. **Anatomy and Embryology**, v. 147, n. 3, p. 309–335, 1975.
- BATSCHAUER, A. R. et al. Behavioral and neurochemical effects in mice after one-generation exposure to low doses of manganese: Focus on offspring development. **Chemico-Biological Interactions**, v. 345, 109532, 2021.
- BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **The Atlas of Chick Development**. Academic Press - Elsevier, 3^a ed., p. 660, 2014.
- BJØRNSTAD, S. et al. Cracking the egg: Potential of the developing chicken as a model system for nonclinical safety studies of pharmaceuticals. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 355, n. 3, p. 386–396, 2015.
- BLAKE, B. E. et al. Evaluation of maternal, embryo and placental effects in CD-1 mice following gestacional exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) or hexafluoropropylene oxide dimer acid (HFPO-DA or GenX). **Environmental Health Perspectives**, v. 128, n. 2, p. 27006-1–27006-17, 2020.
- BLOUNT, J. P. et al. Concepts in the neurosurgical care of patients with spinal neural tube defects: An embryologic approach. **Birth Defects Research**, v. 111, n. 19, p. 1564–1576, 2019.
- BOEKELHEIDE, K. et al. Predicting Later-Life Outcomes of Early-Life Exposures. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 10, p. 1353–1361, out. 2012.
- BROWN, H. M.; MURRAY, S. A.; NORTHRUP, H.; AU, K. S.; NISWANDER, L.A. Snx3 is important for mammalian neural tube closure via its role in canonical and non-canonical WNT signaling. **Development**, v. 147, n. 22, p. 1–12, 2020.
- BUSS, R. R.; SUN, W.; OPPENHEIM, R. W. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. **Annual Review of Neurocience**, v. 29, p. 1–35, 2006.

CALADO, A. M. História do ensino da histologia. **História da ciência e ensino - Construindo interfaces**, v. 20, p 455–466, 2019.

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**, v. 115, n. 11, p. 1596–1602, 2007.

CAO, W. et al. Perfluoroalkyl substances in umbilical cord serum and gestational and postnatal growth in a Chinese birth cohort. **Environment International**, v.116, p. 197–205, 2018.

CARIOU, R. et al. Perfluoroalkyl acid (PFAA) levels and profiles in breast milk, maternal and cord serum of French women and their newborns. **Environmental international**, v. 84, p. 71-81, 2015.

CARLSON, B. M. **Human Embryology & Developmental Biology**. Elsevier Saunders, 15^a ed, p. 216–253, 2014.

COPP, A. J.; GREENE, N. D. Genetics and Development of Neural Tube Defects. **Journal of Pathology**. v. 220, n. 2, p. 217-230, 2010.

COPP, A. J., GREENE, N. D., MURDOCH, J. N. The genetic basis of mammalian neurulation. **Nature Reviews Genetics**. v. 4, n. 10, p. 784–793, 2003.

COSKUN, U.; KIRAN, G.; OZDEMIR, O. Craniorachischisis totalis: a case report and review of the literature. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 25, n. 1, p. 21–25, 2009.

DA COSTA, M. C. V. **Padrão de migração das células da crista neural cefálica em embriões de ave após exposição ao chumbo**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2018.

DA COSTA, M. C. V. Lead exposure affects cephalic morphogenesis and neural crest cells in *Gallus gallus* embryo. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 84, 106948, 2021.

DE LAHUNTA, A.; GLASS, E. N.; KENT, M. Embryonic Development of the Central Nervous System. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 46, n. 2, p. 193–216, 2016.

DONG, W.; ZHANG, Y.; QUAN, X. Health risk assessment of heavy metals and pesticides: A case study in the main drinking water source in Dalian, China. **Chemosphere**, v. 242, p. 125113, 2020.

EIBACH, S. Unjoined primary and secondary neural tubes: junctional neural tube defect, a new form of spinal dysraphism caused by disturbance of junctional neurulation. **Child's Nervous System**, v. 33, n. 10, p. 1633–1647, 2016.

FLENTKE, G. R.; SMITH, S. M. The Avian Embryo as a Model for Fetal Alcohol Spectrum Disorders. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 96 n.2, p. 98–106, 2018.

FOGUTH, R. M. et al. Developmental exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) selectively decreases brain dopamine levels in Northern leopard frogs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 377, 114623, 2019.

GABALLAH, S. et al. Evaluation of Developmental Toxicity, Developmental Neurotoxicity, and Tissue Dose in *Zebrafish* Exposed to GenX and Other PFAS. **Environmental Health**

Perspectives, v. 128, n. 4, 47005, 2020.

GALEA, G. L., et al. Biomechanical coupling facilitates spinal neural tube closure in mouse embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 26, p. E5177–E5186, 2017.

GILBERT, S. F. **Biologia do Desenvolvimento**. Editora FUNPEC, 5ª ed., p. 253–306, 2003.

GOULDING, D. R. et al. Gestational exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA): Alterations in motor related behaviors. **NeuroToxicology**, v. 58, p. 110–119, 2017.

GREENE, N. D. E.; COPP, A. J. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. **Prenatal Diagnosis**, v. 29, n. 4, p. 303–311, abr. 2009.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49–92, 1951.

HILLIER, L.; MILLER, W.; BIRNEY, E. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, v. 432, n. 7018, p. 695–716, 2004.

IRIE, N.; KURATANI, S. The developmental hourglass model: A predictor of the basic body plan? **Development (Cambridge)**, v. 141, n. 24, p. 4649–4655, 2014.

JIANG, Q. et al. *In ovo* very early-in-life exposure to diesel exhaust induced cardiopulmonary toxicity in a hatchling chick model. **Environmental Pollution**, v. 264, 114718, 2020.

JOHANSSON, N.; FREDRIKSSON, A.; ERIKSSON, P. Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 1, p. 160–169, 2008.

KAIN, K. H. et al. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. **Developmental Dynamics**, v. 243, n. 2, p. 216–228, 2014.

KMECICK, M. **Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico no desenvolvimento do sistema nervoso de embriões de ave Gallus gallus**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2017.

KMECICK, M. **Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico no desenvolvimento do sistema nervoso de embriões de ave Gallus gallus**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2018.

KMECICK, M. et al. Morphological evidence of neurotoxic effects in chicken embryos after exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) and inorganic cadmium. **Toxicology**, v. 427, p. 152286, 2019.

KMECICK, M. **Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico no desenvolvimento do sistema nervoso de embriões de ave Gallus gallus**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2019.

KOBUS, K. **Ação da homocisteína e do ácido fólico sobre o padrão morfológico e estrutura organizacional do telencéfalo e medula espinhal de embriões de Gallus domesticus**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

KORN, M. J.; CRAMER, K. S. Windowing chicken eggs for developmental studies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 8, p. 4–5, 2007.

LAU, C. et al. Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings. **Toxicological Sciences**, v. 99, n. 2, p. 366–394, 2007.

LEHMLER, H. J. Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants - A review. **Chemosphere**, v. 58, n. 11, p. 1471–1496, 2005.

LINDSTROM, A. B.; STRYNAR, M. J.; LIBELO, E. L. Polyfluorinated compounds: Past, present, and future. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 19, p. 7954–7961, 2011.

LIU, J. et al. A protective role of autophagy in Pb-induced developmental neurotoxicity in zebrafish. **Chemosphere**, v. 235, p. 1050–1058, 2019.

LOPES, J. E. F. P. **Efeito antiangiogênico do metil jasmonato, puro ou nanocarreado, um novo mecanismo para sua ação antineoplásica e antimetastática.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

LOWERY, L. A.; SIVE, H. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. **Mechanisms of Development**, v. 121, n. 10, p. 1189–1197, 2004.

MACEDO, A. **Screening the effects of emerging pollutants using embryo bioassays: triclosan, methyl-triclosan and perfluoroalkyls chemicals.** [s.l.] University of Porto, 2015.

MATSUMOTO, Y. et al. Apoptosis is involved in maintaining the character of the midbrain and the diencephalon roof plate after neural tube closure. **Developmental Biology**, v. 468, n. 1-2, p. 101–109, 2020.

MATTSSON, A. et al. Metabolic profiling of chicken embryos exposed to perfluorooctanoic acid (PFOA) and agonists to peroxisome proliferator-activated receptors. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–20, 2015.

MATTSSON, A. et al. Developmental exposure to a mixture of perfluoroalkyl acids (PFAAs) affects the thyroid hormone system and the bursa of Fabricius in the chicken. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 19808, 2019.

MOINI, J.; PIRAN, P. Embryology. In: **Functional and Clinical Neuroanatomy: A Guide for Health Care Professionals**. 1. ed. [s.l.: s.n.]. p. 51–76, 2015.

MOLÈ, A. M. et al. Integrin-Mediated Focal Anchorage Drives Epithelial Zippering during Mouse Neural Tube Closure. **Developmental Cell**, v. 52, n. 3, p. 321–334, 2020.

MÜLLER, Y. M. R. et al. Behavioral impairments related to lead-induced developmental neurotoxicity in chicks. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 7, p. 445–451, 2008.

NETHI, S.; ARYA, K. Meningocele. **StatPearls [Internet]**. PMID: 32965845, Bookshelf ID NBK562174, 2021.

NIKOLOPOULOU, E. et al. Neural tube closure: Cellular, molecular and biomechanical mechanisms. **Development (Cambridge)**, v. 144, n. 4, p. 552–566, 2017.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; REIS FILHO, H. S.; GROTZNER, R. S. **Técnicas e Métodos para a Utilização Prática em Microscopia.** Editora Santos, 420 p., 2012.

OULHOTE, Y.; BELLINGER, D. C. Neurodevelopment and Neurobehavioral Disorders in Relation to Developmental Exposures. In: **Health Impacts of Developmental Exposure to Environmental Chemicals.** [s.l.] Springer, 2020. p. 153–174, 2020.

- PREVEDOUROS, K. et al. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 32–44, 2006.
- RAHMAN, M. A. et al. Mechanism of chalaza formation in quail eggs. **Cell and Tissue Research**, v. 330, n. 3, p. 535–543, 2007.
- RASHIDI, H.; SOTTILE, V. The chick embryo: Hatching a model for contemporary biomedical research. **BioEssays**, v. 31, n. 4, p. 459–465, 2009.
- RASHTIAN, J.; CHAVKIN, D. E.; MERHI, Z. Water and soil pollution as determinant of water and food quality/contamination and its impact on female fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2019.
- RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 3, p. 511–533, 2000.
- SADLER, T. W. Distribution of surface coat material on fusing neural folds of mouse embryos during neurulation. **The Anatomical Record**, v. 191, n. 3, p. 345–349, 1978.
- SADLER, T. W. **Langman Embriologia Médica**. Editora LWW. 14^a ed. p. 313–350. 2018.
- SCHATZ, J.C. **Caracterização morfológica de embriões de *Gallus domesticus*, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula**. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- SCHOENWOLF, G. C. Contributions of the chick embryo and experimental embryology to understanding the cellular mechanisms of neurulation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 62, n. 1–3, p. 49–55, 2018.
- SCHOENWOLF, G. C. **Laboratory studies of vertebrate and invertebrate embryos: Guide and Atlas of Descriptive and Experimental Development**. Prentice Hall. 8^a ed. 1995
- SCHOENWOLF, G. C.; SMITH, J. L. **Mechanisms of neurulation**. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l: s.n.]. v. 136p. 125–134, 2000.
- SEALS, R.; BARTELL, S. M.; STEENLAND, K. Accumulation and clearance of perfluorooctanoic acid (PFOA) in current and former residents of an exposed community. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 1, p. 119–124, 2011.
- SERGI, C. M. Perfluorooctanoic Acid - A Water and Oil Repellent. **Encyclopedia of Environmental Health**, 2^a ed, v. 5, 92–95, 2019.
- SHI, Q. et al. Developmental neurotoxicity of triphenyl phosphate in zebrafish larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 203, p. 80–87, 2018.
- SIMÉON, S. et al. Multistate models of developmental toxicity: Application to valproic acid-induced malformations in the zebrafish embryo. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 414, 115424, 2021.
- SKOGHEIM, T.S. et al. Prenatal exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and associations with attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder in children. **Environmental Research**, v. 202, 111692, 2021.

SLABY, S. et al. Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? **Environmental Pollution**, v. 248, p. 478–495, 2019.

SMITH, J. L.; SCHOENWOLF, G. C. Neurulation: Coming to closure. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 11, p. 510–517, 1997.

STARLING, A. P. et al. Perfluoroalkyl substances and lipid concentrations in plasma during pregnancy among women in the Norwegian Mother and Child Cohort Study. **Environment International**, v. 62, p. 104–112, 2014.

STEENLAND, K.; BARRY, V.; SAVITZ, D. Serum perfluorooctanoic acid and birthweight an updated meta-analysis with bias analysis. **Epidemiology**, v. 29, n. 6, p. 765–776, 2018.

STEENLAND, K.; FLETCHER, T.; SAVITZ, D.A. Epidemiologic evidence on the health effects of perfluorooctanoic acid (PFOA). **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p.1100–1108, 2010.

STEIN, C. R. et al. Perfluorooctanoate exposure and major birth defects. **Reproductive Toxicology**, v. 47, p. 15–20, 2014.

SUJA, F.; PRAMANIK, B. K.; ZAIN, S. M. Contamination, bioaccumulation and toxic effects of perfluorinated chemicals (PFCs) in the water environment: A review paper. **Water Science and Technology**, v. 60, n. 6, p. 1533–1554, 2009.

TRIGUEIRO, N. et al. Zebrafish as an Emerging Model System in the Global South: Two Decades of Research in Brazil. **Zebrafish**, v. 17, n. 6, p. 412–125, 2020.

VIERKE, L. et al. Perfluorooctanoic acid (PFOA)-main concerns and regulatory developments in Europe from an environmental point of view. **Environmental Sciences Europe**, v. 24, p. 1–11, 2012.

VIZCAINO, E. et al. Transport of persistent organic pollutants across the human placenta. **Environment International**, v. 65, p. 107–115, 2014.

WILDE, J. J.; PETERSEN, J. R.; NISWANDER, L. Genetic, Epigenetic, and Environmental Contributions to Neural Tube Closure. **Annual Review of Genetics**, v. 48, n. 1, p. 583–611, 2014.

WOLF, C. J. et al. Developmental toxicity of perfluorooctanoic acid in the CD-1 mouse after cross-foster and restricted gestational exposures. **Toxicological Sciences**, v. 95, n. 2, p. 462–473, 2007.

WU, G. et al. Roles of planar cell polarity pathways in the development of neural tube defects. **Journal of Biomedical Science**, v. 18, n. 1, p. 66, 2011.

WU, K. et al. Association between maternal exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) from electronic waste recycling and neonatal health outcomes. **Environment International**, v. 48, p. 1–8, 2012.

WU, T. et al. Fostering efficacy and toxicity evaluation of traditional Chinese medicine and natural products: Chick embryo as a high throughput model bridging *in vitro* and *in vivo* studies. **Pharmacological Research**, v. 133, p. 21–34, 2018.

XU, G. et al. Opening angles and material properties of the early embryonic chick brain. Xu, G., Kemp, PS, Hwu, JA, Beagley, AM, Bayly, PV, & Taber, LA (2010). **Journal of**

Biomechanical Engineering, v. 132, n. 1, p. 011005-1–011005-7, 2010.

YAMAMOTO, F. Y. et al. Cadmium effects on early development of chick embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 548–555, 2012.

YASUI, K. et al. Apical cell escape from the neuroepithelium and cell transformation during terminal lip fusion in the house shrew embryo. **Anatomy and Embryology**, v. 189, n. 6, p. 463–473, 1994.

YOUNG, S. D. et al. Assessment of sublethal ecotoxicity of solvents on larvae of a model native amphibian (*Lithobates pipiens*). **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 483–492, 2020.

ZHANG, J. et al. Neurotoxicity of perfluorooctanoic acid and post-exposure recovery due to blueberry anthocyanins in the planarians *Dugesia japonica*. **Environmental Pollution**, v. 263 (Pt B), 114471, 2020.