

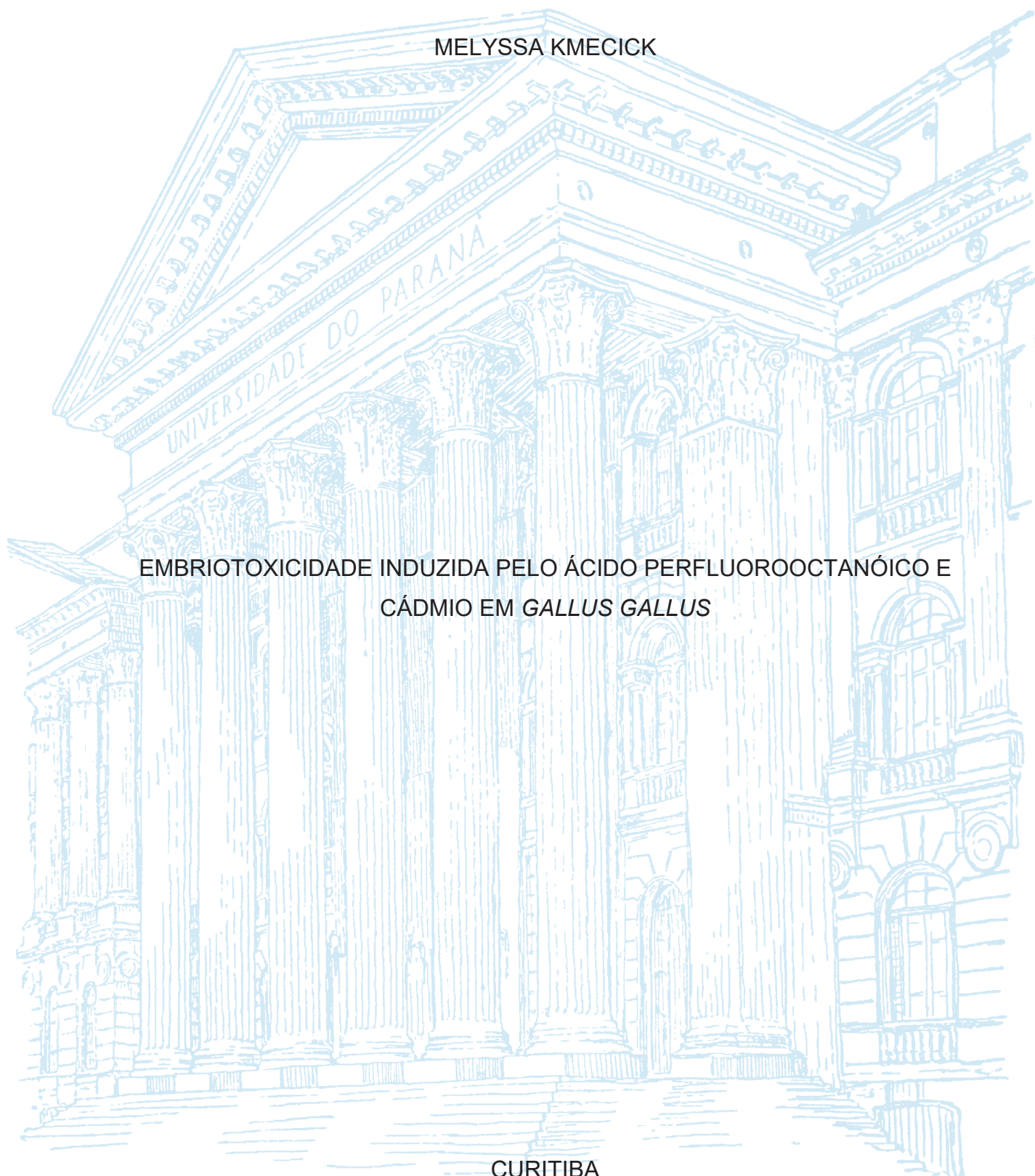
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MELYSSA KMECICK

EMBRIOTOXICIDADE INDUZIDA PELO ÁCIDO PERFLUOROOCATANÓICO E
CÁDMIO EM *GALLUS GALLUS*

CURITIBA

2022



MELYSSA KMECICK

EMBRIOTOXICIDADE INDUZIDA PELO ÁCIDO PERFLUOROOCETANÓICO E
CÁDMIO EM *GALLUS GALLUS*

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutora
em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Feijó Ortolani-
Machado

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Vermeulen
Carvalho Grade

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Kmecick, Melyssa.

Embriotoxicidade induzida pelo ácido perfluorooctanóico e cádmio em *Gallus gallus*. /
Melyssa Kmecick. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientadora: Claudia Feijó Ortolani-Machado.

Coorientadora: Carla Vermeulen Carvalho Grade.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Cádmio. 2. Histologia. 3. Malformações (Anatomia) – Aspectos genéticos. 4. Metais pesados. 5. Mortalidade. 6. Neurulação. 7. Tubo neural. 8. Ácidos. Título. II. Ortolani-Machado, Claudia Feijó. III. Grade, Carla Vermeulen Carvalho. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Bibliotecária: Rosilei Vilas Boas CRB-9/939



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MELYSSA KMECICK** intitulada: **EMBRIOTOXICIDADE INDUZIDA PELO ÁCIDO PERFLUOROOCETANÓICO E CÁDMIO EM *Gallus gallus***, sob orientação da Profa. Dra. CLAUDIA FEIJÓ ORTOLANI MACHADO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

01/04/2022 10:19:42.0

CLAUDIA FEIJÓ ORTOLANI MACHADO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

03/04/2022 21:54:51.0

FLÁVIA SANT'ANNA RIOS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/04/2022 11:36:28.0

PATRICIA FRANCHI DE FREITAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/04/2022 11:58:18.0

DANIEL BUSSOLARO

Avaliador Externo (INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

04/04/2022 13:23:24.0

MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 170740

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 170740

Dedico esta tese:

Aos meus pais, Jorge e Roselaine.

Ao meu esposo, André.

À minha avó, Anna.

AGRADECIMENTOS

À professora Claudia Feijó Ortolani-Machado, minha orientadora nos últimos nove anos, pelo carinho, amizade, paciência e confiança. Obrigada por todos os ensinamentos e conselhos profissionais e também para a vida. Obrigada por sempre me incentivar e por acreditar em mim, desde a iniciação científica.

À minha coorientadora, professora Carla Vermeulen Carvalho Grade, por todas as contribuições para a realização desse trabalho.

Aos professores que ao longo do doutorado avaliaram os relatórios e as qualificações, contribuindo com a construção dessa pesquisa.

Aos meus pais, Jorge e Roselaine, por serem a minha base e proporcionarem condições para que eu fosse quem eu sou hoje. Obrigada pelo amor incondicional, pelo incentivo nos estudos e por me ensinarem a ser forte pra correr atrás dos meus objetivos. Essa conquista também é de vocês!

Ao André, por compartilhar a vida comigo e estar ao meu lado na construção deste e de outros sonhos.

À minha amada família, por diversas vezes compreender a minha ausência e por todo apoio. Obrigada por embarcarem nessa junto comigo, bolando soluções para minhas necessidades no laboratório, cedendo materiais e o seu tempo. Aos meus tios, Silvio e Auri, e ao meu pai, agradeço por todo empenho no projeto e construção da “estante de caixas ninho” para alojamento dos pintinhos nascidos no laboratório.

À amiga Paula, pela parceria e convívio diário. Obrigada pela força, pela torcida e por suportar os meus surtos desde a iniciação científica.

À amiga Mariliza, pela companhia nos experimentos e desesperos. Obrigada pela parceria nas leituras de relatórios, coletas intermináveis e experimentos na madrugada.

À amiga Bruna, pelo apoio que foi essencial durante essa pandemia e as fases finais desse trabalho.

À amiga Ludiana, por ser a minha parceira de UFPR e irmã do coração. Por compartilhar comigo, além da graduação, o ingresso na pós-graduação. Obrigada pela amizade e por não me deixar desistir de biomol lá em 2011.

À amiga Patrícia, obrigada pelos anos de amizade e por acompanhar a minha vida, inclusive a acadêmica, desde que aprendemos a resolver polinômios.

À Nina e ao Luke, por alegrarem os meus dias nessa pandemia sem fim, me fazendo companhia e me tirando de casa pra dar umas bandinhas.

Aos colegas do Laboratório de Embriotoxicologia, pelos experimentos, lanches e risadas compartilhados. Em especial aos alunos de iniciação científica: Eduardo, Isabella, Sandra e Thaís. Obrigada pela amizade e imensa ajuda no laboratório. Eduardo e Thaís, obrigada por tantos blocos cortados, e outros tantos quebrados, lâminas coradas e foto documentadas. E principalmente, obrigada pela oportunidade de aprender tanto sendo sua coorientadora.

Aos demais professores, amigos e colegas do Grupo de Toxicologia Celular. Obrigada pelas enriquecedoras discussões científicas, pelas confraternizações e desabafos. Em especial à Patrícia e ao Tugstênio, pela ajuda e discussões a respeito dos resultados desse trabalho.

Ao Herculano Salviano dos Reis Filho, o Nino, por todas as vezes que fui lhe pedir socorro e prontamente fui atendida, com protocolos, colorações, afiações de navalha e manutenção de microscópio.

Ao Cleber Vieira da Costa, pelas discussões metodológicas e todos os reagentes doados ao laboratório.

À professora Thelma Alvim Veiga Ludwig (PPG Botânica - UFPR), por disponibilizar o uso do fotomicroscópio para a captura das imagens.

Ao Imunova, por disponibilizar a incubadora usada nos experimentos de eclosão e o espaço no aviário para a manutenção dos pintinhos.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular e a todos os professores do programa, que contribuíram com a minha formação.

À Universidade Federal do Paraná, por ser a minha casa, pelas oportunidades e por me proporcionar onze anos de formação de qualidade. Tenho muito orgulho e serei pra sempre UFPR!

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Deus, por estar sempre presente na minha vida e me dar forças pra seguir em frente.

“Um doutorado é muito mais do que um diploma. Ele pode quebrar você em sua forma mais vulnerável, mas tem o potencial de te reconstruir para torná-lo um pesquisador resiliente, determinado, humilde e experiente. Esse processo leva tempo e paciência [...]. Não se trata apenas de obter o título e colocá-lo junto ao seu nome. É sobre se tornar quem você está destinado a ser”.

Autor desconhecido

RESUMO

O ácido perfluorooctanóico (PFOA) e o cádmio (Cd) são poluentes persistentes no ambiente, bioacumuláveis e capazes de transpor a barreira placentária. A exposição a esses contaminantes no período pré-natal interfere no desenvolvimento, comprometendo o crescimento e induzindo malformações no sistema nervoso, como defeitos do tubo neural (TN). No ambiente os organismos vivos estão expostos a uma mistura complexa de poluentes que podem interagir, potencializando ou inibindo seus efeitos tóxicos. Por isso, o estudo da neurotoxicidade no desenvolvimento induzida pelo PFOA e Cd é altamente relevante. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos desses contaminantes, isoladamente e em mistura, em dose única *in ovo*, sobre diferentes parâmetros, em embriões de *Gallus gallus*. Para isso, foram realizadas análises de mortalidade, ocorrência de malformações e caracterização histológica, análise de rede e enriquecimento funcional a partir de genes selecionados em base de dados toxicogenômicos comparativos, além de avaliação anatômica de animais eclodidos. Inicialmente, foram avaliadas diferentes resinas de incorporação para o estudo histológico dos embriões, sendo a historesina a que proporcionou maior precisão de orientação dos embriões para corte, aliada à excelente preservação das estruturas e poucos artefatos. Posteriormente, a exposição dos embriões foi realizada injetando-se solução de contaminante ou veículo na câmara de ar, previamente à incubação. As concentrações utilizadas foram 0,5 ng.ml⁻¹, 5 ng.ml⁻¹ e 50 ng.ml⁻¹ de PFOA, 0,05 µg.ml⁻¹, 0,5 µg.ml⁻¹ e 5 µg.ml⁻¹ de Cd e a mistura de PFOA à 5 ng.ml⁻¹ e Cd à 0,5 µg.ml⁻¹. Os embriões foram incubados por 2 a 6 dias, 8, 21 dias, até a eclosão ou no máximo 24 dias. Foram avaliadas a mortalidade embrionária, a ocorrência de malformações e as alterações histológicas envolvidas nas malformações causadas nos estádios HH14 e HH18, com foco no tubo neural. O material coletado foi processado em historesina, com coloração de hematoxilina e eosina e ácido periódico de Schiff (PAS). Alterações significativas no aumento da mortalidade e malformações indicaram o efeito embriotóxico dos contaminantes no embrião de galinha. As alterações teciduais encontradas no TN corroboram as alterações observadas em montagem total de embriões expostos ao PFOA e Cd nas mesmas concentrações, sendo elas: desorganização das vesículas encefálicas, TN aberto, presença de aglomerados celulares e/ou células apoptóticas na luz do tubo neural, células apoptóticas no neuroepitélio e alteração na forma do TN. A marcação com PAS evidenciou a membrana basal principalmente da notocorda e TN, sendo que a intensidade média de marcação nas secções foi reduzida significativamente em relação ao controle, principalmente no HH18. Esses resultados revelam a ação desses contaminantes a nível histológico, já em estágios iniciais e foram compilados em um índice de lesão elaborado para embriões de galinha em estágios iniciais de desenvolvimento. Além disso, apontam os possíveis mecanismos celulares da ocorrência das malformações, que foram corroborados pela análise de enriquecimento funcional. Nos indivíduos eclodidos e não eclodidos, foram observadas alterações anatômicas compatíveis com as malformações encontradas nos embriões em estágios mais iniciais, evidenciando a permanência dessas alterações ao longo do desenvolvimento.

Palavras-chave: composto perfluorado; histologia; malformações; metal pesado; mortalidade; neurulação; redes de interação; tubo neural.

ABSTRACT

Perfluorooctanoic acid (PFOA) and cadmium (Cd) are persistent and bioaccumulative environmental pollutants capable of crossing the placental barrier. Prenatal exposure to these contaminants interferes with development, impairing growth and inducing malformations in the nervous system, such as neural tube (NT) defects. Living organisms are exposed to complex mixtures of pollutants, which can interact, enhancing or inhibiting their toxic effects. Thus, the study of developmental neurotoxicity induced by PFOA and Cd, alone and in a mixture, is highly relevant. This work aimed to evaluate the effects of PFOA and Cd, isolated and in a mixture, in a single dose *in ovo*, on several parameters in the *Gallus gallus* embryo. To this end, mortality, malformations occurrence, histological characterization, network and functional enrichment of cured genes from Comparative Toxicogenomics Database (CTD), anatomical evaluation of hatched and non-hatched chicks were assessed. Initially, different embedding resins were evaluated for the histological study of the embryos, and historesin was the one that provided greater precision of orientation of the embryos for sectioning, allied to the excellent preservation of the structures and fewer artifacts. After, embryo exposure was performed by injecting contaminant solution or vehicle into the air chamber, before incubation. The concentrations used were 0.5 ng.ml⁻¹, 5 ng.ml⁻¹ and 50 ng.ml⁻¹ of PFOA, 0.05 µg.ml⁻¹, 0.5 µg.ml⁻¹ and 5 µg.ml⁻¹ of Cd and the mixture of 5 ng.ml⁻¹ PFOA and 0.5 µg.ml⁻¹ Cd. Embryos were incubated for 2 to 6 days, 8, 21, until hatching or a maximum of 24 days. Then, embryo mortality, the occurrence of malformations, and histological changes were characterized in stages HH14 and HH18, focusing on the neural tube. The collected material was processed in historesin and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and periodic acid Schiff (PAS). Significant changes in mortality and occurrence of malformations indicated the teratogenic effect of contaminants on the chick embryo. Tissue changes found in NT corroborate alterations observed in the whole-mount analysis of embryos exposed to PFOA and Cd at the same concentrations, namely: brain vesicles disorganization, open NT, presence of cell clusters and/or apoptotic cells in the NT lumen, apoptotic cells in the neuroepithelium and alteration in the shape of the NT. PAS staining evidenced mainly the notochord and TN the basement membranes, and the average intensity of staining in the sections was significantly reduced when compared with the control, mainly at HH18. These results reveal the action of these contaminants at the histological level, even in early stages, and were compiled into a lesion index developed for chicken embryos at early stages of development. In addition, they point out the possible cellular mechanisms for the occurrence of malformations, which were corroborated by the analysis of functional enrichment. In hatched and non-hatched individuals, anatomical alterations compatible with the malformations found in early-stage embryos were observed, evidencing the permanence of these alterations throughout development.

Keywords: heavy metal; histology; interactions network; malformations; mortality; neural tube; neurulation; perfluorinated compound.

SUMÁRIO

Introdução	10
Revisão de literatura	11
Embrião de galinha como modelo animal.....	11
Neurulação	13
<i>Neurulação primária</i>	13
<i>Neurulação secundária</i>	19
<i>Neurulação juncional</i>	20
Histogênese no tubo neural.....	21
Neurotoxicidade no desenvolvimento embrionário	23
Ácido perfluorooctanóico (PFOA).....	24
Cádmio (Cd)	26
Misturas de poluentes	28
Justificativa	30
Objetivos	31
Capítulo I	32
RESUMO	33
1. Introdução	34
2. Material e métodos	38
2.1. Animais.....	38
2.2. Incubação.....	38
2.3. Coleta dos embriões.....	38
2.4. Orientação dos embriões	39
2.5. Processamento em paraplast.....	40
2.6. Processamento em polietilenoglicol	43
2.7. Processamento em historesina	45
2.8. Análise.....	48
3. Resultados	50
3.1. Precisão na Orientação	50
<i>Paraplast</i>	50
<i>Polietilenoglicol</i>	51
<i>Historesina</i>	51
3.2. Visualização dos embriões nos blocos, microtomia e coloração	53

<i>Paraplast</i>	53
<i>Polietilenoglicol</i>	53
<i>Historesina</i>	54
3.3. Qualidade da preservação tecidual	55
<i>Paraplast</i>	55
<i>Polietilenoglicol</i>	56
<i>Historesina</i>	57
3.4. Tempo de preparação dos blocos e custo	59
Capítulo II	72
RESUMO	73
1. Introdução	74
2. Material e métodos	77
2.1. Modelo animal	77
2.2. Desenho experimental	77
2.3. Método de exposição	79
2.4. Coleta dos embriões	80
2.5. Estádios e regiões de interesse	82
2.6. Processamento histológico dos embriões	83
<i>Preparo da Historesina</i>	83
<i>Desidratação e infiltração</i>	84
<i>Emblocagem</i>	84
<i>Microtomia</i>	84
<i>Coloração de hematoxilina e eosina (H&E)</i>	87
<i>Histoquímica com Ácido periódico de Schiff (PAS)</i>	87
2.7. Análise morfológica tecidual	87
<i>Índice de lesão embrionária</i>	88
<i>Histoquímica</i>	89
2.8. Análise estatística	90
2.9. Análise de redes de interação	90
<i>Coleta de dados</i>	90
<i>Enriquecimento funcional</i>	90
2.10. Avaliação dos animais com 21 dias de incubação	91
3. Resultados	95

3.1. Mortalidade.....	95
3.2. Ocorrência de malformações.....	99
3.3. Morfologia tecidual	107
3.4. Redes de interação e enriquecimento funcional.....	121
3.5. Anatomia dos animais eclodidos e não eclodidos	124
4. Discussão	127
5. Conclusões	141
REFERÊNCIAS.....	142
Considerações finais	157
Conclusões	159
REFERÊNCIAS.....	161
ANEXO 1.....	194
ANEXO 2.....	195

Introdução

Atualmente existem mais de 193 milhões de substâncias químicas orgânicas e inorgânicas registradas (CHEMICAL ABSTRACT SERVICE, 2022). Muitas delas são liberadas no ambiente indiscriminadamente pelas atividades antrópicas, a partir de resíduos urbanos, industriais e agrícolas, contaminando o solo, a água e o ar e se distribuindo globalmente. Dessa forma, é crescente a preocupação em relação aos efeitos nocivos dessas substâncias aos seres vivos, visto que muitas delas bioacumulam nos organismos e biomagnificam na cadeia trófica (POPEK, 2018). A exposição de gestantes é particularmente preocupante, pois muitos compostos são capazes de transpor a barreira placentária e atingir o indivíduo em desenvolvimento. O ácido perfluorooctanóico (PFOA) e o cádmio (Cd) são poluentes ambientais persistentes e bioacumuláveis que atravessam a placenta (TAYLOR *et al.*, 2018; ROVIRA *et al.*, 2019). Apesar disso, poucos estudos avaliam seus efeitos sobre o desenvolvimento embrionário e a morfogênese do sistema nervoso, em concentrações realistas para a exposição humana, especialmente em estágios mais sensíveis à ação de agentes externos. Além disso, as alterações morfológicas causadas por eles ainda são pouco exploradas e compreendidas, bem como o efeito da sua exposição em mistura.

O embrião de galinha é um modelo de estudo valioso na Embriologia e Biologia do Desenvolvimento e também oferece vantagens para o estudo da Embriotoxicologia (FLENTKE; SMITH, 2018). O desenvolvimento curto, experimentalmente acessível e semelhante ao de outras espécies de vertebrados (IRIE; KURATANI, 2011), favorece o seu uso na avaliação dos efeitos de xenobióticos sobre o desenvolvimento embrionário, permitindo, também, a extrapolação dos efeitos para outros animais.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos desses contaminantes sobre embriões de galinha, a fim de caracterizar seu efeito embriotóxico.

Revisão de literatura

Embrião de galinha como modelo animal

O embrião de ave *Gallus gallus* (galinha) é um modelo de estudo consolidado nas áreas de Embriologia e Biologia do desenvolvimento (MOK *et al.*, 2015). A partir dele, foram descobertos aspectos fundamentais do desenvolvimento, como a formação das camadas germinativas, os conceitos de indução, destino e competência (STERN, 2005), e foi possível entender os mecanismos da morfogênese de vários órgãos, como o coração e o sistema nervoso (DAVEY; TICKLE, 2007; WITTIG; MÜNSTERBERG, 2016). Por ser um sistema experimental versátil, se destaca também em estudos de Toxicologia (GHIMIRE *et al.*, 2022), Imunologia (GARCIA *et al.*, 2021), Farmacologia (BJØRNSTAD *et al.*, 2015; ZOSEN *et al.*, 2021), Virologia (RIBATTI, 2018) e do câncer (AUGUSTINE *et al.*, 2020; CHU *et al.*, 2021).

O seu êxito como modelo experimental, principalmente do desenvolvimento embrionário, se deve ao fato de o embrião de galinha apresentar estágios¹ de desenvolvimento que são molecular e morfológicamente semelhantes aos de outros vertebrados (IRIE; KURATANI, 2011). Essas semelhanças são mais acentuadas em um período intermediário do desenvolvimento, denominado período filotípico e compreende diferentes estádios² específicos de cada espécie (HU *et al.*, 2017). Em comparação ao desenvolvimento humano, o embrião de galinha é o que mais se assemelha durante a gastrulação, neurulação e dobramentos, os processos iniciais da morfogênese (WANG; WHITE, 2021). Ainda, o embrião de galinha apresenta vantagens em relação a outros animais, como facilidade de obtenção e desenvolvimento detalhadamente descrito (HAMBURGER; HAMILTON, 1951), relativamente curto (21 dias) e externo, o que facilita a sua observação. Essa acessibilidade experimental permite a análise do embrião ao longo do seu desenvolvimento *in ovo* e a realização de manipulações genéticas (ABU-

¹ Estágio: Se refere a um período do desenvolvimento que pode englobar um ou mais estádios embrionários de uma determinada espécie, podendo ser representado pelo tempo de desenvolvimento.

² Estádio: Trata-se de um momento no desenvolvimento em que o embrião apresenta características morfológicas específicas, cujo aparecimento pode estar relacionado ao tempo de desenvolvimento.

Por exemplo, o estágio de desenvolvimento de 3 dias do embrião de galinha compreende os estádios 19-23, segundo a classificação de Hamburger e Hamilton (1951).

BONSRAH; ZHANG; NEWGRREN, 2016) e microcirúrgicas (WACHHOLZ *et al.*, 2021), sem a necessidade de procedimentos cirúrgicos e/ou eutanásia da progenitora. Dessa forma, os estudos que utilizam o embrião de ave *G. gallus* agregam conhecimento sobre os mecanismos do desenvolvimento de outros animais e também auxiliam na caracterização do papel dos fatores genéticos e ambientais na teratogênese (DAVEY *et al.*, 2018).

Na embriotoxicologia³, o uso do embrião de galinha é notável por também permitir o estudo direto dos efeitos de substâncias sobre o desenvolvimento embrionário, já que não possui a influência do metabolismo materno e do transporte placentário (SMITH; FLENTKE; GARIC, 2012). Dessa forma, é possível caracterizar o potencial embriotóxico⁴ e teratogênico⁵ de drogas e poluentes ambientais e, através de diferentes abordagens, determinar como um composto age no embrião desde as etapas mais iniciais do desenvolvimento (WACHHOLZ *et al.*, 2021). Além disso, devido às similaridades nos mecanismos de desenvolvimento, o estudo de alterações causadas por xenobióticos na embriogênese de *G. gallus* permite certo grau de extrapolação para outras espécies de vertebrados, incluindo humanos.

Devido à importância da avaliação a nível tecidual e celular na caracterização detalhada e identificação precoce do efeito teratogênico de substâncias (KURTH *et al.*, 2012), são necessárias metodologias eficientes em promover secções histológicas com excelente preservação tecidual e orientação adequada. Apesar das múltiplas características favoráveis ao uso do embrião de ave *G. gallus* como modelo de estudo, seu tamanho reduzido e fragilidade nos estágios iniciais do desenvolvimento (até 4 dias) requerem

³ Embriotoxicologia: Ramo da toxicologia do desenvolvimento focado no desenvolvimento pré-natal. A toxicologia do desenvolvimento é mais ampla e abrange o estudo dos efeitos adversos no organismo em desenvolvimento desde a concepção até a maturação sexual. (PAMIES *et al.*, 2011)

⁴ Embriotoxicidade: Efeitos tóxicos na prole no período inicial de desenvolvimento, a embriogênese (PAMIES *et al.*, 2011; WILLHITE; MIRKES, 2014).

⁵ Teratogenicidade: Efeitos tóxicos na prole após o período de embriogênese. Esse termo é usualmente empregado para designar malformações ou defeitos estruturais, porém refere-se também a alterações funcionais, atraso no desenvolvimento e morte embrionária ou fetal (WILSON, 1977; PAMIES *et al.*, 2011). A palavra teratogenicidade pode ainda ser usada para designar os efeitos sobre o desenvolvimento pré-natal em geral. É também chamada de fetotoxicidade (WILLHITE; MIRKES, 2014).

No desenvolvimento pré-natal humano esses conceitos são facilmente aplicados, pois o período é claramente dividido em embrionário (até a 8ª semana) e fetal (a partir da 9ª semana) (CARLSON, 2019). No desenvolvimento das aves não há essa distinção. Dessa forma, referem-se à embriotoxicidade os efeitos observados até o final da embriogênese (≡ estágio HH35 na galinha) e teratogenicidade após esse período.

manipulação mais delicada, bem como metodologias diferenciadas em relação aos processamentos histológicos usuais, sobre as quais há pouca literatura.

Neurulação

A neurulação é o processo pelo qual é formado o tubo neural (TN), o primórdio do sistema nervoso central (SNC) (VAN STRAATEN *et al.*, 1996). Esse processo morfogênético é altamente regulado por diversos mecanismos que envolvem os tecidos adjacentes (ectoderme epidérmica, mesoderme dorsal e notocorda) (NIKOLOPOULOU *et al.*, 2017) e nos quais participam a via de sinalização Wnt não-canônica (JURILOFF; HARRIS, 2012), proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) (AMARNATH; AGARWALA, 2016) e vários fatores de transcrição (entre eles Grhl, Cdx, Pax) (EPSTEIN; VEKEMANS; GROS, 1991; GUSTAVSSON *et al.*, 2007; SAVORY *et al.*, 2011). Interferências nos mecanismos que regulam e efetuam as mudanças morfológicas necessárias a esse processo, podem originar malformações e/ou prejudicar o fechamento do TN.

Em amniotos, o TN é formado por dois mecanismos de neurulação, a primária e a secundária, que ocorrem em diferentes níveis rostrocaudais do embrião e sofrem sobreposição na região de interface.

Neurulação primária

Na porção mais anterior, desde a região craniana e por toda a extensão do tronco, o TN é formado pelo processo de neurulação primária (NP), que ocorre em quatro etapas bem definidas e envolve movimentos morfogênicos coordenados por eventos celulares, moleculares e biomecânicos, como adesão celular e remodelação de fibras do citoesqueleto (NIKOLOPOULOU *et al.*, 2017).

Na primeira etapa da NP há a formação da placa neural (FIGURA 1 A), pelo espessamento da ectoderme para formar o neuroepitélio (GREGO-BESSA; HILDEBRAND; ANDERSON, 2015). Esse processo ocorre pela expansão de filamentos de microtúbulos na direção apical das células da ectoderme, alongando-as (JAYACHANDRAN *et al.*, 2016).

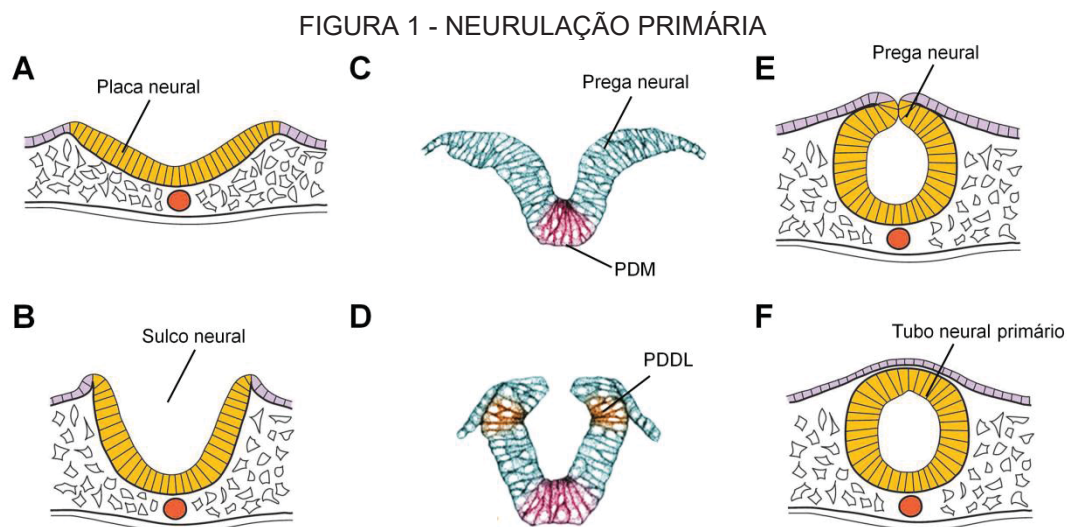
A segunda etapa consiste no alongamento da placa neural no eixo rostrocaudal (extensão) e estreitamento no eixo mediolateral (convergência)

(SCHOENWOLF, 2018). Essa extensão convergente é dependente da via de sinalização Wnt não canônica/polaridade celular planar (PCP) e é responsável por moldar a placa neural, a partir da divisão celular orientada (SUTHERLAND; KELLER; LESKO, 2020), intercalação e rearranjos celulares (ROSZKO; SAWADA; SOLNICA-KREZEL, 2009).

O dobramento da placa neural (FIGURA 1 B) é a terceira etapa da NP. Nessa fase, as bordas laterais da placa neural se dobram para formar as pregas neurais (FIGURA 1 C), que se elevam e se movem em direção à linha média dorsal no embrião, estabelecendo o sulco neural, uma estrutura transitória e craniocaudalmente alongada. Nesse processo, são formados dois tipos de pontos de flexão, o ponto de dobra mediano (PDM) (FIGURA 1 C) e o ponto de dobra dorsolateral (PDDL) (FIGURA 1 D), que têm a função de estabilizar o dobramento da placa neural, devido à ancoragem aos tecidos adjacentes, e são essenciais para a aproximação das pregas neurais. Na porção craniana são formados um PDM e dois PDDL, enquanto no resto da extensão do TN ocorre somente o PDM (LAWSON; SCHOENWOLF, 2009). Um fator importante para a formação dos pontos de flexão é a alteração no formato das células (SUZUKI; MORITA; UENO, 2012). Para isso, é fundamental a contração de filamentos apicais de actina, efetuada pela interação com a miosina recrutada e ativada nessas regiões (KINOSHITA *et al.*, 2008; MASON; TWOROGGER; MARTIN, 2013). Esses eventos são regulados por integrantes da via PCP e dependentes da ativação de Rho quinases (ROCK) (NISHIMURA; HONDA; TAKEICHI, 2012; BUTLER *et al.*, 2019).

Durante a última etapa da NP ocorre o fechamento do sulco (FIGURA 1 D e E), pela fusão das pregas na linha média (FIGURA 1 C), e a remodelação dos epitélios, originando um TN fechado e coberto pela ectoderme não neural (FIGURA 1 F). Esse fechamento é contínuo e ocorre em forma de “zíper”, com as quatro etapas da NP acontecendo simultaneamente ao longo do eixo rostrocaudal do embrião (YAMAGUCHI; MIURA, 2013). Nesse mecanismo de zíper, os pontos de fusão avançam devido a protruções celulares, mediadas por filamentos de actina, que produzem a força mecânica do movimento (ZHOU *et al.*, 2020) e aproximam as camadas da ectoderme de superfície (ES) ou de neuroepitélio, dependendo do nível axial (NIKOLOPOULOU *et al.*, 2017). À medida que as pregas neurais se aproximam o neuroepitélio troca o seu

contato basal com a mesoderme paraxial pela ES (MCSHANE *et al.*, 2015) e uma nova membrana basal (MB) é construída na interface entre o TN e a ES, rica em fibronectina. A interação das células da ES e do neuroepitélio com essa MB é mediada principalmente por integrinas e promove uma adesão transitória entre os epitélios opostos, antes que a adesão celular seja estabelecida na fusão (MOLÈ *et al.*, 2020). Porém, esses mecanismos ainda são pouco esclarecidos (ROLO *et al.*, 2018).



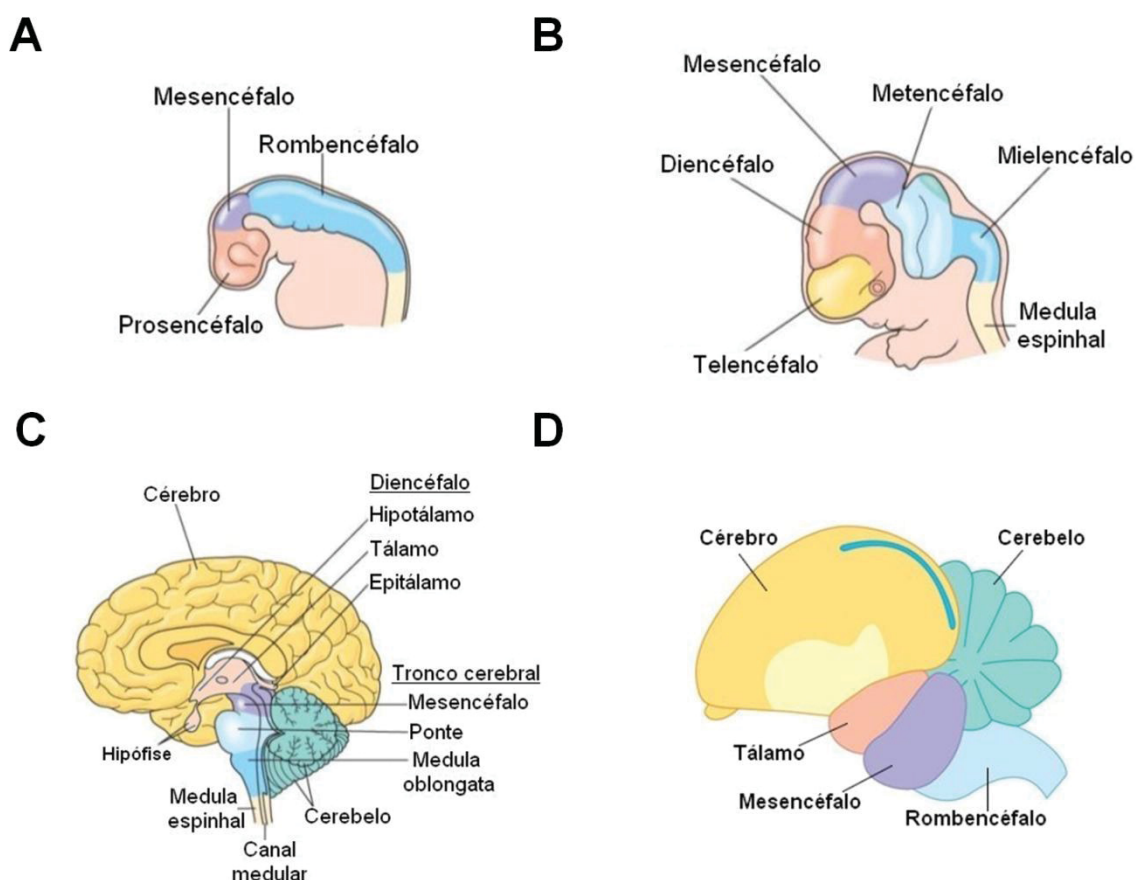
A: Formação da placa neural. B: Dobramento da placa neural. C: Formação das pregas neurais e ponto de dobra mediano. D: Formação dos pontos de dobra dorsolaterais. E: Convergência das pregas neurais. F: Fusão das pregas neurais e fechamento do tubo neural. PDM: Ponto de dobra mediano. PDDL: Ponto de dobra dorsolateral. FONTE: A, B, E e F: Adaptado de Duband (2010). C e D: Adaptado de Wang e White (2021).

Durante o processo de fechamento do TN, células das extremidades das dobras neurais se desprendem e migram em direção ao interior do corpo do embrião. Essas células, chamadas de células da crista neural, são exclusivas dos vertebrados (BRONNER; SIMÕES-COSTA, 2016). Elas sofrem transição de epitélio para mesênquima e adquirem alta capacidade migratória, formando diferentes tipos de células e tecidos, como neurônios sensoriais e células gliais no sistema nervoso periférico, cartilagens e ossos do crânio, células endócrinas e paraendócrinas, melanócitos e tecido conjuntivo (SHYAMALA *et al.*, 2015).

Após o fechamento, o TN sofre especialização regional, se dilata e divide-se para formar três vesículas encefálicas primárias: o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo, que darão origem a diferentes estruturas do

encéfalo (SCHOENWOLF, 1999; BELLAIRS; OSMOND, 2014). O prosencéfalo se subdivide em telencéfalo, que formará os hemisférios cerebrais, e diencéfalo, que dará origem ao tálamo, hipotálamo e vesículas ópticas. O mesencéfalo não se subdivide e formará o aqueduto cerebral. O rombencéfalo é dividido em metencéfalo, que dará origem à ponte e ao cerebelo, e mielencéfalo, que formará a medula oblongata. A região posterior do TN dará origem à medula espinhal (URRY *et al.*, 2021) (FIGURA 2).

FIGURA 2 - DESENVOLVIMENTO DO ENCÉFALO

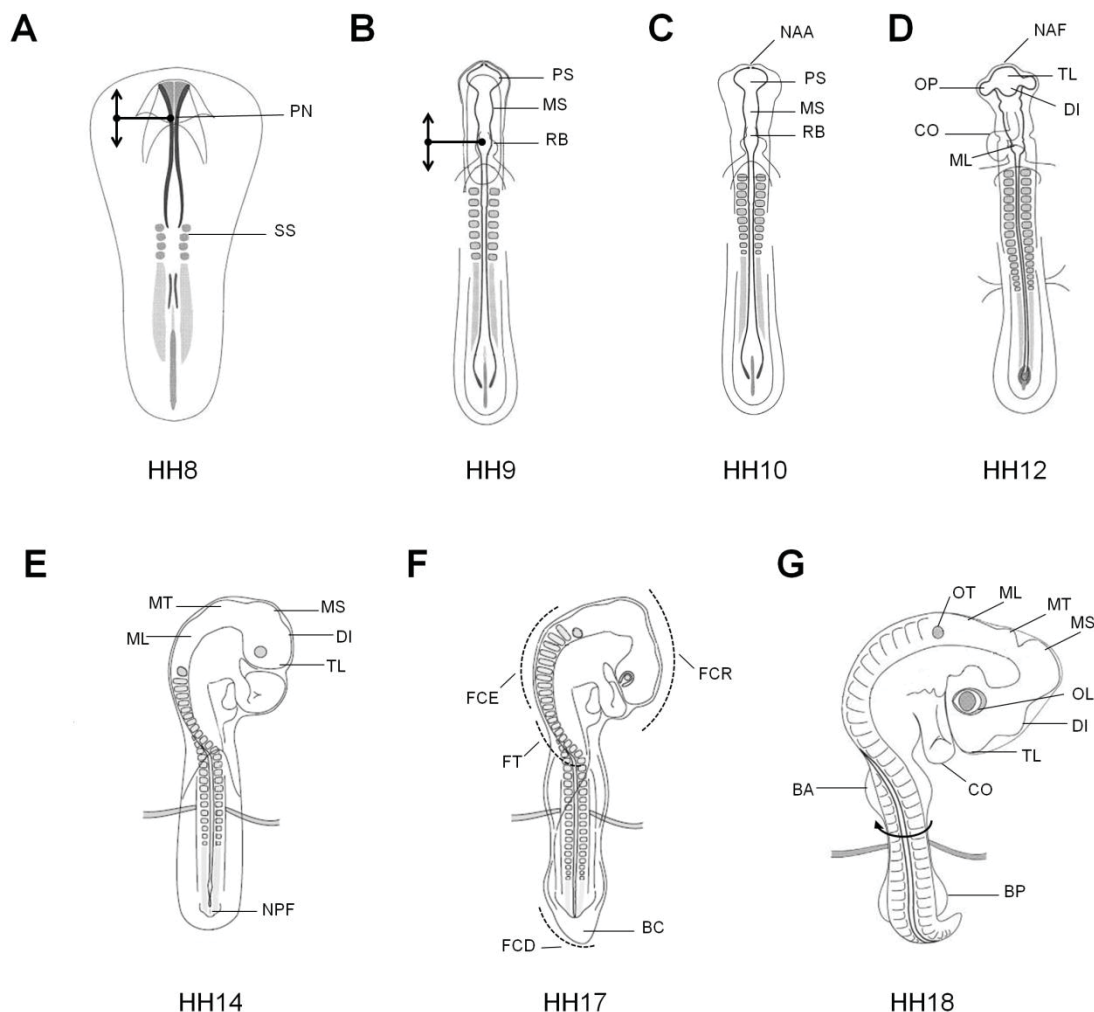


A-C: Desenvolvimento do encéfalo humano a partir da especialização regional do tubo neural. D: Encéfalo de galinha. O processo para a formação das estruturas encefálicas no embrião de galinha é bastante semelhante ao humano e dá origem às mesmas regiões. FONTE: Adaptado de Urry *et al.* (2021).

No embrião de galinha o fechamento do sulco neural inicia-se em dois locais e estádios: 1) no estágio HH8 (FIGURA 3 A) no nível do futuro mesencéfalo e avança cranialmente para formar o prosencéfalo e fechar o neuróporo craniano (ou anterior), e caudalmente, formando o rombencéfalo; 2) no estágio HH9 (FIGURA 3 B) no nível do rombencéfalo, avançando

caudalmente para formar a medula e fechar o neuróporo caudal (ou posterior) (VAN STRAATEN *et al.*, 1996; SCHOENWOLF, 2018). Ainda no estágio HH9, inicia-se a formação das vesículas encefálicas (FIGURA 3 B) e no estágio HH10 já estão estabelecidas as regiões do prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) (FIGURA 3 C). No estágio HH 11 o neuróporo anterior se fecha (SCHOENWOLF, 1979), enquanto no HH12 as vesículas primárias são subdivididas (FIGURA 3 D). Já no HH13 o telencéfalo se destaca pelo aumento de tamanho e o neuróporo caudal se fecha (SCHOENWOLF, 1979). Posteriormente, no estágio HH14, as vesículas encefálicas se encontram bem definidas e a cabeça do embrião está virada para a esquerda (FIGURA 3 E). A partir do estágio HH15 as flexuras craniana, cervical e do tronco se acentuam e no HH17 estão bem evidenciadas, bem como o broto da cauda e a sua curvatura (FIGURA 3 F). No estágio HH18 várias estruturas embrionárias estão formadas e se destacam, além das vesículas encefálicas, como os olhos, brotos dos membros, vesículas óticas e coração, e a rotação do corpo do embrião para a esquerda está evidenciada (FIGURA 3 G).

FIGURA 3 – ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS DE *G. GALLUS* E O DESENVOLVIMENTO DO TUBO NEURAL



Desenhos esquemáticos dos estádios de Hamburger e Hamilton (HH) (1951) do embrião de ave *Gallus gallus* e eventos importantes na formação do tubo neural. A: HH8 – início do fechamento do tubo neural na região do futuro mesencéfalo, progredindo rostralmente para formar o prosencéfalo e fechar o neuróporo craniano e caudalmente para formar o mesencéfalo. B: HH9 - vesículas encefálicas primárias formadas e fechamento do tubo neural na região do rombencéfalo, progredindo anteriormente, para formar o rombencéfalo, e posteriormente, para formar toda a extensão do tronco do tubo neural e fechar o neuróporo caudal. C: HH10. D: HH12: Neuróporo craniano fechado, sendo que o fechamento ocorre no HH11. As vesículas encefálicas secundárias estão formadas. E: HH 14 – as vesículas encefálicas secundárias se destacam e o neuróporo posterior está fechado. F: HH17 – o broto da cauda e as flexuras no corpo do embrião estão evidenciados. G: HH18 – as divisões das vesículas encefálicas estão mais pronunciadas, outras estruturas também se destacam e a rotação do corpo do embrião para a esquerda é evidente. BA: Broto da asa. BC: Broto da cauda. BP: Broto da perna. CO: Coração. DI: Diencefalo. FCE: Flexura cervical. FCD: Flexura caudal. FCR: Flexura craniana. FT: Flexura do tronco. ML: Mielencéfalo. MS: Mesencéfalo. MT: Metencéfalo. NAA: Neuróporo anterior aberto. NAF: Neuróporo anterior fechado. NPF: Neuróporo posterior fechado. OL: Olho. OP: Vesícula óptica. OT: Vesícula ótica. PN: Prega neural. PS: Prosencéfalo. RB: Rombencéfalo. SS: Somito. TL: Telencéfalo. Linhas tracejadas: Flexuras. Seta curva: Rotação. Círculos ligados e seta dupla: Pontos de início e sentidos do fechamento do tubo neural. FONTE: Adaptado de Bellairs e Osmond (2014).

Entre os mecanismos moleculares envolvidos na neurulação e conservados entre vertebrados, está a via Wnt/PCP, responsável pela extensão convergente da placa neural (UENO; GREENE, 2003). Além disso, a sinalização proveniente da notocorda (*Sonic hedgehog - Shh*), ectoderme não neural (BMPs) e placa neural (Noggin) são cruciais para a formação dos pontos de dobra da placa neural (YBOT-GONZALEZ *et al.*, 2007). Morfologicamente, o processo de neurulação é particularmente similar entre mamíferos e aves, quando comparado ao de outros vertebrados. O espessamento da placa neural, primeira etapa da NP, ocorre por alongamento ápico-basal das células, permanecendo como um epitélio pseudoestratificado colunar (COLAS; SCHOENWOLF, 2001). As demais etapas da NP também ocorrem em outros vertebrados (YAMAGUCHI; MIURA, 2013). Além disso, tanto em aves como em mamíferos, o TN da região caudal desenvolve-se durante a neurulação secundária (NS) (HARRINGTON; HONG; BREWSTER, 2009).

Neurulação secundária

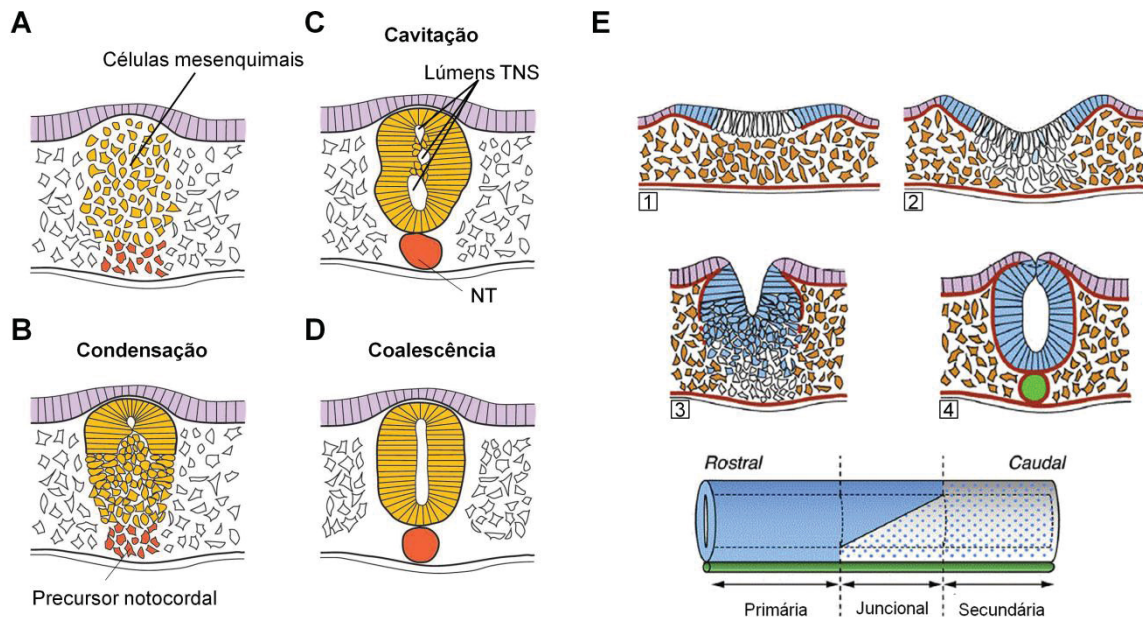
Após o fechamento no neuróporo caudal inicia-se o processo de NS, que ocorre na porção posterior do embrião e consiste na formação de um TN secundário a partir de células mesenquimais indiferenciadas. Em aves, a NS é dividida em três etapas: 1) formação do cordão medular, 2) cavitação e 3) coalescência (COLAS; SCHOENWOLF, 2001). Na primeira etapa, as células do mesênquima do broto da cauda sofrem transição para epitélio e se condensam (FIGURA 4 A) para formar um cordão de células (cordão medular) (FIGURA 4 B). Então, as células do cordão medular se dividem em duas populações, uma externa de células com polaridade ápico-basal e uma interna de células mesenquimais (LOWERY; SIVE, 2004). Assim, se inicia a segunda etapa, a cavitação (FIGURA 4 C), no limite entre as células externas e internas e acredita-se que envolva o recrutamento de células mesenquimais para a camada epitelial, via intercalação celular (GONZALEZ-GOBARTT *et al.*, 2021). Na porção lombossacral do embrião há uma sobreposição dos processos de NP e NS (FIGURA 4 D e E), que em *G. gallus* corresponde à região na altura do 27º par de somitos (SHIMOKITA; TAKAHASHI, 2011). A terceira fase é a coalescência, quando há a união dos vários lumens formados durante a NS,

para originar um único TN (SCHOENWOLF; DELONGO, 1980). A NS secundária em mamíferos é muito semelhante, com exceção da etapa de cavitação e ausência da coalescência (LOWERY; SIVE, 2004). Nesse caso, há a formação de somente um lúmen, contínuo ao longo de todo o cordão medular (SAITSU *et al.*, 2004).

Neurulação juncional

Existe, ainda, uma região, na interface entre a NP e NS, em que ocorre o fenômeno denominado de neurulação juncional (DADY *et al.*, 2014) (FIGURA 4 E). Esse evento apresenta morfologia e movimentos morfogenéticos distintos da NP e NS, porém combinando características desses dois processos. Inicialmente, ocorre a formação de uma placa neural com duas populações de células, uma lateral, composta por células neuroepiteliais, e uma central, formada por células progenitoras (FIGURA 4 E1). Posteriormente, a população lateral se eleva, formando as pregas neurais, e a central sofre transição epitélio-mesenchimal, se dissocia do neuroepitélio e se agrega no mesênquima (FIGURA 4 E2). Esse conjunto de células mesenquimais se diferencia, adquire características das células laterais e, à medida que as pregas neurais se elevam, retornam ao estado epitelial, se unindo às demais células neuroepiteliais laterais (FIGURA 4 E3). A união dessas populações celulares estabelece o TN juncional, que se fecha com o encontro e fusão das pregas neurais (FIGURA 4 E4) (DADY *et al.*, 2014). A ocorrência desse processo já foi demonstrada em humanos (KIM; LEE, 2021) e galinhas (DADY *et al.*, 2014).

FIGURA 4 - NEURULAÇÃO SECUNDÁRIA E JUNCIONAL NO EMBRIÃO DE AVE *GALLUS*



A: Células mesenquimais da região caudal do embrião. B: Condensação das células mesenquimais. C: Cavitação do cordão de células. D: Junção dos lumens para formar um único tubo neural. E: Neurulação juncional; 1) Duas populações de células são visíveis, uma lateral, limitada pela membrana basal (em vermelho), e uma medial, sem membrana basal. 2) A lateral irá formar o TN pela elevação e dobramento, como ocorre na neurulação primária. 3) A medial se acumula abaixo da superfície e depois se reorganiza em um epitélio contínuo com o TN formado dorsalmente. 4) Ao final, há um TN totalmente limitado pela membrana basal. Abaixo das figuras 3 e 4, representação esquemática de uma região do TN, mostrando os locais de ocorrência dos três tipos de neurulação. NT: Notocorda. TNS: Tubo neural secundário. FONTE: A - D: Adaptado de Duband (2010). E: Adaptado de Dady *et al.* (2014).

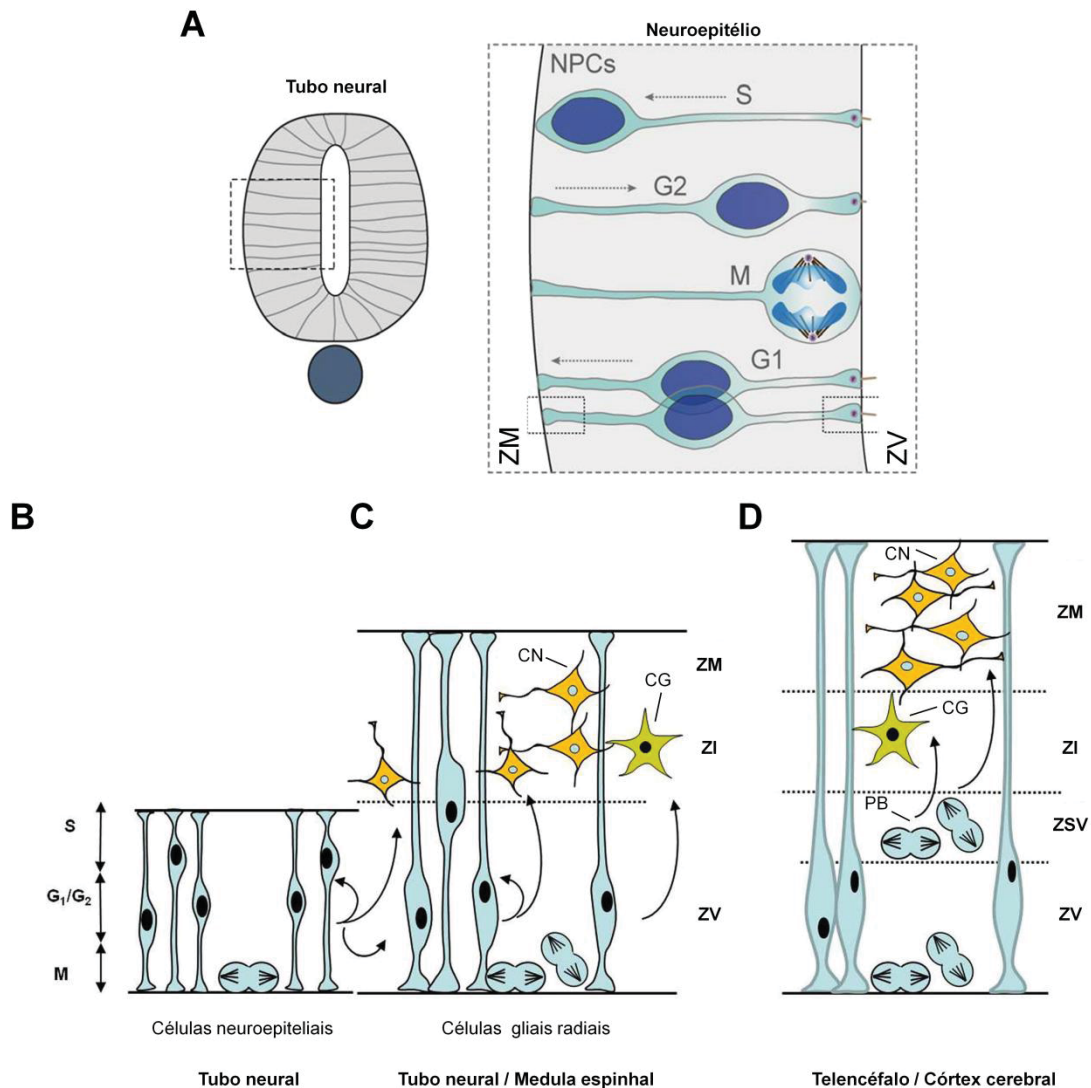
Histogênese no tubo neural

Após a neurulação, o desenvolvimento neural prossegue com o espessamento do neuroepitélio pela intensa proliferação dos neuroblastos (ZIMMERMANN, 2011). Inicialmente, essas células são organizadas em um epitélio pseudoestratificado em toda a extensão do tubo neural, onde atuam como progenitores neurais (MIYATA, 2008), dando origem a todas as células neuronais e gliais do SNC, exceto a microglia (ZHANG; JIAO, 2015; KAWAGUCHI, 2021). A proliferação celular no neuroepitélio ocorre no eixo ápico-basal, sendo que o núcleo das células sofre migração intercinética, variando de posição de acordo com as fases do ciclo celular. Os núcleos das células em fase S localizam-se próximos à membrana basal que circunda o TN, na zona marginal, enquanto os das células em mitose encontram-se no ápice do TN, na zona ventricular (FIGURA 5 A) (SPEAR; ERICKSON, 2012). As divisões mitóticas dos progenitores neurais podem ser classificadas em

simétricas, formando duas células idênticas, ou assimétricas, gerando duas células distintas (HUTTNER; KOSODO, 2005).

Em estágios iniciais de desenvolvimento, os progenitores neurais estão dispostos em uma camada de células proliferativas (FIGURA 5 B), a zona ventricular (ZV) (FIGURA 5 C). À medida que o desenvolvimento avança, nos níveis axiais que originarão a medula espinhal, duas outras camadas são formadas, a zona intermediária (ZI), abaixo da ZV, e a zona marginal (ZM), próxima à membrana basal (FIGURA 5 D). Nessa fase, encontram-se na ZV progenitores neurais com destino mais restrito do que as células neuroepiteliais, as células gliais radiais (MALATESTA; HARTFUSS; GÖTZ, 2000). Já na ZI estão dispostas as células neurais pós-mitóticas (FIGURA 5 D). Ainda, em aves e mamíferos, a organização das camadas de células é distinta na região formadora do córtex cerebral, apresentando um segundo estrato de células proliferativas (progenitores basais), a zona subventricular (ZSV), entre a ZV e ZI (FIGURA 5 E) (LECLERC; NÉANT; MOREAU, 2012).

FIGURA 5 – HISTOGÊNESE NO TUBO NEURAL



Representação esquemática da secção transversal do tubo neural. A: Neuroepitélio do tubo neural e suas células com núcleos em diferentes posições de acordo com a fase do ciclo celular. FONTE: Adaptado de Gobartt (2019). B-D: Eventos mitóticos e diferenciação celular no tubo neural e estruturas derivadas. NPCs: Células progenitoras neurais. CG: Célula glial / precursor glial. CN: Célula neuronal / precursor neuronal. G1/G2: Fases G1 e G2 do ciclo celular. M: Mitose. PB: Progenitores basais. S: Fase S do ciclo celular. ZI: Zona intermediária. ZM: Zona marginal. ZSV: Zona subventricular. ZV: Zona ventricular. FONTE: Adaptado de Leclerc; Néant; Moreau (2012).

Neurotoxicidade no desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário é altamente sensível à exposição a poluentes ambientais, pois nesse período há uma alta taxa de proliferação, diferenciação e migração celular e os sistemas de destoxificação ainda não estão completamente desenvolvidos. O sistema nervoso é particularmente vulnerável a substâncias tóxicas, sendo que, em humanos, os principais períodos críticos do seu desenvolvimento ocorrem no período pré-natal e

também na infância (RICE; BARONE JR, 2000; GIORDANO; COSTA, 2012). Durante essas janelas de sensibilidade, os xenobióticos podem causar alterações morfológicas e funcionais permanentes, mesmo em baixos níveis de exposição, os quais muitas vezes causariam pouco ou nenhum efeito adverso em adultos (GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2014). Durante o desenvolvimento *in utero*, a placenta é formada na interface entre a mãe e a prole e atua na transferência materno-fetal de nutrientes, oxigênio, metabólitos (AL-ENAZY *et al.*, 2017) e também xenobióticos como o PFOA e Cd. Esses compostos conseguem atravessar a placenta (AL-SALEH *et al.*, 2011; HANSSEN *et al.*, 2013) e atingir o organismo em desenvolvimento em níveis capazes de causar efeitos sobre o desenvolvimento embrionário e fetal, que irão se refletir na vida pós-natal do indivíduo (BOEKELHEIDE *et al.*, 2012).

A neurotoxicidade no desenvolvimento é considerada um tipo de teratogenicidade, na qual os teratógenos têm potencial para induzir, além de malformações, alterações neurofuncionais, como prejuízo sensorial e motor, no aprendizado e memória e no comportamento social (AOYAMA *et al.*, 2015). Diversos modelos podem ser utilizados para avaliação do potencial neurotóxico de compostos no desenvolvimento embrionário humano, o grande desafio é a caracterização dos efeitos de doses realistas. Modelos *in vitro* e *in silico* são eficientes na triagem de substâncias, enquanto os modelos *in vivo* são importantes na avaliação dos efeitos sobre o sistema nervoso intacto (CROFTON; MUNDY; SHAFER, 2012) e permitem a avaliação de períodos críticos no desenvolvimento do SNC (CROFTON; CROFTON, 2012).

Ácido perfluorooctanóico (PFOA)

O PFOA é um poluente emergente, estando entre os compostos perfluorados (PFCs) mais abundantes no ambiente (RANKIN *et al.*, 2016). A molécula do PFOA possui natureza anfifílica e apresenta estabilidade térmica e química, por isso tem sido muito utilizada em diversos artigos de aplicação industrial e de consumo, como espumas contra incêndio, inseticidas, produtos para tratamento de superfícies e revestimentos de embalagens de alimentos, tecidos, couros e tapetes (BEGLEY *et al.*, 2008; BUCK *et al.*, 2011; POOTHONG; BOONTANON, S.; BOONTANON, N., 2012). Além disso, também está presente na estrutura de componentes eletrônicos, como

retardante de chamas e uma proteção contra oxidação (GARG *et al.*, 2020). O PFOA é muito conhecido por ser empregado na produção do Teflon® (revestimento de utensílios de cozinha) e do Gore-Tex® (membrana impermeabilizante usada em tecidos e calçados) (STEENLAND; FLETCHER, SAVITZ, 2010). A liberação desse composto no ambiente ocorre pela produção, uso e descarte de produtos que contenham PFOA ou seus PFCs precursores (LAU *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2017). Uma vez liberado no ambiente é transportado por correntes marítimas e atmosféricas, que o distribuem globalmente, contaminando o solo, a água e a biota (AHRENS, 2011; KRAFFT; RIESS, 2015). Além disso, é resistente a foto-oxidação, biodegradação e hidrólise, devido a força das ligações entre os átomos de carbono e flúor (SZNAJDER-KATARZYŃSKA *et al.*, 2019). Dessa forma, é considerado organopersistente e apresenta capacidade de bioacumulação e biomagnificação, sendo potencialmente tóxico aos humanos e animais (VIERKE *et al.*, 2012).

As principais vias de exposição humana ao PFOA são pela ingestão de água e alimentos contaminados (vegetais, laticínios, carnes, peixes e frutos do mar), bem como pela inalação de poeira de ambientes internos (doméstico e profissional) (JIAN *et al.*, 2017; KIM; LEE; OH, 2019). A exposição durante o desenvolvimento ocorre via transferência placentária *in utero* e pelo leite materno (BLAKE; FENTON, 2020). A taxa de transferência por essa via é de aproximadamente 60% (ROVIRA *et al.*, 2019), sendo que a concentração média de PFOA no cordão umbilical varia de 0,36 a 7,73 ng/ml de sangue (LIEN *et al.*, 2013; CARIOU *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016). Dessa forma, o PFOA é um potencial composto tóxico ao desenvolvimento embrionário. Além disso, o PFOA induz estresse oxidativo (OMOIKE *et al.*, 2020) e morte celular por apoptose (CUI *et al.*, 2015).

Os mecanismos associados ao efeito tóxico do PFOA ainda não foram completamente elucidados, porém o mais estudado é a ativação do receptor nuclear de proliferação de peroxissomo alfa (PPAR α) (LI *et al.*, 2017). Esse receptor tem função na regulação do metabolismo de lipídeos (POULSEN; SIERSBÆK; MANDRUP, 2012) e participa da formação da memória (BURRIS, 2016).

A exposição pré-natal ao PFOA causa atraso no desenvolvimento, aumento da mortalidade, redução do peso ao nascer (WOLF *et al.*, 2007) e alterações no comportamento motor em camundongos (GOULDING *et al.*, 2016). Em humanos já foi relatada associação entre níveis de exposição pré-natal ao PFOA e ocorrência de malformações no sistema nervoso como defeitos do TN e hidrocefalia (STEIN *et al.*, 2014), crescimento fetal reduzido (CALLAN *et al.*, 2016), abortos espontâneos, nascimento prematuro, baixo peso ao nascer e natimortos (WU *et al.*, 2012). Também foi observada associação entre a exposição intrauterina e maior risco de ocorrência de transtornos do espectro do autismo (TEA) (LONG *et al.*, 2019; OH *et al.*, 2021) e os níveis séricos de PFOA com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade em crianças (GUMP *et al.*, 2011). Ainda, esse composto altera a homeostase de hormônios tireoidianos em gestantes (AIMUZI *et al.*, 2020), os quais são essenciais para o neurodesenvolvimento fetal normal (JANSEN *et al.*, 2019). Em embriões de *G. gallus* expostos ao PFOA *in ovo* foram observadas alterações neurocomportamentais (PINKAS *et al.*, 2010), cardiotoxicidade (JIANG *et al.*, 2012; LV *et al.*, 2019) e ocorrência de malformações como defeitos do TN, alterações encefálicas e falha no fechamento da parede do corpo (KMECICK *et al.*, 2019).

Cádmio (Cd)

O Cd é um metal pesado que está presente no solo, em sedimentos, no ar e na água (HUANG *et al.*, 2017). É altamente tóxico, sendo classificado em 7º lugar no ranque de prioridade da lista de substâncias perigosas da Agência Americana para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2019). Apresenta capacidade de bioacumulação e biomagnificação, sendo assimilado em altas concentrações por organismos no topo da cadeia trófica, como os humanos, o que resulta em riscos à saúde (ABDEL-BAKI; DKHIL; AL-QURAI SHY, 2011). Esse metal é disseminado no ambiente a partir de processos naturais como atividade vulcânica e erosão de solos e rochas, e antrópicas devido à utilização do Cd em processos industriais. O Cd é empregado na produção de baterias, pigmentos, tintas, soldas e fertilizantes fosfatados (WHO, 2019). Além disso, a queima de combustíveis fósseis, a incineração de resíduos urbanos e o despejo de esgoto aumentam ainda mais

a sua dispersão no ambiente (MOISEENKO; GASHKINA, 2018), bem como sua presença no lixo eletroeletrônico que, muitas vezes, é reciclado de maneira inadequada (LI *et al.*, 2011).

O Cd não apresenta funções fisiológicas conhecidas, porém sabe-se que é capaz de interferir em vias de sinalização, devido a sua similaridade físico-química com íons cálcio (CHOONG; LIU; TEMPLETOM, 2014), e alterar processos celulares de proliferação, diferenciação, progressão do ciclo celular, apoptose, replicação e reparo do DNA (BERTIN; AVERBERCK, 2006). Além disso, pode interagir com outros elementos como o cobre, o ferro e o zinco (MATOVIC *et al.*, 2015) e gerar espécies reativas de oxigênio, alterando o equilíbrio redox (ĐUKIĆ-ĆOSIĆ *et al.*, 2020). É um metal carcinogênico (WANG; YANG, 2019; ZIMTA *et al.*, 2019; CUI *et al.*, 2021), sendo que a exposição humana crônica a ele está associada com maior risco de ocorrência de vários tipos de câncer (PENG *et al.*, 2015; LENER *et al.*, 2021; PARK *et al.*, 2021) e de doenças cardiovasculares (CHOWDHURY *et al.*, 2018; DOMINGO-RELLOSO *et al.*, 2019).

Estudos revelam a capacidade do Cd de transpor a barreira placentária humana pela presença do metal em sangue de cordão umbilical, em concentrações que variam de 0,02 a 0,78 ng/ml, dependendo da população (TANG *et al.*, 2016; CABRERA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018; TAYLOR *et al.*, 2018). Além disso, o Cd se acumula na placenta (CERRILLOS *et al.*, 2019), interfere no transporte de nutrientes para o feto (KIPPLER *et al.*, 2010) e restringe o crescimento fetal (GENG; WANG, 2019).

A exposição ao Cd durante o desenvolvimento é causa de malformações em peixes (ZHU *et al.*, 2014), anfíbios (WU *et al.*, 2017), mamíferos (SALVATORI *et al.*, 2004) e aves (THOMPSON; BANNIGAN, 2007; VEERIAH *et al.*, 2015). Em embriões de zebrafish, a exposição a esse metal reduz a taxa de sobrevivência, batimentos cardíacos, induz morte celular por apoptose e a produção de espécies reativas de oxigênio (PARK *et al.*, 2020). Em camundongos, a exposição *in utero* promove defeito no TN e afeta o crescimento fetal, com redução do peso e comprimento corporal (ZHANG *et al.*, 2016), altera a morfologia de neurônios corticais e induz apoptose nessas células (LÓPEZ *et al.*, 2003). Em humanos, há associação entre maiores níveis de Cd no cordão umbilical com crescimento fetal reduzido (GUO *et al.*, 2017) e,

em fetos, pode induzir a morte de neurônios motores da medula espinhal (SARCHIELLI *et al.*, 2012). Além disso, sua presença no líquido amniótico já foi associada a transtornos do espectro do autismo (LONG *et al.*, 2019). Em embriões de *G. gallus*, foi relatado que o Cd induz defeito na parede do corpo (THOMPSON *et al.*, 2005; KMECICK *et al.*, 2019), com morte celular por apoptose em células da placa lateral da mesoderme, somitos e TN (THOMPSON *et al.*, 2005), além de alterações hepáticas, principalmente no sistema mitocondrial, lisossomal e do retículo endoplasmático (DZUGAN *et al.*, 2018). Também foram observadas malformações no coração, notocorda, vesículas ópticas e auditivas (YAMAMOTO *et al.*, 2012), região encefálica e falha no fechamento do TN (YAMAMOTO *et al.*, 2012; KMECICK *et al.* 2019), evidenciando a neurotoxicidade desse metal no desenvolvimento. Além disso, foi encontrada deposição de Cd na região do TN, podendo-se relacionar diretamente a sua presença com a ocorrência de defeitos no TN (KMECICK, 2017). Os mecanismos da neurotoxicidade do Cd ainda não foram completamente esclarecidos, porém sugere-se que as alterações neuronais sejam mediadas pela indução da produção de espécies reativas de oxigênio (CHEN *et al.*, 2011), interferência na diferenciação neuronal (GULISANO *et al.*, 2009) e alterações neuroquímicas (LAFUENTE *et al.*, 2003).

Misturas de poluentes

Considerando uma exposição real no ambiente, o estudo do efeito de poluentes de forma isolada é pouco representativo, uma vez que os organismos vivos estão expostos a uma mistura complexa de contaminantes (HEYS *et al.*, 2016). As substâncias em mistura podem interagir e gerar efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (WILSON *et al.*, 2016). Essa interação pode interferir no potencial tóxico do poluente, se comparado com a exposição isolada (SOFTELAND *et al.*, 2014). Assim, a avaliação dos efeitos de poluentes isolados pode levar a má interpretação do risco de exposição a determinados compostos (WILSON *et al.*, 2016). Porém, devido a dificuldades conceituais, experimentais e de interpretação dos resultados, o estudo dos efeitos de misturas de poluentes em organismos vivos ainda é pouco explorado (KORTENKAMP, 2007).

Durante o período pré-natal, exposição a misturas complexas de poluentes é ainda mais alarmante, devido à sensibilidade do embrião/feto. Diversas classes de contaminantes são capazes de atravessar a barreira placentária, como bifenilas policloradas, polibromados, pesticidas organoclorados, compostos perfluorados e metais pesados (FISHER *et al.*, 2016; DUFOUR *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019). Já foi demonstrada a presença simultânea do PFOA e Cd em sangue de cordão umbilical, revelando que indivíduos em desenvolvimento sofrem uma exposição concomitante a esses poluentes (NEEDHAM *et al.*, 2011). Em embriões de *G. gallus* expostos *in ovo* à mistura de PFOA e Cd foram observados os mesmos tipos de malformações que na exposição isolada aos dois contaminantes, sem diferenças significativas também na ocorrência de alterações morfológicas gerais ou categorias de malformações específicas (KMECICK, 2017).

Justificativa

O desenvolvimento embrionário é altamente sensível à interferência de agentes externos, como poluentes ambientais. Uma vez que o PFOA e o Cd são poluentes presentes no ambiente, persistentes, bioacumuláveis e capazes de transpor a barreira placentária, a análise do potencial tóxico desses compostos sobre o desenvolvimento é de extrema relevância. Apesar de evidências da embriotoxicidade desses poluentes, os seus efeitos sobre o desenvolvimento ainda não foram completamente esclarecidos. Estudos revelam alterações morfológicas, funcionais e cognitivas como consequência da exposição pré-natal a esses contaminantes, porém os mecanismos celulares e moleculares envolvidos ainda não foram elucidados e os efeitos causados por uma exposição conjunta foram pouco explorados. Ainda, o embrião de ave é um excelente modelo para o estudo da embriotoxicologia, pois apresenta semelhanças morfológicas com o de outros vertebrados, incluindo humanos, em estágios iniciais de desenvolvimento, permitindo um grau de extrapolação. Além disso, é de fácil acessibilidade experimental e permite uma análise direta dos efeitos dos contaminantes sobre o embrião. Por outro lado, existem particularidades em relação a esse modelo que tornam o seu processamento para determinadas análises mais desafiador, como a histológica, pois não existem na literatura protocolos adaptados as suas especificidades.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar os efeitos do ácido perfluorooctanóico (PFOA) e cádmio (Cd), de forma isolada e em mistura, em embriões de *Gallus gallus*.

Objetivos específicos

Capítulo I

- Avaliar o uso de diferentes métodos para processamento histológico de embriões de galinha em estágio inicial de desenvolvimento.

Capítulo II

- Avaliar a mortalidade, a morfologia embrionária geral e do tubo neural, após 2 a 6 e 8 dias de exposição ao PFOA e Cd, isoladamente e em mistura;
- Caracterizar as alterações teciduais nos embriões, frente à exposição ao PFOA e Cd, isoladamente e em mistura;
- Elaborar um índice para avaliação histopatológica de embriões de galinha em estágios iniciais de desenvolvimento;
- Avaliar a interferência do PFOA e Cd em vias importantes ao desenvolvimento embrionário;
- Verificar a presença de malformações em indivíduos eclodidos e não eclodidos expostos ao PFOA e Cd, isoladamente e em mistura.

Capítulo I

Avaliação de diferentes resinas de processamento histológico em embriões de ave (*Gallus gallus*) em estágios iniciais

RESUMO

A avaliação histológica é uma ferramenta importante nos estudos de toxicologia do desenvolvimento. Apesar de extensa literatura a respeito de diferentes métodos de emblocagem de tecidos, poucos trabalhos discutem o uso e eficiência de diferentes abordagens para histologia de tecidos embrionários. Esses tecidos são frágeis, reduzidos em tamanho e difíceis de posicionar no meio de emblocagem para uma correta orientação de corte desejada. Apesar dessas dificuldades, o embrião de galinha é um modelo importante na embriotoxicologia, pois apresenta semelhanças ao desenvolvimento humano permitindo a extrapolação de resultados. Dessa forma, a aplicação da histopatologia em estudos de embriotoxicidade em embriões de galinha é altamente relevante. Nesse capítulo são exploradas três resinas de emblocagem e os procedimentos que ofereceram os melhores resultados em vários quesitos, para embriões de ave em estágios iniciais de desenvolvimento. Ovos de *Gallus gallus* fertilizados foram incubados por 72 horas e, então, os embriões foram coletados, fixados, processados, emblocados em paraplast, polietilenoglicol (PEG) ou historesina e corados com hematoxilina e eosina (H&E). As diferentes resinas foram comparadas em relação à precisão de orientação, visualização dos embriões nos blocos, microtomia, qualidade da preservação tecidual, contraste na coloração, tempo médio do processamento e custo. O paraplast e o PEG não permitiram correta orientação dos embriões devido à rápida polimerização e opacidade das resinas após o endurecimento. Além disso, a preservação das estruturas não foi satisfatória, apresentando retração e ruptura do tecido. Já a historesina possibilitou a orientação precisa dos embriões, pois é translúcida e com polimerização lenta e apresentou excelente preservação das estruturas. Nesse trabalho, priorizamos a orientação e a preservação tecidual e, assim, a historesina foi o meio de emblocagem que proporcionou os melhores resultados, apesar de apresentar maior tempo de processamento e custo. A análise do desempenho de resinas de incorporação contribui com futuros estudos histológicos de embriões, aprimorando o processamento de amostras embrionárias, bem como de pequenas espécies e órgãos, e garantindo análises mais eficientes.

Palavras-chave: embrião de galinha; historesina; paraplast, polietilenoglicol.

1. Introdução

A histopatologia é crucial em estudos de toxicologia e avaliação de risco (BARROS *et al.*, 2017; SANTANA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018), incluindo a avaliação de toxicidade no desenvolvimento, pois os efeitos de teratógenos nos embriões podem ser sutis e não observáveis nas análises por montagem total (KURTH *et al.*, 2012). Além disso, uma avaliação a nível tecidual e celular pode detectar precocemente um efeito teratogênico, sendo, assim, uma metodologia relevante na caracterização detalhada da teratogenicidade de compostos. Ainda, uma análise histológica aprofundada pode fornecer respostas sobre possíveis alvos dos compostos tóxicos nos embriões (células ou tecidos) (LIU *et al.*, 2012) e direcionar futuros estudos a respeito dos mecanismos de toxicidade aplicando-se técnicas mais refinadas e de alto custo. Devido a essa importância, a manutenção da morfologia é essencial na técnica histopatológica e é atingida utilizando-se protocolos adequados ao tipo de amostra analisada. Porém, poucos estudos discutem a aplicação da avaliação histológica na toxicidade do desenvolvimento, bem como adaptações nas metodologias em favor das particularidades das amostras de embriões.

O embrião de ave *Gallus gallus* (*G. gallus*) é um modelo consolidado na embriologia e também tem sido usado em estudos de toxicidade no desenvolvimento (SMITH; FLENTKE; GARIC, 2012; CHENG *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2020). Devido à sua similaridade morfológica e molecular com outros vertebrados, principalmente durante o período filotípico (SLACK, 2013; IRIE; KURATANI, 2014; DROST *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2017), esse modelo fornece uma plataforma apropriada para o estudo dos efeitos de substâncias no desenvolvimento embrionário. Além disso, apresenta desenvolvimento rápido, é de fácil manipulação experimental e oferece bom custo-benefício (KIECKER, 2016). Apesar dessas vantagens, a manipulação de embriões é laboriosa devido à sua fragilidade e tamanho reduzido, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento (até 4 dias de incubação para o embrião de galinha). Essas características dificultam a obtenção de secções histológicas com excelente preservação tecidual e orientação adequada.

Durante o processamento histológico, diferentes matrizes de incorporação podem ser empregadas para impregnar o tecido, para fornecer suporte e

permitir a obtenção de secções bastante delgadas (WOLFE, 2019). A literatura relata o uso de diferentes meios de inclusão e emblocagem para histologia de tecidos animais adultos e de plantas, como resinas à base de parafina. Porém, os tecidos embrionários demandam uma manipulação mais delicada e os processamentos usuais não são eficientes em proporcionar uma boa preservação da estrutura e detalhes celulares (GONZÁLEZ SANTANDER *et al.*, 1997). O polietilenoglicol (PEG) e resinas à base de glicol metacrilato (GMA) são potenciais alternativas para histologia de embriões devido às suas propriedades e protocolos de processamento. No entanto, não foram encontrados relatos na literatura sobre o uso do PEG no processamento de embriões em estágios iniciais e a aplicação de resinas à base de GMA é pouco explorada nesta área.

A parafina é o meio de inclusão mais comum para histologia. Suas formulações comercialmente disponíveis são compostas por misturas de alcanos de cadeia longa e polímeros plásticos, que fundem a 56-58°C (BASKIN, 2014). O Paraplast é uma resina comercial à base de parafina, que apresenta boa infiltração, fornece secções de qualidade (GEMUSSE *et al.*, 2021; RUBIO-VARGAS *et al.*, 2021) e é compatível com a maioria das colorações e protocolos de imunohistoquímica (WOLFE, 2019). Sua formulação é conhecida como Paraplast Plus quando contém dimetil sulfóxido (DMSO), que acelera a infiltração e favorece a microtomia, permitindo a obtenção de cortes de até 2-4µm (SHARIFF; KALER, 2016). Porém, devido à sua insolubilidade em água, o processamento requer solventes de transição, como o xilol, antes da infiltração nos tecidos (MCMILLAN; HARRIS, 2018). Esta etapa intermediária pode prejudicar o resultado final, endurecer e retrair o tecido (CHEN *et al.*, 2010), especialmente de amostras delicadas como embriões de *G. gallus* em estágios iniciais.

Os polietilenoglicóis são polímeros de óxido de etileno, produzidos por catálise alcalina e conhecidos por “PEG”, seguido de um valor numérico, que representa o seu peso molecular médio (HENNING, 2002). O PEG é um meio de incorporação miscível em água e etanol, que é aplicável em histologia, imunohistoquímica e imunofluorescência (SMITHSON; MACVICAR; HATTON, 1983). Possui baixo custo de produção (HENNING, 2002) e é comumente utilizado em histologia vegetal (BARBOSA *et al.*, 2010) ou histoquímica

(FERREIRA *et al.*, 2014). Alguns estudos discutem as suas várias aplicações no estudo de tecidos animais, como histologia (MILES; LINDER, 1952; SIDMAN; MOTTLA; FEDER, 1961) imunohistoquímica (MOWERY *et al.*, 1989; KLOSEN; MAESSEN; AGUILAR, 1993), histoquímica enzimática e histofluorescência (SMITHSON; MACVICAR; HATTON, 1983). No entanto, não existem estudos recentes que o empreguem como meio de incorporação único no processamento de tecidos animais. Talvez sua baixa aceitação ocorra por problemas durante a microtomia em ambientes com alta umidade e a montagem das lâminas (SMITHSON; MACVICAR; HATTON, 1983), devido às propriedades higroscópicas do PEG (KIERNAN, 2015). Além disso, não há trabalhos sobre suas aplicações para histologia de embriões em estágios iniciais, ou imunomarcção, embora seu uso pareça promissor devido ao processamento mais suave quando comparado com resinas à base de parafina. Entre as vantagens em relação ao paraplast, estão a solubilidade em água, excluindo necessidade de desidratação para sua infiltração no tecido, além de menor temperatura de fusão.

As resinas à base de GMA, como a historesina, são meios de incorporação hidrofílicos que proporcionam boa preservação morfológica, pois seus protocolos não requerem agentes clareadores e altas temperaturas de infiltração (WOODRUFF; GREENFIELD, 1979). Diversas formulações foram descritas e diferentes kits comerciais estão disponíveis, nos quais a proporção do monômero e outros componentes podem variar (STIRLING; WOODS, 2019). O GMA não reage com grupos químicos no tecido, que são importantes para os métodos de coloração. Assim, eles são compatíveis com muitos protocolos histológicos e histoquímicos usados para secções de parafina, com algumas modificações (YEUNG; CHAN, 2015).

A adesão das secções histológicas às lâminas é fundamental para evitar a perda dos cortes durante protocolos de coloração ou imunohistoquímica e dependem da resina utilizada e das análises que serão feitas. Em alguns casos, lâminas limpas e secas são suficientes, como para secções em resina de GMA, que aderem às lâminas pelo calor e evaporação da água em uma placa aquecida (LEITÃO, 2018). Todavia, secções em paraplast e PEG requerem revestimentos adesivos nas lâminas, como albumina, gelatina, poli-L-lisina ou organossilano (3-aminopropiltriétoxi-silano) (CULL, 2019). A albumina é

comumente utilizada no processo de microtomia de blocos de paraplast, fazendo a adesão dos cortes pelo aquecimento das lâminas à 55-60°C após a disposição das secções. Esse processo leva à coagulação da camada de albumina, que se torna insolúvel em água e previne que os cortes se soltem da lâmina (KIERNAN, 1999). Já o processo de gelatinização, com solução contendo sulfato de cromo e potássio, confere carga positiva às lâminas, fazendo com que elas atraiam tecidos carregados negativamente (CERRI *et al.*, 2014).

Os métodos de coloração histológica são empregados para realçar características dos tecidos e promover contraste entre as estruturas (ALTURKISTANI; TASHKANDI; MOHAMMEDSALEH, 2015). As hematoxilinas coram a cromatina nuclear e outros componentes celulares ácidos (FELDMAN; WOLFE, 2014). Dentre elas, a hematoxilina de Harris combinada com a eosina é a mais utilizada (LI *et al.*, 2018) para demonstrar a estrutura histológica geral dos tecidos. O cátion mordente nesse caso é o alumínio, que atua como mediador da ligação entre o corante e o tecido, conferindo ao núcleo uma coloração avermelhada, que muda para azulada quando exposta a uma solução fracamente alcalina, frequentemente água corrente da torneira (FELDMAN; WOLFE, 2014). Em contraste, a eosina cora o citoplasma celular e a maior parte do tecido conjuntivo em diferentes tons e intensidades de rosa, laranja e vermelho. Entre os tipos de eosina disponíveis, a Y é a mais utilizada, sendo solúvel em etanol e água (BANCROFT; LAYTON, 2019), o que a torna apropriada no processamento com resinas de GMA. Além disso, a floxina é muito usada para gerar uma coloração citoplasmática mais escura (FELDMAN; WOLFE, 2014).

Até o momento, há pouca informação na literatura sobre o método ideal para obter orientação precisa do tecido e preservação morfológica ideal de secções de embriões. Na busca pelo processamento ideal, foram testadas três resinas de incorporação diferentes (paraplast, PEG e historesina) a fim de encontrar o melhor protocolo para histologia de estágios iniciais de embriões de galinha. Esses resultados contribuem com o aperfeiçoamento das metodologias de inclusão e emblocagem, que se aplicam em muitas áreas que envolvem a embriologia, incluindo a toxicologia.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Ovos de *Gallus gallus* fertilizados e não incubados foram fornecidos por um incubatório, em Curitiba. Foram utilizados aproximadamente 50 ovos, de pelo menos três lotes diferentes. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA / BIO - UFPR, certificado nº 1098; <http://www.bio.ufpr.br/porta/ceua/>) (ANEXO 1).

2.2. Incubação

Os ovos com a casca íntegra foram higienizados com etanol 70% e posicionados aleatoriamente em uma incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio, modelo SL-224, SOLAB Científica) com a câmara de ar voltada para cima. A temperatura durante o período de incubação (72 horas) foi mantida em 38°C (\pm 0,5), com umidade de 60% e ventilação constante (BELLAIRS; OSMOND, 2014).

2.3. Coleta dos embriões

Após 72 horas de incubação, os ovos foram abertos usando o método da janela descrito por Korn e Cramer (2007). Inicialmente, 5 minutos antes da abertura, os ovos foram colocados na posição horizontal na incubadora, para que o embrião se posicionasse na lateral do ovo voltada para cima, possibilitando a sua visualização pela janela. Esse posicionamento é possível devido à ligação existente entre a membrana vitelínica e a chalaza, que permite que o vitelo gire, mantendo o embrião sempre no topo (RAHMAN *et al.*, 2007). Após a retirada dos ovos da incubadora, uma fita adesiva foi colada na casca no local onde seria feita a abertura. Em seguida, foram retirados 5 ml de albumina com seringa e agulha (FIGURA 1 A) e, com tesoura (FIGURA 1 B), foi aberta uma janela de aproximadamente 6 cm² (FIGURA 1 C) e a viabilidade do embrião foi observada (FIGURA 2). Os embriões foram considerados vivos se exibissem coloração rósea brilhante, batimentos cardíacos e vasos sanguíneos extraembrionários íntegros (FIGURA 2 A). Os embriões mortos apresentavam membrana vitelínica esbranquiçada e opaca, ausência de batimentos cardíacos

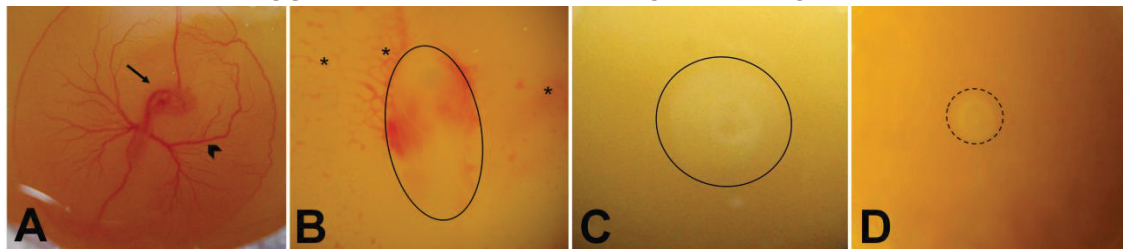
e vasos sanguíneos extraembrionários não intactos (FIGURA 2 B), ou disco embrionário mais desenvolvido do que na postura mas, menos desenvolvido que o esperado pelo tempo de incubação, o que significa que o desenvolvimento foi retomado com a incubação, mas foi encerrado antes da coleta do embrião (FIGURA 2 C). Além disso, alguns embriões foram classificados como não tendo o desenvolvimento retomado com a incubação (FIGURA 2 D). Os embriões mortos foram descartados.

FIGURA 1 - COLETA DOS EMBRIÕES



A: Remoção de albumina. B: Abertura da janela. C: Visualização do embrião. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 2 - VIABILIDADE EMBRIONÁRIA APÓS 72 H



A: Embrião vivo (72 horas), B e C: Embriões mortos. D: Embrião classificado como não tendo o desenvolvimento retomado com a incubação. Ponta de seta: Vasos sanguíneos extraembrionários íntegros. Seta fina: Embrião vivo. Área circulado: Embrião morto. Asteriscos (*): Vasos sanguíneos rompidos. Área tracejada: Blastoderme. FONTE: A autora (2017).

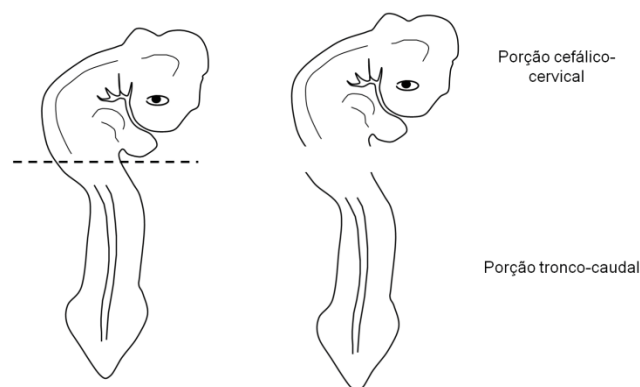
Os embriões vivos foram coletados, transferidos para uma placa de Petri com solução salina tamponada com fosfato (PBS), onde o excesso de suas membranas extraembrionárias foi removido. Em seguida, os embriões foram fixados em paraformaldeído 2% (em PBS) por 72 horas, em placa de 24 poços, para posterior processamento histológico.

2.4. Orientação dos embriões

Para a correta orientação do embrião, os espécimes foram incluídos como embrião inteiro ou fragmento (região cefálico-cervical e tronco-caudal) (FIGURA 3). Essa estratégia foi adotada devido às dificuldades no momento da

orientação do material em paraplast e PEG, pois a cabeça é mais pesada e tende a afundar e, assim, elevar o tronco, gerando um ângulo indesejado. Além disso, essa separação é interessante para estudos de regiões específicas. Para a obtenção dos fragmentos, os embriões foram separados nessas regiões com navalha, sob estereomicroscópio (SQF-F, Tecnival®). Essa divisão foi realizada somente para os processamentos em paraplast e PEG.

FIGURA 3 - DIVISÃO DO EMBRIÃO EM PORÇÃO CEFÁLICO-CERVICAL E TRONCO-CAUDAL



FONTE: A autora (2020).

2.5. Processamento em paraplast

Os embriões fixados foram lavados em PBS, desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e infiltrados em Paraplast Plus (Leica Biosystems) a 58°C (KANNO *et al.*, 2013). Os diferentes tempos testados nessas etapas estão detalhados no QUADRO 1. Em seguida, foram orientados e emblocados para a obtenção de cortes transversais. A emblocagem foi realizada em moldes metálicos com cassetes. Cada bloco continha um embrião inteiro ou um fragmento de embrião.

QUADRO 1 - ETAPAS DO PROCESSAMENTO EM PARAPLAST

Solução	Tempo
PBS	15 min
Etanol 70%	10 ou 15 min
Etanol 80%	10 ou 15 min
Etanol 90%	10 ou 15 min
Etanol 95%	10 ou 15 min
Etanol 100% I	10 ou 15 min
Etanol 100% II	10 ou 15 min
Xilol I	10 ou 15 min
Xilol II	3 ou 5 min
Paraplast I	15, 30, 45 ou 60 min
Paraplast II	15, 30, 45 ou 60 min
Paraplast III	15, 30, 45 ou 60 min

FONTE: Modificado de Kanno *et al.* (2013).

Cortes de 5 µm foram obtidos em micrótomo semiautomático (RM 2145 - Leica Biosystems), utilizando lâminas histológicas descartáveis de aço, e colocados em lâminas de vidro cobertas com albumina de Mayer (QUADRO 2) e água. Após a distensão dos cortes em placa aquecida, as lâminas foram secas durante a noite à temperatura ambiente. Então, as secções foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em série decrescente de etanol e água destilada e coradas com Hematoxilina de Harris e eosina-floxina (H&E). Em seguida, foram desidratadas em etanol e etanol-xilol, clarificadas em xilol e montados com Entellan® e lamínula. Todas as etapas realizadas no processamento e coloração estão detalhadas nos QUADROS 1 e 3.

QUADRO 2 - PREPARO DA SOLUÇÃO DE ALBUMINA

Tipo	Preparo
Albumina concentrada (estoque)	Clara de ovo e glicerina (1:1)
Albumina de Mayer (uso)	Albumina concentrada e água destilada (1:5)

FONTE: Modificado de Oliveira Ribeiro *et al.* (2012) e Pownall e Saha (2019).

QUADRO 3 - COLORAÇÃO DE H&E PARA SECÇÕES EM PARAPLAST

Solução	Tempo
Xilol	6 min
Etanol 100%	6 min
Etanol 95%	6 min
Etanol 90%	3 min
Etanol 80%	3 min
Etanol 70%	3 min
Água destilada	Imersão, duas vezes
Hematoxilina	30 s, 1 min ou 2 min*
Água corrente	10 min
Água destilada	Imersão, duas vezes
Eosina-floxina	30 s, 1 min ou 2 min*
Água destilada	Imersão, duas vezes
Etanol 95%	1 min
Etanol 100% I	3 min
Etanol 100% II	3 min
Etanol 100%: Xilol (1:1)	3 min
Xilol I ou Acetato de amila [#]	3 min
Xilol II ou Acetato de amila [#]	3 min

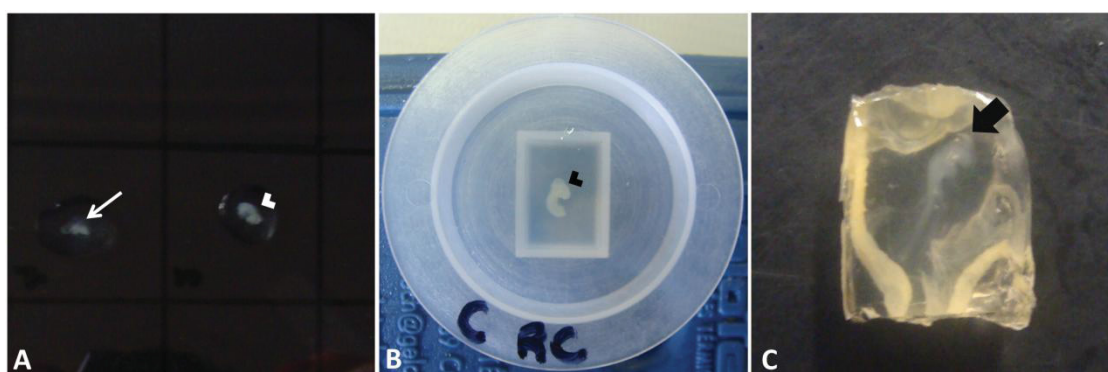
* Os tempos de 1 e 2 minutos foram utilizados somente para amostras pré-emblocadas. #: O acetato de amila foi utilizado somente para amostras pré-emblocadas. FONTE: Modificado de lunes, Branco e Amaral (2013).

Devido à dificuldade em obter orientação precisa para a microtomia dos embriões emblocados em paraplast, optou-se por realizar uma pré-emblocagem. Nessa etapa os embriões foram imobilizados em uma solução de ágar-gelatina antes da emblocagem em paraplast. Esse protocolo foi baseado nos estudos de Buzzel (1975), Ghassemifar e Franzén (1992), Jones e Calabresi (2007) e McClelland e Bowles (2015), com modificações. Soluções estoque de ágar (4%) e gelatina (5%) em PBS foram preparadas para obter uma solução final de ágar-gelatina, que variou entre 2 ou 4% e 2,5 ou 5%, respectivamente. Após testes, as concentrações finais escolhidas foram: ágar a 2% e gelatina a 5%.

Os embriões fixados foram lavados em PBS (duas vezes, por 5 minutos cada) e, em seguida, transferidos para uma gota de ágar-gelatina em uma placa de Petri (FIGURA 4 A) (MCCLELLAND; BOWLES, 2015) ou em um molde de polietileno preenchido com 600 µl da solução (FIGURA 4 B), e orientados para a obtenção de cortes transversais, iniciando na porção mais

anterior. Após a polimerização, os blocos foram retirados dos moldes (FIGURA 4 C), trimados (o excesso de ágar-gelatina foi retirado) e a porção anterior do bloco corada com eosina aquosa 1% (30 segundos), para indicar a orientação do embrião. Em seguida, os blocos foram colocados em cassetes histológicos identificados e armazenados em solução de etanol 70% ou NaCl 0,9%, por, pelo menos, 24 horas. O processamento em paraplast foi realizado conforme descrito anteriormente nesta seção, exceto a etapa com xilol que foi substituído por acetato de amila no processamento de metade dos blocos.

FIGURA 4 - PRÉ-EMBLOCAGEM EM SOLUÇÃO DE ÁGAR-GELATINA



A: Fragmentos de embriões em uma gota de solução em uma placa de Petri. B: Regiões cefálica e cervical de um embrião em um molde de polietileno preenchido com a solução. C: Bloco de ágar-gelatina após polimerização. Seta fina: Região tronco-caudal. Ponta de seta: Região cefálica e cervical. Seta grossa: Embrião inteiro. FONTE: A autora (2020).

2.6. Processamento em polietilenoglicol

Dois métodos foram testados, com desidratação (método 1) (M1) e sem (método 2) (M2), conforme descrito por Wolosewick (1986). Primeiro, os embriões fixados foram lavados em PBS (15 minutos) e depois processados com o M1 ou M2. No M1, os embriões foram desidratados em etanol (25-100%, 10 minutos cada) e infiltrados em duas soluções de PEG e etanol 100%, nas proporções 1:1 e 2:1, por 30 ou 60 minutos cada. Em seguida, foram transferidos para PEG 100% (duas trocas), por 30 ou 60 minutos (QUADRO 4). No processamento M2, as soluções foram preparadas em água destilada nas concentrações (v / v) 25, 50 e 70% de PEG. Os embriões foram infiltrados nessas soluções por 15 ou 30 minutos cada. Em seguida, transferidos para o PEG 100% (duas trocas de 15 ou 30 minutos cada) (QUADRO 5). Todo o processamento foi realizado em uma microplaca de 24 poços. Em todas as

etapas com soluções contendo PEG, as amostras foram mantidas a 55°C. Após a infiltração com PEG, os embriões foram incluídos em moldes de papel. Sobre placa aquecida, o molde identificado foi preenchido com PEG e o embrião foi devidamente orientado para a obtenção de cortes transversais. Dessa forma, foi possível aumentar o tempo de polimerização, principalmente em dias frios, o que permitiu mais tempo para a manipulação do embrião na resina de emblocagem. Cada bloco continha um embrião inteiro ou um fragmento de embrião. Os blocos foram mantidos em recipiente com sílica, à temperatura ambiente ou a 4°C, para polimerização *overnight*. Posteriormente, os blocos foram retirados dos moldes e armazenados em recipiente com sílica, para evitar umidificação e amolecimento. Na sequência, antes do corte, foram trimados e fixados em suporte de madeira com PEG previamente derretido.

Usando navalhas descartáveis, secções transversais de 5 µm foram obtidas em micrótomo semiautomático (Leica RM 2145). As secções foram colocadas em lâminas revestidas com albumina de Mayer ou gelatina a 0,1% ou 1%, com ou sem solução de Triton® X-100 (0,1% em PBS). A solução de Triton 0,1% foi utilizada para melhorar a distensão dos cortes (SMITHSON; MACVICAR; HATTON, 1983). Após a distensão dos cortes em placa aquecida, as lâminas foram secas *overnight*, à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes histológicos foram hidratados em etanol 70% e água destilada e corados com hematoxilina de Harris (30 segundos) e eosina-floxina (30 segundos) (QUADRO 6). Após a secagem, as secções foram cobertas com Permount® e lamínula. Todos os procedimentos estão detalhados nos QUADROS 4, 5 e 6.

QUADRO 4 – ETAPAS DO PROCESSAMENTO COM PEG - MÉTODO 1

Solução	Tempo
PBS	15 min
Etanol 25%	10 min
Etanol 50%	10 min
Etanol 70%	10 min
Etanol 95% I	10 min
Etanol 95% II	10 min
Etanol 100% I	10 min
Etanol 100% : PEG (1:1)	30 ou 60 min
Etanol 100% : PEG (1:2)	30 ou 60 min
PEG 100% I	30 ou 60 min
PEG 100% II	30 ou 60 min

FONTE: Modificado de Wolosewick (1986).

QUADRO 5 – ETAPAS DO PROCESSAMENTO COM PEG – MÉTODO 2

Solução	Tempo
PBS	15 min
PEG 25%	15 ou 30 min
PEG 50%	15 ou 30 min
PEG 70%	15 ou 30 min
PEG 100% I	15 ou 30 min
PEG 100% II	15 ou 30 min

FONTE: Modificado de Wolosewick (1986).

QUADRO 6 - COLORAÇÃO DE H&E PARA SECÇÕES EM PEG

Solução	Tempo
Etanol 70%	3 min
Água destilada	Imersão, uma vez
Hematoxilina	15 s, 30 s ou 45 s
Água corrente	10 min
Água destilada	Imersão, uma vez
Eosina-Floxina	15 s, 30 s ou 45 s
Água destilada	Imersão, uma vez

FONTE: A autora (2020).

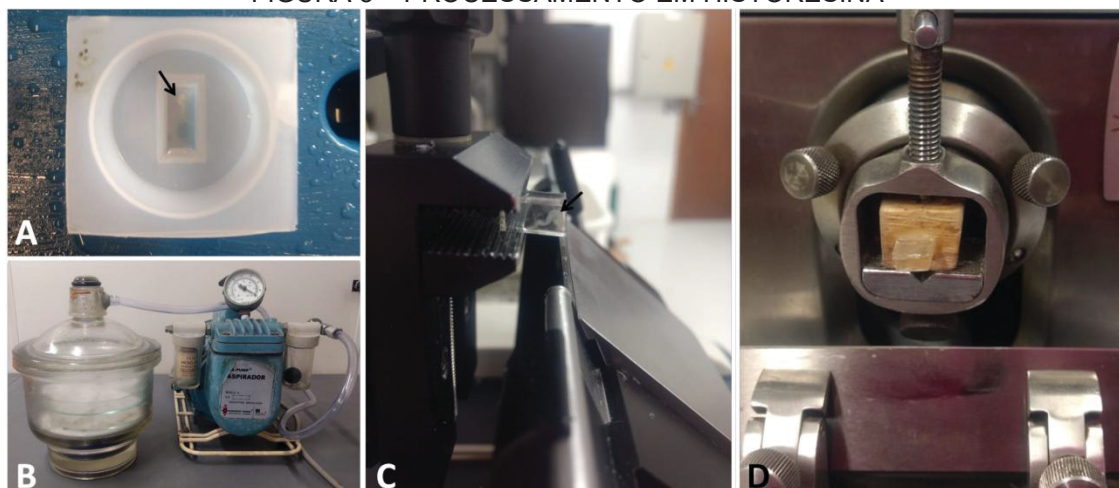
2.7. Processamento em historesina

Esse protocolo foi baseado em González Santander *et al.* (1997), com modificações. A solução de uso foi preparada de acordo com o manual do kit

de historesina (Leica Biosystems), diluindo 5 g do composto ativador em 50 ml de resina (hidroxietil metacrilato), sendo armazenada a 4°C. Em uma placa de 24 poços, os embriões foram lavados em PBS e desidratados em série crescente de etanol (QUADRO 7). Em seguida, foram imersos em solução de pré-infiltração (etanol 100% e solução de uso, 1:1) e, depois, em solução de infiltração (solução de uso), ambas à temperatura ambiente. Em seguida, cada embrião foi colocado em 600 µl de solução de emblocagem (solução de uso e composto endurecedor, 15:1), em moldes de polietileno, e orientado para a obtenção de cortes transversais (FIGURA 5 A). Para manter o embrião na posição desejada, uma placa fria e uma aquecida foram utilizadas para controlar o tempo inicial de polimerização, e uma pinça ou um palito de madeira para segurar o embrião em posição. Cada bloco foi identificado e colocado em dessecador a vácuo com sílica por 48 horas, para completa polimerização (FIGURA 5 B). Na sequência, os blocos foram retirados dos moldes e armazenados em recipiente com sílica, para evitar umidificação e amolecimento.

Para a microtomia, foram utilizados dois micrótomos: um semiautomático (Leica RM 2145) e um manual (Spencer 820), para avaliar o melhor método de fixação do bloco. No semiautomático, o bloco foi fixado diretamente ao suporte do micrótomo e seccionado com navalhas de tungstênio (FIGURA 5 C). No manual, o bloco foi fixado a um suporte de madeira com cola de cianoacrilato antes de ser posicionado no micrótomo e seccionado com navalha de aço não descartável (FIGURA 5 D). Os blocos foram desbastados até que o tecido atingisse a superfície de corte. A coloração com azul de toluidina (0,1%) foi usada para confirmar a presença da amostra nas primeiras secções. Após a confirmação, foram obtidos cortes de 5 µm, que foram dispostos sobre gotas de água em lâminas de vidro limpas (sem revestimento), distendidos e secos em placa aquecida. Em seguida, as secções foram hidratadas em água destilada e coradas com Hematoxilina de Harris e eosina aquosa 1% (QUADRO 8). Após a secagem, as secções foram cobertas com Permount® e lamínula.

FIGURA 5 – PROCESSAMENTO EM HISTORESINA



A: Embrião embocado em molde de polietileno. B: Dessecador e bomba de vácuo. C: Bloco posicionado no micrótomo semiautomático mostrando a vista lateral do bloco transparente e da navalha. D: Bloco fixado em madeira e posicionado no micrótomo manual. Seta preta: Embrião. FONTE: A autora (2020).

QUADRO 7 – ETAPAS DO PROCESSAMENTO EM HISTORESINA

Solução	Tempo
Etanol 30%	5 min
Etanol 50%	10 min
Etanol 70%	10 min
Etanol 80%	10 min
Etanol 90%	10 min
Etanol 100% I	10 min
Etanol 100% II	10 min
Pré-infiltração	2 h
Infiltração	12 h
Emblocagem (solução de uso + endurecedor)	12 h (ou até completa polimerização)

FONTE: Modificado de González Santander *et al.* (1997).

QUADRO 8 – COLORAÇÃO DE H&E PARA SECÇÕES EM HISTORESINA

Solução	Tempo
Água destilada	3 min
Hematoxilina	1, 5, 15 ou 30 min
Água corrente	10 min
Água destilada	Imersão, três vezes
Eosina aquosa (1%)	1, 3, 5, 10 ou 12 min
Água destilada I*	Imersão, três vezes
Água destilada II*	Imersão, três vezes

FONTE: A autora (2020).

2.8. Análise

Foram analisadas 900 lâminas e aproximadamente 10000 secções. As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio óptico (Metrimplex Hungary / PZO-Labimex, Studar lab). Após seleção das lâminas analisadas, o material foi documentado em fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX40, Câmera DP71, *software* DPController), do Laboratório de Ficologia (Departamento de Botânica - UFPR).

Os parâmetros avaliados para considerar o melhor método de emblocagem para os embriões de galinha em estágios iniciais foram: 1) precisão da orientação do tecido, 2) visualização dos embriões nos blocos, 3) microtomia, 4) contraste na coloração, 5) preservação das estruturas (manutenção da morfologia e presença de artefatos), 6) tempo de processamento e 7) custo de processamento.

Os três métodos de incorporação testados receberam uma pontuação para cada parâmetro avaliado, de acordo com o índice de avaliação desenvolvido para este trabalho. Os valores variaram de 0 a 5 (QUADRO 9), sendo que quanto maior a pontuação, mais favorável é a utilização da resina.

A precisão da orientação do tecido, a visualização dos embriões nos blocos e a microtomia foram consideradas de impossível (pontuação = 0) a excelente (pontuação = 5). O contraste fornecido pela coloração foi classificado de muito fraco (pontuação = 0) a excelente (pontuação = 5), pela observação do núcleo, nucléolo e citoplasma. Quanto à preservação, foi considerada a forma das células e estruturas embrionárias (ectoderme, tubo neural, notocorda e somitos), sendo que a morfologia variou de muito ruim (pontuação = 0) a excelente (pontuação = 5) e os artefatos foram classificados de muito frequentes (pontuação = 0) a não observados (pontuação = 5). A presença de artefatos foi classificada de frequente (pontuação = 0) a rara (pontuação = 5). O custo e o tempo foram comparados proporcionalmente e considerado o maior com pontuação = 0 e o menor com a pontuação = 5.

QUADRO 9 – PARÂMETROS AVALIADOS E A CLASSIFICAÇÃO CORRESPONDENTE

Parâmetros	Classificação					
	0	1	2	3	4	5
Precisão na orientação	Impossível	Ruim	Difícil	Boa	Muito boa	Excelente
Visualização dos embriões nos blocos	Impossível	Ruim	Difícil	Boa	Muito boa	Excelente
Microtomia	Impossível	Ruim	Difícil	Boa	Muito boa	Excelente
Contraste na coloração	Muito fraco	Ruim	Satisfatório	Bom	Muito bom	Excelente
Preservação das estruturas						
Morfologia	Muito ruim	Ruim	Satisfatória	Boa	Muito boa	Excelente
Artefatos	Muito frequentes	Frequentes	Ocasionais	Raros	Muito Raros	Não observados
Tempo de processamento	Maior tempo (30 h)	80%	60%	50%	± 20% (6 h)	± 10% (3 h)
Custo	Maior preço	± 80%	± 50%	± 25%	± 10%	± 5%

FONTE: A autora (2020).

3. Resultados

A apresentação dos resultados será dividida por parâmetro analisado e por resina.

3.1. Precisão na Orientação

Paraplast

A orientação dos embriões inteiros foi difícil na emblocagem em paraplast (FIGURA 6 A-B), uma vez que as etapas do processamento os tornaram rígidos e opacos, impossibilitando a identificação dos eixos corporais. Além disso, a rápida polimerização da resina à temperatura ambiente e o tamanho reduzido dos embriões (aproximadamente 5 mm), impossibilitaram posicioná-los e mantê-los na posição desejada para obter secções transversais das regiões cefálica, cervical, do tronco e caudal. Mesmo após a divisão do embrião em dois fragmentos, não foram obtidas secções em cortes transversais da região cefálica-cervical (FIGURA 6 A-B), somente da região tronco-caudal (FIGURA 6 C).

Na tentativa de melhorar a orientação dos embriões no bloco, foi realizada a pré-emblocagem em ágar-gelatina (FIGURA 6 D-F). O primeiro teste realizado, com uma solução de pré-emblocagem contendo ágar a 2% e gelatina a 2,5% não foi eficiente, pois as gotas utilizadas foram dissolvidas na solução de NaCl 0,9% e na de etanol 70%. Então, para o segundo teste, a concentração de ágar foi aumentada para 4% e a de gelatina para 5%, porém, ainda assim não foi possível a sua utilização, pois a solução apresentou muitos grumos. Posteriormente, no terceiro teste, o material foi pré-emblocado utilizando moldes e maior quantidade de solução (aproximadamente 600µl), buscando a não dissolução dos blocos. Entretanto, esses blocos também se dissolveram na solução de NaCl 0,9%, porém não no etanol 70%. Na etapa seguinte, a de clarificação, os blocos foram dissolvidos no xilol e quando utilizado o acetato de amila ficaram opacos, o que impossibilitou a visualização da orientação dos embriões.

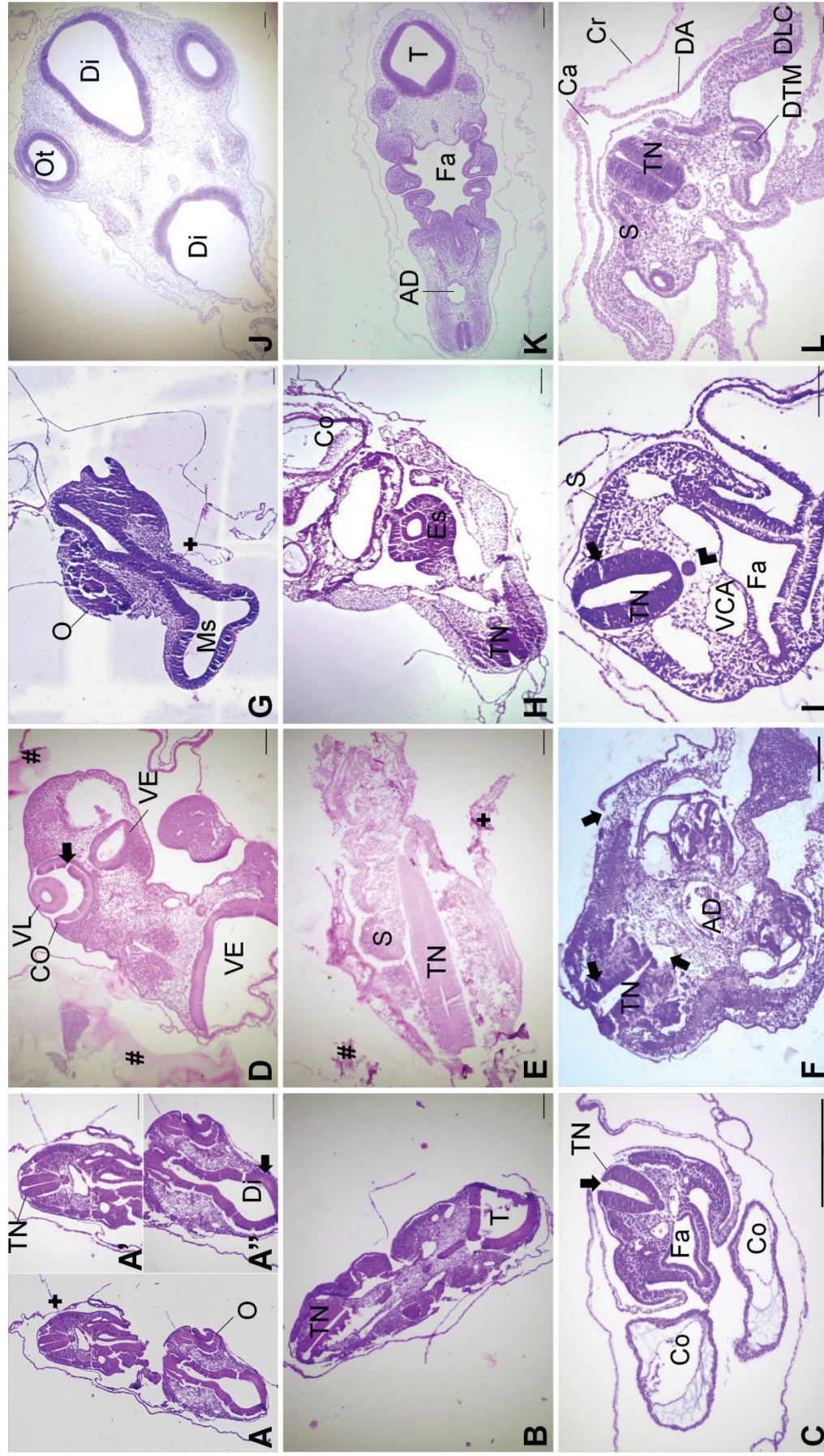
Poliétilenoqlicol

Apesar do PEG proporcionar um tempo maior para posicionar o embrião, a acurácia na orientação do embrião inteiro para corte não foi satisfatória. Já após a fragmentação, foram obtidos ângulos mais favoráveis, porém a região cefálica-cervical (FIGURA 6 G-H) foi mais difícil de orientar do que a tronco-caudal (FIGURA 6 I).

Historesina

A utilização dessa resina foi a mais adequada para as particularidades das nossas amostras. A historesina é translúcida e sua polimerização é lenta, quando comparada aos outros meios de emblocagem. Dessa forma, houve tempo suficiente para orientar os embriões e mantê-los na posição desejada nos blocos, sem a necessidade de fragmentá-los. Além disso, as etapas do processamento clarificam a amostra, porém ainda permitindo a identificação dos eixos corporais do embrião. Devido ao sucesso no posicionamento preciso dos embriões nos blocos, as estruturas embrionárias foram facilmente identificadas (FIGURA 6 J-L).

FIGURA 6 – CORTES HISTOLÓGICOS APRESENTANDO ORIENTAÇÃO CORRETA E INCORRETA



Diferentes orientações de seções histológicas obtidas de embriões emblocados em paraplást (A-C); paraplást com pré-emblocagem em ágar-gelatina (D-F); PEG (G-I); e historesina (J-L). A, D, G, J: Região cefálica. B, E, H, K: Região do tronco. A': Porção cervical. A'': Porção cefálica. A'': Porção cefálica. AD: Aorta dorsal. Ca: Cavidade amniótica. Cr: Córion. Co: Coração. CO: Cálce óptico. DA: Dobra amniótica. Di: Diencefalo. Di: Dobra lateral do corpo. DTM: Ducto e túbulos mesonéfricos. Es: Esôfago. Fa: Faringe. Ms: Mesencéfalo. O: Olho. Ot: Vesícula ótica. S: Somito. T: Telencéfalo. TN: Tubo neural. VCA: Veia cardinal anterior. VE: Vesícula encefálica. VL: Vesícula da lente. +: Porção do corte que soltou da lâmina. #: Resíduo de ágar-gelatina. Cabeça de seta: Retração. Setas grossas: Rompimento. Coloração: H&E. Barra = 100µm. FONTE: A autora (2020).

3.2. Visualização dos embriões nos blocos, microtomia e coloração

Paraplast

Como foi impossível observar os embriões nos blocos (FIGURA 7 A) grande parte do material foi perdida na etapa de microtomia, pois a presença da amostra nos cortes não era facilmente identificada. Apesar disso, foi possível a obtenção e houve a formação de fitas, mesmo não sendo possível identificar o início ou ângulo do embrião no bloco.

A coloração de H&E proporcionou contraste apropriado entre núcleo e citoplasma (FIGURA 8 A-B) e, dessa forma, detalhamento celular satisfatório. Foi possível observar o citoplasma, núcleo e, com ajuste micrométrico, o nucléolo, na maioria das secções. As melhores colorações foram observadas para as secções coradas com tempos de 30 segundos para Hematoxilina de Harris e eosina-floxina (QUADRO 10).

Não foi possível obter cortes histológicos dos embriões pré-emblocados em ágar-gelatina para análise, pois as secções se rompiam assim que eram confeccionadas (dados não mostrados). Os tempos de desidratação e infiltração foram ajustados, porém não houve melhora da integridade das secções obtidas. Além disso, coloração inadequada foi observada com frequência (FIGURA 8 C-E) e, no geral, não foi possível diferenciar citoplasma, núcleo e nucléolo, mesmo com ajustes no protocolo de coloração.

Polietilenoglicol

Não foi possível visualizar os embriões nos blocos (FIGURA 7 B), após a polimerização, também devido à opacidade da resina, tornando inviável sua visualização e conseqüente perda de material.

A microtomia do material emblocado em PEG foi um processo árduo, pois as secções são muito delicadas, assim como a amostra, e se desfaziam à medida que eram confeccionadas. Outro fator que dificultou a microtomia foi a umidade no ambiente, por isso o armazenamento precisou ser à temperatura ambiente, em recipiente com sílica. A distensão dos cortes foi satisfatória somente quando utilizada a solução de Triton X-100 a 0,1%, o que contribuiu também com a boa adesão dos cortes às lâminas revestidas com gelatina a 1%. Durante as etapas de coloração, todas as secções histológicas dispostas

sobre lâminas cobertas com albumina e gelatina a 0,1% desaderiram, ocasionando a perda de todo material.

O detalhe celular não foi satisfatório, pois a coloração com H&E não forneceu um bom contraste, dificultando a visualização do citoplasma, núcleo e nucléolo (FIGURA 8 E-F), mesmo após ajustes na coloração. Ainda que o material não tenha ficado adequado com essa resina e a visualização tenha sido extremamente difícil, os melhores tempos observados foram de 30 segundos, para Hematoxilina de Harris e eosina-floxina (TABELA 10).

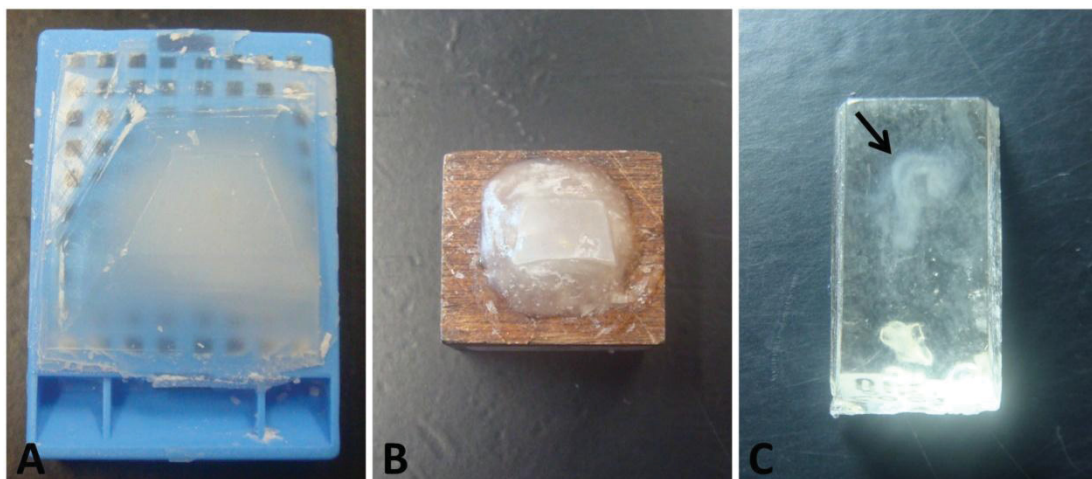
Historesina

Em contraste ao observado nas outras metodologias descritas nesse trabalho, a emblocagem em historesina possibilitou a observação do embrião no bloco (FIGURA 7 C) devido à sua transparência.

Ao utilizar os suportes de madeira para fixar os blocos no micrótomo é necessário que eles sejam colados no dia anterior, para que a cola seque completamente, e armazenados em recipiente com sílica até o momento da microtomia (para evitar o amolecimento da resina). A obtenção dos cortes em historesina é mais demorada, pela dureza da resina e ao fato de que a formação de fitas de cortes é rara, o que torna a obtenção de cortes seriados mais laboriosa.

A coloração de H&E proporcionou excelente contraste e grande detalhamento celular, com citoplasma, núcleo e nucléolo facilmente distinguíveis (FIGURA 8 G-H). O tempo para realização do protocolo de coloração foi mais longo do que nas outras resinas, porém apresentou menos etapas. Os melhores tempos foram de 30 minutos para hematoxilina de Harris e 12 minutos para eosina (QUADRO 10). É importante ressaltar que as soluções-corante não podem conter álcool, pois ele dissolve a historesina e as secções soltam da lâmina, ocasionando perda.

FIGURA 7 – PARÂMETRO VISUALIZAÇÃO DOS EMBRIÕES NOS BLOCOS



A: Paraplast. B: PEG. C: Historesina. Seta: Embrião. FONTE: A autora (2020).

QUADRO 10 - TEMPOS DE COLORAÇÃO COM MELHORES RESULTADOS

Resina	Solução	Tempo
Paraplast	Hematoxilina	30 s
	Eosina-Floxina	30 s
PEG	Hematoxilina	30 s
	Eosina-Floxina	30 s
Historesina	Hematoxilina	30 min
	Eosina aquosa (1%)	12 min

FONTE: A autora (2020).

3.3. Qualidade da preservação tecidual

Nessa categoria foram avaliadas a manutenção da morfologia e a presença de artefatos.

Paraplast

O processamento dos embriões em paraplast gerou boa preservação tecidual (FIGURA 8 A-B), com manutenção da estrutura dos somitos, sendo o dermatomo e miótomo identificáveis (FIGURA 8 A). No entanto, foram observados artefatos que comprometem uma análise histológica detalhada das estruturas embrionárias. Retração tecidual ocorreu frequentemente ao redor do tubo neural e na mesoderme paraxial (FIGURA 8 A-B). Além disso, houve rompimento do tecido, principalmente na ectoderme, tubo neural e

mesênquima (FIGURA 8 A-B). Os melhores resultados foram obtidos com os tempos de processamento descritos no QUADRO 11.

A pré-emblocagem em ágar-gelatina comprometeu a preservação tecidual (FIGURA 8 C-D), com perda da integridade e retração (FIGURA 8 D), coloração fraca (FIGURA 8 C-D), baixíssimo detalhe celular e presença de resíduos de ágar-gelatina (FIGURA 8 C).

QUADRO 11 - TEMPOS QUE APRESENTARAM MELHORES RESULTADOS

Solução	Tempo
Etanol 70%	15 min
Etanol 80%	15 min
Etanol 90%	15 min
Etanol 95%	15 min
Etanol 100% I	15 min
Etanol 100% II	15 min
Xilol I	3 min
Xilol II	3 min
Paraplast I	15 min
Paraplast II	15 min
Paraplast III	15 min

FONTE: A autora (2020).

Poliétilenoglicol

A preservação do tecido não foi satisfatória, independente do protocolo utilizado. A retração tecidual (FIGURA 8 E) foi semelhante à observada com o paraplast, porém a morfologia celular e tecidual foi considerada inadequada, pois as células do tubo neural não se apresentaram justapostas e espaços entre elas foram observados frequentemente (FIGURA 8 E-F). Além disso, porções mais delicadas das secções histológicas, como as membranas extraembrionárias, desaderiram e dobraram sobre o tecido (FIGURA 8 E) e o detalhe celular proporcionado foi ruim. Os melhores resultados foram obtidos com os tempos de processamento descritos no QUADRO 12.

QUADRO 12 - TEMPOS QUE APRESENTARAM MELHORES RESULTADOS

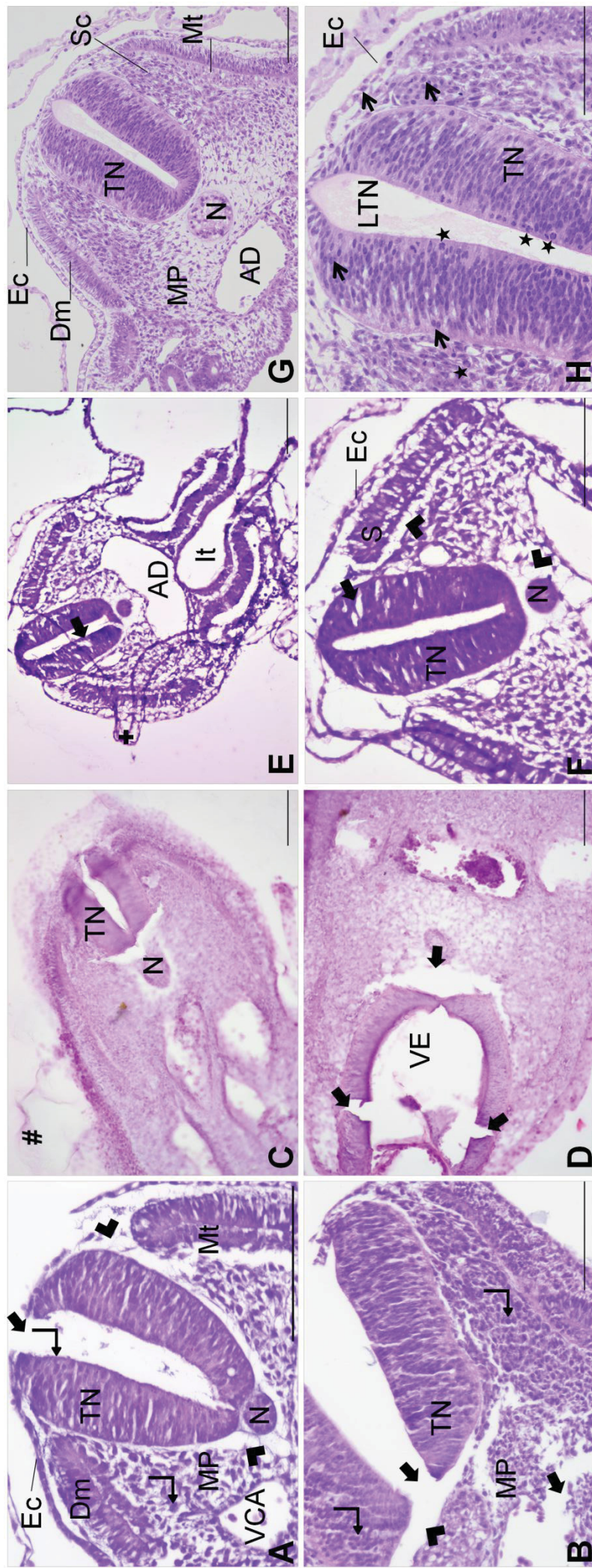
Tipo processamento	Solução	Tempo
Método 1	Etanol 100%: PEG (1:1)	30 min
	Etanol 100% : PEG (1:2)	30 min
	PEG 100% I	30 min
	PEG 100% II	30 min
Método 2	PEG 25%	30 min
	PEG 50%	30 min
	PEG 70%	30 min
	PEG 100% I	30 min
	PEG 100% II	30 min

FONTE: A autora (2020).

Historesina

Apesar da fragilidade dos embriões de galinha em estágios iniciais, essa resina proporcionou excelente preservação tecidual, com manutenção da morfologia (FIGURA 13 G-H) e pouca retração, quando comparada às outras resinas. Além disso, a ectoderme de superfície foi observada como um epitélio simples cúbico (FIGURA 13 H), característica não vista claramente nas outras metodologias. Foi possível distinguir, também, o epitélio pseudoestratificado do tubo neural, com células justapostas, figuras mitóticas no neuroepitélio, próximas à superfície luminal, e na região do esclerótomo (FIGURA 13 H).

FIGURA 8 – CORTES HISTOLÓGICOS COM DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRESERVAÇÃO E COLORAÇÃO



Seções histológicas de embriões emblocados em paraplast (A-B); paraplast com pré-emblocagem em ágar-gelatina (C-D); PEG (E-F); e historesina (G-H). AD: Aorta dorsal. Dm: Dermátomo. Ec: Ectoderme. It: Intestino. LTN: Lúmen do tubo neural. MP: Mesoderme paraxial. Mt: Miotomo. N: Notocorda. S: Somito. Sc: Esclerótomo. TN: Tubo neural. VCA: Veia cardinal anterior. VE: Vesícula encefálica. #: Resíduo do corte que soltou da lâmina. #: Resíduo de ágar-gelatina. *: Figuras mitóticas. †: Núcleo. Cabeça de seta: Retração. Seta grossa: Rompimento. Seta fina: Núcleo e nucléolo evidentes. Coloração: H&E. Barra = 100µm. FONTE: A autora (2020).

3.4. Tempo de preparação dos blocos e custo

O tempo médio necessário para obtenção dos blocos histológicos e o custo podem ser fatores determinantes na escolha de resinas de emblocagem, e por isso também foram descritos nesse trabalho. O tempo de processamento com paraplast durou aproximadamente 6 horas, mas quando empregada a pré-emblocagem ágar-gelatina o tempo aumentou para 30 horas devido à adição de etapas extras. Os menores tempos entre as resinas testadas foram obtidos com o PEG, no M1 e no M2, que duraram 3 e 4 horas, respectivamente. No protocolo em que se empregou a historesina, o tempo de processamento foi próximo ao do paraplast com pré-emblocagem em ágar-gelatina (aproximadamente 30 horas), pois a infiltração da historesina na amostra é mais lenta.

O custo dos kits de historesina e das navalhas necessárias para a microtomia é bastante elevado. Em contrapartida, o custo da utilização do paraplast e PEG é baixo, sendo aproximadamente 10 e 5% do valor da historesina, respectivamente.

A TABELA 1 resume e compara os parâmetros avaliados em cada resina, através de pontuação. Todos os resultados foram piores no processamento em que foi empregada a pré-emblocagem em ágar-gelatina e, por isso, não foram contemplados na comparação.

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES ATRIBUÍDOS AOS PARÂMETROS ANALISADOS EM CADA RESINA

Parâmetros	Resinas		
	Paraplast	PEG	Historesina
Precisão na orientação	1	2	5
Visualização dos embriões nos blocos	0	0	5
Microtomia	2	0	1
Contraste na coloração	4	1	5
Preservação das estruturas			
Manutenção da morfologia	3	1	5
Presença de artefatos	0	0	4
Tempo de processamento	4	5	0
Custo	4	5	0
Total	18	14	25

4. Discussão

A orientação do material em cortes histológicos é crucial para a demonstração adequada da morfologia, identificação correta de estruturas e diagnóstico de possíveis lesões (LAI; LÜ, 2012; COPPER *et al.*, 2018; NAYAK, 2018), particularmente em materiais que apresentam organização distinta dependendo do plano de corte, como os embriões. O paraplast e o PEG são resinas que apresentam altos pontos de fusão (SHARIFF; KALER, 2016) e por isso requerem o uso de estufa e placa aquecida ou estação de emblocagem com dispensador de resina, para a realização da emblocagem. Então, por terem polimerização rápida e dependente somente da temperatura, estas resinas não ofereceram condições necessárias para posicionar corretamente o embrião no molde. Além disso, ambas as resinas se tornaram opacas após a polimerização, impedindo uma boa visualização dos pequenos embriões no bloco, o que levou à perda de material. Em contrapartida, a historesina permitiu que o embrião fosse facilmente posicionado no molde, pois sua polimerização é lenta à temperatura ambiente. Nessa resina, o endurecimento é dependente de um catalisador (o endurecedor que compõe o kit), que reage na presença do ativador, gerando radicais livres que atuam como iniciadores da polimerização (SIDERIDOU; ACHILIAS; KARAVA, 2006). A velocidade dessa reação

depende da temperatura, que, se muito elevada, pode tornar o bloco excessivamente duro e quebradiço, e se muito baixa, demasiadamente flexível (SINGHRAO; NICHOLSON; CREAN, 2012). As condições ideais para a polimerização das resinas à base de glicol metacrilato (GMA), como a historesina, variam bastante de acordo com a composição da resina, como a temperatura (de -20°C à 40°C) e, em alguns casos, a necessidade de luz ultravioleta e microondas (STIRLING; WOODS, 2019), porém não há estudos que descrevam essas condições para a historesina. Outro ponto favorável da historesina foi a sua transparência após a polimerização, permitindo excelente visualização do embrião no bloco, o que facilita o posicionamento na hora de cortar. Por isso ela também é empregada para outras espécies pequenas (AUDINO *et al.*, 2015; FIAZ *et al.*, 2018) ou órgãos (BRITO *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2018).

A literatura sugere a pré-emblocagem em ágar-gelatina para facilitar a orientação de embriões e pequenos tecidos nos blocos de paraplast (MCCLELLAND; BOWLES, 2015). Entretanto, essa metodologia não foi eficiente para melhorar a orientação do nosso material, mesmo com maiores concentrações de ágar e gelatina, ou maior quantidade de material, pois todos os blocos preparados foram comprometidos no processamento, sendo dissolvidos no xilol ou se tornando opacos com o acetato de amila, impedindo a observação do embrião. Além disso, a pré-emblocagem aparentemente afetou a qualidade da preservação tecidual e, mesmo após ajustes nas etapas de desidratação, diafanização e infiltração, não foram obtidos resultados satisfatórios. Essa foi uma situação inesperada, pois de acordo com Jones e Calabresi (2007), a utilização da pré-emblocagem não interfere no processamento histológico, uma vez que a solução de ágar-gelatina não infiltra na amostra (BUZZEL, 1975). Porém, é possível que, devido à composição “gelatinosa” do embrião, pela predominância do mesênquima, a solução tenha infiltrado nos embriões, o que não acontece em amostras maiores e menos delicadas. Ainda, o uso de uma solução de ágar-gelatina deveria prevenir problemas recorrentes quando são usados ágar e gelatina individualmente, como as secções soltarem da lâmina e prejuízo na coloração (JONES; CALABRESI, 2007), como foi observado nesse trabalho.

O Paraplast é uma resina que apresenta boa infiltração e fornece secções de qualidade de tecidos adultos (GEMUSSE *et al.*, 2021; RUBIO-VARGAS *et al.*, 2021). Porém, nesse trabalho o paraplast não favoreceu o processamento das amostras, cuja preservação não foi apropriada e os artefatos foram frequentes. A necessidade da utilização de solventes intermediários, já que não é solúvel em etanol, em conjunto com a alta temperatura (58°C) necessária para infiltração dos tecidos, danificam as delicadas amostras embrionárias e geram artefatos devido ao endurecimento e deformação do tecido (FELDMAN; WOLFE, 2014). Os artefatos observados nesse trabalho foram mais frequentes e acentuados nas amostras pré-emblocadas, pois o revestimento de ágar-gelatina prejudicou a infiltração, que precisou ser prolongada, resultando em maior retração e deterioração das secções. Smith e Warfield (2005) sugerem que a retração tecidual ocorre devido ao efeito do calor no colágeno do tecido, corroborando nossos resultados que demonstraram que tempos mais elevados de exposição a altas temperaturas levam a maiores danos no tecido processado nessas condições. Uma possível alternativa para tentar reduzir os artefatos causados pelo calor é a utilização do Paraplast X-tra, que tem um ponto de fusão menor (53-54°C) (CIMA, 2017). Porém, a temperatura de fusão do PEG é semelhante (55°C), e também não proporcionou preservação estrutural satisfatória.

Nosso estudo é o primeiro a discutir o PEG como meio de incorporação para histologia de embriões de galinha em estágios iniciais e a comparar o seu uso com o de outras resinas. Nesse trabalho, o uso do PEG 1500 não ofereceu preservação adequada da estrutura do tecido nos dois métodos testados (M1 - com desidratação e M2 - sem desidratação). Além disso, o protocolo M1, apesar de apresentar 1 hora a menos, proporcionou a mesma qualidade dos cortes histológicos. Apesar da baixa qualidade da preservação morfológica observada nesse trabalho, essa resina é indicada para análises imunohistoquímicas, devido a alta antigenicidade das secções obtidas (BARD; ROSS, 1986). Além disso, o PEG é compatível com marcações fluorescentes e a preservação do detalhe celular fornecido é descrita como superior à de cortes congelados (GAO; GODKIN, 1991). Outra característica notável da emblocagem em PEG é a ampla faixa de espessura de cortes que pode ser obtida, variando de 1-150 µm, dependendo do peso molecular médio do PEG

utilizado (SMITHSON; MACVICAR; HATTON, 1983). Dessa forma, nossos resultados com a utilização do PEG 1500 como meio de incorporação histológico enriquecem a pouca literatura existente e podem auxiliar estudos futuros que objetivem explorar as suas propriedades em técnicas de imunodeteção.

As resinas acrílicas, como a historesina, são adequadas para emblocagem de tecidos frágeis, macios e sensíveis à temperatura, como os embriões, pois as etapas de infiltração e polimerização ocorrem à temperatura ambiente, minimizando a degradação de proteínas e o dano às estruturas celulares (STIRLING; WOODS, 2019). Segundo González Santander e colaboradores (1997), a historesina é a resina que melhor preserva as características do tecido, sendo as secções preparadas o mais próximo do estado *in vivo*. De fato, a historesina foi a que propiciou a melhor preparação das secções, com excelente preservação da morfologia. Um dos fatores determinantes da qualidade da manutenção estrutural das secções é a hidrofiliabilidade da historesina, o que exclui a necessidade da utilização de agentes clareadores (SULLIVAN-BROWN; BISHOP; BURDINE, 2011), como o xilol, que endurecem e retraem o tecido (CHEN *et al.*, 2010). Além disso, a utilização de resinas de GMA permite uma ampla faixa de espessuras de corte (0,5-5µm), dependendo da formulação da resina e navalha utilizada (STIRLING; WOODS, 2019). Assim, diferentes níveis de detalhe celular, contraste e nitidez podem ser explorados (MATENAERS *et al.*, 2018). Nesse trabalho a espessura dos cortes foi constante a fim de comparar igualmente a qualidade das secções obtidas com as diferentes resinas testadas.

A adesividade dos cortes às lâminas é crucial para evitar perda de material durante o processamento. Nesse estudo, foi utilizada albumina para o paraplast e testadas albumina e gelatina para o PEG. O revestimento de gelatina foi o mais eficiente na adesão de secções em PEG, quando empregada uma solução de gelatina a 1%, o que forneceu mais ligações cruzadas devido à maior concentração de gelatina. Ainda, a solução de Triton X-100 aumentou a adesão dos cortes às lâminas, além de auxiliar na distensão, como foi descrito por Smithson, Macvicar e Hatton (1983).

Nesse trabalho, para a visualização do material foi utilizada a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) nas secções das três resinas testadas.

Diferentes níveis de cor e contraste foram obtidos nas secções de embriões de galinha com essa coloração. A coloração nuclear foi notável nas secções obtidas em todos os métodos testados, exceto nos embriões pré-emblocados em ágar-gelatina. Segundo Bancroft e Layton (2019), variações na coloração podem ocorrer devido a fatores como fixação, variações nas etapas de processamento, espessura de corte e temperatura excessivamente alta na placa aquecida para distender os cortes. Nossos resultados apontam que o meio de incorporação é um fator relacionado ao processamento que também afeta as tonalidades da coloração e o contraste promovido pelos corantes histológicos.

Embora somente a historesina tenha proporcionado uma preparação tecidual satisfatória para uma análise morfológica detalhada de embriões de galinha com 72h de incubação, as três resinas testadas apresentam suas vantagens e desvantagens, dependendo do objetivo do estudo. Dessa forma, no momento da escolha do meio de incorporação é importante considerar fatores como a manutenção da estrutura do tecido, bem como a antigenicidade. O paraplast e o PEG são indicados para abordagens imunohistoquímicas, quando a preservação morfológica não é limitante, ou para avaliação histológica de estágios mais avançados de desenvolvimento, que são menos frágeis que os iniciais. Já as resinas de GMA favorecem a manutenção estrutural, permitindo também a execução de protocolos imunohistoquímicos (BAKO *et al.*, 2015).

Outra característica que difere entre as resinas é o tempo de processamento. O paraplast e o PEG apresentam tempos similares, enquanto o da historesina é mais elevado. Além do processamento, o protocolo de coloração de secções em resina de GMA é mais longo, pois o meio não é removido das secções, o que desacelera a penetração dos corantes (CERRI; SASSO-CERRI, 2003), porém, apresenta menos etapas, pois não são utilizados etanol e xilol.

Em termos de custo, os processamentos em paraplast e em PEG apresentam baixo custo e requerem equipamentos usuais de um laboratório de técnicas histológicas (estufa e/ou estação de emblocagem com dispensador de resina, cassetes, lâminas de aço, etc). Em contrapartida, o kit de historesina

tem custo elevado, assim como as navalhas, de tungstênio ou de vidro, que são necessárias para a microtomia (STIRLING; WOODS, 2019).

Este é o primeiro estudo a comparar esses três métodos de emblocagem para histologia de embriões de galinha em estágios iniciais. Nossos resultados podem, também, auxiliar o estudo histológico de outros tipos de materiais pequenos e frágeis, o que o torna ainda mais significativo. Apesar da avaliação histológica ser laboriosa, como foi observado nesse trabalho, destacamos a sua relevância na caracterização dos efeitos embriotóxicos de poluentes ambientais, pois as alterações morfológicas refletem alterações em níveis inferiores de organização biológica e norteiam futuras investigações sobre os mecanismos teratogênicos.

5. Conclusões

A historesina proporcionou os melhores resultados em embriões de galinha em estágios iniciais de desenvolvimento, combinando preservação morfológica, orientação precisa do tecido e contraste de coloração, apesar da microtomia difícil, custo e tempo de processamento maiores. Além disso, foram observados menos artefatos e maior detalhe celular quando comparados às amostras incorporadas em paraplast e PEG. Assim, nossos dados destacam o melhor método para obter uma avaliação histológica detalhada em estudos usando o embrião de galinha como modelo.

REFERÊNCIAS

- ALTURKISTANI, H. A.; TASHKANDI, F. M.; MOHAMMEDSALEH, Z. M. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. **Global Journal of Health Science**, v. 8, n. 3, p. 72-79, 2015.
- AUDINO, J. A.; MARIAN, J. E. A. R.; WANNINGER, A.; LOPES, S. G. B. C. Mantle margin morphogenesis in *Nodipecten nodosus* (Mollusca: Bivalvia): new insights into the development and the roles of bivalve pallial folds. **BMC Developmental Biology**, v. 15, n. 22, 2015.
- BAKO, P.; BASSIOUNI, M.; ECKHARD, A.; GERLINGER, I.; FRICK, C.; LÖWENHEIN, H.; MÜLLER, M. Methyl methacrylate embedding to study the morphology and immunohistochemistry of adult guinea pig and mouse cochleae. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 254, p. 86-93, 2015.
- BANCROFT, J. D.; LAYTON, C. The hematoxylin and eosin. In: SUVARNA, S.K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. (Eds). **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**, 8^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 126-138.
- BARBOSA, A. C. F., PACE, M. R., WITOVISK, L., ANGYALOSSY, V. A new method to obtain good anatomical slides of heterogeneous plant parts. **IAWA Journal**, v. 31, n. 4, p. 373-383, 2010.
- BARD, J. B. L.; ROSS, A. S. A. Improved method for making high-affinity sections of soft tissue embedded in polyethylene glycol (PEG): its use in screening monoclonal antibodies. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 34, n. 9, p. 1237-1241, 1986.
- BARROS, I. T.; CECCON, J. P.; GLINSKI, A.; LIEBEL, S.; GRÖTZNER, S. R.; RANDI, M. A. F.; BENEDITO, E.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; FILIPAK NETO, F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Environmental risk assessment in five rivers of Parana River basin, Southern Brazil, through biomarkers in *Astyanax* spp. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 19, p. 16228-16240, 2017.
- BASKIN, D. G., Fixation and Tissue Processing in Immunohistochemistry. In: McManus, L. M.; Mitchell, R. N (Eds). **Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms**. Amsterdam: Academic Press, 2014. p. 3797-3806.
- BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **The Atlas of Chick Development**, 3^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2014.
- BRITO, P.; ZAMA, U.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. New characteristics of the male reproductive system in the Meliponini bee, *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae): histological and physiological development during sexual maturation. **Apidologie**, v. 41, p. 203-215, 2010.
- BUZZEL, G. R. Double-embedding techniques for light microscope histology. **Stain Technology**, v. 50, n. 4, p. 285-287, 1975.

CERRI, D. G.; ARTHUR, C. M.; RODRIGUES, L. C.; FERMINO, M. L.; ROCHA, L. B.; STOWELL, S. R.; BARUFFI, M. D. Examination of Galectin Localization Using Confocal Microscopy. In: STOWELL, S.; CUMMINGS, R. (eds). Galectins. **Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**, vol 1207, p 343–354, 2014.

CERRI, P. S.; SASSO-CERRI, E. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. **Micron**, v. 34, n. 8, p. 365-372, 2003.

CHEN, C. Y.; HE, T.; MAO, X. L.; FRIIS, T. E.; QIN, R. H.; JIAN, Y. T. A novel xylene substitute for histotechnology and histochemistry. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 85, n. 4, p. 231-240, 2010.

CHENG, X.; LI, H.; YAN, Y.; WANG, G.; BERMAN, Z.; CHUAI, M.; YANG, X. Usage of Dexamethasone Increases the Risk of Cranial Neural Crest Dysplasia in the Chick Embryo. **Toxicological Sciences**, v. 158, n. 1, p. 36-47, 2017.

CIMA, F. Enzyme Histochemistry for Functional Histology in Invertebrates. In: PELLICCIARI, C.; BIGGIOGERA, M. (Eds). **Histochemistry of Single Molecules: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1560. New Jersey: Humana Press, 2017. p. 69-90.

COPPER, J. E.; BUDGEON, L. R.; FOUTZ, C. A.; VAN ROSSUM, D. B.; VANSELOW, D. J.; HUBLEY, M. J.; CLARK, D. P.; MANDRELL, D. T.; CHENG, K. C. Comparative analysis of fixation and embedding techniques for optimized histological preparation of zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 208, p. 38-46, 2018.

CULL, A. M. Mounting media and slide coatings. In: SUVARNA, S. K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. (Eds). **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**, 8^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 535-536.

DROST, H.-G.; JANITZA, P.; GROSSE, I.; QUINT, M. Cross-kingdom comparison of the developmental hourglass. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 45, p. 69-75, 2017.

FELDMAN, A. T.; WOLFE, D. Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. In: DAY, C. E. (Ed). **Histopathology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1180. New Jersey: Humana Press, 2014. p. 31-43.

FERREIRA, B. G.; TEIXEIRA, C. T.; ISAIAS, R. M. S. Efficiency of the Polyethylene-Glycol (PEG) Embedding Medium for Plant Histochemistry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 62, n. 8, p. 577-583, 2014.

FAIAZ, M.; MARTÍNEZ, L. C.; COSTA, M. S.; COSSOLIN, J. F. S.; PLATA-RUEDA, A.; GONÇALVES, W. G.; SANT'ANA, A. E. G.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, 2018.

GAO, K., GODKIN, J. D. A New Method for Transfer of Polyethylene Glycol-embedded Tissue Sections to Silanated Slides for Immunocytochemistry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 39, n. 4, p. 537-540, 1991.

GEMUSSE, S L.; FOLLE, N. M. T.; SOUZA, A. T. C.; AZEVEDO-LINHARES, M.; FILIPAK NETO, F.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; GARCIA, J. R. E.; ESQUIVEL, L.; SILVA, C. P.; CAMPOS, S. X.; MARTINS, C. C.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Micropollutants impair the survival of *Oreochromis niloticus* and threat local species from Iguaçu River, Southern of Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 83, 2021.

GHASSEMIFAR, R.; FRANZÉN, L. A double-embedding technique for thin tissue membranes. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 67, n. 6, p. 363-366, 1992.

GONZÁLEZ SANTANDER, R.; MARTÍNEZ CUADRADO, G.; GONZÁLEZ-SANTANDER MARTÍNEZ, M.; MONTEAGUDO, M.; MARTÍNEZ ALONSO, F. J.; TOLEDO LOBO, M. V. The Use of Different Fixatives and Hydrophilic Embedding Media (Historesin™ and Unicryl™) for the Study of Embryonic Tissues. **Microscopy Research and Technique**, v. 36, n. 3, p. 151-158, 1997.

HENNING, T. Polyethylene glycols (PEGs) and the pharmaceutical industry. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 1, n. 6, p. 57–59, 2002.

HU, H.; UESAKA, M.; GUO, S.; SHIMAI, K.; LU, T. -M.; FUJIMOTO, S.; ISHIKAWA, M.; LIU, S.; SASAGAWA, Y.; ZHANG, G.; KURATANI, S.; YU, J. -K.; KUSAKABE, T. G.; KHAITOVICH, P.; IRIE, N.; EXPANDE CONSORTIUM. Constrained vertebrate evolution by pleiotropic genes. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 11, p. 1722-1730, 2017.

IRIE, N.; KURATANI, S. The developmental hourglass model: a predictor of the basic body plan? **Development**, v. 141, n. 24, p. 4549-4555, 2014.

IUNES, R. S.; BRANCO, P. C.; AMARAL, J. B. Coleta e Processamento de Amostras. In: SIVIERO, F (Ed). **Biologia Celular. Bases Moleculares e Metodologia de Pesquisa**. São Paulo: Roca, 2013. p. 27-89.

JONES, M. V.; CALABRESI, P. A. Agar-gelatin for embedding tissues prior to paraffin processing. **BioTechniques**, v. 42, n. 5, p. 569-570, 2007.

KANNO, T. Y. N.; MELO, M. O.; BORGES, R. M.; VIECELI, F. M. Métodos e Protocolos em Biologia do Desenvolvimento. In: SIVIERO, F. (Ed). **Biologia Celular. Bases Moleculares e Metodologia de Pesquisa**. São Paulo: Roca, 2013. p. 445-472.

KIECKER, C. The chick embryo as a model for the effects of prenatal exposure to alcohol on craniofacial development. **Developmental Biology**, v. 415, n. 2, p. 314-325, 2016.

KIERNAN, J. A. **Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice**. Banbury: Scion Publishing, 2015.

KIERNAN, J. A. Strategies for Preventing Detachment of Sections from Glass Slides. **Microscopy Today**, v. 7, n. 6, p. 20-24, 1999.

KLOSEN, P.; MAESSEN, X.; AGUILAR, P. V. D. B. PEG Embedding for Immunocytochemistry: Application to the Analysis of Immunoreactivity Loss During Histological Processing. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 455-463, 1993.

KORN, M. J.; CRAMER, K. S. Windowing Chicken Eggs for Developmental Studies. **Journal of Visualized Experiments**, v. 8, e306, 2007.

KURTH, T.; WEICHE, S.; VORKEL, D.; KRETSCHMAR, S.; MENGE, A. Histology of Plastic Embedded Amphibian Embryos and Larvae. **Genesis**, v. 50, n. 3, p. 235-250, 2012.

LAI, M.; LÜ, B. Tissue Preparation for Microscopy and Histology. In: PAWLISZYN, J (Ed). **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**, vol. 3. Amsterdam: Academic Press, 2012. p. 53-93.

LEITÃO, C. A. E. Working Optimally with Serial Sections in Glycol Methacrylate Resin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, e18180103, 2018.

LI, Y.; LI, N.; YU, X.; HUANG, K.; ZHENG, T.; CHENG, X.; ZENG, S.; LIU, X. Hematoxylin and eosin staining of intact tissues via delipidation and ultrasound. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 12259, 2018.

LIU, J.; CAO, Q.; YUAN, J.; ZHANG, X.; YU, L.; SHI, H. Histological observation on unique phenotypes of malformation induced in *Xenopus tropicalis* larvae by tributyltin. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 24, n. 2, p. 195-202, 2012.

MATENAERS, C.; POPPER, B.; RIEGER, A.; WANKE, R.; BLUTKE, A. Practicable methods for histological section thickness measurement in quantitative stereological analyses. **PLoS One**, v. 13, n. 2, e0192879, 2018.

MCCLELLAND, K. S.; NG, E. T.; BOWLES, J. Agarose/gelatin immobilisation of tissues or embryo segments for orientated paraffin embedding and sectioning. **Differentiation**, v. 91, n. 4-5, p. 68-71, 2016.

MCMILLAN, D. B.; HARRIS, R. J. **An Atlas of Comparative Vertebrate Histology**. Amsterdam: Academic Press, 2018.

MILES, A. E. W.; LINDER, J. E. POLYETHYLENE GLYCOLS AS HISTOLOGICAL EMBEDDING MEDIA: WITH A NOTE ON THE DIMENSIONAL CHANGE OF TISSUE DURING EMBEDDING IN VARIOUS MEDIA. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v. 72, n. 4, 1952.

MOWERY, J.; CHESNER, J.; SPANGENBERGER, S.; HIXSON, D. C. Rapid low molecular weight polyethylene glycol embedding protocol for immunocytochemistry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1549-1552, 1989.

NAYAK, R. **Histopathology Techniques and Its Management**. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2018.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; GROTZNER, S. R.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; RIOS, F. S. Pré-microscopia. In: OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; REIS FILHO, H. S.; GRÖTZNER, S. R. (Eds). **Técnicas e Métodos para Utilização Prática em Microscopia** São Paulo: Santos, 2012. p. 41-64.

POWNALL, M. E.; SAHA, M. S. Histological observation of teratogenic phenotypes induced in frog embryo assays. **Methods in Molecular Biology**, v. 1797, p. 309-323, 2019.

RAHMAN, M. A.; BAOYINDELIGEER; IWASAWA, A.; YOSHIKAZI. Mechanism of chalaza formation in quail eggs. **Cell and tissue research**, v. 330, n. 3, p. 535-543, 2007.

RUBIO-VARGAS, D. A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FILIPAK NETO, F.; CORDEIRO, A. L.; CESTARI, M. M.; SOUZA, A. C.; MARTINS, C. C.; SILVA, C. P.; CAMPOS, S. X.; GARCIA, J. R. E.; PRODOCIMO, M. M. Exposure to pollutants present in Iguazu River Southern Brazil affect the health of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758): Assessment histological, genotoxic and biochemical. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 87, 103682, 2021.

SANTANA, M. S.; YAMAMOTO, F. Y.; SANDRINI-NETO, L.; FILIPAK NETO, F.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; PRODOCIMO, M. M. Diffuse sources of contamination in freshwater fish: Detecting effects through active biomonitoring and multi-biomarker approaches. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p. 173-181, 2018.

SANTOS, G. S.; PIANCINI, L. D.; TINCANI, F. H.; KLINGELFUS, T.; YAMAMOTO, F. Y.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; GUILOSKI, I. C.; ASSIS, H.; CESTARI, M. M. Liver Damage in Two Neotropical Fish Species from a Polluted Estuarine Area. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 13, n. 1, p. 39-50, 2018.

SHARIFF, S.; KALER, A. K. **Principles & Interpretation of Laboratory Practices in Surgical Pathology**. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2016.

SIDERIDOU, I. D.; ACHILIAS, D. S.; KARAVA, O. Reactivity of Benzoyl Peroxide/Amine System as an Initiator for the Free Radical Polymerization of Dental and Orthopaedic Dimethacrylate Monomers: Effect of the Amine and Monomer Chemical Structure. **Macromolecules**, v. 39, n. 6, p. 2072-2080, 2006.

SIDMAN, R. L.; MOTTLA, P. A.; FEDER, N. IMPROVED POLYESTER WAS EMBEDDING FOR HISTOLOGY. **Stain Technology**, v. 36, n. 5, 1961.

SINGHRAO, S. K.; NICHOLSON, K.; CREAN, S. Informed choices for challenging specimens when choosing methacrylate resin systems for histology. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 5, p. 576-585, 2012.

SLACK, J. M. W. Evolution and Development. **Essential developmental biology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2013. p. 419-439.

SMITH, P. J.; WARFIELD, J. L. Specimen handling and preparation for routine diagnostic histopathology. In: BURNETT, D.; CROCKER, J. (Eds). **The Science of Laboratory Diagnosis**, 2^a ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2005. p. 3-15.

SMITH, S. M.; FLENTKE, G. R.; GARIC, A. Avian Models in Teratology and Developmental Toxicology. **Methods in Molecular Biology**, v. 889, p. 85-103, 2012.

SMITHSON, K. G.; MACVICAR, B. A.; HATTON, G. I. Polyethylene glycol embedding: a technique compatible with immunocytochemistry, enzyme histochemistry, histofluorescence and intracellular staining. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 7, n. 1, p. 27-41, 1983.

SOUZA, T. L.; BRAGA, A. A.; LÓPEZ-GREGO, L. S.; NUNES, E. T. Functional morphology of the male reproductive system in *Callichirus major* (Crustacea: Decapoda: Axiidea): Evidence of oocytes in the gonad. **Acta Zoologica**, v. 99, n.1, 2018.

STIRLING, J. W.; WOODS, A. E. Resin (plastic) embedding for microscopy and tissue analysis. In: SUVARNA, S. K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. (Eds). **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**, 8^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 96-113.

SULLIVAN-BROWN, J.; BISHER, M. E.; BURDINE, R. D. Embedding, Serial Sectioning and Staining of Zebrafish Embryos Using JB-4TM Resin. **Nature Protocols**, v. 6, n. 1, p. 46-55, 2011.

WOLFE, D. Tissue Processing. In: SUVARNA, S. K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. (Eds). **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**, 8^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 73-83.

WOLOSEWICK, J. J. Polyethylene Glycon Embedding Protocol for Immunofluorescence Microscopy. **Methods in Enzymology**, v. 134, p. 580-591, 1986.

WOODRUFF, J. M.; GREENFIELD, S. A. Advantages of Glycol Methacrylate Embedding Systems for Light Microscopy. **Journal of Histotechnology**, v. 2, n. 4, p. 164-167, 1979.

YAN, Y.; WANG, G.; HUANG, J.; ZHANG, Y.; CHENG, X.; CHUAI, M.; BRAND-SABERI, B.; CHEN, G.; JIANG, X.; YANG, X. Zinc oxide nanoparticles exposure-induced oxidative stress restricts cranial neural crest development during chick embryogenesis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 194, 110415, 2020.

YEUNG, E. C.; CHAN, C. K. W. Glycol methacrylate: the art of embedding and serial sectioning. **Botany**, v. 93, n. 1, p. 1-8, 2015.

Capítulo II

Efeitos embriotóxicos do ácido perfluorooctanóico e cádmio em embriões de
Gallus gallus

RESUMO

A exposição de gestantes ao ácido perfluorooctanóico (PFOA) e cádmio (Cd) é preocupante, pois atravessam a barreira placentária podendo interferir no desenvolvimento embrionário do sistema nervoso, que é particularmente sensível à ação de xenobióticos. A exposição a esses contaminantes altera o desenvolvimento do tubo neural (TN), porém os mecanismos celulares envolvidos ainda não foram esclarecidos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do PFOA e Cd, isoladamente e em mistura, em única administração *in ovo* de concentrações realistas, no desenvolvimento do TN de embriões de *Gallus gallus*. A exposição dos embriões foi realizada injetando-se solução de contaminante ou veículo diretamente na câmara de ar, previamente à incubação. As concentrações utilizadas foram 0,5, 5 e 50 ng.ml⁻¹ de PFOA, 0,05, 0,5 e 5 µg.ml⁻¹ de Cd e uma mistura (PFOA 5 ng.ml⁻¹ + Cd 0,5 µg.ml⁻¹). Os embriões foram incubados por 2-6 dias, 8 ou 21 dias. Foram avaliadas a mortalidade embrionária, a ocorrência de malformações e as alterações histológicas envolvidas nas malformações causadas nos estádios HH14 e HH18, com foco no tubo neural. Análise de malformações após 21 dias em animais eclodidos e não eclodidos também foi realizada. Os embriões coletados foram processados em historesina e, posteriormente, corados em hematoxilina e eosina e ácido periódico de Schiff (PAS). Foi também realizada análise de redes e enriquecimento funcional a partir de genes selecionados em base de dados toxicogenômicos comparativos (CTD). Alterações significativas na mortalidade e ocorrência de malformações indicaram o efeito embriotóxico dos contaminantes no embrião de galinha e efeito de mistura na ocorrência de malformações gerais e no TN. As alterações teciduais encontradas no TN corroboram as alterações observadas em montagem total de embriões expostos ao Cd e PFOA nas mesmas concentrações, sendo elas: desorganização das vesículas encefálicas, TN aberto, presença de aglomerados celulares e/ou células apoptóticas na luz do tubo neural, células apoptóticas no neuroepitélio, alteração na forma do TN e aumento ou redução na espessura do neuroepitélio. A marcação com PAS evidenciou a membrana basal, principalmente da notocorda e TN, sendo que a intensidade média de marcação nas secções foi reduzida significativamente em relação ao controle, principalmente no HH18. Esses achados revelam a ação desses contaminantes a nível histológico, já em estágios iniciais, em exposição a concentrações realistas dos contaminantes, podendo os resultados serem extrapolados para a exposição humana. As alterações histológicas foram quantificadas utilizando um índice de lesão elaborado para embriões de galinha em estágios iniciais de desenvolvimento. A análise de redes e enriquecimento funcional aponta os possíveis mecanismos celulares da ocorrência das malformações e indica genes alvos no processo. Entre eles, destacam-se a interferência nos processos de apoptose e regulação do ciclo celular, nas vias Wnt, em moléculas de adesão e junções celulares, na dinâmica do citoesqueleto de actina e interação com receptores de matriz extracelular. Nos indivíduos eclodidos e não eclodidos, foram observadas alterações anatômicas compatíveis com as malformações encontradas nos embriões em estágios mais iniciais, evidenciando a progressão das alterações ao longo do desenvolvimento e sua apresentação ao final do desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: composto perfluorado; histologia; malformações; metal pesado; mortalidade; neurulação; redes de interação; tubo neural.

1. Introdução

Os humanos são constantemente expostos a misturas de compostos químicos provenientes de variadas fontes, o que reflete na diversidade de moléculas e concentrações presentes no sangue (CONSONNI; SINDACO; BERTAZZI, 2012; WANG *et al.*, 2018), leite materno (ANADÓN *et al.*, 2022) e outros tecidos (PÉREZ *et al.*, 2013). Por isso, existe uma preocupação crescente em relação ao potencial tóxico dessas substâncias no desenvolvimento pré e pós-natal, principalmente do sistema nervoso (FRITSCHÉ *et al.*, 2018). Além disso, a exposição durante o desenvolvimento é alarmante, pois aumenta o risco de doenças e complicações ao longo da vida (VAISERMAN, 2014).

O desenvolvimento do sistema nervoso tem início na neurulação, um processo morfogenético coordenado que culmina com a formação do tubo neural (TN) (GREENE; COPP, 2009). Em amniotos, a neurulação ocorre por dois mecanismos espaço temporalmente distintos, a neurulação primária (NP) e a secundária (NS) (COLAS; SCHOENWOLF, 2001). A NP acontece em quatro etapas que se sucedem a partir da região anterior e se sobrepõe ao longo do eixo rostrocaudal do embrião (LAWSON; SCHOENWOLF, 2009), sendo elas: 1) formação da placa neural, pelo espessamento da ectoderme; 2) modelagem da placa neural, com alongamento anteroposterior e estreitamento mediolateral; 3) dobramento da placa neural pela formação e convergência das pregas neurais; e 4) fusão das pregas neurais na linha média para fechar o TN (SCHOENWOLF, 2018). Ao término da NP, com o fechamento do neuróporo caudal, tem início o processo de NS, em que o TN é formado a partir de células mesenquimais da porção mais caudal do embrião. Inicialmente as células sofrem transição mesênquima-epitélio, formando um cordão de células, que, posteriormente sofre cavitação para formar o lúmen do TN secundário (CATALA, 2021).

Devido à complexidade e longo período para completar o seu desenvolvimento, o sistema nervoso é particularmente suscetível a alterações morfológicas e funcionais como consequência da exposição a xenobióticos, mesmo em baixas concentrações, que podem ter pouco ou nenhum efeito em indivíduos adultos (GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2014). Isso ocorre, pois

durante o processo de formação e especialização do TN, eventos celulares altamente regulados de proliferação, migração e diferenciação são necessários para que as diferentes estruturas se formem corretamente (COSTA *et al.*, 2004). Dessa forma, a exposição de gestantes a compostos químicos, como poluentes orgânicos persistentes (MATHIESEN *et al.*, 2021) e metais (STOJSAVLJEVIC *et al.*, 2022) é preocupante, pois muitos atravessam a barreira placentária e atingem o embrião/feto em desenvolvimento, podendo causar malformações e/ou alterações funcionais.

O ácido perfluorooctanóico (PFOA) é um poluente organopersistente emergente, pertencente à classe dos compostos perfluorados, cuja molécula tem natureza anfifílica e possui resistência à degradação térmica e química. Por essas razões, apresenta ampla aplicação na indústria (GLÜGE *et al.*, 2020) e na produção de itens de consumo (KOTTHOFF *et al.*, 2015; YE; ZUSHI; MASUNAGA, 2015). Está presente em espumas contra incêndio, inseticidas, produtos para tratamento antiaderente de superfícies, utensílios de cozinha e revestimentos de embalagens de alimentos, camadas impermeáveis em tecidos, couros e tapetes (BUCK *et al.*, 2011), componentes eletrônicos (WU *et al.*, 2012) e cosméticos (WHITEHEAD *et al.*, 2021). As fontes ambientais desse contaminante consistem de vias diretas, pela produção e uso do PFOA para fabricação de produtos, e indiretas pelo descarte dos resíduos e degradação de moléculas precursoras (DASU *et al.*, 2022). A disseminação do PFOA no ambiente leva à exposição humana pela ingestão de água e alimentos (PICÓ *et al.*, 2011; DOMINGO; NADAL, 2019) e, também, pela inalação da poeira doméstica (WINKENS *et al.*, 2018).

O cádmio (Cd) é um metal pesado cuja distribuição pelo ambiente ocorre por vulcanismo, erosão de solos e rochas e é ampliada pelas atividades humanas, como mineração, incineração de lixo e queima de combustíveis fósseis (RAHIMZADEH *et al.*, 2017). Além disso, o emprego desse metal em processos industriais (YUAN *et al.*, 2019), para produção de baterias, tintas, fertilizantes e componentes eletrônicos, gera resíduos e produtos contendo Cd, cujo uso e descarte incorreto também são fontes de contaminação ambiental (WHO, 2019). A exposição humana a esse metal ocorre principalmente através da dieta, pela ingestão de água e alimentos contaminados (STRUNGARU;

PLAVAN; NICOARA, 2016), e pela via respiratória, com o tabagismo (SHARIAT *et al.*, 2019) e inalação da poeira doméstica (MATT *et al.*, 2021).

Por serem capazes de ultrapassar a barreira placentária, estarem presentes no sangue do cordão umbilical humano (TANG *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2018) e se acumularem no feto (KABAMBA; TUAKUILA, 2020; BJÖRVANG *et al.*, 2021), o PFOA e Cd são potenciais fatores prejudiciais ao período pré-natal. Também já foram detectados simultaneamente no cordão umbilical (NEEDHAN *et al.*, 2011), compartilham vias de exposição e compõem as principais misturas de substâncias às quais gestantes estão expostas (LEE *et al.*, 2017; TRAORÉ *et al.*, 2018). Apesar da importância desses contaminantes, seus efeitos isolados durante o desenvolvimento humano são pouco estudados e há resultados divergentes sobre a relação da exposição pré-natal e efeitos adversos (STEENLAND *et al.*, 2020) como malformações (NOLAN *et al.*, 2010; STEIN *et al.*, 2014), natimortos (WU *et al.*, 2012), abortos (DARROW *et al.*, 2014; AMADI; IGWEZE; ORISAKWE, 2017; WIKSTRÖM *et al.*, 2021) e problemas no crescimento fetal (BARN *et al.*, 2019; SAVITZ *et al.*, 2012; WIKSTRÖM *et al.*, 2020). Em modelos animais há evidências dos efeitos da exposição ao PFOA e Cd isoladamente durante o período pré-natal, como a ocorrência de malformações, em anfíbios (KIM *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2017), peixes (HAGENAARS *et al.*, 2011; WITESKA *et al.*, 2014) e aves (YAMAMOTO *et al.*, 2012; KMECICK *et al.*, 2019). No embrião de ave *Gallus gallus* (galinha), as principais alterações morfológicas foram no TN na região cefálica, tronco e caudal, sendo que as mesmas malformações ocorreram na exposição à mistura de PFOA e Cd (KMECICK *et al.*, 2019). Entretanto, as alterações teciduais e os mecanismos celulares envolvidos nessas malformações não foram caracterizados e o efeito da mistura desses contaminantes ainda não é compreendido, pois não existem outros estudos com diferentes modelos animais avaliando o efeito do PFOA e Cd em exposição conjunta.

O embrião de ave *G. gallus* é um modelo interessante no estudo da embriotoxicologia, pois o seu desenvolvimento é molecular e morfológicamente semelhante ao de outros vertebrados (IRIE; KURATANI, 2011). Assim, ao extrapolar os níveis de exposição entre as espécies, através do cálculo alométrico (SHARMA; MCNEILL, 2009; DA COSTA *et al.*, 2021), é possível inferir, a partir dos efeitos em embriões de galinha, os potenciais efeitos em

humanos (KIECKER, 2016), principalmente no início da morfogênese, quando os embriões apresentam maior similaridade (WANG; WHITE, 2021).

Nesse contexto, o objetivo desse capítulo foi discutir a exposição ao PFOA e Cd, isoladamente e em mistura, sobre o desenvolvimento de embriões de ave *G. gallus* e seus efeitos sobre a mortalidade e morfologia embrionária, bem como caracterizar histologicamente as malformações observadas no tubo neural buscando por possíveis mecanismos celulares envolvidos nessas alterações. Além disso, objetivou-se elaborar um índice para avaliação histopatológica dos embriões e, através da busca em banco de dados toxicogenômicos, análise de rede e enriquecimento funcional, avaliar a interferência dos contaminantes em vias essenciais ao desenvolvimento embrionário. Já nos indivíduos eclodidos, visamos verificar a presença de alterações anatômicas.

2. Material e métodos

2.1. Modelo animal

Os ovos fertilizados de *Gallus gallus* foram fornecidos por duas empresas especializadas, uma localizada em Curitiba (PR), de onde os ovos foram comprados, e uma localizada na Lapa (PR), que forneceu os ovos por doação. No laboratório, os ovos foram selecionados e pesados. Os que apresentaram casca íntegra foram higienizados com papel toalha umedecido com etanol 70%.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA / BIO - UFPR, certificado nº 1098; <http://www.bio.ufpr.br/portal/ceua/>) (ANEXO 1).

2.2. Desenho experimental

Cada lote de ovos recebido foi utilizado para executar um experimento independente. Os ovos foram divididos e identificados de acordo com os grupos experimentais (QUADRO 1). As concentrações PFOA e Cd testadas foram utilizadas em trabalho anterior do Laboratório de Embriotoxicologia

(UFPR) e induziram alterações morfológicas em estruturas encefálicas e falha no fechamento do TN em embriões com 72 horas de incubação (KMECICK *et al.*, 2019).

QUADRO 1 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupos experimentais	Ovos
Controle	NaCl 0,9%
PFOA 0,5	PFOA 0,5 ng.ml ⁻¹
PFOA 5	PFOA 5 ng.ml ⁻¹
PFOA 50	PFOA 50 ng.ml ⁻¹
Cd 0,05	CdCl ₂ [Cd]* = 0,05 µg.ml ⁻¹
Cd 0,5	CdCl ₂ [Cd]* = 0,5 µg.ml ⁻¹
Cd 5	CdCl ₂ [Cd]* = 5 µg.ml ⁻¹
Mistura	PFOA 5 ng.ml ⁻¹ + Cd 0,5 µg.ml ⁻¹

*[Cd] se refere a concentração final de Cd na solução de CdCl₂ injetada. Fonte: A autora (2022).

As concentrações intermediárias (PFOA 5 e Cd 0,5) correspondem ao nível médio de PFOA (ZHANG *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2013; LIEN *et al.*, 2013; MANZANO-SALGADO *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2018) e Cd (SORKUN *et al.*, 2007; AL-SALEH, *et al.*, 2011; SAKAMOTO *et al.*, 2013; AL-SALEH *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2016) detectados na placenta humana, cordão umbilical, sangue materno e do recém-nascido. Essas concentrações foram determinadas a partir do cálculo de extrapolação alométrica, utilizando as taxas metabólicas basais para diferentes grupos animais (aves não passeriformes e mamíferos placentários) (KABAT *et al.*, 2008), conforme demonstrado no cálculo 1. A taxa metabólica basal de embriões humanos para o período entre a 3^a e 8^a semanas de desenvolvimento foi definida como a de referência e, portanto, a dosagem calculada é correspondente para embriões de galinha no mesmo período filotípico (DA COSTA *et al.*, 2021). As demais concentrações foram testadas a fim de avaliar os efeitos de concentrações superiores e inferiores às realistas, e verificar possíveis alterações a nível tecidual, não detectáveis na análise por montagem total (KURTH *et al.*, 2012). Além disso, foi testada também a mistura dos dois contaminantes nas suas concentrações intermediárias.

CÁLCULO 1 – EXTRAPOLAÇÃO ALOMÉTRICA INTERESPÉCIES

$$TMB_{ref} = k \times m^{0.75} = 70 \times 0.001^{0.75} = 0.394$$

$$TMB_{alvo} = k \times m^{0.75} = 78 \times 0.0000411^{0.75} = 0.04007$$

$$Dose_{ref} = \frac{Dose\ refer\ência\ total\ (mg)}{TMB_{ref}}$$

$$Dose_{alvo} = Dose_{ref} \times TMB_{alvo}$$

TMB – Taxa metabólica basal. k – Constante de grandes grupos taxionômicos, de acordo com os grupos de energia de Hainsworth: aves não passeriformes (k = 78) e mamíferos placentários (k = 70). m – massa corporal (kg). Total da dose de referência (mg) – média das doses encontradas em diferentes matrizes biológicas. Fonte: Kabat *et al.* (2008); Da Costa *et al.* (2021)

2.3. Método de exposição

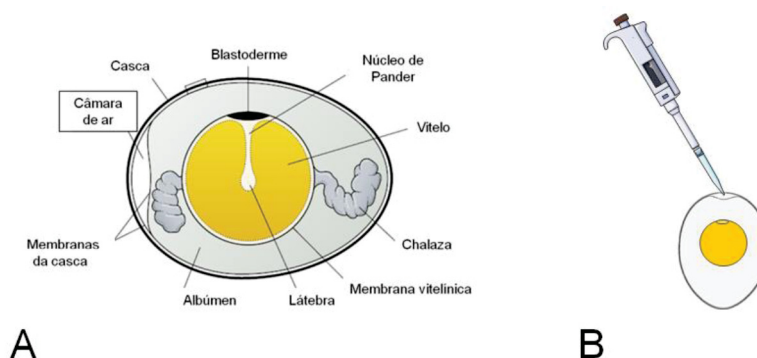
As soluções dos contaminantes utilizadas para a exposição foram preparadas diluindo-se o PFOA (Sigma-Aldrich) e o cloreto de cádmio (CdCl₂) (Sigma-Aldrich) em solução salina (NaCl 0,9%, pH 7,4).

Os embriões foram expostos aos contaminantes previamente à incubação e, portanto, na fase de blástula, também denominada de blastoderme ou blastodisco. No fluxo laminar, a casca foi perfurada com uma agulha e foi injetado, com micropipeta, um volume de acordo com o peso do ovo (QUADRO 2) de solução salina (NaCl 0,9%) ou do(s) contaminante(s) diretamente na câmara de ar (Figura 1 A-B), local que permite melhor dispersão do contaminante no embrião (YAMAMOTO *et al.*, 2012).

QUADRO 2 – VOLUME DE INJEÇÃO

Peso do ovo	Volume de injeção
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: A autora (2017).

FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO OVO DE *Gallus gallus*

A: Indicação de suas partes. FONTE: Modificado de Bellairs; Osmond (2014). B: Injeção das soluções na câmara de ar. FONTE: A autora (2017).

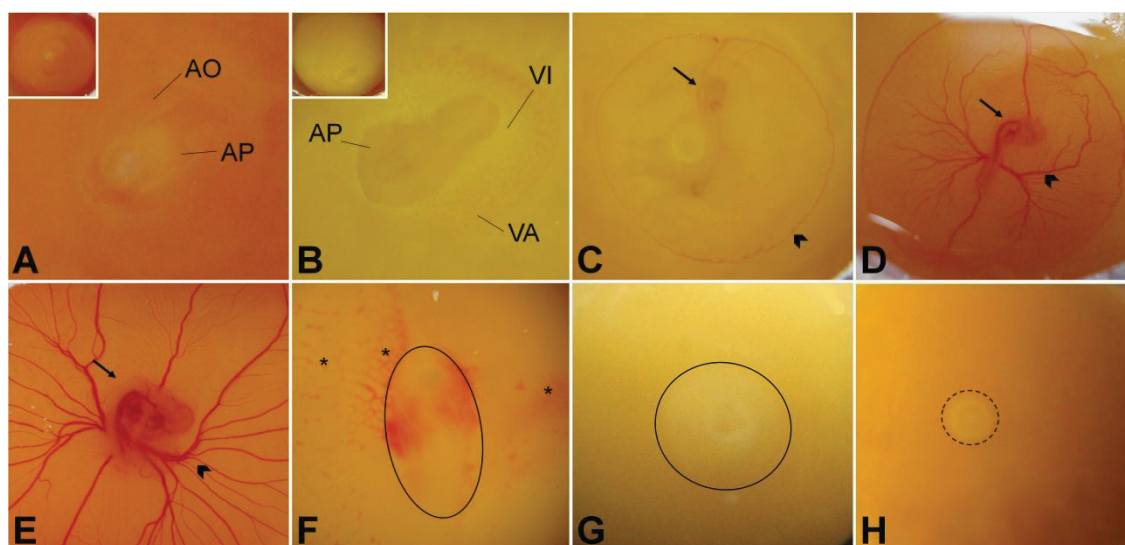
Após a injeção, os ovos foram selados com fita adesiva, posicionados verticalmente, com a câmara de ar voltada para cima, e dispostos randomicamente nas bandejas da incubadora BOD (SL-224, SOLAB Científica). A incubação foi a 38°C (\pm 0,5°C), com umidade e ventilação adequadas, pelos tempos de 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 21 dias.

2.4. Coleta dos embriões

Após o tempo de incubação determinado para obtenção dos estádios embrionários desejados e/ou avaliação dos parâmetros de mortalidade e ocorrência de malformações, os embriões foram coletados. Os ovos com até 4 dias de incubação foram abertos pelo método da janela para a coleta dos embriões (KORN; CRAMER, 2007). Já os incubados por mais de 5 dias foram retirados da incubadora e quebrados em placa de Petri. Após a abertura do ovo foi determinada a viabilidade dos embriões (FIGURA 2). Os mortos foram contabilizados para a taxa de mortalidade e descartados e os vivos coletados para as análises. Os embriões foram considerados vivos se apresentassem características compatíveis com o tempo de incubação, coloração rósea e vasos sanguíneos extraembrionários íntegros (FIGURA 2 A-E). Foram considerados mortos os embriões que apresentavam: coloração esbranquiçada, ausência de batimentos cardíacos e vasos sanguíneos extraembrionários não íntegros (FIGURA 2 F), ou disco embrionário mais desenvolvido que no momento da postura, com características de que o desenvolvimento foi retomado na incubação, porém foi interrompido antes da

abertura do ovo (FIGURA 2 G). Além disso, alguns embriões não foram considerados para a análise de mortalidade, pois foram classificados como não tendo o desenvolvimento retomado na incubação (FIGURA 2 H). Após a determinação da viabilidade dos embriões, o desenvolvimento foi interrompido e os embriões vivos coletados para as análises. Não foi utilizada anestesia, uma vez que antes do 10º dia de incubação não é necessária a utilização de fármaco anestésico (ALEKSANDROWICZ; HERR, 2015; CONCEA, 2015).

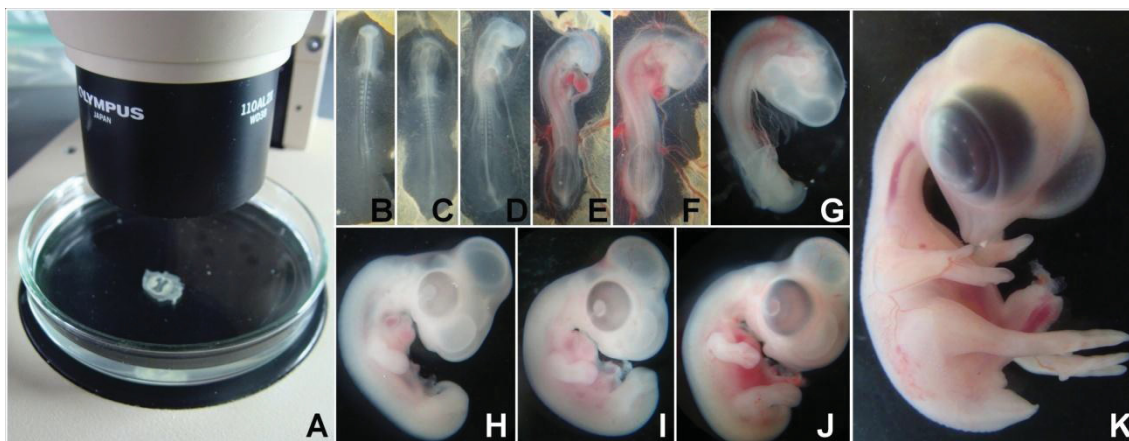
FIGURA 2 - VIABILIDADE EMBRIONÁRIA



A-E: Embrião vivo. A: 34 hrs. B: 48 hrs. C: 55 hrs. D: 72 hrs. E: 5 dias. F: Embrião morto aproximadamente no 3º dia de incubação. G: Embrião morto, não compatível com o tempo de incubação, 72 hrs. H: Embrião que não teve o desenvolvimento retomado durante a incubação. Área tracejada: Blastoderme. AO: Área opaca. AP: Área pelúcida. VI: Área vitelínica da área opaca. VA: Área vasculosa da área opaca. Seta: Embrião vivo. Cabeça de seta: Vasos sanguíneos extraembrionários íntegros. Asterisco: Vasos sanguíneos extraembrionários não íntegros. Área circulada: Embrião morto. FONTE: A autora (2018).

Os embriões viáveis foram transferidos para uma placa de Petri com salina tamponada com fosfato (PBS), e suas membranas extraembrionárias removidas. Então, foram analisados quanto à morfologia geral e o estágio embrionário foi determinado (FIGURA 3), sob estereomicroscópio (Olympus, SZ40), segundo a descrição de Hamburger e Hamilton (1951). Em seguida, foram fixados em paraformaldeído 2% (em PBS) por 72 horas, em placa de 24, 12 ou 6 poços (dependendo do tamanho do embrião), para posterior processamento histológico.

FIGURA 3 - ESTADIAMENTO EMBRIONÁRIO



A: Estadiamento em estereomicroscópio. B-K: Estádios do embrião de galinha segundo a classificação de Hamburger e Hamilton (1951). B: HH10. C: HH12. D: HH14. E: HH16. F: HH18. G: HH20. H: HH22. I: HH26. J: HH30. K: HH34. FONTE: A autora (2018).

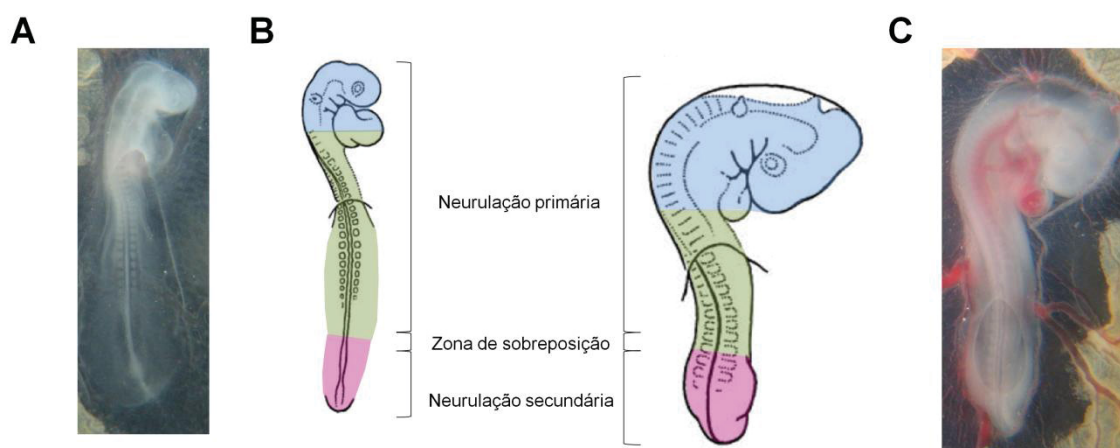
2.5. Estádios e regiões de interesse

Para as análises de mortalidade e malformações gerais foram utilizados embriões incubados por 2, 3, 4, 5, 6 e 8 dias. Todos os embriões vivos foram coletados (total = 1889), estadiados, fixados e armazenados para utilização nesta tese ou em outros trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Embriotoxicologia.

Nas análises histológicas e histoquímicas foram empregados embriões nos estádios HH14 e HH18 (FIGURA 4), visto que nesses estádios o TN primário se encontra fechado e a neurulação secundária está em curso. O estágio HH14 foi selecionado, pois nesse período a neurulação primária já se completou, com o fechamento do neuróporo caudal, e outros processos importantes para o desenvolvimento do sistema nervoso estão ocorrendo. Entre eles está a formação dos gânglios cranianos, que está sendo analisada em outro trabalho desenvolvido no Laboratório de Embriotoxicologia, e que permitirá uma correlação com os nossos resultados obtidos com o TN, complementando e trazendo informações importantes a respeito da neurotoxicidade do PFOA e Cd no desenvolvimento. Já o HH18 foi selecionado por ter sido o estágio onde ocorreram mais malformações nas análises por montagem total (KMECICK *et al.*, 2019) e que deram origem às perguntas que motivaram esse trabalho de tese. Além disso, ao comparar os dois estádios, é possível analisar a expansão das vesículas para formar o cérebro e demais estruturas encefálicas. Já nas regiões do tronco e caudal, observa-se o

desenvolvimento do tubo neural, que dará origem à medula. As regiões de interesse compreendem toda a extensão do embrião, pois foram observadas alterações morfológicas nas regiões cefálica, cervical, tronco e caudal (KMECICK *et al.*, 2019), em embriões com 72 h de incubação, e a análise do embrião como um todo direciona a avaliação em futuras análises, com imunomarcações, por exemplo, para proliferação celular e apoptose.

FIGURA 4 - ESTÁDIOS E REGIÕES DE INTERESSE



A: HH14. B: Representação esquemática dos estádios e regiões de interesse. C: HH18. Azul: Regiões cefálica e cervical. Verde: Região do tronco. Rosa: Região caudal. FONTE: A e C: A autora (2018); B: Modificado de Bellairs; Osmond (2014).

2.6. Processamento histológico dos embriões

O processamento dos embriões para emblocagem em historesina foi realizado baseado no protocolo de González Santander e colaboradores (1997), com adaptações. Foram processados 5 embriões por grupo experimental em cada um dos dois estádios de interesse, totalizando 80 embriões.

Preparo da Historesina

A solução de uso foi preparada segundo o manual do kit de historesina (Leica Biosystems), diluindo-se 5g do pó ativador (peróxido de dibenzoíla) em 50 ml de resina básica (hidroxietil metacrilato). Essa solução foi armazenada na geladeira.

Desidratação e infiltração

Em microplaca de 24 poços foi feita lavagem dos embriões em PBS por 2 horas. Em seguida, o material foi desidratado em série crescente de etanol (25, 50, 70, 80 e 100%). Então, os embriões foram imersos na solução de pré-infiltração (etanol 100% e historesina de uso, na proporção 1:1), por duas horas, e de infiltração (somente historesina de uso), por pelo menos 12 horas, ambas à temperatura ambiente.

Emblocagem

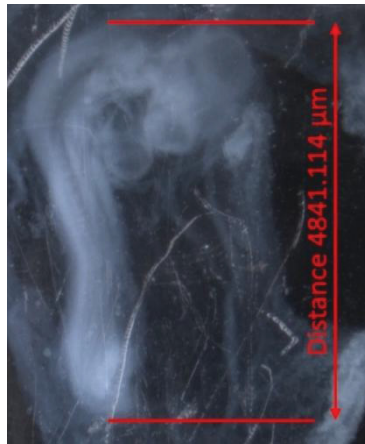
Após a infiltração, foi realizada a emblocagem em moldes plásticos, utilizando a solução de emblocagem (historesina de uso e endurecedor, na proporção 15:1). Sobre placa de gelo, foram adicionados 600 µl de solução de emblocagem nos moldes e os embriões foram orientados, com auxílio de pinça. Cada bloco recebeu uma etiqueta de identificação, que foi imersa na historesina. Para polimerização mais rápida, os blocos foram mantidos em dessecador a vácuo, com sílica, por, no mínimo, 48 horas.

Após a polimerização, os blocos foram retirados do dessecador e mantidos em estufa a 37°C, por 12 horas, para completa secagem da superfície.

Microtomia

Após secagem em estufa, os blocos foram retirados dos moldes e armazenados em frasco com sílica. Para a realização das secções histológicas, os blocos foram previamente fotografados em câmera (AxioCam 503, Zeiss) acoplada ao estereomicroscópio (Discovery.V12, Zeiss) e o tamanho dos embriões foi mensurado no *software* Zen pro 2.6 (Zeiss) (FIGURA 5). A partir dessa medição, foi calculado o número de cortes a serem desprezados em cada bloco, de modo a coletar cortes das diferentes regiões de interesse nesse estudo (Item 2.5).

FIGURA 5 - MENSURAÇÃO DO COMPRIMENTO DO EMBRIÃO

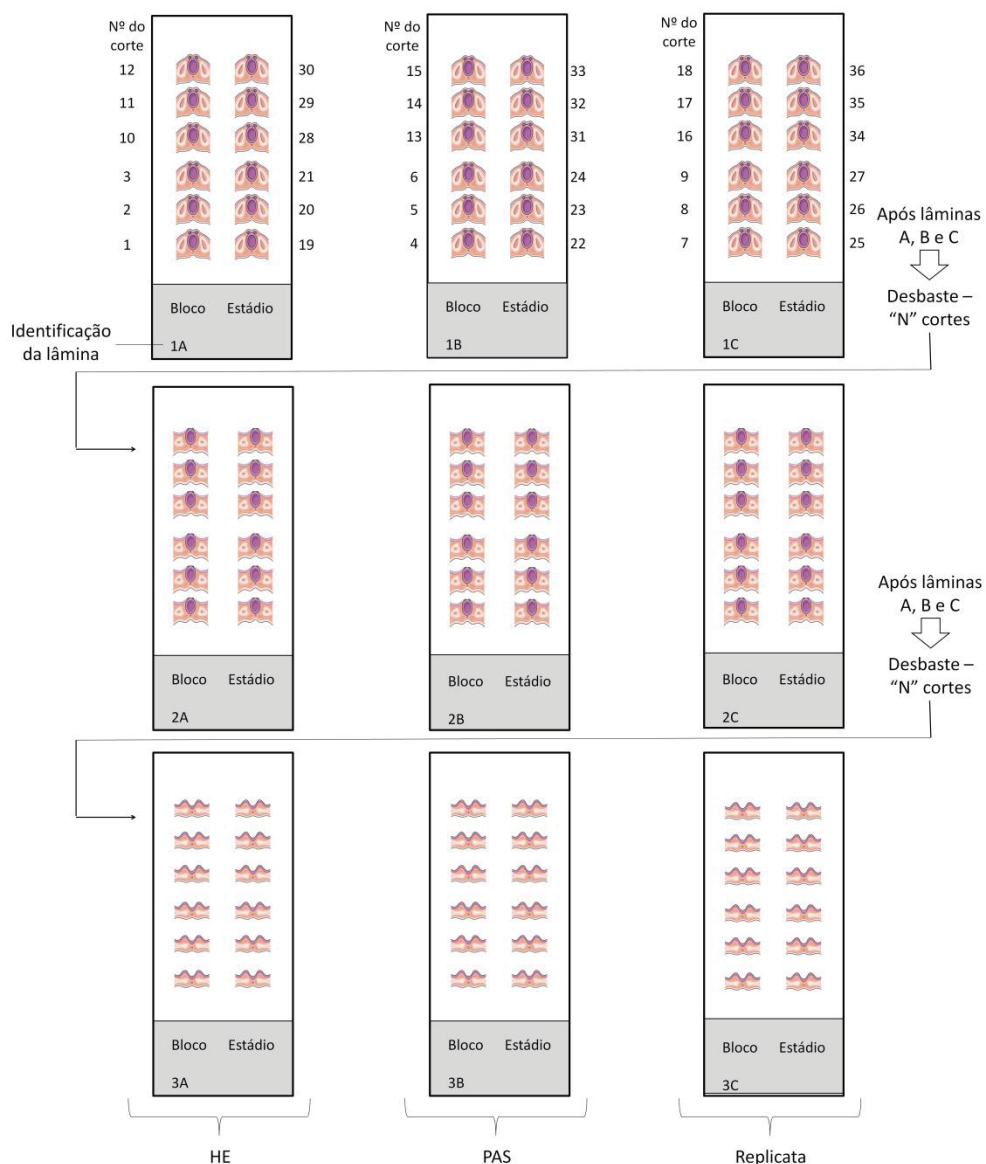


Mensuração do comprimento do embrião no bloco no software Zen pro 2.6 (Zeiss). FONTE: A autora (2019).

Para a microtomia dos blocos foi utilizado micrótomo semiautomático (Leica RM 2145) e navalhas de aço permanentes ou descartáveis próprias para resinas mais rígidas (Technovit® Histoblade). Os blocos foram desbastados até o material alcançar a face de corte. Para confirmar o início do material, algumas secções foram coradas com azul de toluidina. Uma vez confirmada a presença de material nos cortes, estes foram coletados, dispostos sobre gotas de água em lâminas de vidro e distendidos em placa aquecida. Após a secagem das lâminas, estas foram armazenadas até a coloração.

A partir de cada um dos 80 blocos foram confeccionadas 10 lâminas em triplicata (total de 30 lâminas por bloco), totalizando 2400 lâminas (FIGURA 6), abrangendo as três regiões de interesse, para coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e ácido periódico de Schiff (PAS), além de uma replicata caso fosse necessário repetir alguma coloração.

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISPOSIÇÃO DOS CORTES NAS LÂMINAS



Representação esquemática da disposição dos cortes nas lâminas. Os três primeiros cortes foram colocados sobre a lâmina 1A, os próximos três na 1B e os seguintes na 1C. Então, retornou-se para a lâmina 1A, sempre adicionando os cortes de três em três. Após finalizar as lâminas "1", foi realizado o desbaste de "n" cortes, de acordo com o tamanho do embrião, e o processo se repetiu até que todo o embrião fosse cortado. Foram obtidas 10 lâminas por embrião, em triplicata, para H&E, PAS e uma replicata. FONTE: A autora (2019).

Coloração de hematoxilina e eosina (H&E)

Nessa coloração foram preparadas 800 lâminas. As secções histológicas foram hidratadas em água destilada (3 minutos), coradas com hematoxilina de Harris (30 minutos), lavadas em água da torneira corrente (10 minutos) e água destilada (2 vezes, por imersão). Posteriormente, foram coradas com eosina aquosa 1% (12 minutos). Após a completa secagem, as lâminas foram cobertas com Entellan® (Merk) e lamínula.

Histoquímica com Ácido periódico de Schiff (PAS)

Com essa marcação histoquímica foram preparadas 800 lâminas. Primeiro, foi feita a desplastificação dos cortes em 3 etapas, no *shaker*: 1) metacrilato, por 2 horas; 2) xilol + clorofórmio 1:1, por 1 hora; 3) xilol por 30 minutos. Depois, as secções foram hidratadas em série decrescente de etanol (100, 95 e 90 %), para remover o xilol, e secas à temperatura ambiente. Após a secagem, foram hidratadas em água destilada e expostas ao ácido periódico 1%, por 2 horas. Posteriormente foram lavadas em água corrente (20 minutos), coradas com Reativo de Schiff (2 horas), lavadas em água da torneira (20 minutos), água destilada (2 vezes por imersão) e contracoradas com hematoxilina de Harris (15 minutos). Após a completa secagem, as lâminas foram cobertas com Entellan® (Merk) e lamínula.

2.7. Análise morfológica tecidual

Foram utilizados 5 embriões de cada estágio por grupo experimental, totalizando 80 embriões.

As lâminas foram analisadas sob microscópio de luz e documentadas utilizando o fotomicroscópio (Olympus BX40) do Laboratório de Ficologia, do departamento de Botânica da UFPR. As estruturas presentes nas secções histológicas foram identificadas com auxílio de diferentes atlas do desenvolvimento de embrião de galinha (SCHOENWOLF, 2001; SCHOENWOLF; MATHEWS, 2003; BELLAIRS; OSMOND, 2014).

Índice de lesão embrionária

Foram analisadas 10 lâminas por embrião, com a avaliação de pelo menos 4 secções por lâmina, totalizando 800 lâminas e 3200 secções analisadas. A partir da análise das lâminas, foi elaborado um índice, baseado no método desenvolvido para histopatologia de peixes por Bernet e colaboradores (1999), e adaptado por Boareto e colaboradores (2013) e Gomes (2016) para fetos de ratos e camundongos, respectivamente. O método foi adaptado para embriões de galinha em estágios iniciais de desenvolvimento, para representar o nível de gravidade das alterações morfológicas encontradas nos embriões, uma vez que não há na literatura uma metodologia de avaliação histopatológica de embriões no início do desenvolvimento. Para a obtenção do índice, foi considerada a morfologia de diversas estruturas presentes no organismo embrionário, a importância patológica das alterações observadas e a sua extensão (QUADRO 3). O índice de lesão embrionária (ILE) foi definido como a soma da multiplicação dos fatores de importância (F) das alterações encontradas pela sua extensão (e) em níveis axiais. Além disso, foi calculado o índice de alterações observadas no tubo neural.

QUADRO 3 – ÍNDICE DE LESÃO EMBRIONÁRIA PARA EMBRIÕES DE AVE EM ESTÁGIOS INICIAIS DE DESENVOLVIMENTO

Parâmetro	Descrição
Estruturas	Broto dos membros; coração e vasos sanguíneos; ectoderme; gânglios cranianos; mesoderme; notocorda; somitos; tubo digestório; túbulos e ductos mesonéfricos; tubo neural; vesículas ópticas e auditivas.
Extensão da alteração (E)	Quantidade de lâminas sequenciais em que a alteração é observada.
Fator de importância (F)	Indica a importância patológica da alteração e pode receber o valor 1, 2 ou 3. Onde: <u>Baixa</u> (F=1): Presença de células apoptóticas na estrutura; presença de células apoptóticas e/ou fragmentos celulares na luz da estrutura. <u>Moderada</u> (F=2): Alterações na forma (ex. tubo neural com mais de um lúmen em região de neurulação primária) e na arquitetura da estrutura (ex. massas anormais, desorganização, vacúolos, aumento ou redução de espessura e/ou tamanho, células se soltando). <u>Alta</u> (F=3): Formação incompleta (ex. tubo neural aberto) ou ausência da estrutura.
Índice de lesão embrionária (ILE)	$ILE = \sum(F \times e)$

FONTE: A autora (2022), baseado em Bernet e colaboradores (1999).

Histoquímica

Foi realizada uma análise semiquantitativa da marcação histoquímica com PAS. Para isso, foram obtidas 3 imagens de 3 cortes histológicos (total 9 imagens), no aumento de 40 vezes, de cada um dos 5 embriões dos 8 grupos experimentais nos dois estádios (HH14 e HH18), totalizando 720 imagens. Então, utilizando o *software* FIJI, foi avaliada a intensidade da coloração nas imagens capturadas, utilizando as ferramentas *color deconvolution*, *threshold adjust* e *measure*, segundo o protocolo descrito por Crowe e Yue (2019).

2.8. Análise estatística

Os dados de mortalidade, ocorrência de malformações e embriões com estádio indefinido foram analisados com o Teste Exato de Fisher. O índice de lesão e a intensidade média da marcação com PAS foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e, posteriormente, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para múltiplas comparações. Em todas as análises, os grupos expostos aos contaminantes isoladamente foram comparados com o grupo controle e com as demais concentrações do mesmo contaminante, para avaliar efeito concentração dependente. Já o grupo mistura foi comparado com os grupos expostos isoladamente às concentrações presentes na mistura. Para avaliar o efeito da exposição ao longo do tempo, foram também comparados os diferentes tempos de incubação em uma mesma concentração. Todos os dados foram analisados com o *software* GraphPad Prism 9.0 e o $p < 0,05$ foi considerado significativo.

2.9. Análise de redes de interação

Coleta de dados

Primeiramente, foi realizada uma busca no *Comparative Toxicogenomics Database* (CTD <http://ctdbase.org>) por dados de genes cuja expressão é afetada pela exposição ao Cd e ao PFOA. O módulo *VennViewer* (CTD) foi utilizado para avaliar a associação de genes e comparação de *data sets* para os compostos químicos PFOA e Cd, de maneira isolada e em conjunto.

Todas as interações resultantes da busca nesse banco de dados foram curadas e o grau de interação entre os compostos e os genes seguiu o *default* de pesquisa (aumenta, diminui ou afeta em graus inespecíficos). A lista de genes com interações em comum com o PFOA e o Cd na espécie *Gallus gallus* foi utilizada para as análises de redes de interação e enriquecimento funcional.

Enriquecimento funcional

O *input* dos genes foi adicionado ao *STRING*, utilizando o *software* Cytoscape v. 3.8.2, e a rede de interações foi construída com os seguintes parâmetros: espécie (*Gallus gallus*); *network type* (*full STRING network*);

confidence score cutoff (0.4) e *maximum additional interactors* (0). Em seguida, utilizando o *app* ClueGo v2.5.8, essa mesma lista foi adicionada como input para construir uma rede de interação e enriquecimento funcional entre vias, através do banco de dados KEGG *pathways* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). A busca dos termos associados com a lista de genes (*Gene Ontology* – GO) foi construída com uma especificidade média, com o mínimo de 5 genes por *cluster* e conectividade (*Kappa Score*) de 0.4. Apenas vias que foram significativamente enriquecidas utilizando o teste estatístico de *Enrichment/Depletion* (*Two-sided hypergeometric* teste) com correção do valor de p pelo teste de Bonferroni foram avaliadas. Além disso, apenas as vias consideradas representativas para os processos avaliados nesse estudo foram evidenciadas. As redes geradas foram organizadas de acordo com o método “*yFiles Organic*”.

2.10. Avaliação dos animais com 21 dias de incubação

Com essa análise objetivamos avaliar a presença de malformações em animais eclodidos e não eclodidos. Foram realizados três experimentos piloto para padronização das condições de incubação. No primeiro, somente ovos controle foram incubados, por 21 dias, sendo 15 controle fechado (sem injeção) e 15 com injeção de solução de NaCl 0,9% (veículo), totalizando 30 ovos. Nos dois seguintes foram incubados ovos controle veículo, além de injetados com PFOA e Cd, exceto com a mistura, sendo 6 ovos por grupo experimental, totalizando 96 ovos.

Até o terceiro dia de incubação, os ovos foram mantidos na posição vertical, com a câmara de ar voltada para cima. A partir de então, foram colocados na posição horizontal e o motor de viragem da incubadora foi ligado, girando os ovos a cada 20 minutos. No 19º dia de incubação, a viragem dos ovos foi interrompida para que os embriões pudessem se posicionar corretamente para o processo de bicagem na casca (FIGURA 7). Foi feita a ovoscopia (FIGURA 8 A-C) e os ovos não viáveis foram retirados da incubadora e abertos para determinar o dia aproximado da morte ou a não retomada do desenvolvimento.

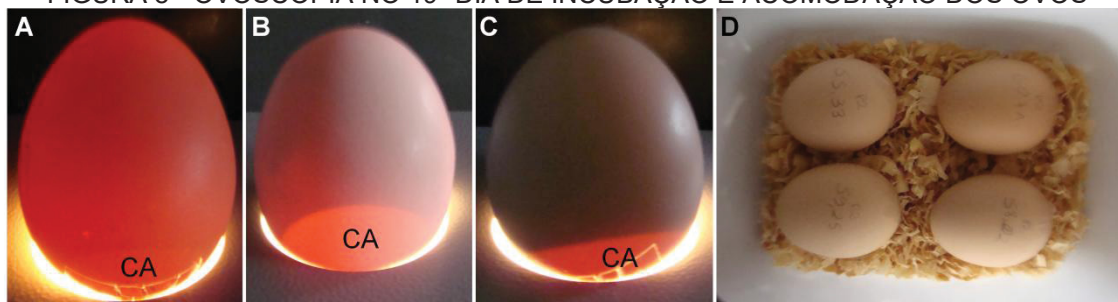
Foram considerados inviáveis os ovos que se apresentaram “claros” no momento da ovoscopia (FIGURA 8 A), ou com “mancha escura” incompatível com 19 dias de incubação (FIGURA 8 B). Foram considerados ovos viáveis os que estavam totalmente “escuros” (FIGURA 8 C), sendo possível a observação da câmara de ar como a única região “clara”. Após a ovoscopia, os ovos foram separados por grupo experimental e acomodados em recipientes para que os animais de grupos diferentes não se misturassem após a eclosão (FIGURA 8 D).

FIGURA 7 – POSIÇÃO NORMAL PARA ECLOSÃO



Região dorsal do embrião está paralela ao eixo mais comprido do ovo e o bico fica posicionado embaixo da asa direita. A ponta do bico fica direcionada para a câmara de ar, na extremidade arredondada do ovo. Dessa forma, a asa afasta a membrana na casca da face do embrião e proporciona mais liberdade de movimento ao bico. A asa também ajuda a esticar a membrana interna da casa e auxilia na perfuração dessa membrana pelo bico. Assim, o embrião consegue acesso à câmara de ar e inicia a respiração pulmonar. O embrião assume essa posição no 19º dia de incubação. FONTE: Ross Tech (2010).

FIGURA 8 - OVOSCOPIA NO 19º DIA DE INCUBAÇÃO E ACOMODAÇÃO DOS OVOS

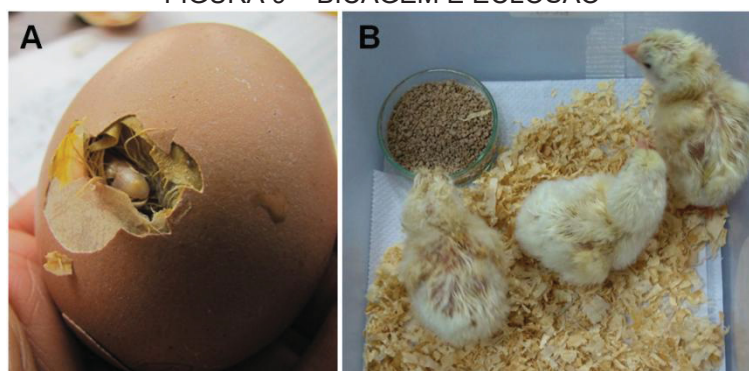


A: Ovo com embrião morto precocemente ou que não retomou o desenvolvimento. B: Ovo com embrião morto aproximadamente no 9º dia de incubação. C: Ovo com o embrião compatível com 19 dias de incubação. D: Ovos acomodados para eclosão. CA: câmara de ar. FONTE: A autora (2018).

Aproximadamente no 20º de incubação o embrião realiza a bicagem (FIGURA 9 A), que consiste em fazer pequena rachadura na casca do ovo com o seu *eggtooth*, uma estrutura presente no bico exclusiva para essa função. Esse processo requer muita energia, então após esta rachadura inicial ser feita, o embrião repousa por até 10 horas antes de continuar a quebrar a casca para

eclozir. Após a eclosão, os animais foram mantidos na incubadora até a completa secagem das penas (FIGURA 9 B). Após 3 dias da eclosão do último animal, se ainda houvesse ovos não eclodidos, esses foram tirados da incubadora e abertos, para determinar o dia aproximado da morte do embrião e analisar a anatomia externa, quando possível. Os animais que completaram 19 dias de desenvolvimento ou mais, foram fotografados e a anatomia e posicionamento embrionários foram avaliados.

FIGURA 9 – BICAGEM E ECLOSÃO

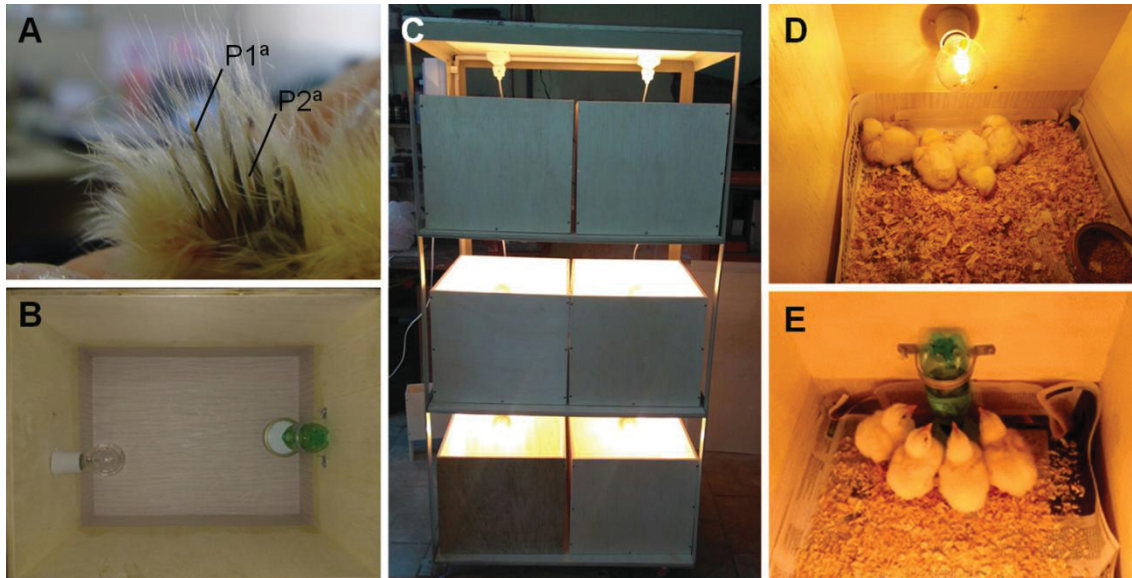


A: Bicagem da casca. B: Indivíduos eclodidos. FONTE: A autora (2018).

Os indivíduos que eclodiram foram pesados, identificados, o sexo foi determinado e a anatomia externa analisada. A sexagem foi realizada verificando-se o padrão de comprimento das camadas das penas nas asas (COBB-VANTRESS, 2008) (FIGURA 10 A). A análise anatômica dos animais foi realizada considerando as seguintes características: membros superiores e inferiores, face e fechamento adequado da parede torácica e abdominal. Posteriormente, os animais foram transferidos para uma caixa de madeira (caixa ninho) (FIGURA 10 B) com maravalha. As caixas foram confeccionadas especificamente para o Laboratório de Embriotoxicologia da UFPR, medindo 36x47x33 cm (CARVALHO *et al.*, 2008; MÜLLER *et al.*, 2008), bem como a estante (FIGURA 10 C) para acomodação das caixas, que contém tomadas e *dimmer* para regular a intensidade da luz. Cada caixa possui um cabo com plugue para tomada e um bocal para lâmpada. Uma lâmpada halógena de 70 W foi utilizada para garantir a temperatura na caixa (FIGURA 10 D). Durante o período de permanência na caixa-ninho, foi ofertada ração inicial para aves (Supra Inicial) e água *ad libitum* (FIGURA 10 E). Os animais foram mantidos no aviário do Setor de Ciências Biológicas por 8 dias para a realização de testes

comportamentais, não contemplados nessa tese. Após esse período, os animais foram anestesiados (isoflurano, \cong 5%) e eutanasiados por deslocamento cervical. Então, foram coletados o encéfalo, fígado, coração e sistema reprodutor para serem avaliados em outros estudos desenvolvidos no Laboratório de Embriotoxicologia.

FIGURA 10 - SEXAGEM E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS



A: Sexagem dos animais. Fêmea, penas secundárias (P2^a) mais curtas que as primárias (P1^a). B: Caixa-ninho com lâmpada e bebedouro. C: Estante para acomodação das caixas-ninho. D e E: Animais na caixa com lâmpada e ração e água *ad libitum*. FONTE: A autora (2018).

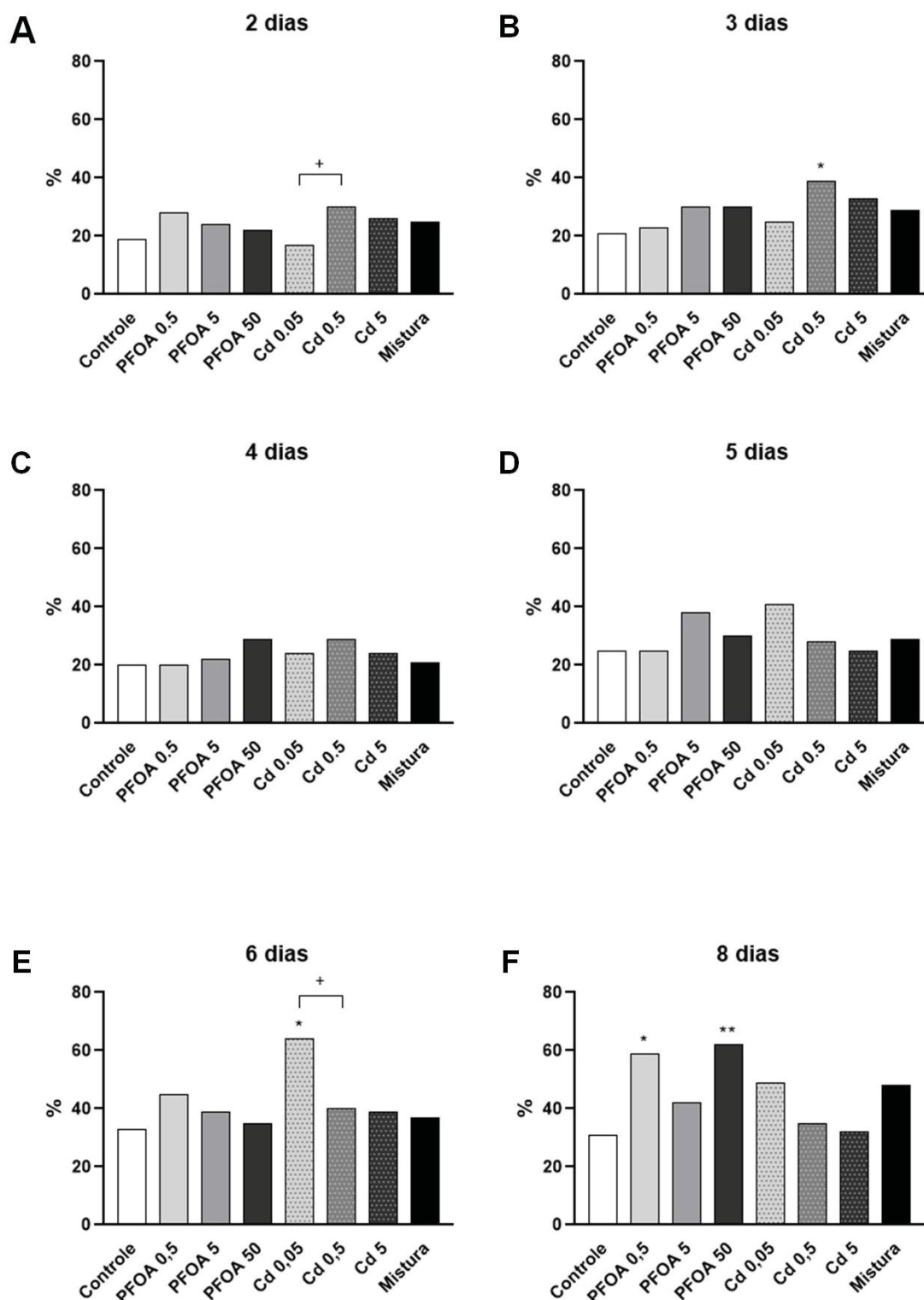
3. Resultados

3.1. Mortalidade

A ocorrência de mortalidade nos diferentes grupos experimentais por tempo de incubação está representada na FIGURA 11. A mortalidade embrionária no grupo controle foi de aproximadamente 20% do 2º ao 5º dia de incubação (FIGURA 11 A-D) e 30% no 6º e 8º (FIGURA 11 E-F). Aumento significativo na mortalidade foi observado no 3º dia de incubação, na concentração intermediária de Cd em relação ao controle (39%) (FIGURA 11 B), no 6º dia, na menor concentração de Cd (64%) (FIGURA 11 E), e no 8º dia, nas concentrações de 0,5 (59%) e 50 ng.ml⁻¹ de PFOA, quando atingiu 62% (FIGURA 11 F). Além disso, nas concentrações de 0,05 e 0,5 µg.ml⁻¹ de Cd, houve efeito concentração dependente, no 2º e 6º dias, com elevação e redução da mortalidade, respectivamente (FIGURAS 11 A e E). Também foi avaliada a mortalidade ao longo do tempo (FIGURA 12), porém não houve diferença significativa em relação aos tempos de incubação dentro de uma mesma concentração.

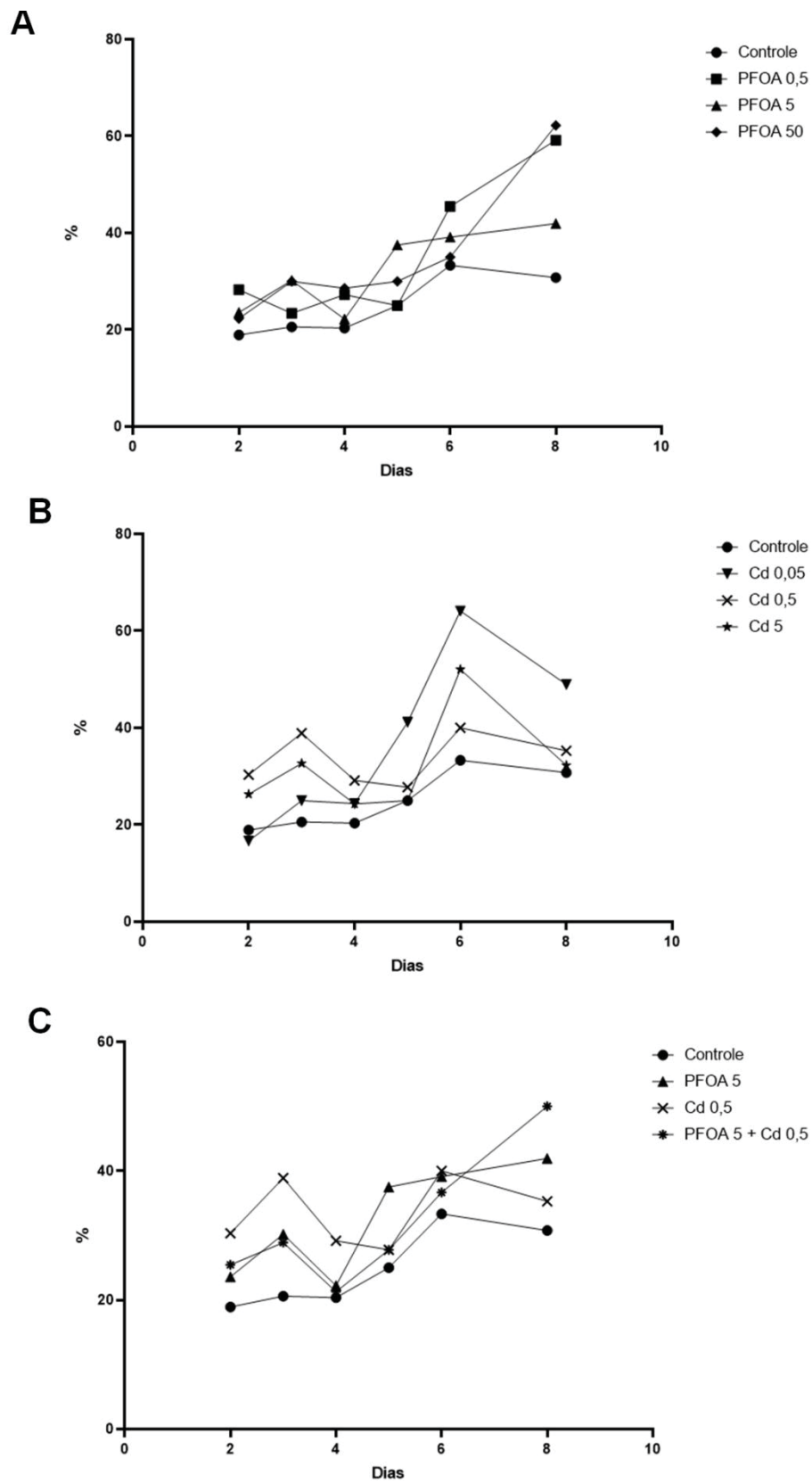
Os resultados de mortalidade estão resumidos na TABELA 1.

FIGURA 11 - MORTALIDADE EMBRIONÁRIA



Asteriscos (*) indicam diferença estatística em relação ao grupo controle: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Sinal positivo (+) indica efeito concentração dependente: + $p < 0.05$; Teste Exato de Fisher. Número mínimo de ovos por grupo = 20. FONTE: A autora (2022).

FIGURA 12 - MORTALIDADE EMBRIONÁRIA AO LONGO DO TEMPO



FONTE: A autora (2022).

TABELA 1 – RESUMO DOS RESULTADOS DE MORTALIDADE

Parâmetro analisado	Tempo (dias)	Controle	PFOA (ng.ml ⁻¹)			Cd (µg.ml ⁻¹)			PFOA + Cd 5 + 0,5
			0,5	5	50	0,05	0,5	5	
Mortalidade (%)	2	19	28	24	22	17 → 30	26	25	
	3	21	23	30	30	25	39	29	
	4	20	20	22	29	24	29	24	
	5	25	25	38	30	41	28	25	
	6	33	45	39	35	64 → 40	39	37	
	8	31	59	42	62	49	35	32	48

Sombreado vermelho: Aumento significativo em relação ao controle. Seta horizontal: Vermelha – aumento significativo em relação à concentração do mesmo contaminante; Verde: Redução significativa em relação à concentração do mesmo contaminante. FONTE: A autora (2022).

3.2. Ocorrência de malformações

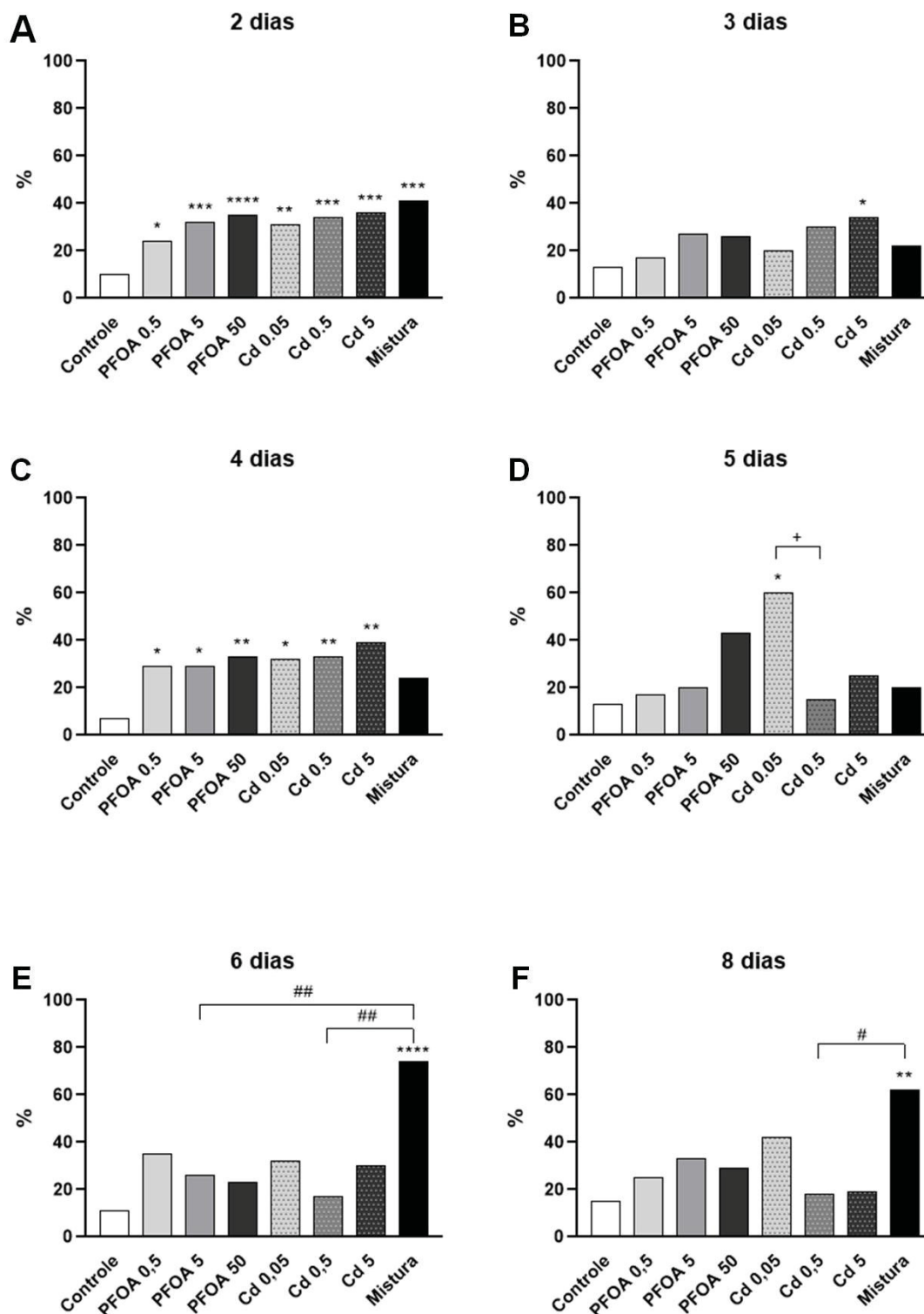
A ocorrência de alterações morfológicas teve resultado significativamente diferente do controle em todos os tempos de incubação testados, em pelo menos um dos grupos experimentais (FIGURA 13 A-F). No grupo controle, a porcentagem de embriões malformados variou de 7-15% ao longo do período avaliado. Os resultados mais expressivos ocorreram no 2° e 4° dias, porém não houve diferença entre os grupos expostos. No 2° dia, 24, 32 e 35% dos embriões expostos ao PFOA, nas concentrações de 0,5, 5 e 50 ng.ml^{-1} , respectivamente, apresentaram algum tipo de alteração na morfologia. Já nos grupos expostos ao Cd anormalidades morfológicas ocorreram em 31, 34 e 36%, nas concentrações de 0,05, 0,5 e 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, respectivamente. No grupo exposto à mistura de PFOA e Cd, a ocorrência de malformações foi de 41%, sendo significativamente maior que no controle, entretanto, não foi diferente dos grupos expostos às concentrações isoladas (FIGURA 13 A). Nos embriões expostos por 4 dias, houve aumento significativo nas malformações em todas as exposições isoladas, com 29% de embriões malformados no PFOA 0,5 e 5 ng.ml^{-1} , 33% no PFOA 50 ng.ml^{-1} e 32, 33, e 39% no Cd 0,05, 0,5 e 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, respectivamente (FIGURA 13 C).

No 6° e 8° dia, foi observado efeito de mistura, onde o grupo exposto ao PFOA e Cd foi estatisticamente diferente do controle e, também, da exposição isolada ao PFOA e Cd no 6°, e ao Cd no 8° dia (FIGURA 13 E-F). Já efeito concentração dependente houve somente no 5° dia com redução na porcentagem de embriões malformados no grupo exposto a 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ em relação à concentração de 0,05 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de Cd, de 60 para 15% (FIGURA 13 D).

Na variável tempo de exposição (FIGURA 14 A-C), ocorreu diferença significativa entre dias de incubação somente para os embriões expostos à mistura, entre os dias 5 e 6, quando houve um aumento na ocorrência de malformações, de 20 para 74% (FIGURA 14 C).

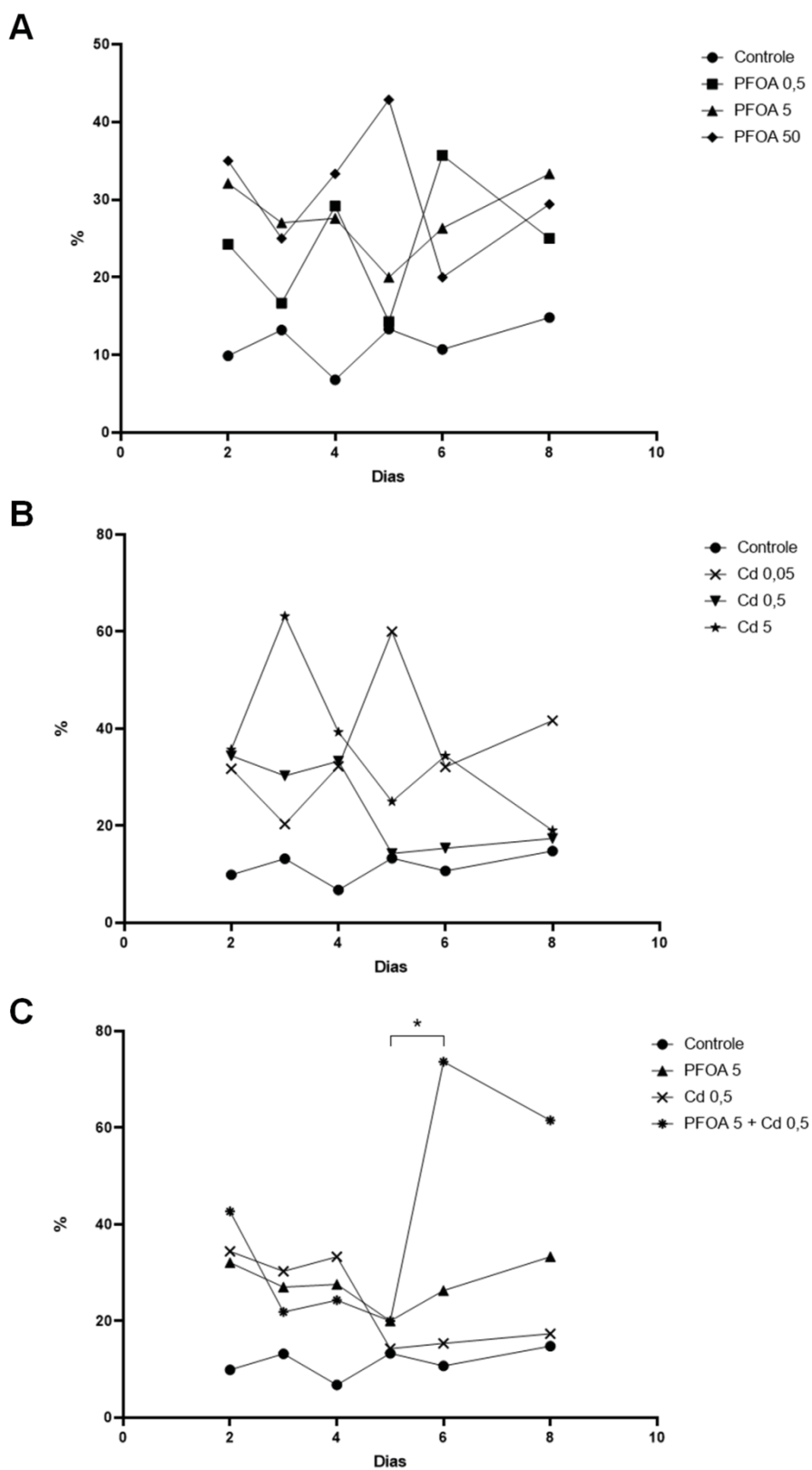
Os resultados da ocorrência de malformações gerais estão resumidos na TABELA 2.

FIGURA 13 - OCORRÊNCIA DE MALFORMAÇÕES GERAIS



Asteriscos (*) indicam diferença estatística em relação ao grupo controle: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Sinal positivo (+) indica efeito concentração dependente: + $p < 0.05$. Cerquilha (#) indica efeito de mistura: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$; Teste Exato de Fisher. Número mínimo de embriões por grupo = 8. FONTE: A autora (2022).

FIGURA 14 - OCORRÊNCIA DE MALFORMAÇÕES GERAIS AO LONGO DO TEMPO



Teste exato de Fisher. * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2022).

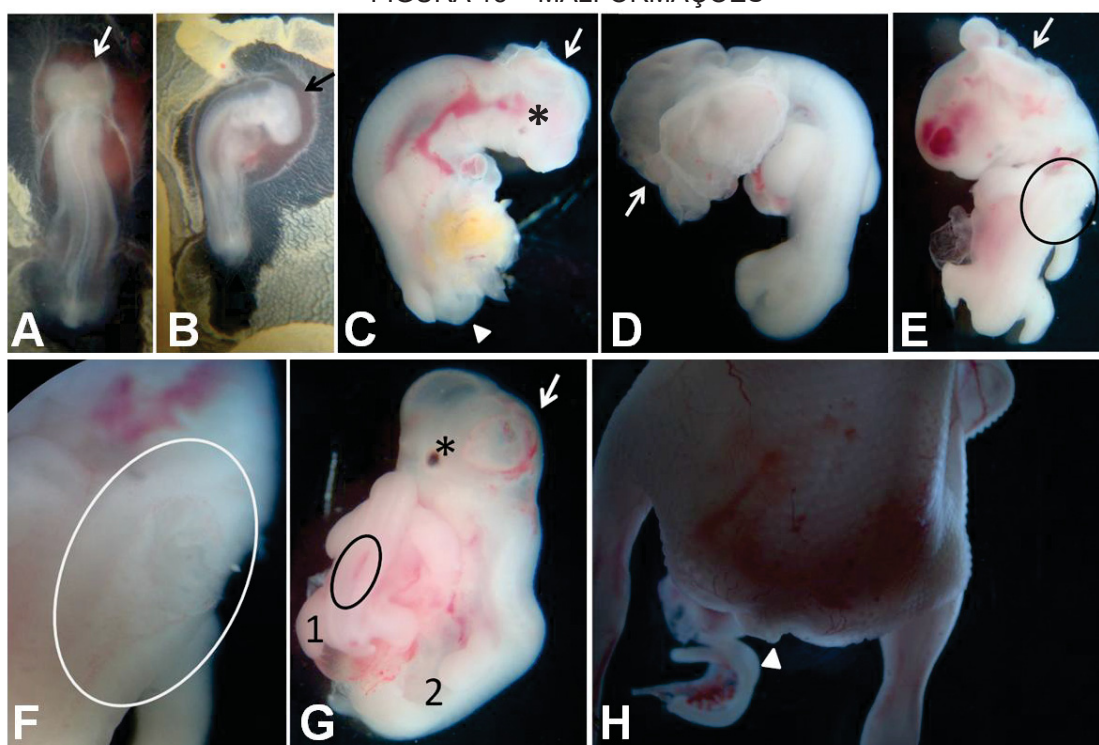
TABELA 2 – RESUMO DOS RESULTADOS DE OCORRÊNCIA DE MALFORMAÇÕES GERAIS

Parâmetro analisado	Tempo (dias)	Controle	PFOA (ng.ml ⁻¹)			Cd (µg.ml ⁻¹)			PFOA + Cd
			0,5	5	50	0,05	0,5	5	5 + 0,5
Malformações gerais	2	10	24	32	35	31	34	36	41
	3	13	17	27	26	20	30	34	22
	4	7	29	29	33	32	33	39	24
	5	13	17	20	43	60	15	25	20
	6	33	45	39	35	64	40	39	74 (↑ PFOA ↑ Cd)
	8	15	25	33	29	42	18	19	62 (↑ Cd)

Sombreado vermelho: Aumento significativo em relação ao controle. Seta horizontal verde: Redução significativa em relação à concentração do mesmo contaminante. Na coluna do grupo PFOA+Cd, a seta vertical seguida do nome do contaminante representa aumento significativo em relação à exposição isolada. FONTE: A autora (2022).

Malformações foram encontradas por todo o embrião. Na região cefálica, foram observadas vesículas encefálicas abertas (FIGURA 15 A, C, D e E), falhas na subdivisão das vesículas e/ou tamanho reduzido (FIGURA 15 B, C e G) e microftalmia (FIGURA 15 C e G). Na região do tronco ocorreu TN aberto (FIGURA 15 E-G) e presença de corpo duplicado (FIGURA 15 G). Já na região caudal foram observados encurtamento (FIGURA 15 B) e ausência da cauda (FIGURA 15 C e H).

FIGURA 15 – MALFORMAÇÕES



Malformações observadas nos embriões expostos: A: Cd 5 µg.ml⁻¹ (3 dias). B: PFOA 0,5 ng.ml⁻¹ (3 dias). C: PFOA 5 ng.ml⁻¹ (4 dias). D: PFOA 5 ng.ml⁻¹ (5 dias). E: PFOA 50 ng.ml⁻¹ (5 dias). F: Aumento de E. G: PFOA 5 ng.ml⁻¹ (5 dias). H: PFOA 0,5 ng.ml⁻¹ (9 dias). Seta (preta e branca): Região cefálica alterada. Área circulada: Tubo neural aberto. Cabeça de seta branca: Região caudal malformada, ausência da cauda. Cabeça de seta preta: Região caudal encurtada. Asterisco: Microftalmia. 1 e 2: Duas regiões do tronco e caudal em um embrião. FONTE: A autora (2018).

As alterações de interesse nesse estudo e também as que ocorreram com mais frequência nos embriões expostos foram aquelas relacionadas ao processo de neurulação. Dessa forma, focamos nossas análises nas alterações encontradas no TN na região cefálica (FIGURA 16), do tronco e caudal (FIGURA 17).

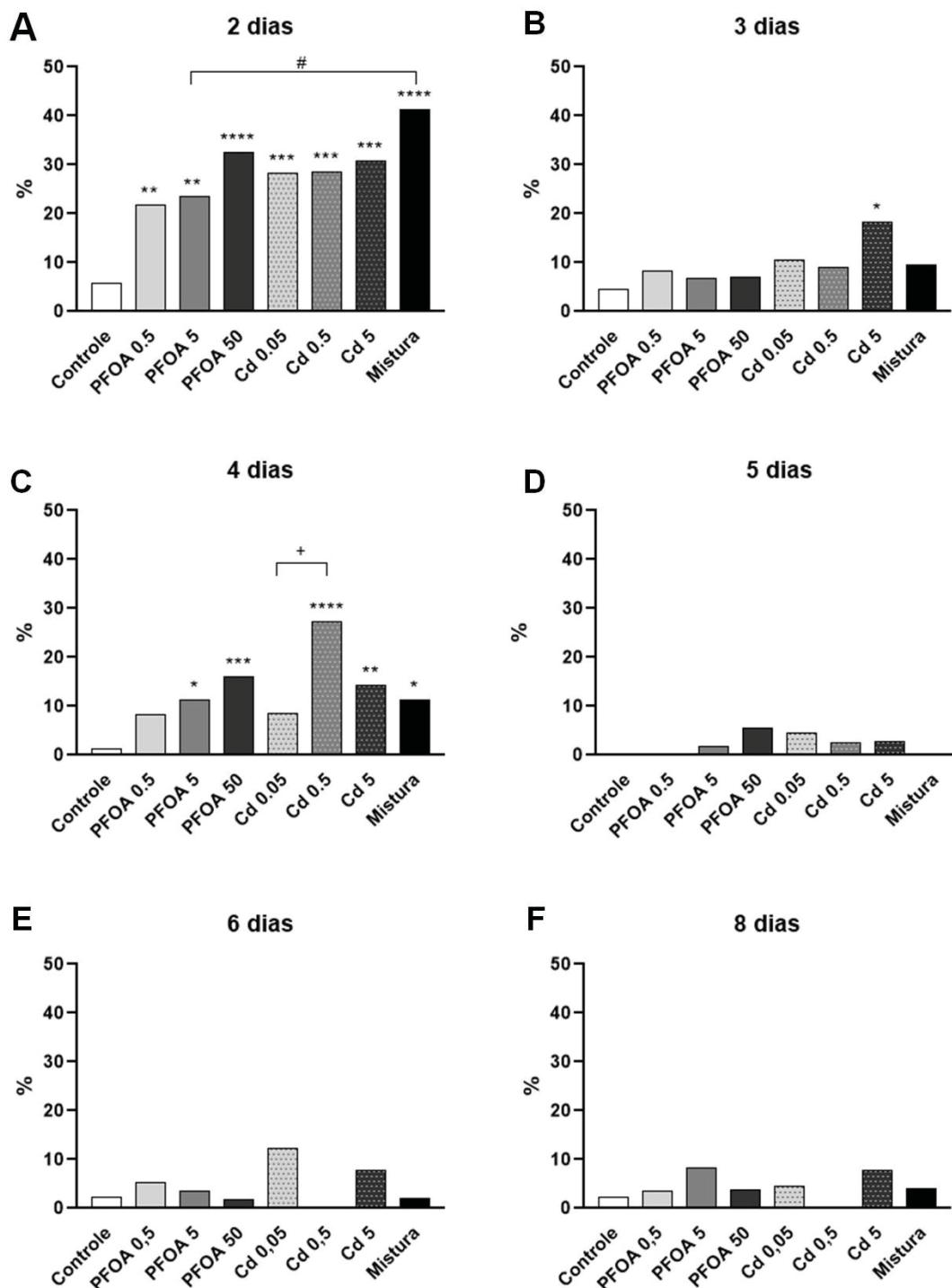
A ocorrência de malformações no TN, tanto na região cefálica (FIGURA 16 A) quanto na do tronco e caudal (FIGURA 17 A), foi significativamente maior em todos os grupos de embriões expostos por 2 dias. Na região cefálica também foi observado efeito de mistura no 2º dia, com o grupo exposto ao PFOA e Cd sendo estatisticamente distinto do exposto ao PFOA 5 ng.ml⁻¹. No 3º dia de incubação, houve aumento na porcentagem de embriões que apresentaram alterações no TN na região cefálica na maior concentração de Cd (5 µg.ml⁻¹) (FIGURA 16 B), enquanto que na região do tronco e caudal esse aumento foi significativo na menor concentração de PFOA (5 ng.ml⁻¹) e em todas as de Cd (FIGURA 17 B). No 4º dia, a porcentagem de embriões com malformações no TN na região cefálica foi maior que no controle nas maiores concentrações de PFOA (5 e 50 ng.ml⁻¹) e Cd (0,5 e 5 µg.ml⁻¹) e também na mistura (FIGURA 16 C). Além disso, houve efeito dependente da concentração na exposição ao Cd. Ainda, aos 4 dias de incubação, a ocorrência de alterações no TN da região do tronco e caudal foi significativamente maior na concentração mais elevada de PFOA (50 ng.ml⁻¹), bem como na média e maior de Cd (0,5 e 5 µg.ml⁻¹). No 5º dia, alterações no TN na região do tronco e caudal ocorreram na menor concentração de Cd. Nos demais dias analisados, não foram observadas alterações estatisticamente significativas em relação ao controle nessas regiões.

As alterações encontradas nos embriões expostos, principalmente as mais graves na região cefálica, muitas vezes comprometiam a determinação correta do estágio embrionário, pois, nos primeiros dias de desenvolvimento, as características dessa região são cruciais para a classificação em estádios. Dessa forma, aqueles embriões em que as alterações morfológicas impediram a determinação do estágio, foram denominados como embriões com estágio indefinido (FIGURA 18). A ocorrência desses embriões foi mais frequente no 2º, 3º e 4º dias de incubação, sendo significativa em todos os grupos

experimentais aos 2 dias, na concentração de Cd $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e na mistura no 3° dia, e apenas na concentração de Cd $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ no 4° dia.

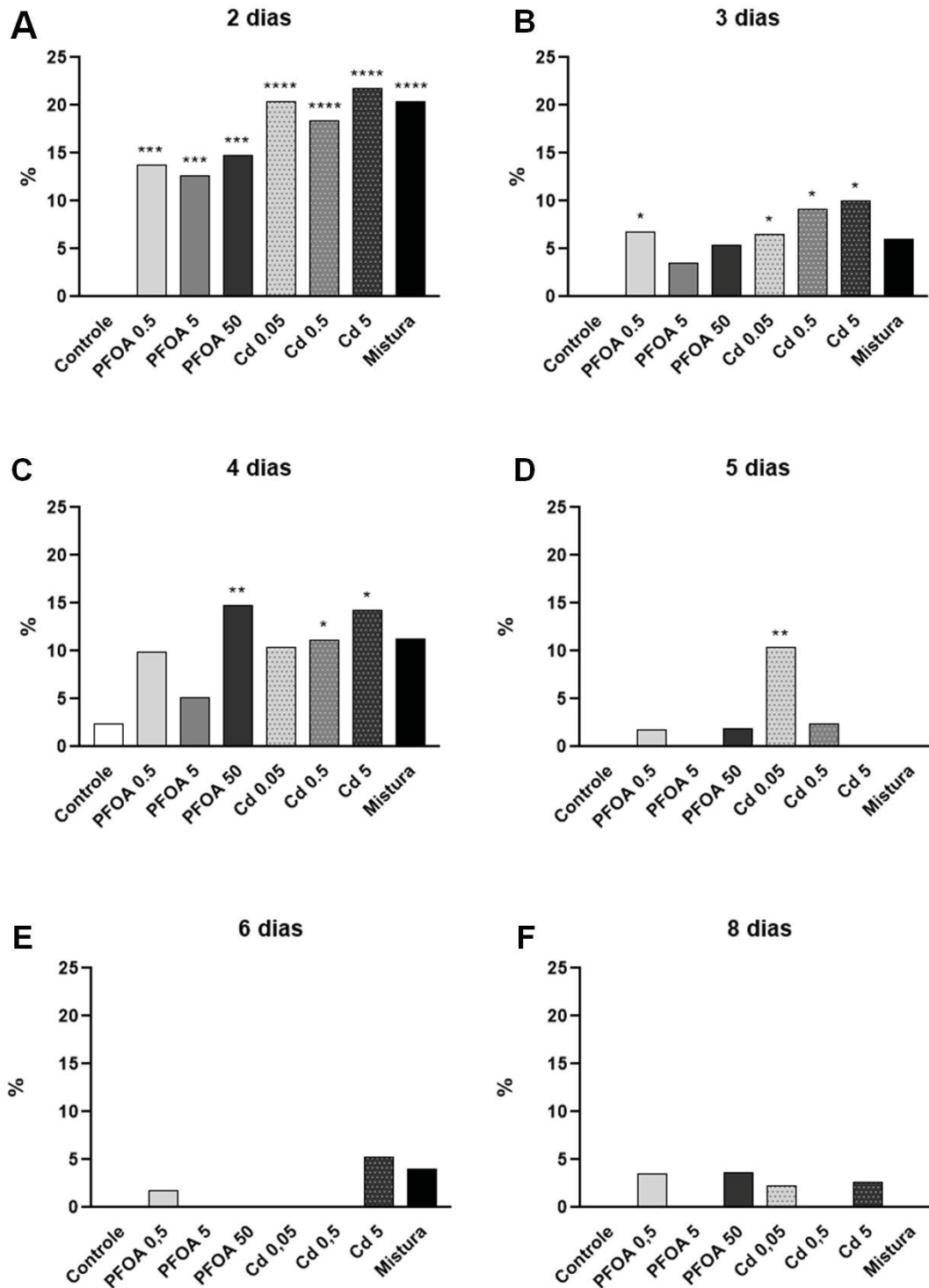
Os resultados da ocorrência de malformações no tubo neural estão resumidos na TABELA 3.

FIGURA 16 – OCORRÊNCIA DE MALFORMAÇÕES NO TUBO NEURAL NA REGIÃO CEFÁLICA



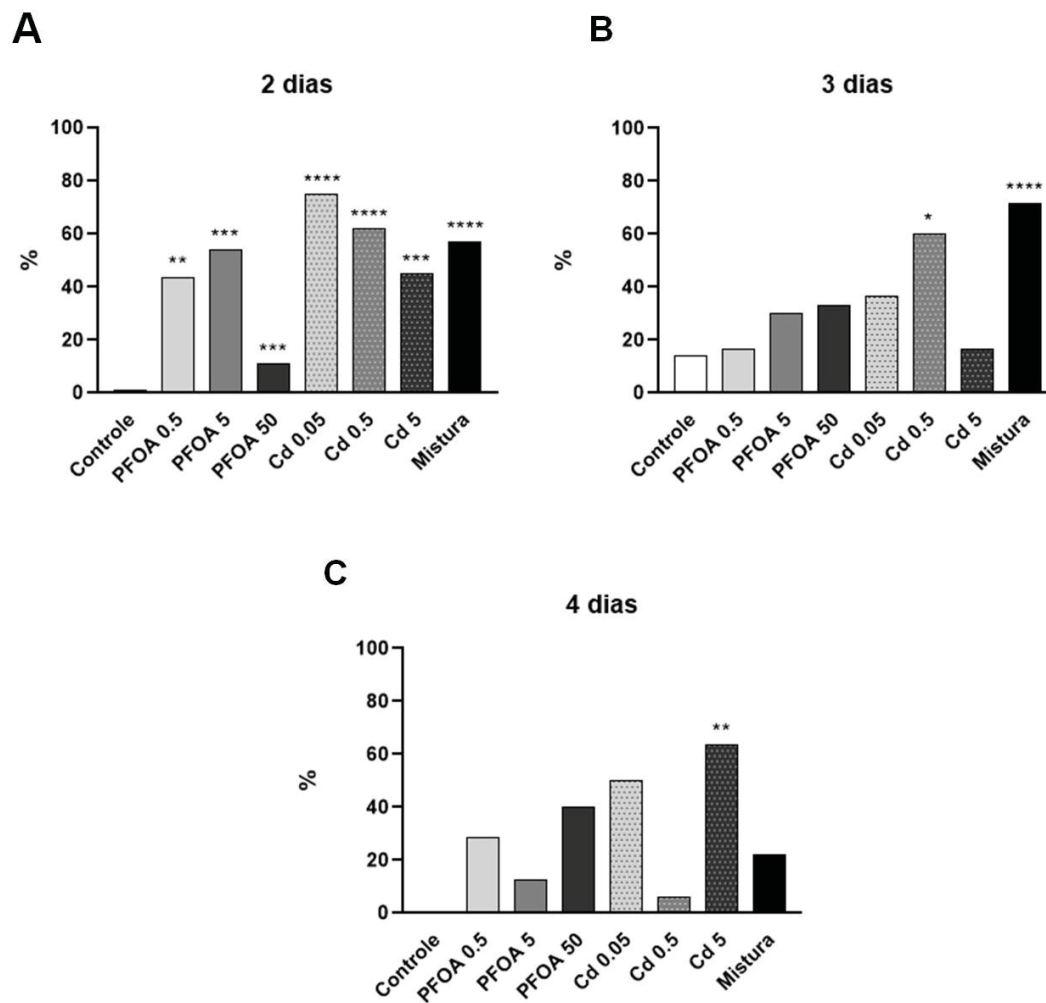
Asteriscos (*) indicam diferença estatística em relação ao grupo controle: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Sinal positivo (+) indica efeito concentração dependente: + $p < 0,05$. Cerquilha (#) indica efeito de mistura: # $p < 0,05$, # $p < 0,01$; Teste Exato de Fisher. Número mínimo de embriões por grupo = 8. FONTE: A autora (2022).

FIGURA 17 - OCORRÊNCIA DE MALFORMAÇÕES NO TUBO NEURAL NAS REGIÕES DO TRONCO E CAUDAL



Asteriscos (*) indicam diferença estatística em relação ao grupo controle: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; Teste Exato de Fisher. Número mínimo de embriões por grupo = 8.
 FONTE: A autora (2022).

FIGURA 18 - PORCENTAGEM DE EMBRIÕES COM ESTÁDIO INDEFINIDO



Asteriscos (*) indicam diferença estatística em relação ao grupo controle: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; Teste Exato de Fisher Número mínimo de embriões por grupo = 8.
 FONTE: A autora (2022).

TABELA 3 – RESUMO DOS RESULTADOS DE OCORRÊNCIA DE MALFORMAÇÕES NO TUBO NEURAL E EMBRIÕES COM ESTÁDIO INDEFINIDO

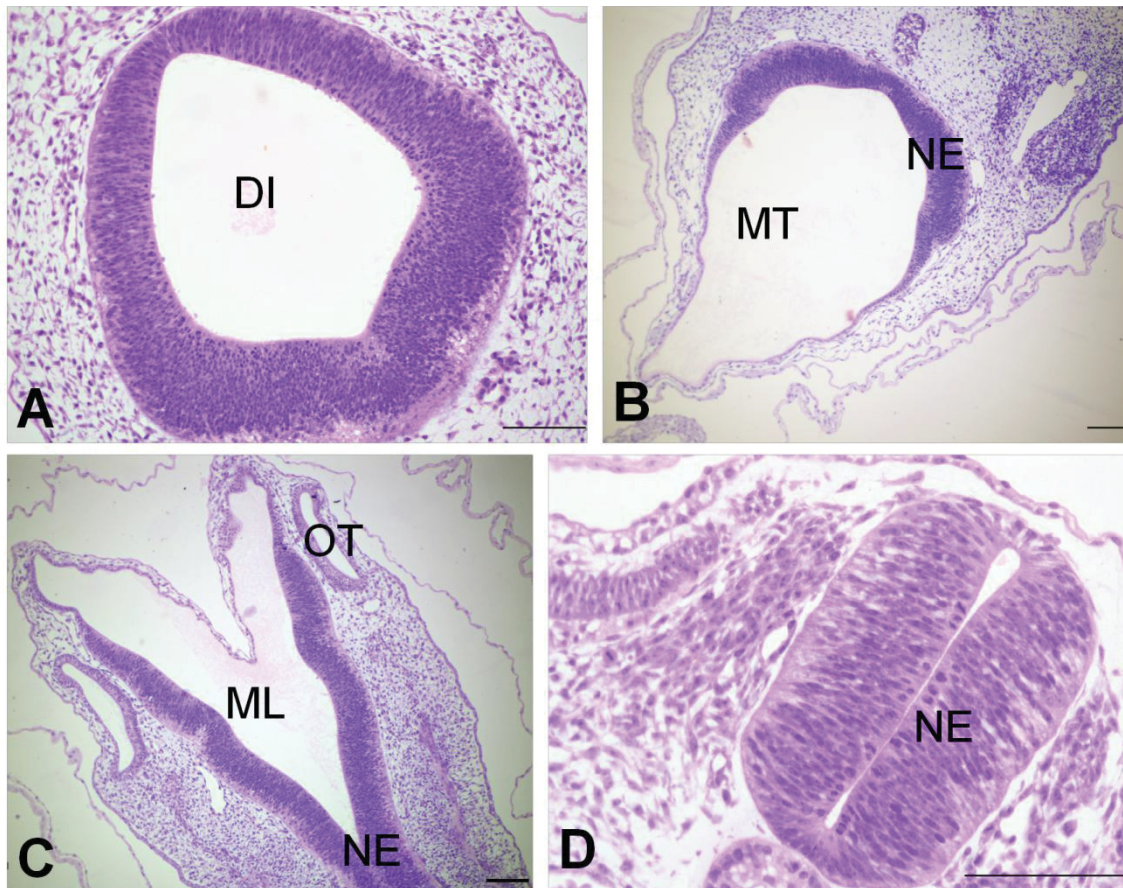
Parâmetro analisado	Tempo (dias)	Controle	PFOA (ng.ml ⁻¹)			Cd (µg.ml ⁻¹)			PFOA + Cd 5 + 0,5
			0,5	5	50	0,05	0,5	5	
Malformações no tubo neural da região cefálica	2	5.75	21.88	23.61	32.47	29.33	28.57	30.77	41.25 (↑ PFOA)
	3	4.65	8.33	6.78	7.14	10.42	9.09	18.18	9.62
	4	1.2	8.33	11.29	16.13	8.51	27.27	14.29	11.32
	5	0	0	0	1.79	5.45	4.44	2.44	0
	6	2.38	5.17	3.51	1.89	12.24	0	7.69	2.08
	8	2.38	3.51	8.33	3.7	4.44	0	7.69	0
Malformações no tubo neural da região tronco-caudal	2	0	13.79	12.7	14.75	20.37	18.37	21.74	20.34
	3	0	6.78	3.51	5.45	6.52	9.09	10	6
	4	2.38	9.84	5.17	14.75	10.42	11.11	14.29	11.32
	5	0	1.79	0	1.89	10.42	2.4	0	0
	6	33	45	39	35	64	40	39	37
	8	31	59	42	62	49	35	32	48
Estádio indefinido	2	1	42.75	53.84	11	75	61.9	42	57.14
	3	14.28	16.66	30	33.33	36.36	60	16.66	71.42
	4	0	28.57	12.5	40	50	5.88	63.63	22.22

Sombreado vermelho: Aumento significativo em relação ao controle. Seta horizontal vermelha: Aumento significativo em relação à concentração do mesmo contaminante. Na coluna do grupo PFOA+Cd, a seta vertical seguida do nome do contaminante representa aumento significativo em relação à exposição isolada. FONTE: A autora (2022).

3.3. Morfologia tecidual

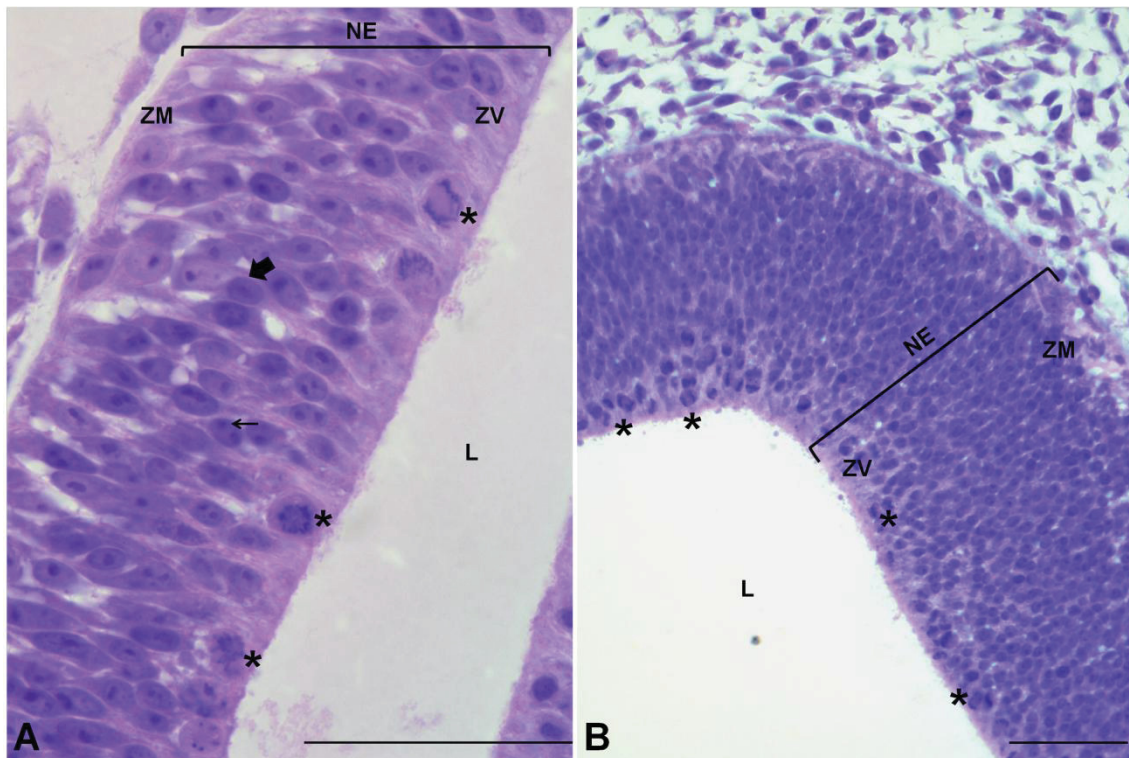
Quando dentro da normalidade, o TN da região cefálica apresenta dilatações para formar as vesículas encefálicas (FIGURA 19 A-C), enquanto nos demais níveis axiais da extensão do TN (região cervical, tronco e caudal) sua forma é elíptica, com as paredes laterais mais espessas que a dorsal e a ventral (FIGURA 19 D). O neuroepitélio do TN é organizado em uma camada de células com núcleos alongados e posicionados em diferentes alturas no eixo apicobasal (FIGURA 20 A), sendo classificado como um epitélio pseudoestratificado colunar. Essa organização ocorre na região cefálica no HH14 e nos demais níveis axiais do TN no HH14 e HH18, ou seja, nas regiões cervical, tronco e caudal. Na região cefálica do HH18, o neuroepitélio já se expandiu e apresenta mais de uma camada de células (FIGURA 20 B). Em ambas as arquiteturas, os núcleos localizados na zona ventricular estão em fase de mitose, como observado pela presença de figuras mitóticas próximas ao lúmen do TN (FIGURA 20 A e B).

FIGURA 19 – FORMATO DO TUBO NEURAL



Secções histológicas de embriões controle no HH18, evidenciando o formato do tubo neural. A-C: Região cefálica. D: Região do tronco. DI: Diencefalo. ML: Mielencefalo. MT: Metencefalo. NE: Neuroepitélio. OT: Vesícula ótica. Barra = 50 μ m. FONTE: A autora (2022).

FIGURA 20 – ORGANIZAÇÃO DO NEUROEPITÉLIO

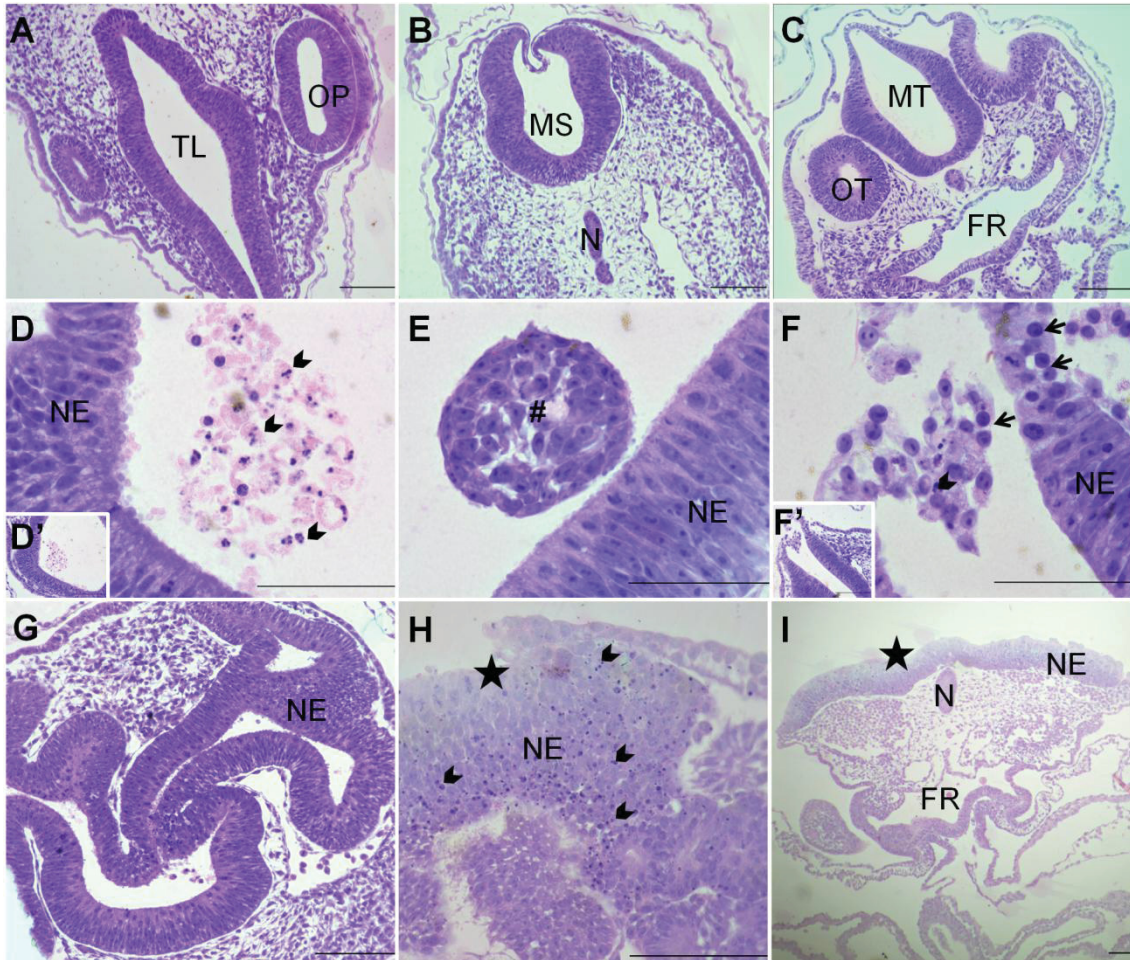


Secções histológicas de embriões controle, evidenciando a arquitetura do neuroepitélio. Região do TN. A: Região do tronco de embrião no HH14. B: Região cefálica de embrião no HH18. L: Lúmen. NE: neuroepitélio. ZM: Zona marginal. ZV: Zona ventricular. Seta larga: Núcleo da célula neuroepitelial. Seta fina: Nucléolo. Asterisco (*): Célula em mitose. Barra = 50 μ m. FONTE: A autora (2022).

A maioria dos embriões controle apresentou a morfologia tecidual da região cefálica normal (FIGURA 21 A-C; FIGURA 22 A-B), sem alterações. Já os embriões expostos exibiram diferentes tipos e graus de alterações. Em ambos os estádios analisados, observamos a presença de grupamentos e/ou fragmentos celulares (FIGURA 21 D; FIGURA 22 C-E), ou ainda, massas (FIGURA 21 E) no lúmen do tubo neural. Na maioria dos casos, essas células apresentaram características morfológicas de células apoptóticas, com picnose e fragmentação nuclear (FIGURA 21 D; FIGURA 22 C). Ainda, nessa região houve a presença de células no neuroepitélio dorsal com o núcleo mais arredondado e mais corado que o normal, aparentando estarem se soltando e algumas delas, com núcleo fragmentado. (FIGURA 21 F). As alterações mais graves ocorreram nos embriões com estágio indefinido, observados em todos os grupos expostos (FIGURA 18), nos quais a estrutura do tubo neural exibiu grande desorganização na arquitetura das vesículas encefálicas (FIGURA 21 G-I; FIGURA 22 E-F), falha no fechamento (FIGURA 21 H e I; FIGURA 22 G-H)

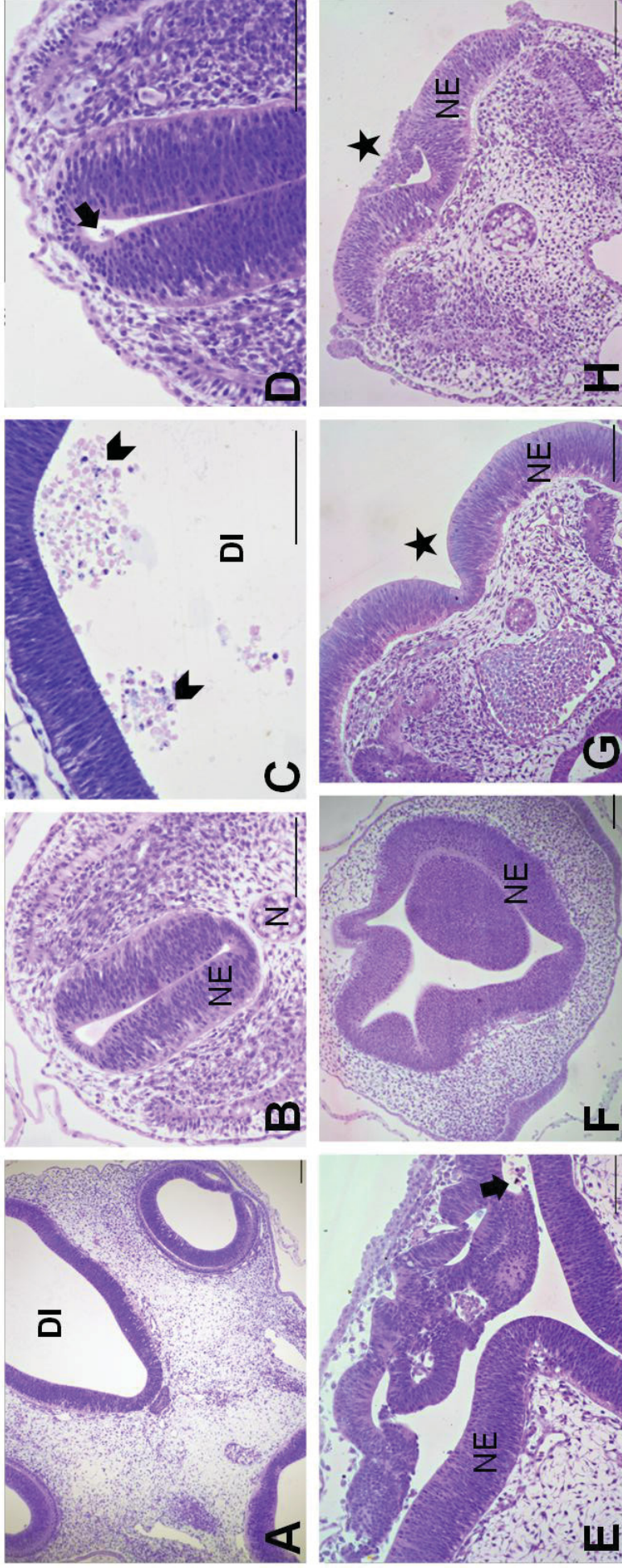
e também a presença de células no lúmen (FIGURA 22 E) e apoptóticas no neuroepitélio (FIGURA 21 H).

FIGURA 21 – ALTERAÇÕES NO TUBO NEURAL NA REGIÃO CEFÁLICA, NO HH14 OU INDEFINIDOS COM 2 DIAS



A-F: HH14. G-I: Estádio indefinido. A-C: Controle. D e D': PFOA $0,5 \text{ ng.ml}^{-1}$. D': Menor aumento de D. E: PFOA $0,5 \text{ ng.ml}^{-1}$ + Cd $0,5 \text{ µg.ml}^{-1}$. F e F': PFOA $0,5 \text{ ng.ml}^{-1}$. F': Menor aumento de F. G: PFOA 50 ng.ml^{-1} . H: Cd 5 µg.ml^{-1} . I: Cd $0,05 \text{ µg.ml}^{-1}$. FR: Faringe. MS: Mesencéfalo. MT: Metencéfalo. NE: Neuroepitélio. OP: Vesícula óptica. OT: Vesícula ótica. TL: Telencéfalo. Cabeça de seta: Células com núcleo fragmentado. Seta: Células se despreendendo do neuroepitélio. Estrela (★): TN aberto. Cerquilha (#): Massa celular no lúmen do TN. Barra: A-C e I = 100 µm ; D-F e H = 50 µm . FONTE: A autora (2022).

FIGURA 22 – ALTERAÇÕES NO TUBO NEURAL NA REGIÃO CEFÁLICA E CERVICAL, NO HH18 OU INDEFINIDOS COM 3 DIAS



A-D: HH18. E-H: Estádio indefinido. A e B: Controle. C: PFOA 5 ng.ml^{-1} . D: PFOA 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. E: Cd 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. F: PFOA 50 ng.ml^{-1} . G: Cd 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. H: Cd 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. DI: Diencefalo. NE: Neuroepitélio. N: Notocorda. Cabeça de seta: Células com núcleo fragmentado. Seta larga: Células soltas na porção dorsal do TN. Estrela (★): TN aberto. Barra: A, B e D-H = 100 μm ; C = 50 μm . FONTE: A autora (2022).

As principais alterações histológicas identificadas no TN dos embriões expostos ao PFOA e Cd ocorreram na região do tronco e caudal, em ambos os estádios analisados (FIGURA 23 e 24). Grande parte das secções de embriões controle apresentou morfologia normal (FIGURA 23 A; FIGURA 24 A).

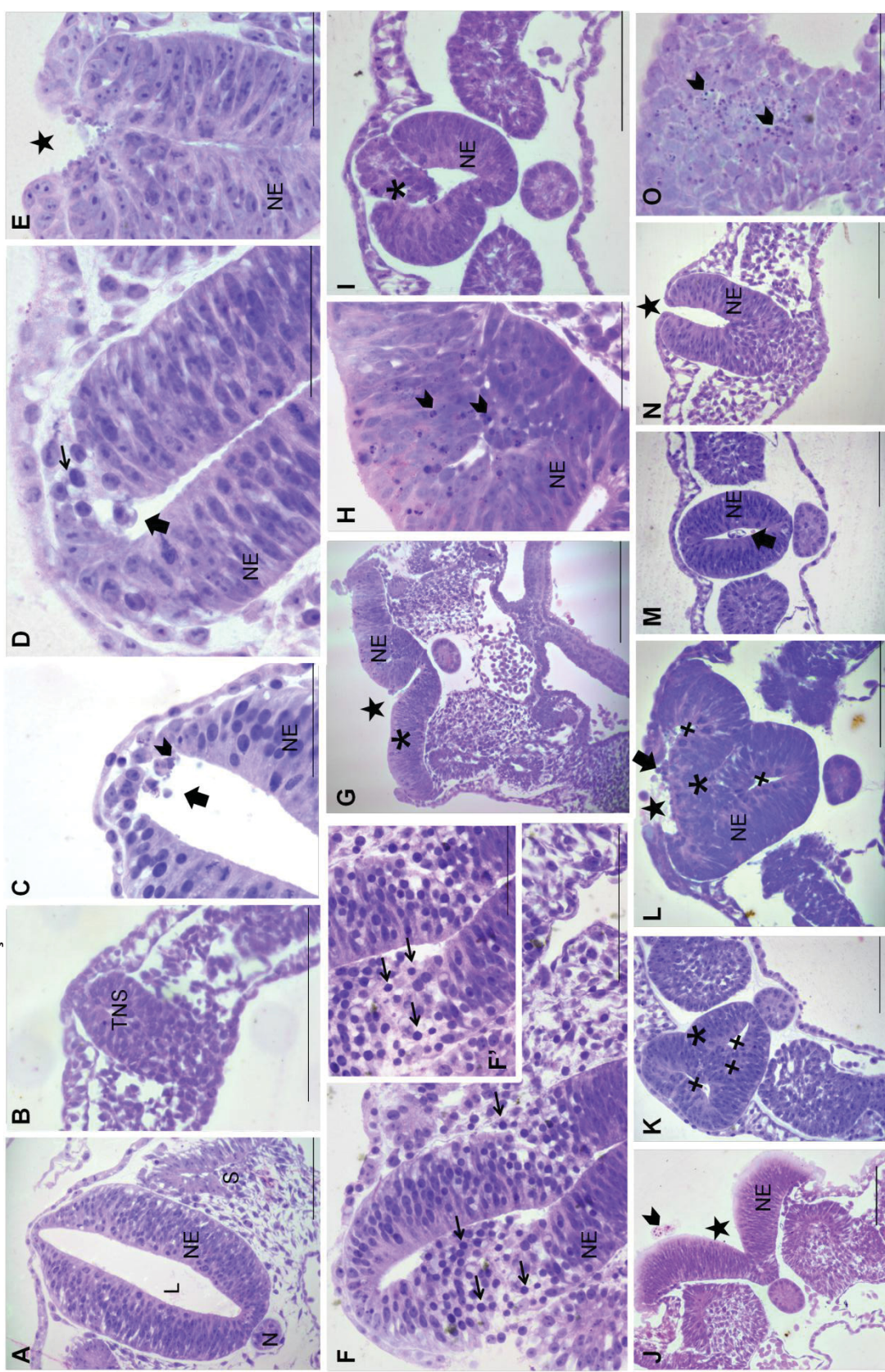
Na região do tronco, foi observado fechamento incompleto do TN (FIGURA 23 E, G e J; FIGURA 24 C, D, J e O), com as extremidades do neuroepitélio próximas (FIGURA 23 E, L; FIGURA 24 C, D, J, O) ou muito afastadas (FIGURA 23 G e J). Além disso, houve alterações na forma do TN (FIGURA 23 G-L; FIGURA 24 C, F, J, L e N), como aumento ou redução da espessura das paredes (FIGURA 23 K e L; FIGURA 24 C, F e L) e/ou a presença de múltiplos lumens (FIGURA 23 K e L; FIGURA 24 L e N). No neuroepitélio ocorreu desprendimento de células para a luz (FIGURA 23 C, D, L e M; FIGURA 24 E, G-I), algumas delas com núcleo fragmentado (FIGURA 23 C; FIGURA 24 B, E, G-I) e, na maioria das ocorrências, na porção dorsal do TN. Também foi observada a presença de células com o núcleo mais arredondado e mais corado que o normal, aparentando estarem se soltando do neuroepitélio (FIGURA 23 D e F; FIGURA 24 K), além de células apoptóticas, com picnose e fragmentação nuclear (FIGURA 23 H).

Na região caudal de embriões no HH14 verificou-se tubo neural aberto (FIGURA 23 N) e a presença de células com picnose e fragmentação nuclear na região de ocorrência da NS (FIGURA 23 O). No HH18 não foram observadas alterações histológicas nessa região.

O conjunto das alterações teciduais observadas como consequência da exposição ao PFOA e Cd foi compilado no índice de lesão embrionária (FIGURA 25) elaborado para esse trabalho. Nesse índice são consideradas as alterações observadas e a sua gravidade. No estádio HH14 houve aumento significativo das lesões na maior concentração de Cd, de 1 (controle) para 6,8 (Cd 5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Já no HH18, houve aumento no nível de dano ao tecido embrionário em relação ao controle na concentração de 0,5 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$ de PFOA e de 5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de Cd, onde o índice foi de 7,75 e 8,2, respectivamente. Em ambos os estádios avaliados, os embriões expostos à mistura apresentaram índice de lesão próximo aos dos grupos estatisticamente maiores que o grupo controle, porém não foram significativos.

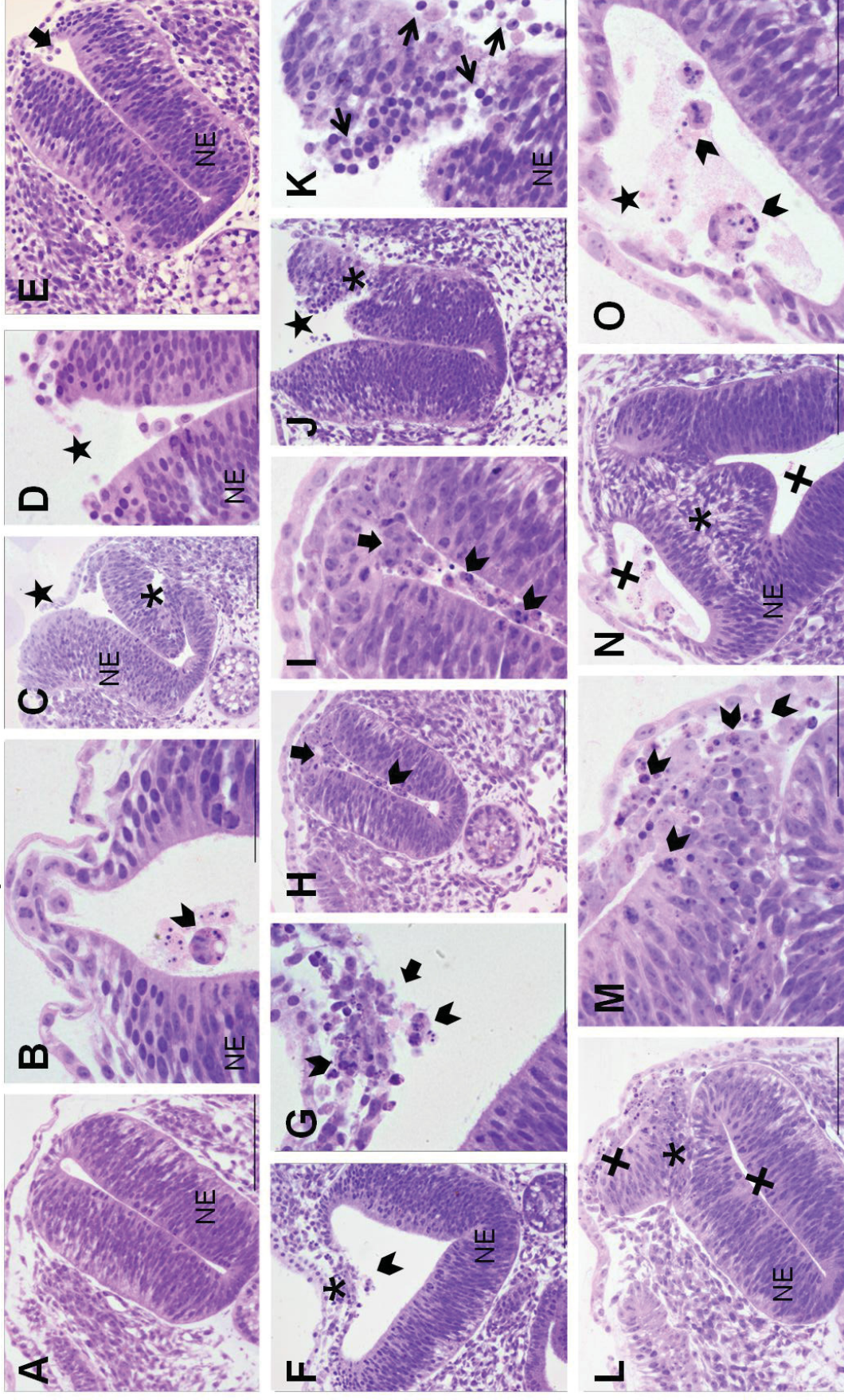
Os resultados do índice de lesão embrionária estão resumidos na TABELA 4.

FIGURA 23 – ALTERAÇÕES NO TUBO NEURAL NA REGIÃO DO TRONCO E CAUDAL NO HH14



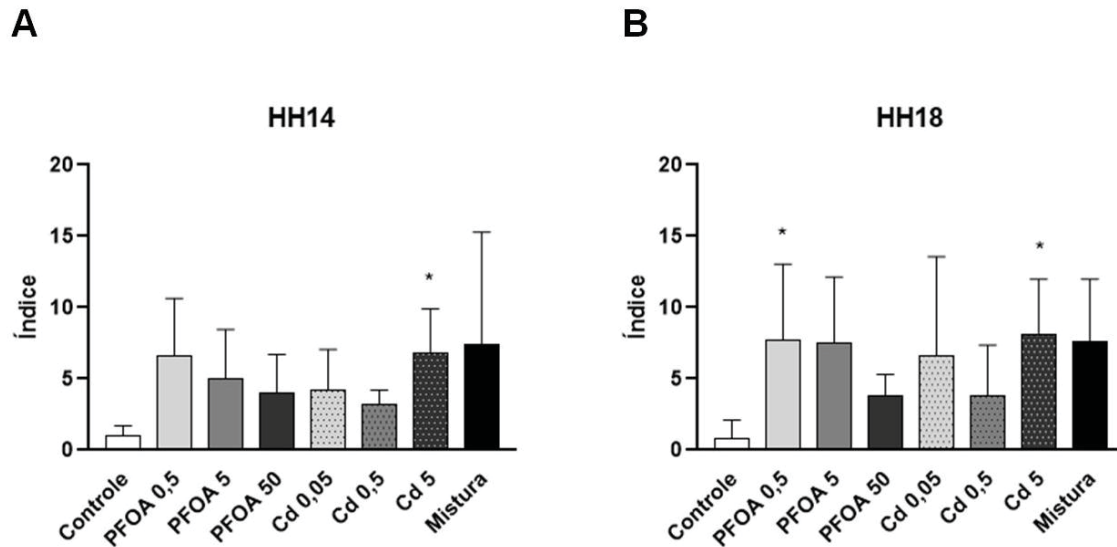
A e B: Controle. C-M: Região do tronco. B, N, O: Região caudal. L: PFOA 0,5 ng.ml⁻¹. I, M: PFOA 5 ng.ml⁻¹. G, H: PFOA 50 ng.ml⁻¹. E, J, K: Cd 0,05 µg.ml⁻¹. C, N: Cd 0,5 µg.ml⁻¹. D, O: Cd 5 µg.ml⁻¹. F e F': PFOA 5 ng.ml⁻¹ + Cd 0,5 µg.ml⁻¹. F': Maior aumento de F. Cabeça de seta: Células com núcleo fragmentado. Setas: Células soltas da porção dorsal do TN. Setas fina: Células se desprendo do neuroepitélio. Estrela (*): TN aberto. Asterisco (*): Alteração na forma. Cruz (+): Múltiplos lumens. Barra: A, F, G, I, J-M = 100 µm; B - E, F', H, N e O = 50 µm. FONTE: A autora (2022).

FIGURA 24 – ALTERAÇÕES NO TUBO NEURAL NA REGIÃO DO TRONCO NO HH18



A: Controle. D, F, G: PFOA 0,5 ng.ml^{-1} . N, O: PFOA 50 ng.ml^{-1} . C, H, I: PFOA 50 ng.ml^{-1} . E: Cd 0,05 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. L, M: Cd 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. B: Cd 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. J, K: PFOA 5 ng.ml^{-1} + Cd 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Cabeça de seta: Células com núcleo fragmentado. Setas: Células soltas da porção dorsal do TN. Setas finas: Células se desprendo do neuroepitélio. Estrela (★): TN aberto. Asterisco (*): Alteração na forma. Cruz (+): Múltiplos lumens. Barra: A, C, E, F, H, J, L e N = 100 μm ; B, D, G, I, K, M e O = 50 μm . FONTE: A autora (2022).

FIGURA 25 - ÍNDICE DE LESÃO EMBRIONÁRIA



Média e erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle: * $p < 0.05$; Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Número de embriões = 5 por grupo experimental em cada estágio. FONTE: A autora (2022).

TABELA 4 – RESUMO DOS RESULTADOS DO ÍNDICE DE LESÃO EMBRIONÁRIA

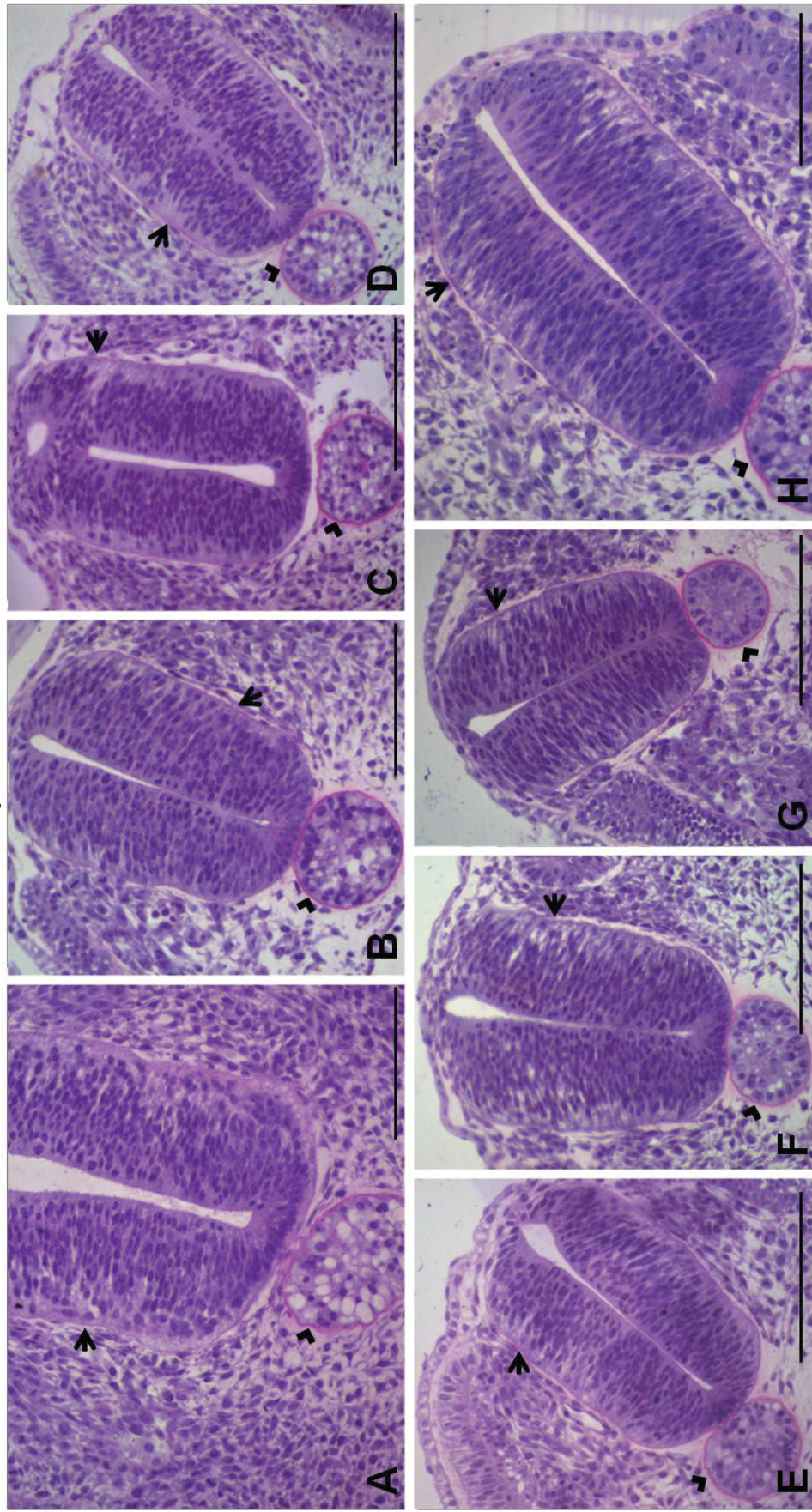
Parâmetro analisado	Estádio HH	Controle	PFOA (ng.ml ⁻¹)			Cd (µg.ml ⁻¹)			PFOA + Cd 5 + 0,5
			0,5	5	50	0,05	0,5	5	
Índice histopatológico	HH14	1	6.6	5	4	4.2	3.25	6.8	7.4
	HH18	0.8	7.75	7.57	3.83	6.66	3.8	8.2	7.6

Sombreado vermelho: Aumento significativo em relação ao controle. FONTE: A autora (2022).

A coloração histoquímica com PAS evidenciou a região da membrana basal do TN e da notocorda. A membrana basal da notocorda apresentou intensa marcação positiva, demonstrando-se mais espessa do que a do tubo neural (FIGURA 26). Visualmente não foi possível perceber diferenças entre os grupos experimentais, porém, quando avaliada de forma semiquantitativa a intensidade da marcação nas secções histológicas, foi possível diferenciar os grupos, principalmente no estágio HH18. No HH14 não houve diferença significativa entre os grupos expostos e o controle, somente um efeito da concentração de PFOA, que na maior (50 ng.ml^{-1}) apresentou uma marcação menos intensa que na menor ($0,5 \text{ ng.ml}^{-1}$) (FIGURA 27 A). Já no HH18 ocorreu redução significativa na intensidade da marcação em todos os grupos expostos, exceto na concentração média de PFOA (5 ng.ml^{-1}) e na mistura (FIGURA 27 B). Essa redução representa uma menor deposição de moléculas PAS-positivas nos embriões.

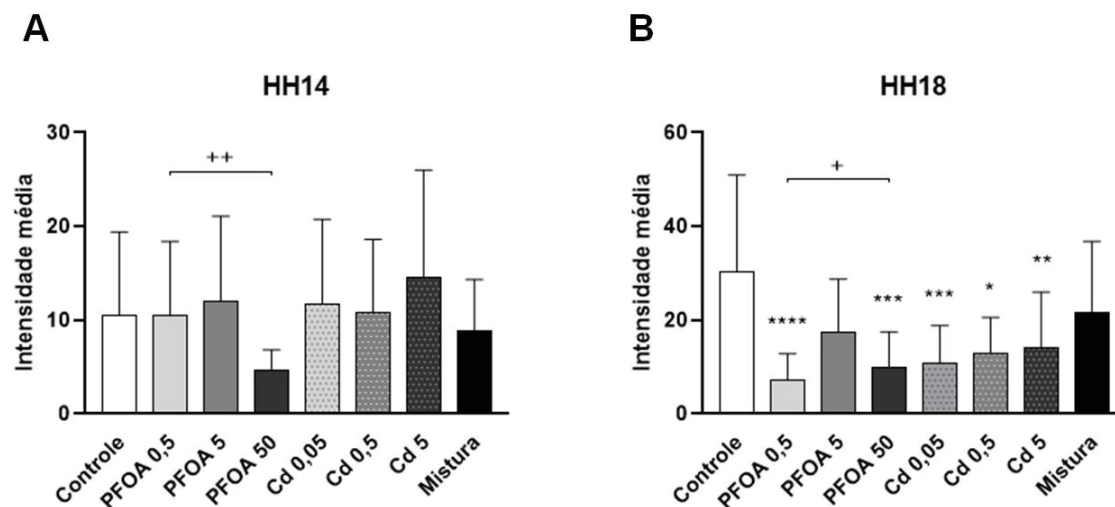
Os resultados da intensidade da marcação com PAS estão resumidos na TABELA 5.

FIGURA 26 – MARCAÇÃO HISTOQUÍMICA COM PAS



Secções histológicas marcadas com a técnica histoquímica do PAS. Observar marcação PAS positiva na membrana basal do tubo neural (seta) e da notocorda (cabeça de seta). A: Controle. B: PFOA 0,5 ng.ml⁻¹. C: PFOA 50 ng.ml⁻¹. D: PFOA 5 ng.ml⁻¹. E: Cd 0,05 µg.ml⁻¹. F: Cd 0,5 µg.ml⁻¹. G: Cd 5 µg.ml⁻¹. H: PFOA 5 ng.ml⁻¹ + Cd 0,5 µg.ml⁻¹. Barra = 100 µm. FONTE: A autora (2022).

FIGURA 27 - INTENSIDADE DA MARCAÇÃO COM PAS



Média e erro padrão da média. Asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas em relação ao grupo controle: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Sinal positivo (+) indica efeito concentração dependente: + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$; Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Número de embriões = 5 por grupo experimental em cada estágio, sendo que para cada embrião foram analisadas 9 imagens. FONTE: A autora (2022).

TABELA 5 – RESUMO DOS RESULTADOS DA INTENSIDADE DA MARCAÇÃO COM PAS

Parâmetro analisado	Estádio HH	Controle	PFOA (ng.ml ⁻¹)			Cd (µg.ml ⁻¹)			PFOA + Cd 5 + 0,5
			0,5	5	50	0,05	0,5	5	
Histoquímica	HH14	10.48	10.46	12.05	4.71	11.74	10.77	14.61	8.83
	HH18	30.45	7.33	17.5	9.89	10.95	12.9	14.77	21.77

Sombreado verde: Redução significativa em relação ao controle. Seta horizontal: Vermelha – aumento significativo em relação à concentração do mesmo contaminante; Verde – redução significativa em relação à concentração do mesmo contaminante. FONTE: A autora (2022).

A TABELA 6 resume os resultados de mortalidade, ocorrência de malformações, índice histopatológico e intensidade da marcação com PAS.

TABELA 6 – RESUMO DOS RESULTADOS

Parâmetro analisado	Tempo (dias) / Estádio HH	Controle	PFOA (ng.ml ⁻¹)			Cd (µg.ml ⁻¹)			PFOA + Cd		
			0,5	5	50	0,05	0,5	5	5 + 0,5		
Mortalidade (%)	2	19	28	24	22	17	30	26	25		
	3	21	23	30	30	25	39	33	29		
	4	20	20	22	29	24	29	24	21		
	5	25	25	38	30	41	28	25	29		
	6	33	45	39	35	64	40	39	37		
	8	31	59	42	62	49	35	32	48		
Morfologia (% de embriões)	Malformações gerais	2	10	24	32	35	31	34	36	41	
		3	13	17	27	26	20	30	34	22	
		4	7	29	29	33	32	33	39	24	
		5	13	17	20	43	60	15	25	20	
		6	33	45	39	35	64	40	39	74 (↑ PFOA ↑Cd)	
		8	15	25	33	29	42	18	19	62 (↑ Cd)	
	Malformações no tubo neural da região cefálica	2	5.75	21.88	23.61	32.47	29.33	28.57	30.77	41.25 (↑ PFOA)	
		3	4.65	8.33	6.78	7.14	10.42	9.09	18.18	9.62	
		4	1.2	8.33	11.29	16.13	8.51	27.27	14.29	11.32	
		5	0	0	0	1.79	5.45	4.44	2.44	0	
		6	2.38	5.17	3.51	1.89	12.24	0	7.69	2.08	
		8	2.38	3.51	8.33	3.7	4.44	0	7.69	0	
	Malformações no tubo neural da região tronco-caudal	2	0	13.79	12.7	14.75	20.37	18.37	21.74	20.34	
		3	0	6.78	3.51	5.45	6.52	9.09	10	6	
		4	2.38	9.84	5.17	14.75	10.42	11.11	14.29	11.32	
		5	0	1.79	0	1.89	10.42	2.4	0	0	
		6	33	45	39	35	64	40	39	37	
		8	31	59	42	62	49	35	32	48	
	Estádio indefinido	2	1	42.75	53.84	11	75	61.9	42	57.14	
		3	14.28	16.66	30	33.33	36.36	60	16.66	71.42	
		4	0	28.57	12.5	40	50	5.88	63.63	22.22	
	Histologia	Índice histopatológico	HH14	1	6.6	5	4	4.2	3.25	6.8	7.4
			HH18	0.8	7.75	7.57	3.83	6.66	3.8	8.2	7.6
		Histoquímica	HH14	10.48	10.46	12.05	4.71	11.74	10.77	14.61	8.83
HH18			30.45	7.33	17.5	9.89	10.95	12.9	14.77	21.77	

Sombreado: Vermelho - aumento significativo em relação ao controle; Verde – redução significativa em relação ao controle. Seta horizontal: Vermelha – aumento significativo em relação à concentração do mesmo contaminante; Verde: redução significativa em relação à concentração do mesmo contaminante. Na coluna do grupo PFOA+Cd, a seta vertical seguida do nome do contaminante representa aumento significativo em relação à exposição isolada. FONTE: A autora (2022).

3.4. Redes de interação e enriquecimento funcional

A partir da busca realizada no CTD para a espécie *G. gallus* foram encontrados 2926 genes alterados pela exposição ao PFOA e 3072 ao Cd. Com o emprego da ferramenta *VennViewer*, foi gerado um diagrama mostrando que 859 genes têm a sua expressão alterada pela exposição aos dois contaminantes (FIGURA 28), representados na intersecção. Posteriormente, no *software Cytoscape* foi avaliada a interação entre esses genes e a construção da rede foi de acordo com as vias que fazem parte as proteínas codificadas pelos genes (FIGURA 29), agrupando-as. Entre as 90 vias envolvidas com os genes diferentemente expressos, 12 têm papel importante durante o desenvolvimento embrionário (QUADRO 4), sendo elas: 1) interação com receptores de matriz extracelular; 2) moléculas de adesão celular; 3) junções aderentes; 4) junções de oclusão; 5) junções GAP; 6) regulação do citoesqueleto de actina; 7) via de sinalização Wnt; 8) ciclo celular; 9) via da p53; 10) apoptose; 11) via de sinalização por cálcio; e 12) via de sinalização PPAR.

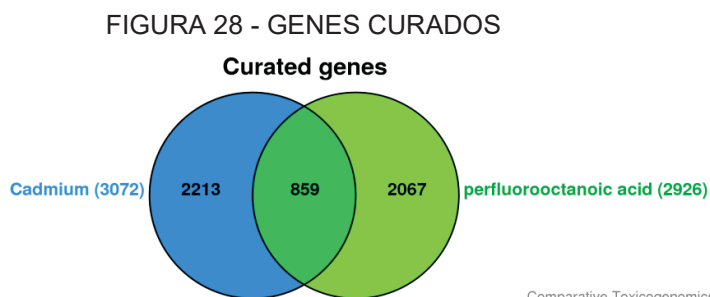
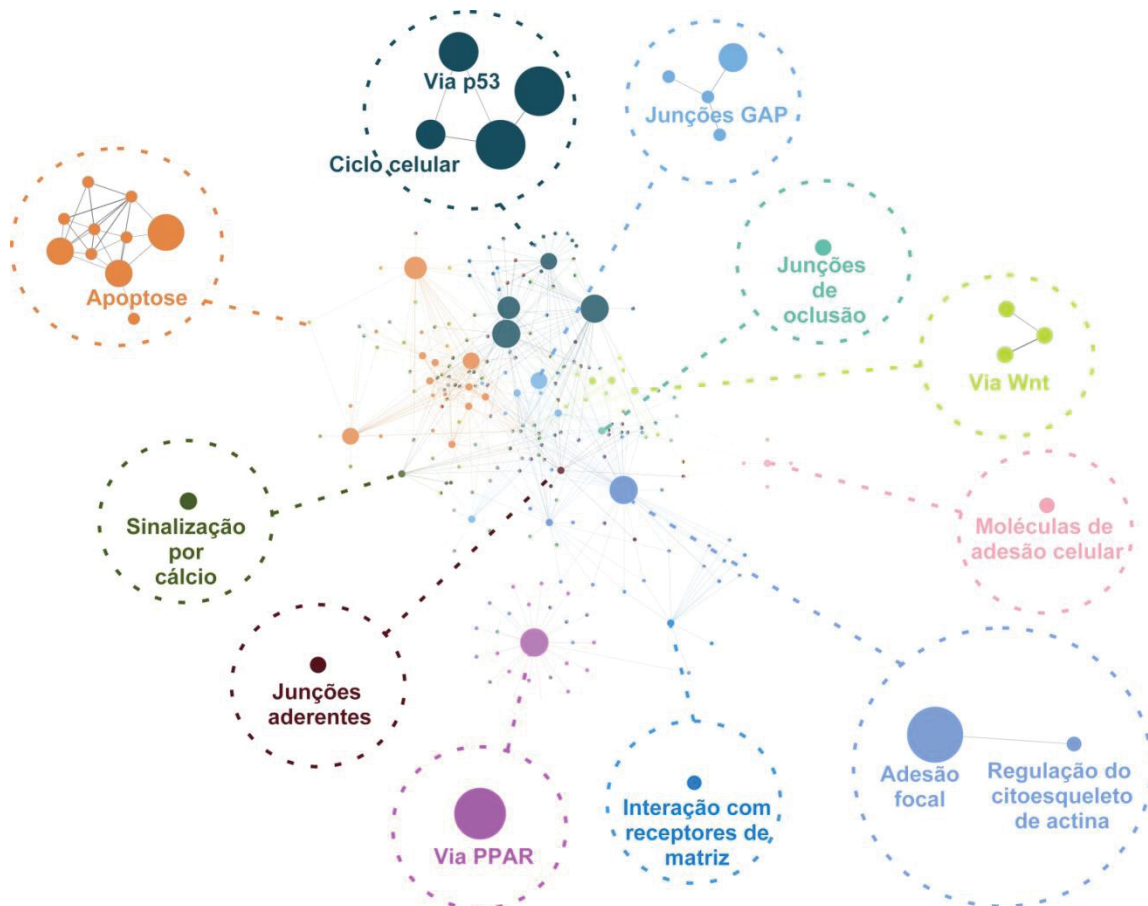


Diagrama representando os genes curados relacionados à exposição ao Cd e PFOA, obtido com a ferramenta *VennViewer* do CTD. FONTE: A autora (2022).

FIGURA 29 - REDE DE INTERAÇÃO ENTRE VIAS E ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL



Rede construída no *software* Cytoscape com o *app* ClueGO. Os círculos (ou nós) mais centrais de cada grupo da mesma cor representam as vias, cujo tamanho reflete o grau de interação dentro da rede. Os círculos ao redor representam as proteínas que conectam outras proteínas ou vias. As linhas (ou vértices) indicam as interações entre vias ou proteínas. Em destaque com as circunferências pontilhadas, são mostradas as vias relevantes ao desenvolvimento embrionário. FONTE: A autora (2022).

QUADRO 4 – ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL

Vias/Funções	Número de genes	Genes afetados pela exposição ao PFOA e Cd
Interação com receptor de matriz extracelular	12	CD36, COL1A1, COL1A2, COL4A1, COL4A2, COL6A3, DAG1, FN1, ITGA2, ITGA6, VTN, VWF
Moléculas de adesão celular	8	ALCAM, CDH1, CDH2, CLDN11, CNTN1, ITGA6, OCLN, SELE
Junções aderentes	13	ACP1, CDH1, CTNNB1, EGFR, ERBB2, IGF1R, LEF1, MAPK3, SNAI1, SRC, TGFB1, TGFB2, TJP1
Junções de oclusão	11	CCND1, CLDN11, ERBB2, EZR, HSPA4, JUN, MYL12A, OCLN, PRKAA1, SRC, TJP1
Junções GAP	15	CDK1, EGF, EGFR, GJA1, GRB2, MAP2K1, MAPK3, PDGFA, PDGFRA, PDGFRB, PRKACA, PRKCA, SRC, TJP1, TUBB2A
Regulação do citoesqueleto de actina	24	ARHGAP35, ARPC4, BCAR1, CXCL12, EGF, EGFR, EZR, F2, FN1, ITGA2, ITGA6, KNG1, MAP2K1, MAPK3, MYL12A, PDGFA, PDGFRA, PDGFRB, PFN2, PIK3R1, SRC, TGFB111, TMSB4X, TMSB4Y
Via de sinalização Wnt	13	CACYBP, CCND1, CCND3, CTNNB1, FZD2, GSK3A, JUN, LEF1, MYC, PRKCA, SERPINF1, WNT3A, WNT5A
Ciclo celular	24	BUB1, CCNA1, CCNA2, CCNB1, CCND1, CCND3, CCNE1, CDC20, CDK1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2B, GADD45A, GADD45B, GADD45G, GSK3A, MCM2, MCM4, MCM5, MDM2, MYC, TGFB1, TGFB3, WEE1
Via de sinalização p53	18	BCL2, BCL2L1, CASP9, CCNB1, CCND1, CCND3, CCNE1, CDK1, CDKN1A, CYCS, GADD45A, GADD45B, GADD45G, IGF1, IGFBP3, MDM2, PTEN, RRM2
Apoptose	27	ATF4, BAK1, BCL2, BCL2L1, CASP9, CHUK, CTSB, CTSD, CTSH, CTSK, CYCS, DDIT3, ERN1, FOS, GADD45A, GADD45B, GADD45G, JUN, MAP2K1, MAPK3, NFKB1, NFKBIA, PIK3R1, RELA, TNFRSF10B, TNFRSF1A, TNFSF10
Via de sinalização por cálcio	13	EGFR, ERBB2, ERBB3, LHCGR, NOS2, PDGFRA, PDGFRB, PPIF, PRKCA, SLC25A4, SLC25A5, VDAC1, VDAC2
Via de sinalização PPAR	25	ACAA1, ACADL, ACOX1, ACSL1, ACSL5, ANGPTL4, APOA1, APOA2, CD36, CPT1A, CPT2, DBI, FABP1, FABP4, FABP5, GK2, HMGCS2, LPL, NR1H3, PLIN2, PPARA, PPARG, SCD, SCP2, SLC27A1

FONTE: A autora (2022).

3.5. Anatomia dos animais eclodidos e não eclodidos

No total, foram realizados 3 experimentos. O primeiro somente com embriões controle e obtivemos uma eclodibilidade de 19% no grupo controle fechado (CF) e 27% no veículo (CV), com 12 animais eclodidos (5 CF e 7 CV) dos 30 ovos incubados (15 CF e 15 CV). No segundo e terceiro experimentos, foram incubados 6 ovos por grupo experimental (totalizando 12 ovos por grupo), sendo embriões controle veículo e expostos ao PFOA e Cd. Dos 12 ovos, apenas 3 animais eclodiram, ao todo, sendo 1 do grupo PFOA 5 ng.ml⁻¹, 1 do PFOA 50 ng.ml⁻¹ e 1 do Cd 0,5 µg.ml⁻¹ (TABELA 7).

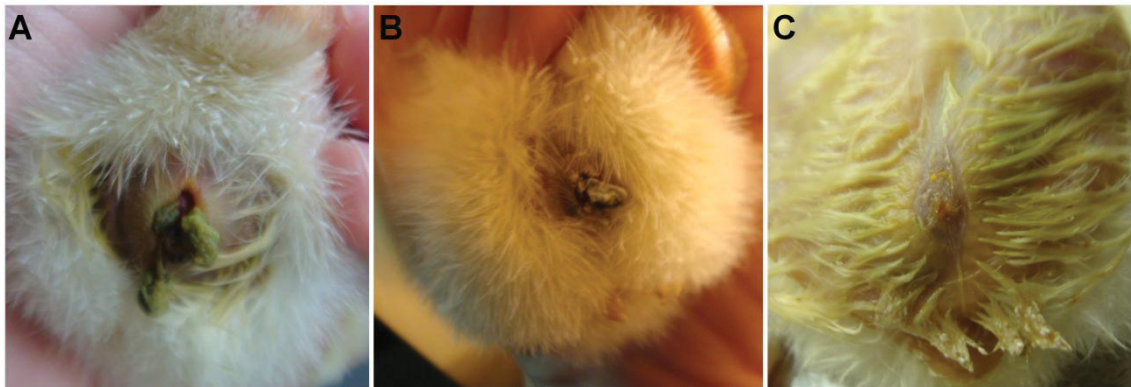
TABELA 7 – Resultados dos experimentos de eclosão

Grupos	Controle		PFOA			Cd		
	Fechado	Veículo	0,5	5	50	0,05	0,5	5
Nº de ovos incubados	27	27	12	12	12	12	12	12
Nº Individuos eclodidos	5	7	0	1	1	0	1	0
Eclodibilidade (%)	19	26	0	8	8	0	8	0
Mortalidade (%)	81	74	100	91	91	100	91	100
Mortalidade após 18 dias (%)	0	8	66	33	50	50	58	58
Malposicionamento (%)	0	0	16	8	25	25	16	16
Malformados com 18 dias (%)	-	-	-	-	16	-	16	8
Malformados eclodidos (%)	-	-	-	-	100	-	-	-

FONTE: A autora (2022).

Nos indivíduos eclodidos foi observada somente uma malformação em um indivíduo (FIGURA 30) do grupo PFOA 50 ng.ml⁻¹. No dia da eclosão o animal apresentou fechamento incompleto da parede abdominal na região umbilical, com pequena protrusão aparente de alças intestinais (FIGURA 30 A e B), porém o fechamento se completou e no oitavo dia após a eclosão a parede abdominal se apresentava totalmente fechada (FIGURA 30 C).

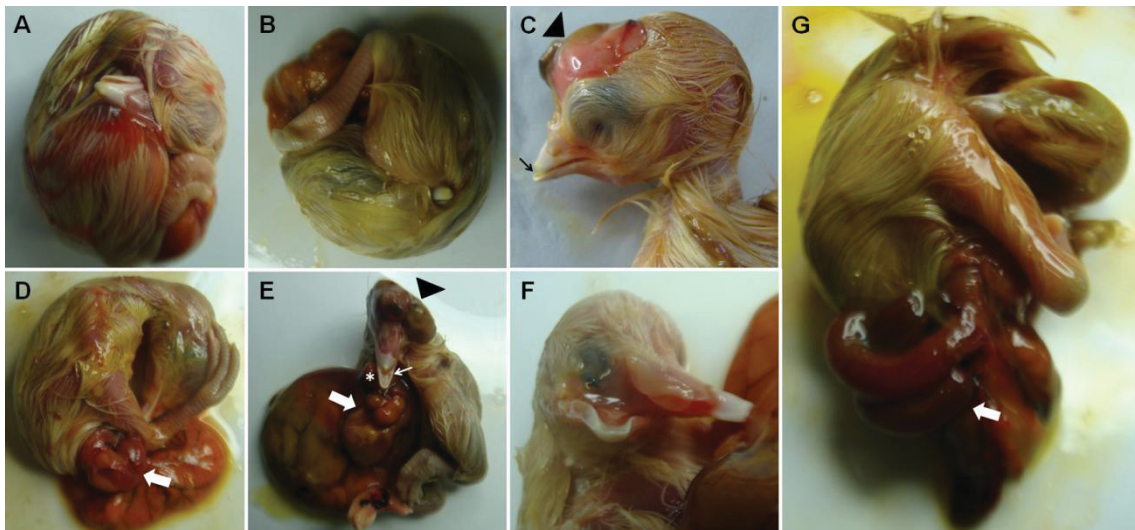
FIGURA 30 - INDIVÍDUO ECLODIDO MALFORMADO



Indivíduo do grupo PFOA 50 ng.ml^{-1} apresentando fechamento incompleto da parede abdominal e extrusão de alças intestinais (A e B). Em C, a parede abdominal está totalmente fechada. A: Dia da eclosão. B: Terceiro dia após eclosão. C: Oitavo dia após eclosão. FONTE: A autora (2018).

Após 3 dias da eclosão do último animal os ovos com embriões não eclodidos foram abertos e a anatomia externa foi analisada (FIGURA 31). Os embriões controle não apresentavam malformações ou posicionamento incorreto do embrião dentro do ovo (FIGURA 31 A). Nos embriões que morreram aproximadamente entre o 18º e 21º dia, foram observados posicionamento incorreto do embrião no ovo, frequentemente com a cabeça do embrião voltada para a extremidade menor do ovo, oposta à câmara de ar (FIGURA 31 B), e malformações (FIGURA 31 C-G), sendo encontradas alterações cefálicas e faciais, como encéfalo exposto (FIGURA 31 C-E) e alterações no bico (FIGURA 31 C, E-F), além de extrusão visceral (FIGURA 31 D, E e G) e coração para fora da cavidade torácica (FIGURA 31 E).

FIGURA 31 - ANATOMIA DOS ANIMAIS NÃO ECLODIDOS



A: Embrião controle, sem malformações e na posição normal de nascimento. B-G: Embriões expostos. B: PFOA $0,5 \text{ ng.ml}^{-1}$, sem malformações e mal posicionado; C: PFOA 50 ng.ml^{-1} , apresentando encéfalo exposto (cabeça de seta) e bico malformado (seta fina); D: PFOA 50 ng.ml^{-1} , com extrusão visceral (seta larga); E: Cd $0,5 \text{ µg.ml}^{-1}$, apresentando encéfalo exposto (cabeça de seta), bico malformado (seta fina), *ectopia cordis* (asterisco) e extrusão visceral (seta larga); F: Cd 5 µg.ml^{-1} , com malformações na face; G: Cd $0,5 \text{ µg.ml}^{-1}$, apresentando extrusão visceral (seta larga). FONTE: A autora (2018).

4. Discussão

A exposição ao PFOA e ao Cd é preocupante, pois esses contaminantes são bioacumuláveis e capazes de atravessar a barreira placentária (AL-SALEH *et al.*, 2011; HANSSEN *et al.*, 2013), atingindo o embrião/feto em desenvolvimento. Por isso, são necessários estudos para avaliação do potencial embriotóxico e teratogênico dessas substâncias. Nesse contexto, um fator importante para extrapolar os resultados obtidos com modelos animais para a condição humana, é a utilização de concentrações realistas. Para a execução desse estudo, realizamos o cálculo alométrico (DA COSTA *et al.*, 2021) para extrapolação da concentração média observada em humanos, para o embrião de galinha. Dessa forma, obtivemos as concentrações de PFOA 5 ng.ml⁻¹ e Cd 0,5 µg.ml⁻¹, que foram usadas na exposição isolada e na mistura. Foi também utilizada uma concentração 10 vezes menor e uma 100 vezes maior dos compostos isolados.

Nesse trabalho, avaliamos a embriotoxicidade do PFOA e Cd sobre o desenvolvimento de *G. gallus*, com foco na interferência sobre a formação do tubo neural. Anteriormente, em estudo desenvolvido no nosso laboratório, foi demonstrado pela análise em montagem total, que esses contaminantes induzem malformações em embriões de galinha, com o aparecimento de alterações morfológicas no tubo neural e também em outras estruturas, como cauda, parede do corpo, coração e curvatura (YAMAMOTO *et al.*, 2012; KMECICK *et al.*, 2019). Porém, a análise por montagem total apresenta limitações e não permite avaliação mais detalhada das estruturas. Dessa forma, buscamos, através da análise histológica e de rede de enriquecimento funcional, caracterizar a embriotoxicidade desses compostos procurando por possíveis mecanismos teciduais e celulares, bem como genes alvo, envolvidos na indução de malformações no TN frente à exposição a esses contaminantes.

Segundo os princípios da teratologia, postulados por Wilson (1977) e ainda utilizados na avaliação dos efeitos e na interpretação do risco teratogênico (GOMES *et al.*, 2021), a mortalidade embrionária, malformações, atraso no desenvolvimento e alterações funcionais são manifestações da teratogênese. Wilson (1977) afirma que o estágio embrionário no momento da exposição é determinante na susceptibilidade a teratógenos. Em nosso

trabalho, empregamos dois desses parâmetros, a mortalidade e a ocorrência de malformações, com a exposição ocorrendo na fase de blástula. Nos embriões controle, a mortalidade e a ocorrência de malformações observadas estão de acordo com a normalidade nessas condições experimentais (YAMAMOTO *et al.*, 2012; KMECICK *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021). Em ambos os parâmetros, obtivemos resultados significativos nos embriões expostos, demonstrando que esses contaminantes são embriotóxicos à galinha e, potencialmente aos embriões humanos. De forma geral, os compostos isolados tiveram maior influência nas malformações nos primeiros dias, quando ocorre o período inicial de desenvolvimento e organogênese e o embrião é mais sensível à ação de agentes externos, que podem causar morte embrionária e alterações morfológicas importantes (ALWAN; CHAMBERS, 2015). No entanto, chama a atenção que o PFOA interferiu significativamente na mortalidade no 8º dia. Além disso, as alterações morfológicas, de modo geral, foram mais significativas nos primeiros dias de incubação e houve uma tendência à redução nos embriões do 6º ao 8º dia. Isso possivelmente ocorreu, pois os embriões em estágios iniciais são translúcidos, o que permite a visualização das estruturas, que são mais opacas, como as vesículas encefálicas e o restante do tubo neural. À medida que o desenvolvimento avança as estruturas observadas previamente são cada vez menos visíveis externamente (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Isso acontece pois as estruturas desaparecem, dando origem a outras estruturas (ex. somitos), e/ou se tornam internalizadas e cobertas pelas cartilagens, músculos e pele em formação (ex. vesículas encefálicas). Dessa forma, a ausência de alterações externas nos embriões com maior tempo de incubação não exclui a sua presença internamente. Além disso, nos primeiros dias de incubação os embriões apresentam menos estruturas e o estadiamento é feito a partir das características da região encefálica. Devido a essa região ser alvo da embriotoxicidade desses compostos (KMECICK *et al.*, 2019), uma porcentagem significativa dos embriões foi impossível de estadiar, principalmente no 2º dia.

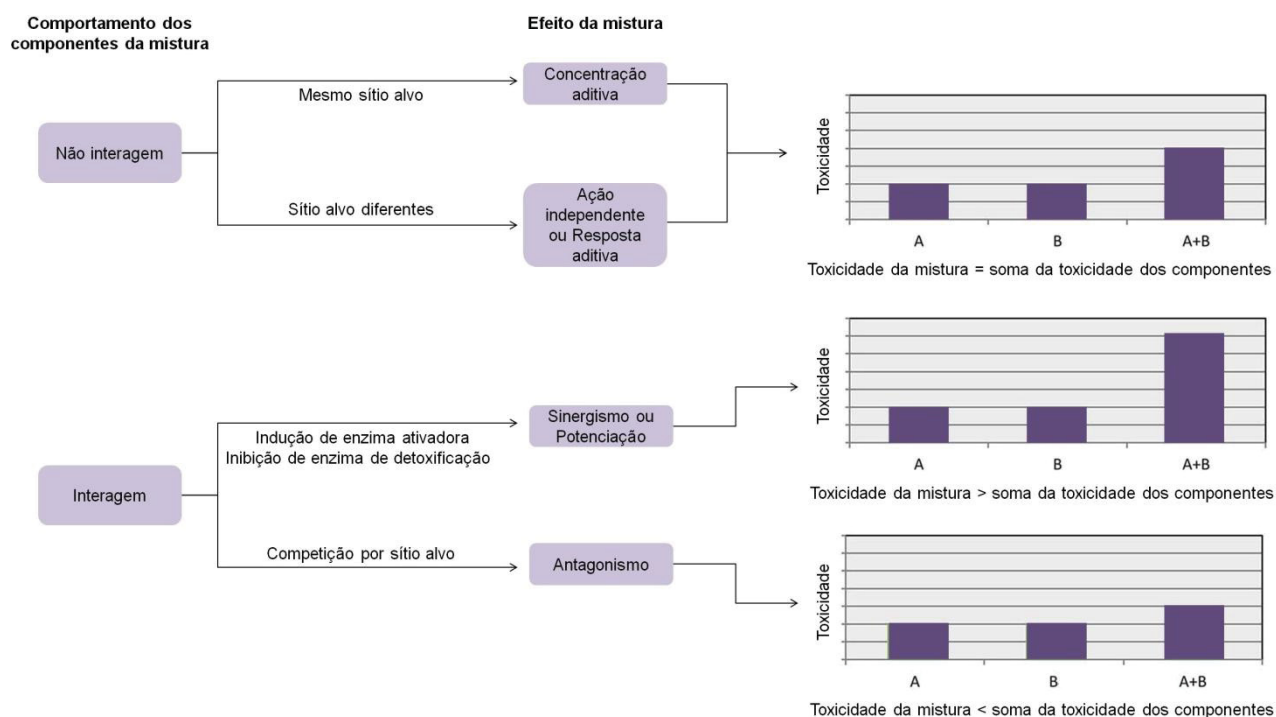
Além disso, avaliamos a variável tempo de exposição na mortalidade embrionária e ocorrência de malformações. Era esperado que, com o avanço do desenvolvimento, as alterações morfológicas graves observadas nos

embriões em estágios mais iniciais (2-4 dias), representadas principalmente pela ocorrência de embriões com estágio indefinido, inviabilizassem a continuidade do desenvolvimento, aumentando a mortalidade ao longo do tempo. Esse aumento era esperado também devido ao maior tempo de exposição aos contaminantes, que é determinante na viabilidade embrionária (CONLEY; RICHARDS, 2008). Apesar da tendência na elevação da mortalidade observada ao longo do tempo, os aumentos não foram significativos. É possível que se essas condições de exposição fossem mantidas e o desenvolvimento avaliado por mais tempo, essa tendência se confirmaria, como foi observado pela baixa eclodibilidade dos animais expostos. Não há na literatura dados sobre a avaliação da mortalidade e ocorrência de malformações em embriões expostos ao PFOA, Cd e à mistura, ao longo do tempo, com a exposição ocorrendo antes do processo de gastrulação. Nossos resultados são, portanto, inéditos e contribuem com a compreensão dos efeitos desses contaminantes no início do desenvolvimento, em concentrações realistas. Porém, são necessários mais estudos para compreender a influência desses compostos, principalmente ao longo de um período maior do desenvolvimento.

Na exposição conjunta, foi observado um efeito de mistura com aumento na ocorrência de malformações no 6º e 8º dias, cujos resultados diferiram significativamente do PFOA 5 ng.ml⁻¹ e Cd 0,5 µg.ml⁻¹ ou somente do Cd 0,5 µg.ml⁻¹, respectivamente, o que sugere um efeito aditivo na exposição combinada. De maneira geral, o efeito da mistura de substâncias pode se comportar de quatro formas, a depender da interação ou ausência de interação entre os componentes da mistura (FIGURA 32). O PFOA e o Cd pertencem a classes diferentes de compostos e, até onde se conhece, não compartilham ou competem por sítios biológicos alvo em animais, não interagem e não interferem no metabolismo e/ou detoxificação um do outro. Isso significa que as respostas biológicas desencadeadas pela sua exposição são diferentes e que, possivelmente, a toxicidade da mistura é equivalente à soma dos efeitos dos compostos isolados (HEYS *et al.*, 2016). Apesar de atuarem independentemente, os seus efeitos se sobrepõem, alterando componentes de vias em comum e gerando uma resposta aditiva, com aumento da ocorrência das alterações observadas na exposição isolada. A análise de redes e

enriquecimento funcional corrobora essa afirmação. Porém, segundo Rider e colaboradores (2018), para afirmar qual o tipo de efeito de mistura ocorre na exposição a múltiplos contaminantes é necessário um desenho experimental específico, que não foi empregado no presente estudo. Dessa forma, outros experimentos são necessários para avaliar os efeitos da exposição conjunta a essas substâncias no desenvolvimento embrionário e confirmar o tipo do efeito da mistura. Outra forma de avaliar o efeito de misturas é a utilização de modelos preditivos que podem, posteriormente, ser validados experimentalmente (BUREŠ *et al.*, 2021).

FIGURA 32 – ESQUEMA DE MODELOS TEÓRICOS DE EFEITOS DE MISTURAS



FONTE: Adaptado de Heys *et al.* (2016).

O resultado é sutil em relação ao efeito dependente da concentração, sendo observados principalmente para o Cd em alguns parâmetros avaliados. Na exposição ao Cd, foi observado efeito dependente da concentração no 2º dia, com aumento da mortalidade, e no 4º dia, com elevação na ocorrência de alterações no tubo neural da região cefálica, ambos no grupo exposto ao Cd $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ em relação ao Cd $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Esses resultados são corroborados pela literatura, pois com o aumento nos níveis de exposição, um aumento no

efeito é esperado (WILSON, 1977; FRIEDMAN, 2010). O oposto aconteceu no 5º dia, na ocorrência de malformações gerais, e no 6º na mortalidade, com redução no grupo Cd 0,5 µg.ml⁻¹ em relação ao Cd 0,05 µg.ml⁻¹. É possível propor que a redução das alterações morfológicas observadas nos embriões incubados e, portanto, expostos por 5 dias, impactou negativamente na viabilidade embrionária, levando a redução da mortalidade em estágios mais avançados, no 6º dia. Na exposição ao PFOA, houve efeito dependente da concentração na marcação histoquímica com PAS, entre a menor e a maior concentração, com aumento da intensidade no HH14 e redução no HH18. Esses resultados levantam a hipótese da presença do fenômeno de hormese, em que a dose-resposta é bifásica, e um menor nível de exposição apresenta um efeito maior, enquanto maiores concentrações resultam em menor efeito (CALABRESE, 2014). Porém, para confirmar a presença desse fenômeno é necessária a avaliação de curvas dose-resposta através de delineamentos experimentais e estatísticos específicos (NWEKE; OGBONNA, 2017).

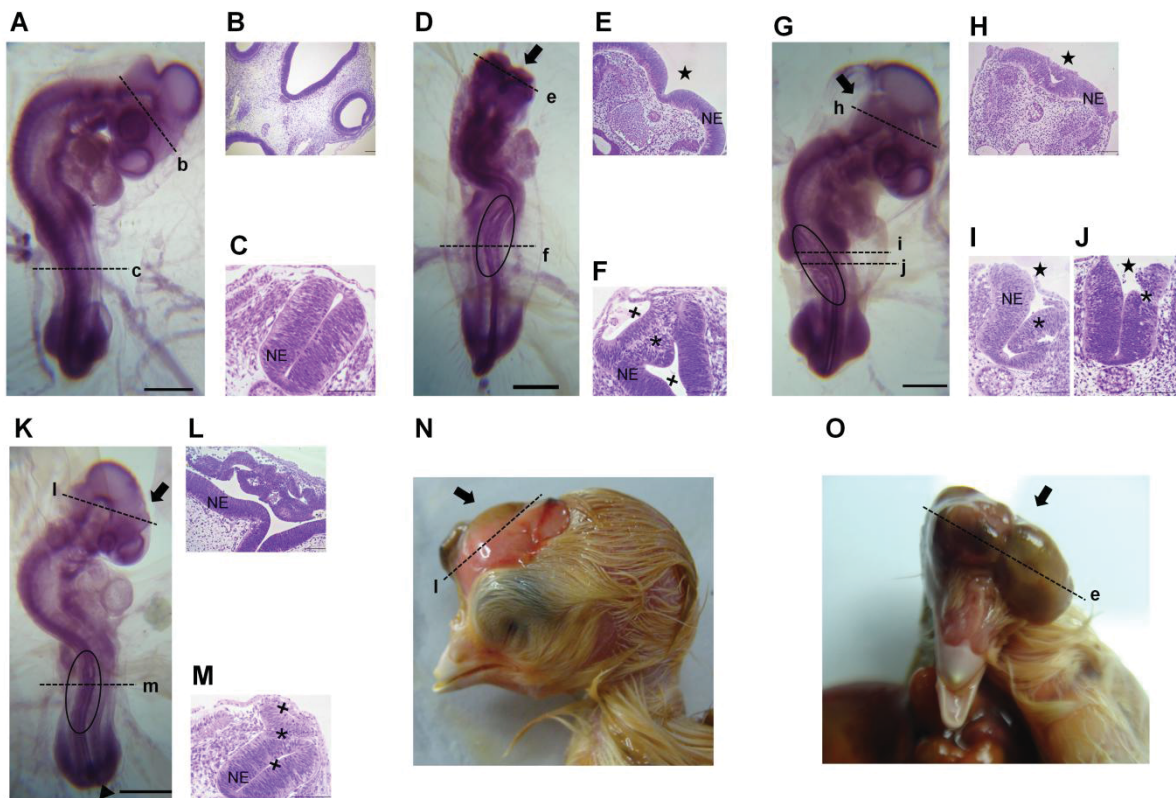
Entre os níveis de PFOA e Cd testados, o que alterou um maior número de parâmetros entre os analisados foi a maior concentração de Cd (5 µg.ml⁻¹), seguida da menor (0,05 µg.ml⁻¹) e média (0,5 µg.ml⁻¹), maior (50 ng.ml⁻¹) e menor (0,5 ng.ml⁻¹) de PFOA, mistura e média de PFOA (5 ng.ml⁻¹). Apesar das concentrações intermediárias de cada um dos contaminantes representarem a média do que é encontrado em humanos, as demais concentrações testadas também são realistas em relação à exposição humana aos contaminantes, pois concentrações equivalentes são encontradas na população humana (ZHANG *et al.*, 2011; LIEN *et al.*, 2013; SAKAMOTO *et al.*, 2013; AL-SALEH *et al.*, 2014; MANZANO-SALGADO *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2016).

O efeito tóxico do PFOA e Cd durante o desenvolvimento embrionário se destaca pelo aparecimento de alterações morfológicas relacionadas ao processo inicial de formação do TN, a neurulação (KMECICK *et al.*, 2019). Nesse estudo caracterizamos histologicamente o comportamento celular e a morfologia tecidual em embriões expostos a esses contaminantes, com estágio definido (HH14 e 18) e indefinido. Devido ao sistema nervoso em desenvolvimento ser alvo da embriotoxicidade desses compostos (KMECICK *et al.*, 2019), uma porcentagem significativa dos embriões foi impossível de

estadiar, devido as extensas alterações observadas, com desorganização corporal e estruturas totalmente aberrantes.

Nossos achados ressaltam a importância da análise morfológica com aplicação de metodologias complementares na caracterização dos efeitos e na busca pelos mecanismos de embriotoxicidade. Na Figura 33 (A-M), estão demonstradas as possíveis alterações correspondentes avaliadas pela técnica de montagem total e pela histologia. Os achados morfológicos são compatíveis com as malformações observadas no TN nas regiões cefálica, do tronco e caudal de embriões expostos ao PFOA (KMECICK *et al.*, 2019) e Cd (YAMAMOTO *et al.*, 2012; KMECICK *et al.*, 2019), avaliados pela técnica de montagem total. Esses resultados histológicos confirmam que os contaminantes podem causar falha no fechamento do tubo neural e outras anomalias estruturais, que culminam em alterações anatômicas ao final do desenvolvimento, como observado nos animais não eclodidos (FIGURA 33 N e O) e comprometem a eclodibilidade, que foi mais baixa nos grupos expostos.

FIGURA 33 – COMPARAÇÃO DAS ALTERAÇÕES OBSERVADAS EM DIFERENTES METODOLOGIAS



Embriões de galinha em estágios iniciais de desenvolvimento, preparados para análise morfológica pela técnica de montagem total (A, D, G, K) e histologia (B, C, E, F, H-J, L, M); Indivíduos não eclodidos (N, O). A-C: Embriões controle. D-O: Embriões expostos. As linhas tracejadas identificadas por letras minúsculas representam o possível nível axial da secção histológica identificada pela letra maiúscula correspondente. Seta: Alteração na região encefálica. Área circulada: Alteração no tubo neural na região do tronco. Cabeça de seta: Alteração na região caudal. NE: Neuroepitélio. Estrela (★): Tubo neural aberto. Asterisco (*): Alteração na forma. Cruz (+): Múltiplos lumens. Fonte: A, D, G, K: Adaptado de Kmecick *et al.* (2019); B, C, E, F, H-J, L, M: A autora (2022); N, O: A autora (2018).

Ainda, a análise histológica, em conjunto com a construção da rede de interação a partir da extração e seleção de dados toxicogenômicos públicos, apontou possíveis mecanismos celulares altamente interconectados envolvidos na teratogenicidade desses compostos.

O controle do número de células é um mecanismo importante para a morfogênese tecidual normal e envolve os processos de proliferação e morte celular por apoptose. A partir da pesquisa na base de dados CTD, encontrou-se evidências de que vias de controle do ciclo celular e apoptose, com envolvimento das proteínas BCL-2, caspase-9 e CDK1, por exemplo, são afetadas pela exposição ao PFOA e ao Cd na espécie *G. gallus*. Esses resultados são corroborados pela literatura, que relata a capacidade do PFOA e do Cd de induzir apoptose em diferentes tipos celulares (ZHOU *et al.*, 2020;

CAO *et al.*, 2021; OU *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2021) e de promover o desbalanço entre os processos de proliferação e apoptose (ZHU *et al.*, 2021; DU *et al.*, 2022).

As alterações teciduais com aumento da espessura das paredes do tubo neural observadas nos embriões expostos ao PFOA e Cd podem estar relacionadas à proliferação celular descontrolada, com o surgimento de um TN hiperplásico (CECCONI *et al.*, 2008). Esse achado, juntamente com a presença de células com características apoptóticas (núcleo fragmentado e picnótico) no neuroepitélio e na região de condensação de células na NS, sugere que esses contaminantes podem estar, de fato, interferindo na regulação desses processos e, estes, estarem envolvidos nas malformações vistas. O controle do ciclo celular no neuroepitélio é essencial para o fechamento do TN, principalmente na região cefálica (GREENE; COPP, 2014), assim como as células apoptóticas, que atuam facilitando a remodelação neuroepitelial e movimentação das demais células (TENG; TOYAMA, 2011). Em estágios iniciais de desenvolvimento, essas células são encontradas nas bordas da ectoderme não neural e do neuroepitélio, durante o fechamento do TN, e na linha média dorsal do TN, após o fechamento (YAMAGUCHI *et al.*, 2011). Entretanto, o aumento ou redução das taxas de proliferação e morte celular podem causar malformações no TN (AVAGLIANO *et al.*, 2015), como observado nesse trabalho. Já na região de ocorrência de neurulação secundária, a presença de células apoptóticas é anormal, pois nesse processo não está envolvida a morte celular programada (GONZALEZ-GOBARTT *et al.*, 2021). Dessa forma, nossos resultados podem ser condizentes com o desenvolvimento normal, porém para confirmar se as alterações no TN envolvem a desregulação dos processos de apoptose e proliferação pela exposição aos contaminantes, análises complementares, como imunomarcação, são necessárias. Ademais, a apoptose apresenta também outras funções durante o desenvolvimento embrionário, como a modelagem de estruturas (ex. coração e dígitos) e a eliminação de células danificadas (FUCHS; STELLER, 2011).

Durante o desenvolvimento embrionário, diversas vias de sinalização são essenciais para garantir a formação adequada do tubo neural, e muitas delas estão interconectadas, como foi observado na análise de rede. Entre elas,

destaca-se a via Wnt canônica/PCP, que também sofre interferência na exposição ao PFOA (SMIRNOVA *et al.*, 2021) e Cd (WEI; SHAIKH, 2017) em outros modelos. Essa via regula, entre outros processos, a extensão convergente da placa neural e a constrição apical das células para que ocorra o dobramento. A extensão convergente molda a placa neural através de forças biomecânicas orquestradas pelo citoesqueleto de actina, que ao interagir com proteínas acessórias (SHINDO *et al.*, 2018), junções celulares e a matriz extracelular (SKOGLUND; KELLER, 2010) promove a migração celular direcionada. Após esse processo, as dobras neurais se elevam para formar os pontos de dobra, que ocorrem pela redução na área da superfície apical das células, causada pela constrição apical de filamentos de actina associados à miosina nas junções apicais e pelo atraso na migração intercinética nuclear (EOM *et al.*, 2011; BUTLER *et al.*, 2019). Alterações nesses eventos envolvendo o citoesqueleto de actina podem impedir que a placa neural se dobre corretamente para o fechamento do tubo, gerando as anormalidades morfológicas presentes nos embriões expostos ao PFOA e Cd. A literatura fundamenta os nossos achados, pois se sabe que ambos os contaminantes afetam a organização dos filamentos de actina, causando disfunções em células em cultura (GE *et al.*, 2019; BEHR *et al.*, 2020). Assim, sugerimos a desorganização do citoesqueleto de actina como um possível mecanismo celular envolvido na embriotoxicidade do PFOA e Cd.

Nesse trabalho, com a utilização da técnica de PAS, foi possível avaliar uma possível redução na deposição de moléculas de matriz extracelular para formação da membrana basal, principalmente no HH18. Essa metodologia é utilizada para demonstração de carboidratos e glicoconjugados, como glicogênio, glicoproteínas e proteoglicanos. A técnica baseia-se na oxidação pelo ácido periódico, de ligações entre átomos de carbono dos carboidratos, formando grupos aldeídos livres. Esses grupos, então, reagem com o reagente de Schiff, gerando um produto de coloração avermelhada (LAYTON; BANCROFT, 2019) que pode ser observada sob o microscópio de luz.

A membrana basal (MB) é um tipo especializado de matriz extracelular, formada por uma rede fibrilar de moléculas como colágeno IV, lamininas e proteoglicanos (POZZI; YURCHENCO; IOZZO, 2017). Essa rede separa a superfície basal dos epitélios dos tecidos subjacentes (ZAGRIS, 2001) e

participa de diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação e migração (KULAR; BASU; SHARMA, 2014). A formação da membrana basal durante o desenvolvimento embrionário é essencial para manter a organização e estabilidade das estruturas (MINER; YURCHENCO, 2004). Na notocorda, a MB é secretada pelas células epiteliais periféricas, enquanto as células centrais formam vacúolos intracelulares que exercem pressão sobre a MB, fornecendo a rigidez e resistência mecânica necessárias (TRAPANI; BONALDO; CORALLO, 2017). Já durante a neurulação, há depósito de colágeno tipo IV ao redor do TN (MOLÈ, 2016). Dessa forma, a exposição ao PFOA e Cd no início do desenvolvimento pode afetar moléculas de matriz extracelular e, assim, interferir na embriogênese normal, pois a laminina e a fibronectina têm papel central no controle da morfogênese neural, atuando sinergicamente para manutenção da polaridade ápico-basal do TN (ARAYA; CARMONA-FONTAINE; CLARKE, 2016). Além disso, a adesão célula-matriz mediada por receptores de matriz extracelular é essencial para a aproximação e contato inicial entre as extremidades da ES e do neuroepitélio para o fechamento do TN (GOODWIN *et al.*, 2017). À medida que as dobras neurais se aproximam, uma membrana basal rica em fibronectina é montada na interface entre o TN e a ES, com a qual as células da ES e do neuroepitélio interagem através de integrinas. Essa interação promove uma adesão transitória entre os epitélios opostos, antes que a adesão celular definitiva seja estabelecida no local da fusão (MOLÈ *et al.*, 2020). Além de mediar o formato das estruturas e proporcionar adesão, a matriz extracelular também regula os processos de proliferação, diferenciação e migração celular (LONG; HUTTNER, 2019).

A maior parte das alterações histológicas observadas no TN dos embriões expostos ao PFOA e ao Cd ocorreu na porção dorsal, na região da placa do teto (*roof plate*). Essa região é especificada durante a padronização dorsoventral do TN, que forma dorsalmente a placa do teto e ventralmente, a do assoalho (*floor plate*), pela indução de proteínas provenientes da ectoderme de superfície (BMPs) e da notocorda (Shh) (GOUTI; METZIS; BRISCOE, 2015). Inicialmente, essas moléculas atuam na linha média dorsal e ventral, respectivamente, formando os centros sinalizadores da placa do teto e do assoalho, que, então passam a também secretar BMPs e Shh (LE DRÉAU; MARTÍ, 2012). Isso gera um gradiente dessas moléculas no eixo dorsoventral

da medula espinhal em desenvolvimento, o que promove proliferação e especificação de progenitores de neurônios motores, sensoriais e interneurônios (SIMÕES-COSTA; BRONNER, 2015; REKLER; KALCHEIM, 2021). Sendo assim, alterações nessa região sinalizadora importante podem interferir na formação de neurônios e causar alterações funcionais, além das anomalias morfológicas encontradas.

As alterações morfológicas observadas nos embriões expostos ao PFOA e Cd podem, também, estar relacionadas a vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} , como evidenciado pela análise de enriquecimento funcional da rede de interação entre moléculas. A homeostase desse íon é essencial para o desenvolvimento embrionário normal e interfere em múltiplas vias. Nesse contexto, o PFOA pode estar modulando os efeitos do Cd por ser capaz de afetar o potencial de membrana (HARADA *et al.*, 2005) e, conseqüentemente, os canais de Ca^{2+} , liberando o íon de reservas intracelulares (LIU *et al.*, 2011). Também, os íons Cd^{2+} podem substituir o Ca^{2+} na ligação a proteínas, como a Ca^{2+} ATPase, inibindo a sua atividade, e interferir na atividade de canais de Ca^{2+} (CHOONG *et al.*, 2014). Já as alterações no equilíbrio do Ca^{2+} podem desencadear apoptose pela via mitocondrial (KLESZCZYŃSKI; SKŁADANOWSKI, 2011; YUAN *et al.*, 2013), interferir na adesão celular (CHOI *et al.*, 2013), perturbar a dinâmica do citoesqueleto (TEMPLETON; LIU, 2013) e alterar a proliferação e migração celular (WANG *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018; PIEROZAN; JERNEREN; KARLSSON, 2018).

Um dos mecanismos mais estudados na toxicidade do PFOA é a ativação de receptores nucleares de proliferação de peroxissomos (PPAR), principalmente do tipo α (LI *et al.*, 2017). Essa família de receptores são fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos no metabolismo e também no desenvolvimento embrionário (ROTMAN *et al.*, 2006), inclusive no fechamento do TN (HIGA *et al.*, 2007). Proteínas envolvidas nas vias ativadas por receptores PPAR são afetadas pela exposição ao PFOA e ao Cd e, dessa forma, podem estar implicadas no mecanismo embriotóxico das alterações observadas no presente trabalho. Já foi demonstrado que os receptores $\text{PPAR}\alpha$ têm papel na toxicidade no desenvolvimento induzida pelo PFOA (ABBOTT *et al.*, 2007). Porém, são necessários mais estudos para

compreender suas funções no desenvolvimento e também investigar seu envolvimento na embriotoxicidade.

A análise histopatológica se mostrou eficiente na caracterização das alterações induzidas pelos contaminantes e proporcionou a discussão sobre os possíveis mecanismos celulares envolvidos nas malformações, corroborados pelos dados toxicogenômicos e a análise de enriquecimento funcional. Apesar de qualitativa, essa análise fornece subsídios para estudos futuros na busca pelos mecanismos de embriotoxicidade e teratogenicidade dos compostos químicos. Além disso, através da elaboração do índice de lesão embrionária, inédito na literatura para embriões no início do desenvolvimento, foi possível quantificar o conjunto de alterações observadas em cada embrião, com a análise de cortes sequenciais alternados dos embriões de galinha inteiros, e comparar os grupos experimentais. Esse índice foi elaborado de acordo com o método desenvolvido por Bernet e colaboradores (1999), que é muito utilizado na Ecotoxicologia (OLIVEIRA *et al.*, 2019; GEMUSSE *et al.*, 2021) e já foi adaptado para diferentes modelos de estudo e órgãos específicos (MELA *et al.*, 2007; BOARETO *et al.*, 2013; LUZIO *et al.*, 2016). No presente estudo, as adaptações foram feitas de acordo com as particularidades de nosso modelo experimental, como as estruturas presentes no embrião nos estádios de desenvolvimento avaliados. O índice se mostrou efetivo para quantificar as alterações nos embriões, mas parece subestimar as deformidades graves encontradas. Dessa forma, sugerimos que outros fatores qualitativos que considerem a magnitude das alterações sejam incorporados, como o nível de gravidade da alteração, para representar a quantidade de células apoptóticas presentes, por exemplo. Outro possível parâmetro a ser ajustado para valorizar esse método e observar resultados mais significativos, é o número amostral, visto que em alguns grupos experimentais os resultados foram próximos aos de resultados significativos, como na mistura no HH14 e HH18.

Com a incubação dos ovos por 21 dias, foi possível observar como as alterações teciduais impactaram na anatomia dos animais, apesar de grande parte não ter eclodido. Entre as alterações observadas nos animais que não eclodiram estão posicionamento embrionário incorreto dentro do ovo e a presença de malformações, como extrusão visceral, encéfalo exposto e alterações no bico, evidenciando a teratogenicidade do PFOA e Cd. O correto

posicionamento embrionário é de extrema importância para que o embrião consiga movimentar a cabeça e realizar a bicagem, bem como impulsionar as pernas para eclodir (TONG *et al.*, 2013). Na posição de nascimento considerada normal, a região dorsal do embrião está paralela ao eixo mais comprido do ovo e o bico fica posicionado embaixo da asa direita, ficando a ponta do bico direcionada para a câmara de ar. Nessa posição, a asa afasta a membrana da casca da face do embrião e proporciona mais liberdade de movimento ao bico. Além disso, a asa ajuda a esticar a membrana interna da casca e auxilia na perfuração dessa membrana pelo bico (ROSS TECH, 2010). O posicionamento embrionário incorreto pode ocorrer e é classificado em 6 tipos (ROSS TECH, 2010) (ANEXO 2). A posição mais frequentemente observada nos embriões expostos ao Cd e PFOA, nesse trabalho, foi aquela em que a cabeça do embrião está voltada para a extremidade menor do ovo. Apesar de já ter sido demonstrado que a posição do ovo na incubação não interfere na eclodibilidade (VAN DE VEN *et al.*, 2011), os manuais de manejo de incubatórios comerciais (COBB-VANTRESS, 2008; ROSS TECH, 2010) descrevem que essa má posição ocorre comumente em ovos incubados com a extremidade menor do ovo para cima e com mais frequência em ovos que foram incubados na posição horizontal quando comparado com os ovos incubados com a câmara de ar para cima. Pode ocorrer também quando a temperatura da incubadora está alta (superior a 38°C) ou quando o ângulo de viragem é pequeno (ROSS TECH, 2010). Porém, todos esses fatores foram levados em conta no momento da incubação sendo que, do 1º ao 3º dia, os ovos foram mantidos com a câmara de ar para cima e do 3º dia em diante mantidos na posição horizontal, com ângulo de viragem de aproximadamente 180°, a cada 20 minutos. Além disso, a temperatura da incubadora foi controlada durante todo o período de incubação e não passou dos 38,5°C, que é adequada para o desenvolvimento normal e eclosão (NOIVA; MENEZES; PELETEIRO, 2014). Assim, sugere-se que a baixa eclodibilidade ocorrida em nossos experimentos não está relacionada às condições de posicionamento dos ovos, da temperatura e umidade da incubadora, da viragem dos ovos e tampouco à presença de malformações, pois sequer os animais controle eclodiram satisfatoriamente. Assim, para avaliar a ação de xenobióticos sobre a eclodibilidade e outros parâmetros em animais eclodidos é necessário um

aprofundamento maior nas práticas de incubação e sua padronização no laboratório.

As malformações na região cefálica, observadas nos animais não eclodidos, são compatíveis com alterações de falha no fechamento do TN, encontradas nos embriões em estágios mais iniciais, evidenciando a progressão das alterações ao longo do desenvolvimento e sua apresentação ao final do desenvolvimento embrionário (FIGURA 33 N e O). Essas alterações dão origem a defeitos no TN, como anencefalia acompanhada ou não de acrania (COPP; STANIER; GREENE, 2013). Já as malformações craniofaciais observadas podem ter sido causadas por alterações nas células da crista neural cefálica, que dão origem a cartilagens e ossos do crânio (SHYAMALA *et al.*, 2015). Espera-se, em breve, confirmar esse ponto, pois há um trabalho em andamento no Laboratório de Embriotoxicologia que investiga os efeitos do PFOA e Cd sobre as células da crista neural cefálica. As alterações de extrusão de vísceras abdominais e do coração observadas neste trabalho são caracterizadas como defeitos na parede do corpo e causadas por fechamento anormal da parede ventral do corpo (SADLER, 2010). Dependendo da região afetada, essas alterações podem levar a *ectopia cordis* e gastrosquise (PREFUMO; IZZI, 2014). Apesar da baixa eclodibilidade também nos grupos controle, ela foi ainda mais baixa nos grupos expostos e é possível que essas anormalidades encontradas tenham comprometido a viabilidade do desenvolvimento e reduzido a eclodibilidade.

Dentre os 7 indivíduos eclodidos, 1 apresentou alteração anatômica na eclosão, uma discreta protrusão de alças intestinais, que foi totalmente revertida de forma natural. Durante o desenvolvimento, o intestino delgado cresce extensivamente e, como em outros amniotas, sofre uma herniação para o cordão umbilical. Essa alça intestinal é contínua com o saco vitelínico e começa a retornar para o abdômen no 17º dia de incubação, porém esse processo só se completa no 19º, quando o remanescente do saco vitelínico também é internalizado (BELLAIRS; OSMOND, 2014). No indivíduo que eclodiu com a parede abdominal aberta é possível que o fechamento tenha sido atrasado, uma vez que se completou durante a primeira semana pós-eclosão.

5. Conclusões

A exposição ao PFOA e Cd foi capaz de induzir aumento na mortalidade, enquanto a mistura não mostrou alterações significativas.

A exposição ao PFOA e Cd foi capaz de induzir a ocorrência de malformações gerais e no TN da região cefálica e tronco-caudal, principalmente nos primeiros dias, quando a presença de embriões com estágio indefinido foi significativa. A mistura também induziu malformações durante todo o período avaliado. Em alguns parâmetros houve um efeito concentração dependente sutil, sendo observado principalmente para o Cd.

O PFOA e Cd causaram alterações na morfologia tecidual, principalmente no tubo neural, como alterações na forma, presença de células no lúmen, células apoptóticas no neuroepitélio e falha no fechamento. Os compostos também interferem na membrana basal mostrando uma redução nesse componente tecidual.

O índice elaborado para avaliação histopatológica de embriões de galinha em estágios iniciais de desenvolvimento compilou as alterações teciduais observadas, quantificando o nível de dano.

O PFOA e Cd interferem na expressão de componentes de vias importantes ao desenvolvimento embrionário, tais como apoptose, controle do ciclo celular, adesão e dinâmica do citoesqueleto de actina, sugerindo que estão relacionadas aos mecanismos celulares das alterações encontradas.

Nos indivíduos incubados por 21 dias (eclodidos e não eclodidos) foram observadas alterações anatômicas compatíveis com as malformações encontradas nos embriões em estágios mais iniciais, evidenciando a progressão das alterações ao longo do desenvolvimento e sua apresentação ao final do desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, B. D.; WOLF, C. J.; SCHMID, J. E.; DAS, K.; ZEHR, R.; HELFANT, L.; NAKAYAMA, S.; LINDSTROM, A. B.; STRYNAR, M. J.; LAU, C. S. Perfluorooctanoic acid (PFOA)-induced developmental toxicity in the mouse is dependent on expression of peroxisome proliferator activated receptor-alpha (PPAR- α). **Toxicological Sciences**, v. 98, n. 2, p. 541-581, 2007.
- ALEKSANDROWICZ, E.; HERR, I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. **Altex**, v. 32, n. 2, p. 143-147, 2015.
- AL-SALEH, I.; SHINWARI, N.; MASHHOUR, A.; MOHAMED, G. E. D.; RABAH, A. Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, p. 79-101, 2011.
- AL-SALEH, I.; SHINWARI, N.; MASHHOUR, A.; RABAH, A. Birth outcome measures and maternal exposure to heavy metals (lead, cadmium and mercury) in Saudi Arabian population. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 2017, n. 2-3, p. 205-218, 2014.
- ALWAN, S.; CHAMBERS, C. D. Identifying Human Teratogens: An Update. **Journal of Pediatric Genetics**, v. 4, n. 2, p. 39-41, 2015.
- AMADI, C. N.; IGWEZE, Z. N.; ORISAKWE, O. E. Heavy metals in miscarriages and stillbirths in developing nations. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 22, n. 2, p. 91-100, 2017.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; ARES, I.; MARTÍNEZ, M. A. Drugs and chemical contaminants in human breast milk. In: Gupta, R. C. (Ed). **Reproductive and Developmental Toxicology**. 3 ed. Cambridge: Academic Press, 2022. p. 1019-1052.
- ARAYA, C.; CARMONA-FONTAINE, C.; CLARKE, J. D. W. Extracellular matrix couples the convergence movements of mesoderm and neural plate during the early stages of neurulation. **Developmental Dynamics**, v. 245, n. 5, p. 580-589, 2016.
- ATSDR - Agency for toxic substances & disease registry. The ATSDR 2019 Substance Priority List. Disponível em <<https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2019spl>> Acesso em 21/03/2022.
- AVAGLIANO, L.; DOI, P.; TOSI, D.; SCAGLIOTTI, V.; GUALTIERI, A.; GASTON-MASSUET, C.; PISTOCCHI, A.; GALLINA, A.; MARCONI, A. M.; BULFAMANTE, G.; MASSA, V. Cell death and cell proliferation in human spina bifida. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 106, n. 2, p. 104-113
- BARN, P.; GOMBOJAV, E.; OCHIR, C.; BOLDBAATAR, B.; BEEJIN, B.; NAIDAN, G.; GALSUREN, J.; LEGTSEG, B.; BYAMBAA, T.; HUTCHEON, J. A.; JANES, C.; JANSSEN, P. A.; LANPHEAR, B. P.; MCCANDLESS, L. C.; TAKARO, T. K.; VENNERS, S. A.; WEBSTER, G. M.; PALMER, C. D.;

PARSONS, P. J.; ALLEN, R. W. Coal smoke, gestational cadmium exposure, and fetal growth. **Environmental Research**, v. 179, 2019.

BEHR, A. C.; KWIATKOWSKI, A.; STÅHLMAN, M.; SCHMIDT, F. F.; LUCKERT, C.; BRAEUNING, A.; BUHRKE, T. Impairment of bile acid metabolism by perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in human HepaRG hepatoma cells. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 1673–1686, 2020.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. The Atlas of Chick Development. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2014.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BJÖRVANG, R. D.; VINNARS, M. – T.; PAPADOGIANNAKIS, N.; GIDLÖF, S.; MAMSEN, L. S.; MUCS, D.; KIVIRANTA, H.; RANTAKOKKO, P.; RUOKOJÄRVI, P.; LINDH, C. H.; ANDERSEN, C. Y.; DAMDIMOPOULOU, P. Mixtures of persistent organic pollutants are found in vital organs of late gestation human fetuses. **Chemosphere**, v. 283, 131125, 2021.

BOARETO, A. C.; MÜLLER, J. C.; LOURENÇO, E. L. B.; LOMBARDI, N.; LOURENÇO, A. C.; RABITTO, I.; DE MORAIS, R. N.; RIOS, F. S.; DALSENTER, P. R. Effects of the combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rat embryos. **Human & Experimental Toxicology**, 2013.

BUCK, R. C.; FRANKLIN, J.; BERGER, U.; CONDER, J. M.; COUSINS, I. T.; DE VOOGT, P.; JENSEN, A. A.; KANNAN, K.; MABURY, S. A.; VAN LEEUWEN, S. P. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 4, p. 513-41, 2011.

BUREŠ, M. S.; CVETNIĆ, M.; MILOLOŽA, M.; KUČIĆ GRGIĆ, D.; MARKIĆ, M.; KUŠIĆ, H.; BOLANČA, T.; ROGOŠIĆ, M.; UKIĆ, Š. Modeling the toxicity of pollutants mixtures for risk assessment: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, p. 1629-1655, 2021.

BURRIS, T. P. PPAR ligands make memories. **Nature Chemical Biology**, v. 12, p. 993-994, 2016.

BUTLER, M. B.; SHORT, N. E.; MANIOU, E.; ALEXANDRE, P.; GREENE, N. D. E. E.; COPP, A. J.; GALEA, G. L. Rho kinase-dependent apical constriction counteracts M-phase apical expansion to enable mouse neural tube closure. **Journal of Cell Science**, v. 132, n. 13, 2019.

CALABRESE, E. J. Hormesis: a fundamental concept in biology. **Microbial Cell**, v. 1, n. 5, p. 145-149, 2014.

CAO, X. FU, M.; BI, R.; ZHENG, X.; FU, B.; TIAN, S.; LIU, C.; LI, Q.; LIU, J. Cadmium induced BEAS-2B cells apoptosis and mitochondria damage via MAPK signaling pathway. **Chemosphere**, v. 263, 128346, 2021.

CARVALHO, M. C.; NAZARI, E. M.; FARINA, M.; MÜLLER, Y. M. R. Behavioral, Morphological, and Biochemical Changes after *In Ovo* Exposure to Methylmercury in Chicks. **Toxicological Sciences**, v. 106, n. 1, p. 180-185, 2008.

CAS - Chemical Abstract Service - A division of the American Chemical Society. Disponível em <<http://www.cas.org/>>. Acesso em 20/03/2022.

CATALA, M. Overview of Secondary Neurulation. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 64, n. 3, p. 346-358, 2021.

CECCONI, F.; PIACENTINI, M.; FIMIA, G. M. The involvement of cell death and survival in neural tube defects: a distinct role for apoptosis and autophagy? **Cell Death and Differentiation**, v. 15, p. 1170-1170, 2008.

CHEN, Q.; HUANG, R.; HUA, L.; GUO, Y.; HUANG, L.; ZHAO, Y.; WANG, X.; ZHANG, J. Prenatal exposure to perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances and childhood atopic dermatitis: a prospective birth cohort study. **Environmental Health**, v. 17, n. 8, 2018.

CHOI, S.-K.; KIM, J.-H.; PARK, J.-K.; LEE, K.-M.; KIM, E.; JEON, W.B. Cytotoxicity and inhibition of intercellular interaction in N2a neurospheroids by perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 520–529, 2013

CHOONG, G.; LIU, Y.; TEMPLETON, D.M. Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 211, p. 54–65, 2014.

COBB-VANTRESS. **Guia de Manejo de Incubação**. 2008. Disponível em <<https://cobb-guides.s3.amazonaws.com/4ba5c8b0-bcb4-11e6-bd5d-55bb08833e29.pdf>>. Acesso em 01/05/2017.

COLAS, J-F.; SCHOENWOLF, G.C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. **Developmental Dynamics**, v. 221, n. 2, p. 117-145, 2001.

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. 2015.

CONLEY, J. M.; RICHARDS, S. M. Teratogenesis. In: JØRGENSEN, S. E.; FATH, B. D. **Encyclopedia of Ecology**. Elsevier, 2008. p. 3528-3536.

CONSONNI, D.; SINDACO, R.; BERTAZZI, P. A. Blood levels of dioxins, furans, dioxin-like PCBs, and TEQs in general populations: A review, 1989–2010. **Environment International**, volume 44, p. 151-162, 2012.

COPP, A. J.; STANIER, P.; GREENE, N. D. E. Neural tube defects: recent advances, unsolved questions and controversies. **Lancet Neurology**, v. 12, p. 799-810, 2013.

COSTA, L. G.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. P. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 87-110, 2004.

CROWE, A. R.; YUE, W. Semi-quantitative Determinations of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. **Bio-protocol**, v. 9, n. 24, e3465, 2019.

DA COSTA, M. C. V.; KMECICK, M.; DE FREITAS, P. F.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Lead exposure affects cephalic morphogenesis and neural crest cells in *Gallus gallus* embryo. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 84, 106948, 2021.

DARROW, L. A.; HOWARDS, P. P.; WINQUIST, A.; STEENLAND, K. PFOA and PFOS serum levels and miscarriage risk. **Epidemiology**, v. 25, n. 4, p. 505-512, 2014.

DASU, K.; XIA, X.; SIRIWARDENA, D.; KLUPINSKI, T. P.; SEAY, B. Concentration profiles of per- and polyfluoroalkyl substances in major sources to the environment. **Journal of Environmental Management**, v. 301, 113879, 2022.

DOMINGO, J. L.; NADAL, M. Human exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) through drinking water: A review of the recent scientific literature. **Environmental Research**, v. 177, 108648, 2019.

DRÉAU, G. L.; MARTÍ, E. Dorsal-ventral patterning of the neural tube: a tale of three signals. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 12, p. 1471-1481, 2012.

DU, Y.; CAI, Z.; ZHOU, G.; LIANG, W.; MAN, Q.; WANG, W. Perfluorooctanoic acid exposure increases both proliferation and apoptosis of human placental trophoblast cells mediated by ER stress-induced ROS or UPR pathways. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 236, 113508, 2022.

EOM, D. S.; AMARNATH, S.; FOGEL, J. L.; AGARWALA, S. Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway. **Development**, v. 138, 3179, 2011.

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.

FRIEDMAN, J. M. The principles of teratology: are they still true? *Birth Defects Research Part A Clinical and Molecular Teratology*, v. 88, p. 766–768, 2010.

FRITSCHÉ, E.; GRANDJEAN, P.; CROFTON, K. M.; ASCHNER, M.; GOLDBERG, A.; HEINONEN, T.; HESSEL, E. V. S.; HOGBERG, H. T.; BENNEKOU, S. H.; LEIN, P. J.; LEIST, M.; MUNDY, W. R.; PAPARELLA, M.; PIERSMA, A. H.; SACHANA, M.; SCHMUCK, G.; SOLECKI, R.; TERRON, A.; MONNET-TSCHUDI, F.; WILKS, M. F.; WITTERS, H.; ZURICH, M. G.; BAL-PRICE, A. Consensus statement on the need for innovation, transition and

implementation of developmental neurotoxicity (DNT) testing for regulatory purposes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 354, n. 3-6, 2018.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 742-458, 2011.

GE, Y.; SONG, X.; CHEN, L.; HU, D.; HUA, L.; CUI, Y.; LIU, J.; AN, Z.; YIN, Z.; NING, H. Cadmium induces actin cytoskeleton alterations and dysfunction in Neuro-2a cells. **Environmental Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 469-475, 2019.

GEMUSSE, S. L.; FOLLE, N. M. T.; SOUZA, A. T. C.; AZEVEDO-LINHARES, M.; FILIPAK NETO, F.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; GARCIA, J. R. E.; ESQUIVEL, L.; SILVA, C. P.; CAMPOS, S. X.; MARTINS, C. C.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Micropollutants impair the survival of *Oreochromis niloticus* and threat local species from Iguaçu River, Southern of Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 83, 103596, 2021.

GLÜGE, J.; SCHERINGER, M.; COUSINS, I. T.; DEWITT, J. C.; GOLDENMAN, G.; HERZKE, D.; LOHMANN, R.; NG, C. A.; TRIER, X.; WANG, Z. An overview of the uses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 22, p. 2345-2373, 2020.

GOMES, C. **Modelo de malária experimental na gestação como ferramenta para avaliação de embriotoxicidade do artesanato**. 120 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

GOMES, J. A.; OLSTAD, E. W.; KOWALSKI, T. W.; GERVIN, K.; VIANNA, F.; SALES, L.; SCHÜLER-FACCINI, L.; NORDENG, H. M. E. Genetic Susceptibility to Drug Teratogenicity: A Systematic Literature Review. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 2021.

GONZÁLEZ SANTANDER, R.; MARTÍNEZ CUADRARO, G.; GONZÁLEZ-SANTANDER MARTÍNEZ, M.; MONTEAGUDO, M.; MARTÍNEZ ALONSO, F. J.; TOLEDO LOBO, M.V. The Use of Different Fixatives and Hydrophilic Embedding Media (Historesin and Unicryl) for the Study of Embryonic Tissues. **Microscopy Research and Technique**, v. 36, p. 151-158, 1997.

GONZALEZ-GOBARTT, E.; BLANCO-AMEIJEIRAS, J.; USIETO, S.; ALLIO, G.; BENAZERAF, B.; MARTI, E. Cell intercalation driven by SMAD3 underlies secondary neural tube formation. **Developmental Cell**, v. 26, p. 1147-1163, 2021.

GOODWIN, K.; LOSTCHUCK, E. E.; CRAMB, K. M. L.; ZULUETA-COARASA, T.; FERNANDEZ- GONZALEZ, R.; TANENTZAPF, G. Cell-cell and cell-extracellular matrix adhesions cooperate to organize actomyosin networks and maintain force transmission during dorsal closure. **Molecular Biology of the Cell**, v. 28, p. 1301–1310, 2017.

GOUTI, M.; METZIS, V.; BRISCOE, J. The route to spinal cord cell types: a tale of signals and switches. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 6, 2015.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Neurobehavioral effects of developmental toxicity. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 3, p. 330-338, 2014.

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

GREENE, N. D. E.; COPP, A. J. Neural Tube Defects. **Annual Reviews in Neuroscience**, v. 37, p. 221-242, 2014.

HAGENAARS, A.; VERGAUWEN, L.; COEN, D. D.; KNAPEN, D. Structure-activity relationship assessment of four perfluorinated chemicals using a prolonged zebrafish early life stage test. **Chemosphere**, v. 82, n. 5, 764-772, 2011.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology*, v. 88, n. 1, p. 231-272, 1951.

HAN, W.; GAO, Y.; YUAN, T.; WANG, Y.; ZHAO, S.; SHI, R.; BONEFELD-JORGENSEN, E. C.; SHEN, X.; TIAN, Y. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in matched parental and cord serum in Shandong, China. **Environment International**, v. 116, p. 206-213, 2018.

HANSSSEN, L.; DURAREV, A. A.; HUBER, S.; ODLAND, J. O.; NIEBOER, E.; SANDANGER, T. M. Partition of perfluoroalkyl substances (PFASs) in whole blood and plasma, assessed in maternal and umbilical cord samples from inhabitants of arctic Russia and Uzbekistan. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 430-437, 2013.

HARADA, K.; XU, F.; ONO, K.; IJIMA, T.; KOIZUMI, A. Effects of PFOS and PFOA on L-type Ca^{2+} currents in guinea-pig ventricular myocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329, n. 2, p. 487-494, 2005.

HEYS, K. A.; SHORE, R. F.; GLÓRIA PEREIRA, M.; JONES, K. C.; MARTIN, F. L. Risk assessment of environmental mixture effects. **Royal Society of Chemistry Advances**, n. 6, p. 47844-47857, 2016.

HIGA, R.; GONZÁLEZ, E.; PUSTOVRH, M. C.; WHITE, V.; CAPOBIANCO, E.; MARTÍNEZ, N.; JAWERBAUM, A. PPAR α and its activator PGI $_2$ are reduced in diabetic embryopathy: involvement of PPAR α activation in lipid metabolic and signalling pathways in rat embryo early organogenesis. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 2, p. 103-110, 2007.

IRIE, N.; KURATANI, S. Comparative transcriptome analysis reveals vertebrate phylotypic period during organogenesis. **Nature Communications**, v. 2, n. 248, 2011.

KABAMBA, M.; TUAKUILA, J. Toxic metal (Cd, Hg, Mn, Pb) partition in the maternal/fetal unit: A systematic mini — review of recent epidemiological studies. **Toxicology letters**, v. 322, p. 20-26, 2020.

KABAT, A. P.; BLACKBURN, T. M.; MCKECHNIE, A. E.; BUTLER, P. J. Phylogenetic analysis of the allometric scaling of therapeutic regimes for birds. **Journal of Zoology**, v. 275, n. 4, p. 359-367, 2008.

KIECKER, C. The chick embryo as a model for the effects of prenatal exposure to alcohol on craniofacial development. **Developmental Biology**, v. 415, n. 2, p. 314-325, 2016.

KIM, M.; SON, J.; PARK, M. S.; JI, Y.; CHAE, S.; JUN, C.; BAE, J.-S.; KWON, T. K.; CHOO, Y.-S.; YOON, H.; YOON, D.; RYOO, J., KIM, S.-H.; PARK, M.-J.; LEE, H.-S. In vivo evaluation and comparison of developmental toxicity and teratogenicity of perfluoroalkyl compounds using *Xenopus* embryos. **Chemosphere**, v. 93, p. 1153-1160, 2013.

KLESZCZYŃSKI, K.; SKŁADANOWSKI, A.C. Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids. III. Disturbance in Ca²⁺ homeostasis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 251, p. 163-168, 2011.

KMECICK, M.; VIEIRA DA COSTA, M.C.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Morphological evidence of neurotoxic effects in chicken embryos after exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) and inorganic cadmium. **Toxicology**, v. 427, 152286, 2019.

KORN, M. J.; CRAMER, K. S. Windowing Chicken Eggs for Developmental Studies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 8, e306, 2007.

KOTTHOFF, M.; MÜLLER, J.; JÜRLING, H.; SCHLUMMER, M.; FIEDLER, D.. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in consumer products. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 19, p. 14546–14559, 2015.

KULAR, J. K.; BASU, S.; SHARMA, R. I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering**, v. 5, 2014.

KURTH, T.; WEICHE, S.; VORKEL, D.; KRETSCHMAR, S.; MENGE, A. Histology of Plastic Embedded Amphibian Embryos and Larvae. **Genesis**, v. 50, n. 3, p. 235-250, 2012.

LAWSON, A.; SCHOENWOLF, G. C. Neurulation. In: SQUIRE, L. R (Ed). **Encyclopedia of Neuroscience**. Amsterdam: Academic Press, 2009, p. 1107-1113.

LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. Carbohydrates. In: SUVARNA, S. K.; LAYTON, C., BANCROFT, J. D. editors. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th ed. Amsterdam: Elsevier; 2019. pp. 176-197.

LE DRÉAU, G.; MARTÍ, E. Dorsal-ventral patterning of the neural tube: a tale of three signals. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 12, p. 1471-1481, 2012.

LEE, W. C.; FISHER, M.; DAVIS, K.; ARBUCKLE, T. E.; SINHA, S. K. Identification of chemical mixtures to which Canadian pregnant women are

exposed: The MIREC Study. **Environment International**. v. 99, p. 321-330, 2017.

LEE, Y. J.; KIM, M-K.; BAE, J.; YANG, J-H. Concentrations of perfluoroalkyl compounds in maternal and umbilical cord sera and birth outcomes in Korea. **Chemosphere**, v. 90, p. 1603-1609, 2013.

LI, A.; ZHUANG, T.; SHI, J.; LIANG, Y.; SONG, M. Heavy metals in maternal and cord blood in Beijing and their efficiency of placental transfer. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 89, p. 99-106, 2019.

LI, K.; GAO, P.; XIANG, P.; ZHANG, X.; CUI, X.; MA, L. Q. Molecular mechanisms of PFOA-induced toxicity in animals and humans: Implications for health risks. **Environment International**, v. 99, p. 43-54, 2017.

LI, X.; BAO, C.; MA, Z.; XU, B.; LIU, X.; YING, X.; ZHANG, X. Perfluorooctanoic acid stimulates ovarian cancer cell migration, invasion via ERK/NF- κ B/MMP-2/-9 pathway. **Toxicology. Letters**, v. 294, p. 44–50, 2018.

LIEN, G-W.; HUANG, C-C.; WU, K-Y.; CHEN, M-H.; LIN, C-Y.; CHEN, C-Y.; HSIEH, W-S.; CHEN, P-C. Neonatal-maternal factors and perfluoroalkyl substances in cord blood. **Chemosphere**, v. 92, p. 843-850, 2013.

LIU, X., JIN, Y., LIU, W., WANG, F., HAO, S. Possible mechanism of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate on the release of calcium ion from calcium stores in primary cultures of rat hippocampal neurons. **Toxicology In Vitro**, v. 25, p. 1294–1301, 2011.

LONG, K. R; HUTTNER, W. B. How the extracellular matrix shapes neural development. **Open Biology**, v. 9, 180216, 2019.

LUZIO, A.; MONTEIRO, S. M.; ROCHA, E.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. A.; COIMBRA, A. M. Development and recovery of histopathological alterations in the gonads of zebrafish (*Danio rerio*) after single and combined exposure to endocrine disruptors (17 α -ethinylestradiol and fadrozole). **Aquatic Toxicology**, v. 175, p. 90–105, 2016.

MANZANO-SALGADO, C. B.; CASAS, M.; LOPEZ-ESPINOSA, M-J.; BALLESTER, F.; BASTERRECHEA, M.; GRIMALT, J. O.; JIMÉNEZ, A-M.; KRAUS, T.; SCHETTGEN, T.; SUNYER, J.; VRIJHEID, M. Transfer of perfluoroalkyl substances from mother to fetus in a Spanish birth cohort. **Environmental Research**, v. 142, p. 471-478, 2015.

MATHIESEN, L.; BUERKI-THURNHERR, T.; PASTUSCHEK, J.; AENGENHEISTER, L.; KNUDSEN, L. E. Fetal exposure to environmental chemicals; insights from placental perfusion studies. **Placenta**, v. 106, p. 58-66, 2021.

MATT, G. E.; QUINTANA, P. J. E.; HOH, E.; DODDER, N. G.; MAHABEE-GITTENS, E. M.; PADILLA, S.; MARKMAN, L.; WATANABE, K. Tobacco smoke is a likely source of lead and cadmium in settled house dust. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 63, 126656, 2021.

MELA, M.; RANDI, M. A. F.; VENTURA, D. F.; CARVALHO, C. E. V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, p. 426-435, 2007.

MINER, J. H.; YURCHENCO, P. D. Laminin functions in tissue morphogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, p. 255-284, 2004.

MOK, G. F.; ALREFAEI, A. F.; MCCOLL, J.; GROCCOTT, T.; MÜNSTERBERG, A. Chicken as a Developmental Model. In: **Encyclopedia of Life Sciences (eLS)**. Chichester: John Wiley & Sons, 2015. p. 1-8.

MOLÈ, M. A. **Cell dynamics and cell-matrix interactions during neural tube closure**. 182 f. Thesis (PhD in Developmental Biology & cancer). Developmental Biology, UCL Great Ormond Street Institute of Child health, 2016.

MÜLLER, Y. M. R.; RIVERO, L. B. D.; CARVALHO, M. C.; KOBUS, K.; FARINA, M.; NAZARI, E. M. Behavioral impairments related to lead-induced developmental neurotoxicity in chicks. **Archives of Toxicology**, v. 82, p. 445-451, 2008.

NEEDHAM, L. L.; GRANDJEAN, P.; HEINZOW, B.; JØRGENSEN, P. J.; NIELSEN, F.; PATTERSON JR, D. G.; SJÖDIN, A.; TURNER, W. E.; WEIHE, P. Partition of Environmental Chemicals between Maternal and Fetal Blood and Tissues. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 1121–1126, 2011.

NOIVA, R. M.; MENEZES, A. C.; PELETEIRO, M. C. Influence of temperature and humidity manipulation on chicken embryo development. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 234, 2014.

NOLAN, L. A.; NOLAN, J. M.; SHOFER, F. S.; RODWAY, N. V.; EMMETT, E. A. Congenital anomalies, labor/delivery complications, maternal risk factors and their relationship with perfluorooctanoic acid (PFOA)-contaminated public drinking water. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 147-155, 2010.

NWEKE, C. O.; OGBONNA, C. J. Statistical models for biphasic dose-response relationships (hormesis) in toxicological studies. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 12, n. 1, p. 39-55, 2017.

OLIVEIRA, F. G.; LIROLA, J. R.; SALGADO, L. D.; DE MARCHI, G. H.; PADIAL, A. A.; GUIMARÃES, A. T. B.; CESTARI, M. M.; ASSIS, H. C. S. Toxicological effects of anthropogenic activities in *Geophagus brasiliensis* from a coastal river of southern Brazil: A biomarker approach. **Science of The Total Environment**, v. 667, p. 371-383, 2019.

OU, L.; WANG, H.; WU, Z.; WANG, P.; YANG, L., LI, X.; SUN, K.; ZHU, X.; ZHANG, R. Effects of cadmium on osteoblast cell line: Exportin 1 accumulation, p-JNK activation, DNA damage and cell apoptosis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, 111668, 2021.

PÉREZ, F.; NADAL, M.; NAVARRO-ORTEGA, A.; FÀBREGA, F.; DOMINGO, J. L.; BARCELÓ, D.; FARRÉ, M. Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. **Environment International**, v. 59, p. 354-362, 2013.

PICÓ, Y.; FARRÉ, M.; LLORCA, M.; BARCELÓ, D. Perfluorinated Compounds in Food: A Global Perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 7, 2011.

PIEROZAN, P.; JERNEREN, F.; KARLSSON, O. Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure promotes proliferation, migration and invasion potential in human breast epithelial cells. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 5, p. 1729-1739, 2018.

POZZI, A.; YURCHENCO, P. D.; IOZZO, R. V. The nature and biology of basement membranes. **Matrix Biology**, v. 57-58, p. 1-11. 2017.

POZZI, A.; YURCHENCO, P. D.; IOZZO, R. V. The nature and biology of basement membranes. **Matrix Biology**, v. 57-58, p. 1-11. 2017.

PREFUMO, F.; IZZI, C. Fetal abdominal wall defects. **Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 28, n. 3, p. 391-402, 2014.

RAHIMZADEH, M. R.; RAHIMZADEH, M. R.; KAZEMI, S.; MOGHADAMNIA, A. A. Cadmium toxicity and treatment: An update. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 8, n. 3, p. 135-145, 2017.

REKLER, D.; KALCHEIM, C. From Neural Crest to Definitive Roof Plate: The Dynamic Behavior of the Dorsal Neural Tube. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, 3911, 2021.

RIDER, C. V.; DINSE, G. E.; UMBACH, D. M.; SIMMONS, J. E.; HERTZBERG, Predicting mixture toxicity with models of additivity. In: Rider, C.V.; Simmons, J. E. (Eds.). **Chemical Mixtures and Combined Chemical and Nonchemical Stressors**. Springer, Cham, 2018.

ROSS TECH. **Como investigar as práticas de incubação**. 2010. Disponível em http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/Ross-Tech-SET-2010.pdf>. Acesso em 24/10/2018.

ROTMAN, N.; MICHALIK, L.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. PPARs in fetal and early postnatal development. **Advances in Developmental Biology**, v. 16, p. 33-64, 2006.

SADLER, T. W. The embryonic origin of ventral body wall defects. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 19, n. 3, p. 209-214, 2010.

SAKAMOTO, M.; YASUTAKE, A.; DOMINGO, J.L.; CHAN, H. M.; KUBOTA, M.; MURATA, K. Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: Potential use as indicators for prenatal exposure. **Environment International**, v. 60, p. 106-111, 2013.

SAVITZ, D. A.; STEIN, C. R.; BARTER, S. M.; ELSTON, B.; GONG, J.; SHIN, H. – M.; WELLENIUS, G. A. Perfluorooctanoic Acid Exposure and Pregnancy Outcome in a Highly Exposed Community. **Epidemiology**, v. 23, n. 3, 386-392, 2012.

SCHOENWOLF, G. C. Contributions of the chick embryo and experimental embryology to understanding the cellular mechanisms of neurulation. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 62, n. 1-2-3, p. 49-55, 2018.

SCHOENWOLF, G. C. **Laboratory Studies of Vertebrate and Invertebrate Embryos**. 8 ed. Prentice Hall, 2001.

SCHOENWOLF, G. C.; MATHEWS, W. W. **Atlas of Descriptive Embryology**. 6 ed. Pearson Education, 2003.

SHARIAT, S. Z. A. S.; RASTQAR, A.; JABBARI, M.; TAHERI, M.; KESHVARI, M. Cadmium Concentration in Cigarette Brands, Tobacco Leaves, and Smokers' Blood Samples. **Herbal Medicines Journal**, v. 4, n. 1, p. 11-17, 2019.

SHARMA, V.; MCNEILL, J. H. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 6, p. 907-921, 2009.

SHINDO, A. Models of convergent extension during morphogenesis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 7, n. 1, p. 293-310, 2018.

SHYAMALA, K.; YANDURI, S.; GIRISH, H. C.; MURGOD, S. Neural crest: the fourth germ layer. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v.19, n. 2, p. 221-229, 2015.

SIMÕES-COSTA, M.; BRONNER, M. E. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. **Development**, v. 142, n. 2, p. 242–257, 2015.

SKOGLUND, P.; KELLER, R. Integration of Planar Cell Polarity and ECM Signaling in Elongation of the Vertebrate Body Plan. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 5, p. 589-596, 2010.

SMIRNOVA, A.; MENTOR, A.; RANEFALL, P.; BORNEHAG, C-G.; BRUNSTRÖM, B.; MATTSSON, A.; JÖNSSON, M. Increased apoptosis, reduced Wnt/ β -catenin signaling, and altered tail development in zebrafish embryos exposed to a human-relevant chemical mixture. **Chemosphere**, v, 264, n. pt1, p. 128467, 2021.

SORKUN, H. C.; BIR, F.; AKBULUT, M.; DIVRIKLI, U.; ERKEN, G.; DEMIRHAN, H.; DUZCAN, E.; ELCI, L.; CELIK, I.; YOZGATLI, U. The effects of air pollution and smoking on placental cadmium, zinc concentration and metallothionein expression. **Toxicology**, v. 238, n. 1, p. 15-22, 2007.

STEENLAND, K.; FLETCHER, T.; STEIN, C. R.; BARTELL, S. M.; CARROW, L.; LOPEZ-ESPINOSA, M. – J.; RYAN, P. B.; SAVITZ, D. A. Review: Evolution of evidence on PFOA and health following the assessments of the C8 Science Panel. **Environment International**, v. 145, 16125, 2020.

STEIN, C. R.; SAVITZ, D. A.; ELSTON, B.; THORPE, P. G.; GILBOAC, S. M. Perfluorooctanoate exposure and major birth defects. **Reproductive Toxicology**, v. 47, p. 15-20, 2014.

STERN, C. D. The Chick: A Great Model System Commentary Becomes Even Greater. **Developmental Cell**, v. 9, p. 9-17, 2005.

STOJSAVLJEVIC, A.; ROVCANIN, M.; MIKOVIC, Z.; PEROVIC, M.; JEREMIC, A.; ZECEVIC, N.; MANOJLOVIC, D. Analysis of essential, toxic, rare earth, and noble elements in maternal and umbilical cord. **Environmental Science and Pollution Research**, 2022.

STRUNGARU, S. A.; PLAVAN, G.; NICOARA, M. A short overview about cadmium and its toxicity focused on humans, bioindicators and model organisms. **Journal of Survey in Fisheries Sciences**, v. 2, n. 2, p. 1-15, 2016.

TANG, M., XU, C., LIN, N., LIU, K., ZHANG, Y., YU, X., LIU, W. Lead, mercury, and cadmium in umbilical cord serum and birth outcomes in Chinese fish consumers. **Chemosphere**, v. 148, p. 270-275, 2016.

TEMPLETON, D. M.; LIU, Y. Effects of cadmium on the actin cytoskeleton in renal mesangial cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 91, n. 1, p. 1–7, 2013.

TENG, X.; TOYAMA Y. Apoptotic force: active mechanical function of cell death during morphogenesis. **Development Growth & Differentiation**, v. 53, p. 269-276, 2011.

TONG, Q.; ROMANINI, C. E.; EXADAKTYLOS, V.; BAHR, C.; BERCKMANS, D.; BERGOU, H.; ETERRADOSSI, N.; ROULSTON, N.; VERHELST, R.; MCGONNELL, I. M.; DEMMERS, T. Embryonic development and the physiological factors that coordinate hatching in domestic chickens. **Poultry Science**, v. 92, p. 620-628, 2013.

TRAORÉ, T.; FORHAN, A.; SIROT, V.; KADAWATHAGEDARA, M.; HEUDE, B.; HULIN, M.; DE LAUZON-GUILLAIN, B.; BOTTON, J.; CHARLES, M. A.; CRÉPET, A. To which mixtures are French pregnant women mainly exposed? A combination of the second French total diet study with the EDEN and ELFE cohort studies. **Food and Chemical Toxicology: An international journal published for the British Industrial Biological Research Association**. v. 111, p. 310-328, 2018.

TRAPANI, V.; BONALDO, P.; CORALLO, D. Role of ECM in notochord formation, function and disease. **Journal of Cell Science**, v. 130, p. 3203-3211, 2017.

VAISERMAN, A. Early-life Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and Later-life Health Outcomes: An Epigenetic Bridge? **Aging and Disease**, v. 5, n. 6, p. 419-429, 2014.

VAN DE VEN, L. J.; BALLER, L.; VAN WAGENGERG, A. V.; KEMP, B.; VAN DE BRAND, H. Effects of egg position during late incubation on hatching parameters and chick quality. **Poultry Science**, v. 90, n. 10, p. 2342-2347, 2011.

VIEIRA, C.; POMBERO, A.; GARCÍA-LOPEZ, R.; GIMENO, L.; ECHEVARRIA, D.; MARTÍNEZ, S. Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, p. 7-20, 2010.

WANG, H.; ENGSTROM, A. K.; XIA, Z. Cadmium impairs the survival and proliferation of cultured adult subventricular neural stem cells through activation of the JNK and p38 MAP kinases. **Toxicology**, v. 380, p. 30-37, 2017.

WANG, J. X.; WHITE, M. D. Mechanical forces in avian embryo development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 120, p. 133-146, 2021.

WANG, Y.; ZHONG, Y.; LI, J.; ZHANG, J.; LYU, B.; ZHAO, T.; WU, Y. Occurrence of perfluoroalkyl substances in matched human serum, urine, hair and nail. **Journal of Environmental Sciences**, v. 67, p. 191-197, 2018.

WEI, Z.; SHAIKH, Z. A. Cadmium stimulates metastasis-associated phenotype in triple-negative breast cancer cells through integrin and β -catenin signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 328, p. 70-80, 2017.

WHITEHEAD, H. D.; VENIER, M.; WU, Y.; EASTMAN, E.; URBANIK, S.; DIAMOND, M. L.; SHALIN, A.; SCHWARTZ-NARBONNE, H.; BRUTON, T. A.; BLUM, A.; WANG, Z.; GREEN, M.; TIGHE, M.; WILKINSON, J. T.; MCGUINNESS, S.; PEASLEE, G. F. Fluorinated Compounds in North American Cosmetics. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 8, n. 7, p. 538-544, 2021.

WHO. Exposure do cadmium: a major public health concern. World Health Organization, 2019. Disponível em <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329480/WHO-CED-PHE-EPE-19.4.3-eng.pdf>>. Acesso em 21/03/2022.

WIKSTRÖM, S.; HUSSEIN, G.; KARLSSON, A. L.; LINDH, C. H.; BORNEHAG, C. – G. Exposure to perfluoroalkyl substances in early pregnancy and risk of sporadic first trimester miscarriage. **Scientific Reports**, v. 11, 3568, 2021.

WIKSTRÖM, S.; LIN, P. – I.; LINDH, C. H.; SHU, H.; BORNEHAG, C. – G. Maternal serum levels of perfluoroalkyl substances in early pregnancy and offspring birth weight. **Pediatric Research**, v. 87, p. 1093-1099, 2020.

WILSON, J. Current status of teratology: general principles and mechanisms derived from animal studies. In: WILSON, J.; FRASER, F. (Eds). **Handbook of Teratology**. New York: Plenum Press, 1977. p. 47-74.

WINKENS, K.; GIOVANOULIS, G.; KOPONEN, J.; VERTERGREN, R.; BERGER, U.; KARVONEN, A. M.; PEKKANEN, J.; KIVIRANTA, H.; COUSINS, I. T. Perfluoroalkyl acids and their precursors in floor dust of children's bedrooms – Implications for indoor exposure. **Environmental international**, v. 119, p. 493-502, 2018.

WITESKA, M.; SARNOWSKI, P.; LUGOWSKA, K.; KOWAL, E. The effects of cadmium and copper on embryonic and larval development of ide *Leuciscus idus* L. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 151-163, 2014.

WU, C.; ZHANG, Y.; CHAI, L.; WANG, H. Oxidative stress, endocrine disruption, and malformation of *Bufo gargarizans* embryo exposed to sub-lethal cadmium concentrations. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 49, p. 97-104, 2017.

WU, K.; XU, X.; PENG, L.; LIU, J.; GUO, Y.; HUO, X. Association between maternal exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) from electronic waste recycling and neonatal health outcomes. **Environment International**, v. 48, n. 1, p. 1-8, 2012.

XU, G.; LIU, S.; HUANG, M.; JIANG, X.; YANG, M. Cadmium induces apoptosis of human granulosa cell line KGN via mitochondrial dysfunction-mediated pathways. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 220, 112341, 2021.

XU, L.; GE, J.; HUO, X.; ZHANG, Y.; LAU, A. T. Y.; XU, X. Differential proteomic expression of human placenta and fetal development following e-waste lead and cadmium exposure *in utero*. **Science of The Total Environment**, v. 550, 1163-1170, 2016.

YAMAGUCHI, Y.; MIURA, M. How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70 70, p. 3171-86, 2013.

YAMAGUCHI, Y.; SHINOTSUKA, N.; NONOMURA, K.; TAKEMOTO, K.; KUIDA, K.; YOSIDA, H.; MIURA, M. Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, p. 1047-1060, 2011.

YAMAMOTO, F. Y.; FILIPAK NETO, F.; FREITAS, P. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Cadmium effects on early development of chick embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 548-555, 2012.

YE, F.; ZUSHI, Y.; MASUNAGA, S. Survey of perfluoroalkyl acids (PFAAs) and their precursors present in Japanese consumer products. **Chemosphere**, v. 127, p. 262-268, 2015.

YUAN, Y.; JIANG, C.-Y.; XU, H.; SUN, Y.; HU, F.-F.; BIAN, J.-C.; LIU, X.-Z.; GU, J.-H.; LIU, Z.-P. Cadmium-induced apoptosis in primary rat cerebral cortical neurons culture is mediated by a calcium signaling pathway. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64330, 2013.

YUAN, Z.; LUO, T.; LIU, X.; HUA, H.; ZHUANG, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; XU, W.; REN, J. Tracing anthropogenic cadmium emissions: From sources to pollution. **Science of The Total Environment**, v. 676, p. 87-96, 2019.

ZAGRIS, N. Extracellular matrix in development of the early embryo. **Micron**, v. 32, p. 427-438, 2001.

ZAGRIS, N. Extracellular matrix in development of the early embryo. **Micron**, v. 32, p. 427-438, 2001.

ZHANG, W.; LIN, Z.; HU, M.; WANG, X.; LIAN, Q.; LIN, K.; DONG, Q.; HUANG, C. Perfluorinated chemicals in blood of residents in Wenzhou, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 6, p. 1787-1793, 2011.

ZHOU, Y.; LI, H.; LIN, C.; MAO, Y.; RAO, J.; LOU, Y.; YANG, X.; XU, X.; JIN, F. Perfluorooctanoic acid (PFOA) inhibits the gap junction intercellular communication and induces apoptosis in human ovarian granulosa cells. **Reproductive Toxicology**, v. 98, p. 125-133, 2020.

ZHU, M.; MIAO, S.; ZHOU, W.; ELNESR, S. S.; DONG, X.; ZOU, X. MAPK, AKT/FoxO3a and mTOR pathways are involved in cadmium regulating the cell cycle, proliferation and apoptosis of chicken follicular granulosa cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 214, 112091, 2021.

Considerações finais

A avaliação dos efeitos da exposição pré-natal a poluentes ambientais, como o PFOA e Cd, em modelos animais é fundamental para verificar o risco de exposição de embriões/fetos humanos, investigando o potencial embriotóxico e teratogênico desses compostos (WACHHOLZ *et al.*, 2021). Nesse contexto, a análise morfológica é importante na avaliação da ocorrência de malformações, pois reflete alterações em níveis inferiores de organização biológica e permite inferir sobre os possíveis mecanismos celulares do surgimento dessas malformações.

O embrião de galinha é um excelente modelo de estudo para Embriotoxicologia (FLENTKE; SMITH, 2018), porém algumas particularidades, como fragilidade e tamanho reduzido, dificultam a sua utilização para avaliação histológica. Dessa forma, no capítulo I, diferentes métodos de processamento histológico foram testados na busca por orientação precisa dos embriões e preservação adequada das secções histológicas. Três resinas, paraplast, polietilenoglicol e historesina, foram avaliadas e comparadas em relação à precisão de orientação no bloco, visualização dos embriões nos blocos, qualidade da preservação tecidual (morfologia e presença de artefatos de técnica), eficiência na microtomia, contraste na coloração, tempo médio do processamento e custo. A historesina foi a que proporcionou melhor desempenho, com maior precisão de orientação dos embriões para corte, aliada à excelente preservação das estruturas e poucos artefatos, apesar de apresentar tempo de preparo e custo elevados.

No capítulo II, investigamos a ação do PFOA e Cd sobre a mortalidade, ocorrência de malformações e caracterizamos histologicamente as alterações morfológicas encontradas, em dois estádios selecionados, utilizando o processamento em historesina. Houve interferência dos contaminantes isolados no aumento da mortalidade, enquanto a mistura não mostrou alterações significativas. Os contaminantes isoladamente e em mistura induziram a ocorrência de malformações gerais e no TN e causaram alterações teciduais e na membrana basal. Dessa forma, comprovamos o efeito embriotóxico dos compostos isolados e em mistura no embrião de galinha.

Esses resultados podem ser extrapolados para embriões humanos devido às similaridades no desenvolvimento (IRIE; KURATANI, 2011; WANG; WHITE, 2021) e a utilização de concentrações realistas para a exposição humana, extrapoladas para o embrião de ave através do cálculo alométrico (DA COSTA *et al.*, 2021).

Além disso, foi possível avaliar detalhadamente a morfologia das malformações que, aliada à análise de rede e enriquecimento funcional, possibilitou propor mecanismos celulares envolvidos no surgimento das alterações, como a interferência em processos importantes para a morfogênese normal, entre eles citamos o controle do ciclo celular e apoptose, vias de sinalização Wnt e dependentes de Ca^{2+} , regulação do citoesqueleto de actina, junções celulares e interação com a matriz extracelular.

Também evidenciamos a progressão das alterações ao longo do desenvolvimento e sua apresentação ao final do desenvolvimento embrionário, confirmando a teratogenicidade dos compostos. Os resultados desse trabalho abrem questionamentos sobre os mecanismos celulares da ação do PFOA e Cd sobre o desenvolvimento embrionário, bem como sobre a interação desses compostos em mistura para originar os efeitos observados. Dessa forma, suscitam perguntas que podem ser exploradas em estudos futuros na busca pela compreensão dos efeitos deletérios desses contaminantes no desenvolvimento embrionário.

Conclusões

Nossos dados evidenciam o melhor método de processamento histológico para se obter os melhores resultados em embriões de galinha em estágios iniciais de desenvolvimento e realizar uma avaliação histológica detalhada. A historesina foi o meio de infiltração e emblocagem, entre os testados, que proporcionou melhor preservação morfológica, orientação precisa do tecido e contraste de coloração, apesar da microtomia difícil, custo e tempo de processamento maiores.

Além disso, nossos resultados enriquecem a literatura existente sobre a embriotoxicidade do PFOA e do Cd, gerando questionamentos para estudos futuros, e também ressaltam a preocupação com a exposição pré-natal a essas substâncias.

A exposição ao PFOA e Cd, isoladamente, foi capaz de induzir aumento na mortalidade e ocorrência de malformações. Já a exposição à mistura não apresentou alterações significativas. Entre as alterações induzidas na morfologia estão as malformações gerais e no TN da região cefálica e tronco-caudal, principalmente nos primeiros dias, quando a presença de embriões com estágio indefinido foi significativa. Em alguns dos parâmetros analisados, foi observado efeito dependente da concentração.

O PFOA e Cd causaram alterações na morfologia tecidual, principalmente no tubo neural, com alterações na forma, presença de células no lúmen, células apoptóticas no neuroepitélio e falha no fechamento. As alterações teciduais observadas foram quantificadas através do índice de lesão embrionária, elaborado para avaliação histopatológica de embriões de galinha em estágios iniciais de desenvolvimento. Além disso, os compostos também interferem na formação da membrana basal mostrando uma redução dessa estrutura.

O PFOA e Cd interferem na expressão de componentes de vias importantes ao desenvolvimento embrionário, tais como apoptose, controle do ciclo celular, adesão, interação com receptores de matriz extracelular, via Wnt e dinâmica do citoesqueleto de actina, sugerindo que estão relacionadas aos mecanismos celulares das alterações teciduais encontradas.

Nos indivíduos incubados por 21 dias (eclodidos e não eclodidos) foram observadas alterações anatômicas compatíveis com as malformações encontradas nos embriões em estágios mais iniciais, evidenciando a progressão das alterações ao longo do desenvolvimento e sua apresentação ao final do desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, B. D.; WOLF, C. J.; SCHMID, J. E.; DAS, K.; ZEHR, R.; HELFANT, L.; NAKAYAMA, S.; LINDSTROM, A. B.; STRYNAR, M. J.; LAU, C. S. Perfluorooctanoic acid (PFOA)-induced developmental toxicity in the mouse is dependent on expression of peroxisome proliferator activated receptor-alpha (PPAR- α). **Toxicological Sciences**, v. 98, n. 2, p. 541-581, 2007.
- ABDEL-BAKI, A. S.; DKHIL, M. A.; AL-QURAI SHY, S. Bioaccumulation of some heavy metals in tilapia fish relevant to their concentration in water and sediment of Wadi Hanifah, Saudi Arabia. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 2541-2547, 2011.
- ABU-BONSRAH, K. D.; ZHANG, D.; NEWGREEN, D. F. CRISPR/Cas9 Targets Chicken Embryonic Somatic Cells *In Vitro* and *In Vivo* and generates Phenotypic Abnormalities. **Scientific Reports**, v. 6, 34524, 2016.
- AHRENS, L. Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 20–31, 2011.
- AIMUZI, R.; LUO, K.; HUANG, R.; HUO, X.; NIAN, M.; OUYANG, F.; DU, Y.; FENG, L.; WANG, W.; ZHANG, J. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances and maternal thyroid hormones in early pregnancy. **Environmental Pollution**, v. 264, 114557, 2020.
- ALEKSANDROWICZ, E.; HERR, I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. **Altex**, v. 32, n. 2, p. 143-147, 2015.
- AL-ENAZY, S.; ALI, S.; ALBEKAIRI, N.; EL-TAWIL, M.; RYTTING, E. Placental control of drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 116, p. 63–72, 2017.
- AL-SALEH, I.; SHINWARI, N.; MASHHOUR, A.; MOHAMED, G. E. D.; RABAH, A. Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, p. 79-101, 2011.
- AL-SALEH, I.; SHINWARI, N.; MASHHOUR, A.; RABAH, A. Birth outcome measures and maternal exposure to heavy metals (lead, cadmium and mercury) in Saudi Arabian population. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 2017, n. 2-3, p. 205-218, 2014.
- ALTURKISTANI, H. A.; TASHKANDI, F. M.; MOHAMMEDSALEH, Z. M. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. **Global Journal of Health Science**, v. 8, n. 3, p. 72-79, 2015.
- ALWAN, S.; CHAMBERS, C. D. Identifying Human Teratogens: An Update. **Journal of Pediatric Genetics**, v. 4, n. 2, p. 39-41, 2015.

AMADI, C. N.; IGWEZE, Z. N.; ORISAKWE, O. E. Heavy metals in miscarriages and stillbirths in developing nations. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 22, n. 2, p. 91-100, 2017.

AMARNATH, S.; AGARWALA, S. Cell-cycle-dependent TGFbeta-BMP antagonist regulates neural tube closure by modulating tight junctions. **Journal of Cell Science**, v. 130, p. 119-131, 2016.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; ARES, I.; MARTÍNEZ, M. A. Drugs and chemical contaminants in human breast milk. In: Gupta, R. C. (Ed). **Reproductive and Developmental Toxicology**. 3 ed. Cambridge: Academic Press, 2022. p. 1019-1052.

AOYAMA, H.; TAKAHASHI, N.; SHUTOH, Y.; MOTOMURA, A.; CROFTON, K. M. Developmental Neurotoxicology: History and Outline of Developmental Neurotoxicity Study Guidelines. **Food Safety**, v. 3, n. 2, p. 48-61, 2015.

ARAYA, C.; CARMONA-FONTAINE, C.; CLARKE, J. D. W. Extracellular matrix couples the convergence movements of mesoderm and neural plate during the early stages of neurulation. **Developmental Dynamics**, v. 245, n. 5, p. 580-589, 2016.

ATSDR - Agency for toxic substances & disease registry. The ATSDR 2019 Substance Priority List. Disponível em < <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html> >. Acesso em 21/03/2022.

AUDINO, J. A.; MARIAN, J. E. A. R.; WANNINGER, A.; LOPES, S. G. B. C. Mantle margin morphogenesis in *Nodipecten nodosus* (Mollusca: Bivalvia): new insights into the development and the roles of bivalve pallial folds. **BMC Developmental Biology**, v. 15, n. 22, 2015.

AUGUSTINE, R.; ALHUSSAIN, H.; HASA, A.; AHMED, M. B.; YALCIN, H. C.; AL MOUSTAFA, A. – E. A novel in ovo model to study cancer metastasis using chicken embryos and GFP expressing cancer cells. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 140-148, 2020.

AVAGLIANO, L.; DOI, P.; TOSI, D.; SCAGLIOTTI, V.; GUALTIERI, A.; GASTON-MASSUET, C.; PISTOCCHI, A.; GALLINA, A.; MARCONI, A. M.; BULFAMANTE, G.; MASSA, V. Cell death and cell proliferation in human spina bifida. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 106, n. 2, p. 104-113, 2016.

BAKO, P.; BASSIOUNI, M.; ECKHARD, A.; GERLINGER, I.; FRICK, C.; LÖWENHEIN, H.; MÜLLER, M. Methyl methacrylate embedding to study the morphology and immunohistochemistry of adult guinea pig and mouse cochleae. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 254, p. 86-93, 2015.

BANCROFT, J. D.; LAYTON, C. The hematoxylin and eosin. In: SUVARNA, S.K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. (Eds). **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**, 8^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 126-138.

BARBOSA, A. C. F., PACE, M. R., WITOVISK, L., ANGYALOSSY, V. A new method to obtain good anatomical slides of heterogeneous plant parts. **IAWA Journal**, v. 31, n. 4, p. 373-383, 2010.

BARD, J. B. L.; ROSS, A. S. A. Improved method for making high-affinity sections of soft tissue embedded in polyethylene glycol (PEG): its use in screening monoclonal antibodies. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 34, n. 9, p. 1237-1241, 1986.

BARN, P.; GOMBOJAV, E.; OCHIR, C.; BOLDBAATAR, B.; BEEJIN, B.; NAIDAN, G.; GALSUREN, J.; LEGTSEG, B.; BYAMBAA, T.; HUTCHEON, J. A.; JANES, C.; JANSSEN, P. A.; LANPHEAR, B. P.; MCCANDLESS, L. C.; TAKARO, T. K.; VENNERS, S. A.; WEBSTER, G. M.; PALMER, C. D.; PARSONS, P. J.; ALLEN, R. W. Coal smoke, gestational cadmium exposure, and fetal growth. **Environmental Research**, v. 179, 2019.

BARROS, I. T.; CECCON, J. P.; GLINSKI, A.; LIEBEL, S.; GRÖTZNER, S. R.; RANDI, M. A. F.; BENEDITO, E.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; FILIPAK NETO, F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Environmental risk assessment in five rivers of Parana River basin, Southern Brazil, through biomarkers in *Astyanax* spp. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 19, p. 16228-16240, 2017.

BASKIN, D. G., Fixation and Tissue Processing in Immunohistochemistry. In: McManus, L. M.; Mitchell, R. N (Eds). **Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms**. Amsterdam: Academic Press, 2014. p 3797-3806.

BEGLEY, T. H.; HSU, W.; NOONAN, G.; DIACHENKO, G. Migration of fluorochemical paper additives from food-contact paper into foods and food simulants. **Food Additives and contaminants**, v. 25, n. 3, p. 384–390, 2008.

BEHR, A. C.; KWIATKOWSKI, A.; STÄHLMAN, M.; SCHMIDT, F. F.; LUCKERT, C.; BRAEUNING, A.; BUHRKE, T. Impairment of bile acid metabolism by perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in human HepaRG hepatoma cells. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 1673–1686, 2020.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **The Atlas of Chick Development**, 3^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2014.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences. **Biochimie**, v. 88, p. 1549-1559, 2006.

BJØRNSTAD, S.; AUSTDAL, L. P. E.; ROALD, B.; GLOVER, J. C.; PAULSEN, R. E. Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. **The Journal of**

Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 355, n. 3, p. 386-396, 2015.

BJÖRVANG, R. D.; VINNARS, M. – T.; PAPADOGIANNAKIS, N.; GIDLÖF, S.; MAMSEN, L. S.; MUCS, D.; KIVIRANTA, H.; RANTAKOKKO, P.; RUOKOJÄRVI, P.; LINDH, C. H.; ANDERSEN, C. Y.; DAMDIMOPOULOU, P. Mixtures of persistent organic pollutants are found in vital organs of late gestation human fetuses. **Chemosphere**, v. 283, 131125, 2021.

BLAKE, B. E.; FENTON, S. E. Early life exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and latent health outcomes: A review including the placenta as a target tissue and possible driver of peri- and postnatal effects. **Toxicology**, v. 443, 152565, 2020.

BOARETO, A. C.; MÜLLER, J. C.; LOURENÇO, E. L. B.; LOMBARDI, N.; LOURENÇO, A. C.; RABITTO, I.; DE MORAIS, R. N.; RIOS, F. S.; DALSENTER, P. R. Effects of the combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rat embryos. **Human & Experimental Toxicology**, 2013.

BOEKELHEIDE, K.; BLUMBERG, B.; CHAPIN, R. E.; COTE, I.; GRAZIANO, J. H.; JANESICK, A.; LANE, R.; LILLYCROP, K.; MYATT, L.; STATES, C.; THAYER, K. A.; WAALKES, M. P.; ROGERS, J. M. Predicting Later-Life Outcomes of Early-Life Exposures. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 10, 2012.

BRITO, P.; ZAMA, U.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. New characteristics of the male reproductive system in the Meliponini bee, *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae): histological and physiological development during sexual maturation. **Apidologie**, v. 41, p. 203-215, 2010.

BRONNER, M. E.; COSTA-SIMÕES, M. The Neural Crest Migrating into the twenty-First Century. In: WASSARMAN, P. M. (Ed). **Essays on development biology**. 1 ed. California: Elsevier, 2016. p. 115-130.

BUCK, R. C.; FRANKLIN, J.; BERGER, U.; CONDER, J. M.; COUSINS, I. T.; DE VOOGT, P.; JENSEN, A. A.; KANNAN, K.; MABURY, S. A.; VAN LEEUWEN, S. P. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 4, p. 513-41, 2011.

BUREŠ, M. S.; CVETNIĆ, M.; MILOLOŽA, M.; KUČIĆ GRGIĆ, D.; MARKIĆ, M.; KUŠIĆ, H.; BOLANČA, T.; ROGOŠIĆ, M.; UKIĆ, Š. Modeling the toxicity of pollutants mixtures for risk assessment: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, p. 1629-1655, 2021.

BURRIS, T. P. PPAR ligands make memories. **Nature Chemical Biology**, v. 12, p. 993-994, 2016.

BUTLER, M. B.; SHORT, N. E.; MANIOU, E.; ALEXANDRE, P.; GREENE, N. D. E.; COPP, A. J.; GALEA, G. L. Rho kinase-dependent apical constriction counteracts M-phase apical expansion to enable mouse neural tube closure. **Journal of Cell Science**, v. 132, n. 13, 2019.

BUZZEL, G. R. Double-embedding techniques for light microscope histology. **Stain Technology**, v. 50, n. 4, p. 285-287, 1975.

CABRERA-RODRÍGUEZ, R.; LUZARDO, O. P.; GONZÁLEZ-ANTUÑA, A.; BOADA, L. D.; ALMEIDA-GONZÁLEZ, M.; CAMACHO, M.; ZUMBADO, M.; ACOSTA-DACAL, A. C.; RIAL-BERRIEL, C.; HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, L. A. Occurrence of 44 elements in human cord blood and their association with growth indicators in newborns. **Environment International**, v. 116, p. 43-51, 2018.

CALABRESE, E. J. Hormesis: a fundamental concept in biology. **Microbial Cell**, v. 1, n. 5, p. 145-149, 2014.

CALLAN, A. C.; ROTANDER, A.; THOMPSON, K.; HEYWORTH, J.; MUELLER, J. F.; ODLAND, J. Ø.; WOOD, A. L. H. Maternal exposure to perfluoroalkyl acids measured in whole blood and birth outcomes in offspring. **Science of The Total Environment**, v. 569 - 570, p. 1107-1113, 2016.

CAO, X. FU, M.; BI, R.; ZHENG, X.; FU, B.; TIAN, S.; LIU, C.; LI, Q.; LIU, J. Cadmium induced BEAS-2B cells apoptosis and mitochondria damage via MAPK signaling pathway. **Chemosphere**, v. 263, 128346, 2021.

CARIOU, R.; VEYRAND, B.; YAMADA, A.; BERREBI, A.; ZALKO, D.; DURAND, S.; POLLONO, C.; MARCHAND, P.; LEBLANC, J.-C.; ANTIGNAC, J.-P.; LE BIZEC, B. Perfluoroalkyl acid (PFAA) levels and profiles in breast milk, maternal and cord serum of French women and their newborns. **Environment International**, v. 84, p. 71-81, 2015.

CARLSON, B. M. **Human Embryology and Developmental Biology**, 6^a ed. St. Louis: Elsevier, 2019.

CARVALHO, M. C.; NAZARI, E. M.; FARINA, M.; MÜLLER, Y. M. R. Behavioral, Morphological, and Biochemical Changes after *In Ovo* Exposure to Methylmercury in Chicks. **Toxicological Sciences**, v. 106, n. 1, p. 180-185, 2008.

CAS - Chemical Abstract Service - A division of the American Chemical Society. Disponível em <<http://www.cas.org/>>. Acesso em 20/03/2022.

CATALA, M. Overview of Secondary Neurulation. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 64, n. 3, p. 346-358, 2021.

CECCONI, F.; PIACENTINI, M.; FIMIA, G. M. The involvement of cell death and survival in neural tube defects: a distinct role for apoptosis and autophagy? **Cell Death and Differentiation**, v. 15, p. 1170-1170, 2008.

CERRI, D. G.; ARTHUR, C. M.; RODRIGUES, L. C.; FERMINO, M. L.; ROCHA, L. B.; STOWELL, S. R.; BARUFFI, M. D. Examination of Galectin Localization Using Confocal Microscopy. In: STOWELL, S.; CUMMINGS, R. (eds). Galectins. **Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**, vol 1207, p 343-354, 2014.

CERRI, P. S.; SASSO-CERRI, E. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. **Micron**, v. 34, n. 8, p. 365-372, 2003.

CERRILLOS, L.; FERNÁNDEZ, R.; MACHADO, M. J.; MORILLAS, I.; DAHIRI, B.; PAZ, S.; GONZALEZ-WELLER, D.; GUTIÉRREZ, A.; RUBIO, C.; HARDISSON, A.; MORENO, I.; FERNÁNDEZ-PALACÍN, A. Placental levels of metals and associated factors in urban and sub-urban areas of Seville (Spain). **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 54, p. 21-26, 2019.

CHAPARRO-ORTEGA, A.; BETANCOURT, M.; ROSAS, P.; VÁZQUEZ-CUEVAS, F. G.; CHAVIRA, R.; BONILLA, E.; CASAS, E.; DUCOLOMB, Y. Endocrine disruptor effect of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) on porcine ovarian cell steroidogenesis. **Toxicology in vitro**, v. 46, p. 86-93, 2018.

CHEN, C. Y.; HE, T.; MAO, X. L.; FRIIS, T. E.; QIN, R. H.; JIAN, Y. T. A novel xylene substitute for histotechnology and histochemistry. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 85, n. 4, p. 231-240, 2010.

CHEN, L.; XU, B.; LIU, L.; LUO, Y.; ZHOU, H.; CHEN, W.; SHEN, T.; HAN, X.; KONTOS, C. D.; HUANG, S. Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, n. 5, p. 624-632, 2011.

CHEN, Q.; HUANG, R.; HUA, L.; GUO, Y.; HUANG, L.; ZHAO, Y.; WANG, X.; ZHANG, J. Prenatal exposure to perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances and childhood atopic dermatitis: a prospective birth cohort study. **Environmental Health**, v. 17, n. 8, 2018.

CHENG, X.; LI, H.; YAN, Y.; WANG, G.; BERMAN, Z.; CHUAI, M.; YANG, X. Usage of Dexamethasone Increases the Risk of Cranial Neural Crest Dysplasia in the Chick Embryo. **Toxicological Sciences**, v. 158, n. 1, p. 36-47, 2017.

CHOI, S.-K.; KIM, J.-H.; PARK, J.-K.; LEE, K.-M.; KIM, E.; JEON, W.B. Cytotoxicity and inhibition of intercellular interaction in N2a neurospheroids by perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 520–529, 2013

CHOONG, G.; LIU, Y.; TEMPLETON, D.M. Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 25, n. 211, p. 54-65, 2014.

CHOWDHURY, R.; RAMOND, A.; O'KEEFFEE, L. M.; SHAHZAD, S.; KUNUTSOR, S. K.; MUKA, T.; GREGSON, J.; WILLEIT, P.; WARNAKULA, S.; KHAN, H.; CHOWDHURY, S.; GOBIN, R.; FRANCO, O. H. ANGELANTONIO, E. D. Environmental toxic metal contaminants and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. **The BMJ**, v. 362, k3310, 2018.

CHU, P. – Y.; KOH, A. P. – F.; ANTONY, J.; HUANG, R. Y. – J. Applications of the Chick Chorioallantoic Membrane as an Alternative Model for Cancer Studies. **Cell Tissues Organs**, v. 29, p. 1-16, 2021.

CIMA, F. Enzyme Histochemistry for Functional Histology in Invertebrates. In: PELLICCIARI, C.; BIGGIOGERA, M. (Eds). **Histochemistry of Single Molecules: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1560. New Jersey: Humana Press, 2017. p. 69-90.

COBB-VANTRESS. **Guia de Manejo de Incubação**. 2008. Disponível em <<https://cobb-guides.s3.amazonaws.com/4ba5c8b0-bcb4-11e6-bd5d-55bb08833e29.pdf>>. Acesso em 01/05/2017.

COLAS, J-F.; SCHOENWOLF, G. C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. **Developmental Dynamics**, v. 221, n. 2, p. 117-145, 2001.

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. 2015.

CONLEY, J. M.; RICHARDS, S. M. Teratogenesis. In: JØRGENSEN, S. E.; FATH, B. D. **Encyclopedia of Ecology**. Elsevier, 2008. p. 3528-3536.

CONSONNI, D.; SINDACO, R.; BERTAZZI, P. A. Blood levels of dioxins, furans, dioxin-like PCBs, and TEQs in general populations: A review, 1989–2010. **Environment International**, volume 44, p. 151-162, 2012.

COPP, A. J.; STANIER, P.; GREENE, N. D. E. Neural tube defects: recent advances, unsolved questions and controversies. **Lancet Neurology**, v. 12, p. 799-810, 2013.

COPPER, J. E.; BUDGEON, L. R.; FOUTZ, C. A.; VAN ROSSUM, D. B.; VANSELOW, D. J.; HUBLEY, M. J.; CLARK, D. P.; MANDRELL, D. T.; CHENG, K. C. Comparative analysis of fixation and embedding techniques for optimized histological preparation of zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 208, p. 38-46, 2018.

COSTA, L. G.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. P. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 87-110, 2004.

CROFTON, K. M.; MUNDY, W. R.; SHAFER, T. J. Developmental neurotoxicity testing: A path forward. **Congenital Anomalies**, v. 52, n. 3, p. 140-146, 2012.

CROWE, A. R.; YUE, W. Semi-quantitative Determinations of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. **Bio-protocol**, v. 9, n. 24, e3465, 2019.

CUI, Y.; LIU, W.; XIE, W.; YU, W.; WANG, C.; CHEN, H. Investigation of the Effects of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on Apoptosis and Cell Cycle in a Zebrafish (*Danio rerio*) Liver Cell Line. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, p. 15673-15682, 2015.

CUI, Z.-G.; AHMED, K.; ZAIDI, S. F.; MUHAMMAD, J. S. Ins and outs of cadmium-induced carcinogenesis: Mechanism and prevention. **Cancer Treatment and Research Communications**, v. 27, 100378, 2021.

CULL, A. M. Mounting media and slide coatings. In: SUVARNA, S. K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. (Eds). **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**, 8^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 535-536.

DA COSTA, M. C. V.; KMECICK, M.; DE FREITAS, P. F.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Lead exposure affects cephalic morphogenesis and neural crest cells in *Gallus gallus* embryo. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 84, 106948, 2021.

DADY, A.; HAVIS, E.; ESCRIOU, V.; CATALA, M., DUBAND, J. – L. Junctional Neurulation: A Unique Developmental Program Shaping a Discrete Region of the Spinal Cord Highly Susceptible to Neural Tube Defects. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 39, 2014.

DARROW, L. A.; HOWARDS, P. P.; WINQUIST, A.; STEENLAND, K. PFOA and PFOS serum levels and miscarriage risk. **Epidemiology**, v. 25, n. 4, p. 505-512, 2014.

DASU, K.; XIA, X.; SIRIWARDENA, D.; KLUPINSKI, T. P.; SEAY, B. Concentration profiles of per- and polyfluoroalkyl substances in major sources to the environment. **Journal of Environmental Management**, v. 301, 113879, 2022.

DAVEY, M. G.; TICKLE, C. The chicken as a model for embryonic development. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 117, p. 231-239, 2007.

DAVEY, M. G.; TOWERS, M.; VARGESSON, N.; TICKLE, C. The chick limb: embryology, genetics and teratology. **International Journal of Developmental Biology**, v. 62, p. 85-95, 2018.

DOMINGO, J. L.; NADAL, M. Human exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) through drinking water: A review of the recent scientific literature. **Environmental Research**, v. 177, 108648, 2019.

DOMINGO-RELLOSO, A.; GRAU-PEREZ, M.; BRIONGOS-FIGUERO, L.; GOMEZ-ARIZA, J. L.; GARCIA-BARRERA, T.; DUEÑAS-LAITA, A.; BOBB, J. F.; CHAVES, F. J.; KIOUMOURTZOGLU, M. A.; NAVAS-ACIEN, A.; REDONMAS, J.; MARTIN-ESCUADERO, J. C.; TELLEZ-PLAZA, M. The association of urine metals and metal mixtures with cardiovascular incidence in an adult population from Spain: the Ortega Follow-Up Study. **International Journal of Epidemiology**, v. 48, n. 6, 2019.

DROST, H. -G.; JANITZA, P.; GROSSE, I.; QUINT, M. Cross-kingdom comparison of the developmental hourglass. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 45, p. 69-75, 2017.

DU, Y.; CAI, Z.; ZHOU, G.; LIANG, W.; MAN, Q.; WANG, W. Perfluorooctanoic acid exposure increases both proliferation and apoptosis of human placental

trophoblast cells mediated by ER stress-induced ROS or UPR pathways. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 236, 113508, 2022.

DUBAND, J-L. Diversity in the molecular and cellular strategies of epithelium-to-mesenchyme transitions. **Cell Adhesion & Migration**, v. 4, n. 3, p. 458-482, 2010.

DUFOUR, P.; PIRARD, C.; SEGHAYE, M.-C. Association between perfluoroalkyl substances in cord blood and birth weight in Belgian population. **Toxicology**, v. 295, p. S230, 2018.

ĐUKIĆ-ĆOSIĆ, D.; BARALIĆ, K.; JAROVAC, D.; DJORDJEVIC, A. B.; BULAT, Z. An overview of molecular mechanisms in cadmium toxicity. **Current Opinion in Toxicology**, v. 19, p. 56-62, 2020.

DZUGAN, M.; TRYBUS, W.; LIS, M.; WESOŁOWSKA, M.; TRYBUS, E.; KOPACZ-BEDNARSKA, A.; KRÓL, T. Cadmium-induced ultrastructural changes in primary target organs of developing chicken embryos (*Gallus domesticus*). **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 167-174, 2018.

EOM, D. S.; AMARNATH, S.; FOGEL, J. L.; AGARWALA, S. Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway. **Development**, v. 138, 3179, 2011.

EPSTEIN, D. J.; VEKEMANS, M.; GROS, P. Splotch (*Sp2H*), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. **Cell**, v. 67, p. 767-774, 1991.

FELDMAN, A. T.; WOLFE, D. Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. In: DAY, C. E. (Ed). **Histopathology: Methods and Protocols**, Methods in Molecular Biology, v. 1180. New Jersey: Humana Press, 2014. p 31-43.

FERREIRA, B. G.; TEIXEIRA, C. T.; ISAIAS, R. M. S. Efficiency of the Polyethylene-Glycol (PEG) Embedding Medium for Plant Histochemistry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 62, n. 8, p. 577-583, 2014.

FIAZ, M.; MARTÍNEZ, L. C.; COSTA, M. S.; COSSOLIN, J. F. S.; PLATA-RUEDA, A.; GONÇALVES, W. G.; SANT'ANA, A. E. G.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, 2018.

FISHER, M.; ARBUCKLE, T. E.; LIANG, C. L.; LEBLANC, A.; GAUDREAU, E.; FOSTER, W. G.; HAINES, D.; DAVIS, K.; FRASER, W. D. Concentration of persistent organic pollutants in maternal and cord blood from the maternal-infant research on environmental chemicals (MIREC) cohort study. **Environmental Health**, v. 15, n. 1, 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.

FRIEDMAN, J. M. The principles of teratology: are they still true? **Birth Defects Research Part A Clinical and Molecular Teratology**, v. 88, p. 766–768, 2010.

FRITSCHÉ, E.; GRANDJEAN, P.; CROFTON, K. M.; ASCHNER, M.; GOLDBERG, A.; HEINONEN, T.; HESSEL, E. V. S.; HOGBERG, H. T.; BENNEKOU, S. H.,; LEIN, P. J.; LEIST, M.; MUNDY, W. R.; PAPARELLA, M.; PIERSMA, A. H.; SACHANA, M.; SCHMUCK, G.; SOLECKI, R.; TERRON, A.; MONNET-TSCHUDI, F.; WILKS, M. F.; WITTERS, H.; ZURICH, M. G.; BAL-PRICE, A Concentration of persistent organic pollutants in maternal and cord blood from the maternal-infant research on environmental chemicals (MIREC) cohort study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 354, n. 3-6, 2018.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 742-458, 2011.

GAO, K., GODKIN, J. D. A New Method for Transfer of Polyethylene Glycol-embedded Tissue Sections to Silanated Slides for Immunocytochemistry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 39, n. 4, p. 537-540, 1991.

GARCIA, P.; WNAG, Y.; VIALLET, J.; JILKOVA, Z. M. The Chicken Embryo Model: A Novel and Relevant Model for Immune-Based Studies. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 791081, 2021.

GARG, S.; KUMAR, P.; MISHRA, V.; GUIJT, R.; SINGH, P.; DUMÉE, L. F.; SHARMA, R. S. A review on the sources, occurrence and health risks of per-/poly-fluoroalkyl substances (PFAS) arising from the manufacture and disposal of electric and electronic products. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, 101683, 2020.

GE, Y.; SONG, X.; CHEN, L.; HU, D.; HUA, L.; CUI, Y.; LIU, J.; AN, Z.; YIN, Z.; NING, H. Cadmium induces actin cytoskeleton alterations and dysfunction in Neuro-2a cells. **Environmental Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 469-475, 2019.

GEMUSSE, S. L.; FOLLE, N. M. T.; SOUZA, A. T. C.; AZEVEDO-LINHARES, M.; FILIPAK NETO, F.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; GARCIA, J. R. E.; ESQUIVEL, L.; SILVA, C. P.; CAMPOS, S. X.; MARTINS, C. C.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Micropollutants impair the survival of *Oreochromis niloticus* and threat local species from Iguaçu River, Southern of Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 83, 103596, 2021.

GENG, H-X.; WANG, L. Cadmium: Toxic effects on placental and embryonic development. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 67, p. 102-107, 2019.

GHASSEMIFAR, R.; FRANZÉN, L. A double-embedding technique for thin tissue membranes. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 67, n. 6, p. 363-366, 1992.

GHIMIRE, S.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; WU, C. Use of Chicken Embryo Model in Toxicity Studies of Endocrine-Disrupting Chemicals and Nanoparticles. **Chemical Research in Toxicology**, v. 35, n. 4, p. 550-568, 2022.

GIORDANO, G.; COSTA, L. G. Developmental Neurotoxicity: Some Old and New Issues. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, 814795, 2012.

GLÜGE, J.; SCHERINGER, M.; COUSINS, I. T.; DEWITT, J. C.; GOLDENMAN, G.; HERZKE, D.; LOHMANN, R.; NG, C. A.; TRIER, X.; WANG, Z. An overview of the uses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 22, p. 2345-2373, 2020.

GOBARTT, E. G. **Study of the Secondary Neurulation in the chick embryo, a model to understand neural tube defects**. 203 f. Tesis (Doctorado en Biomedicina). Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 2019.

GOMES, C. **Modelo de málaia experimental na gestação como ferramenta para avaliação de embriotoxicidade do artesunato**. 120 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

GOMES, J. A.; OLSTAD, E. W.; KOWALSKI, T. W.; GERVIN, K.; VIANNA, F.; SALES, L.; SCHÜLER-FACCINI, L.; NORDENG, H. M. E. Genetic Susceptibility to Drug Teratogenicity: A Systematic Literature Review. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 2021.

GONZÁLEZ SANTANDER, R.; MARTÍNEZ CUADRADO, G.; GONZÁLEZ-SANTANDER MARTÍNEZ, M.; MONTEAGUDO, M.; MARTÍNEZ ALONSO, F. J.; TOLEDO LOBO, M. V. The Use of Different Fixatives and Hydrophilic Embedding Media (HistoresinTM and UnicrylTM) for the Study of Embryonic Tissues. **Microscopy Research and Technique**, v. 36, n. 3, p. 151-158, 1997.

GONZALEZ-GOBARTT, E.; BLANCO-AMEIJEIRAS, J.; USIETO, S.; ALLIO, G.; BENAZERAF, B.; MARTI, E. Cell intercalation driven by SMAD3 underlies secondary neural tube formation. **Developmental Cell**, v. 26, p. 1147-1163, 2021.

GOODWIN, K.; LOSTCHUCK, E. E.; CRAMB, K. M. L.; ZULUETA-COARASA, T.; FERNANDEZ- GONZALEZ, R.; TANENTZAPF, G. Cell-cell and cell-extracellular matrix adhesions cooperate to organize actomyosin networks and maintain force transmission during dorsal closure. **Molecular Biology of the Cell**, v. 28, p. 1301–1310, 2017.

GOULDING, D. R.; WHITE, S. S.; MCBRIDE, S. J.; FENTON, S. E.; HARRY, G. J. Gestational exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA): Alterations in motor related behaviors. **Neurotoxicology**, v. 58, p. 110-119, 2016.

GOUTI, M.; METZIS, V.; BRISCOE, J. The route to spinal cord cell types: a tale of signals and switches. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 6, p. 282-289, 2015.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Neurobehavioral effects of developmental toxicity. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 3, p. 330-338, 2014.

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

GREENE, N. D. E.; COPP, A. J. Neural Tube Defects. **Annual Reviews in Neuroscience**, v. 37, p. 221-242, 2014.

GREGO-BESSA, J.; HILDEBRAND, J.; ANDERSON, K. V. Morphogenesis of the mouse neural plate depends on distinct roles of cofilin 1 in apical and basal epithelial domains. **Development**, v. 142, n. 7, p. 1305-1314, 2015.

GULISANO, M.; PACINI, S.; PUNZI, T.; MORUCCI, G.; QUAGLIATA, S.; DELFINO, G.; SARCHIELLI, E.; MARINI, M.; VANNELLI, G. B. Cadmium modulates proliferation and differentiation of human neuroblasts. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 1, p. 228-237, 2009.

GUMP, B. B.; WU, Q.; DUMAS, A. K.; KANNAN, K. Perfluorochemical (PFC) exposure in children: associations with impaired response inhibition. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 19, p. 8151-8159, 2011.

GUO, J.; WU, C.; QI, X.; JIANG, S.; LIU, Q.; ZHANG, J.; CAO, Y.; CHANG, X.; ZHOU, Z. Adverse associations between maternal and neonatal cadmium exposure and birth outcomes. **Science of The Total Environment**, v. 575, p. 581-587, 2017.

GUSTAVSSON, P.; GREENE, N. D. E.; LAD, D.; PAUWS, E.; DE CASTRO, S. C. P.; STANIER, P.; COPP, A. J. Increased expression of Grainyhead-like-3 rescues spina bifida in a folate-resistant mouse model. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 21, p. 2640-2646, 2007.

HAGENAARS, A.; VERGAUWEN, L.; COEN, D. D.; KNAPEN, D. Structure-activity relationship assessment of four perfluorinated chemicals using a prolonged zebrafish early life stage test. **Chemosphere**, v. 82, n. 5, p. 764-772, 2011.

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

HAN, W.; GAO, Y.; YUAN, T.; WANG, Y.; ZHAO, S.; SHI, R.; BONEFELD-JORGENSEN, E. C.; SHEN, X.; TIAN, Y. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in matched parental and cord serum in Shandong, China. **Environment International**, v. 116, p. 206-213, 2018.

HANSSSEN, L.; DURAREV, A. A.; HUBER, S.; ODLAND, J. O.; NIEBOER, E.; SANDANGER, T. M. Partition of perfluoroalkyl substances (PFASs) in whole blood and plasma, assessed in maternal and umbilical cord samples from inhabitants of arctic Russia and Uzbekistan. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 430-437, 2013.

HARADA, K.; XU, F.; ONO, K.; IJIMA, T.; KOIZUMI, A. Effects of PFOS and PFOA on L-type Ca^{2+} currents in guinea-pig ventricular myocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329, n. 2, p. 487-494, 2005.

HARRINGTON, M. J.; HONG, E.; BREWSTER, R. Comparative Analysis of Neurulation: First Impressions Do Not Count. **Molecular Reproductive & Development**, v. 76, p. 954-965, 2009.

HENNING, T. Polyethylene glycols (PEGs) and the pharmaceutical industry. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 1, n. 6, p. 57-59, 2002.

HEYS, K. A.; SHORE, R. F.; PEREIRA, M. G.; JONES, K. C.; MARTIN, F. L. Risk assessment of environmental mixture effects. **RSC Advances**, n. 6, p. 47844-47857, 2016.

HIGA, R.; GONZÁLEZ, E.; PUSTOVRH, M. C.; WHITE, V.; CAPOBIANCO, E.; MARTÍNEZ, N.; JAWERBAUM, A. PPAR α and its activator PGI $_2$ are reduced in diabetic embryopathy: involvement of PPAR α activation in lipid metabolic and signalling pathways in rat embryo early organogenesis. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 2, p. 103-110, 2007.

HU, H.; UESAKA, M.; GUO, S.; SHIMAI, K.; LU, T. – M.; LI, F.; FUJIMOTO, S.; ISHIKAWA, M.; LIU, S.; SASAGAWA, Y.; ZHANG, G.; KURATANI, S.; YU, J. – K.; KUSAKABE, T. G.; KHAITOVICH, P.; IRIE, N.; EXPANDE CONSORTIUM. Constrained vertebrate evolution by pleiotropic genes. **Nature ecology & Evolution**, v. 1, p. 1722-1730, 2017.

HUANG, Y.; HE, C.; SHEN, C.; GUO, J.; MUBEEN, S.; YUAN, J.; YANG, Z. Toxicity of cadmium and its health risks from leafy vegetable consumption. **Food & Function**, v. 8, n. 4, p. 1373-1401, 2017.

HUTTNER, W. B.; KOSODO, Y. Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 648-657, 2005.

IRIE, N.; KURATANI, S. Comparative transcriptome analysis reveals vertebrate phylotypic period during organogenesis. **Nature Communications**, v. 2, 248, 2011.

IRIE, N.; KURATANI, S. The developmental hourglass model: a predictor of the basic body plan? **Development**, v. 141, n. 24, p. 4549-4555, 2014.

IUNES, R. S.; BRANCO, P. C.; AMARAL, J. B. Coleta e Processamento de Amostras. In: SIVIERO, F (Ed). **Biologia Celular. Bases Moleculares e Metodologia de Pesquisa**. São Paulo: Roca, 2013. p. 27-89.

JANSEN, T. A.; KOREVAAR, T. I. M. MULDER, T. A.; WHITE, T.; MUETZEL R. L.; PEETERS, R. P.; TIEMEIER, H. Maternal thyroid function during pregnancy and child brain morphology: a time window-specific analysis of a prospective cohort. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 7, n. 8, p. 619-637, 2019.

JAYACHANDRAN, P.; OLMO, V. N.; SANCHEZ, S. P.; MCFARLAND, R. J.; VITAL, E.; WERNER, J. M.; HONG, E.; SANCHEZ-ALBEROLA, N.; MOLODSTOV, A.; BREWSTER, R. M. Microtubule-associated protein 1b is required for shaping the neural tube. **Neural Development**, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2016.

JIAN, J. M.; GUO, Y.; ZENG, L.; LIANG-YING, L.; LU, X.; WANG, F.; ZENG, E. Y. Global distribution of perfluorochemicals (PFCs) in potential human exposure source – A review. **Environment International**, v. 108, p. 51–62, 2017.

JIANG, Q.; LUST, R. M.; STRYNAR, M. J.; DAGNINO, S.; DEWITT, J. C. Perfluorooctanoic acid induces developmental cardiotoxicity in chicken embryos and hatchlings. **Toxicology**, v. 293, p. 97-106, 2012.

JONES, M. V.; CALABRESI, P. A. Agar-gelatin for embedding tissues prior to paraffin processing. **BioTechniques**, v. 42, n. 5, p. 569-570, 2007.

JURILOFF, D. M.; HARRIS, M. J. A consideration of the evidence that genetic defects in planar cell polarity contribute to the etiology of human neural tube defects. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 94, p. 824-840, 2012.

KABAMBA, M.; TUAKUILA, J. Toxic metal (Cd, Hg, Mn, Pb) partition in the maternal/fetal unit: A systematic mini — review of recent epidemiological studies. **Toxicology letters**, v. 322, p. 20-26, 2020.

KABAT, A. P.; BLACKBURN, T. M.; MCKECHNIE, A. E.; BUTLER, P. J. Phylogenetic analysis of the allometric scaling of therapeutic regimes for birds. **Journal of Zoology**, v. 275, n. 4, p. 359-367, 2008.

KANNO, T. Y. N.; MELO, M. O.; BORGES, R. M.; VIECELI, F. M. Métodos e Protocolos em Biologia do Desenvolvimento. In: SIVIERO, F. (Ed). **Biologia Celular. Bases Moleculares e Metodologia de Pesquisa**. São Paulo: Roca, 2013. p. 445-472.

KAWAGUCHI, A. Neuronal Delamination and Outer Radial Glia Generation in Neocortical Development. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 623573, 2021.

KIECKER, C. The chick embryo as a model for the effects of prenatal exposure to alcohol on craniofacial development. **Developmental Biology**, v. 415, n. 2, p. 314-325, 2016.

KIERNAN, J. A. **Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice**. Banbury: Scion Publishing, 2015.

KIERNAN, J. A. Strategies for Preventing Detachment of Sections from Glass Slides. **Microscopy Today**, v. 7, n. 6, p. 20-24, 1999.

KIM, D-H.; LEE, J-H.; OH, J-E. Assessment of individual-based perfluoroalkyl substances exposure by multiple human exposure sources. **Journal of Hazardous Materials**, v. 365, p. 26-33, 2019.

KIM, K. H.; LEE, J. Y. Junctional Neurulation: A Junction between Primary and Secondary Neural Tubes. **Journal of Korean Neurosurgery Society**, v. 64, n.3, p. 374-379, 2021.

KIM, M.; SON, J.; PARK, M. S.; JI, Y.; CHAE, S.; JUN, C.; BAE, J.-S.; KWON, T. K.; CHOO, Y.-S.; YOON, H.; YOON, D.; RYOO, J., KIM, S.-H.; PARK, M.-J.; LEE, H.-S. In vivo evaluation and comparison of developmental toxicity and teratogenicity of perfluoroalkyl compounds using *Xenopus* embryos. **Chemosphere**, v. 93, p. 1153-1160, 2013.

KINOSHITA, N.; SASAI, N.; MISAKI, K.; YONEMURA, S. Apical Accumulation of Rho in the Neural Plate Is Important for Neural Plate Cell Shape Change and Neural Tube Formation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, p. 2289-2299, 2008.

KIPPLER, M.; HOQUE, A. M.; RAQIB, R.; OHRVIK, H.; EKSTROM, E. C.; VAHTER, M. Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. **Toxicology Letters**, v. 192, n. 2, p. 162-168, 2010.

KLESZCZYŃSKI, K.; SKŁADANOWSKI, A. C. Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids. III. Disturbance in Ca²⁺ homeostasis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 251, p. 163–168, 2011.

KLOSEN, P.; MAESSEN, X.; AGUILAR, P. V. D. B. PEG Embedding for Immunocytochemistry: Application to the Analysis of Immunoreactivity Loss During Histological Processing. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 455-463, 1993.

KMECICK, M. **Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico nos estágios iniciais de desenvolvimento de embriões de ave (*Gallus gallus*)**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

KMECICK, M.; VIEIRA DA COSTA, M. C.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Morphological evidence of neurotoxic effects in chicken embryos after exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) and inorganic cadmium. **Toxicology**, v. 427, 152286, 2019.

KORN, M. J.; CRAMER, K. S. Windowing Chicken Eggs for Developmental Studies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 8, e306, 2007.

KORTENKAMP, A. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, p. 98-105, 2007.

KOTTHOFF, M.; MÜLLER, J.; JÜRLING, H.; SCHLUMMER, M.; FIEDLER, D. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in consumer products. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 19, p. 14546–14559, 2015.

KRAFFT, M. P.; RIESS, J. G. Per- and polyfluorinated substances (PFASs): Environmental challenges. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 20, p. 192-212, 2015.

KULAR, J. K.; BASU, S.; SHARMA, R. I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering**, v. 5, 2014.

KURTH, T.; WEICHE, S.; VORKEL, D.; KRETSCHMAR, S.; MENGE, A. Histology of Plastic Embedded Amphibian Embryos and Larvae. **Genesis**, v. 50, n. 3, p. 235-250, 2012.

LAFUENTE, A.; GONZÁLEZ-CARRACEDO, A.; ROMERO, A.; ESQUIFINO, A. L. Effect of cadmium on 24h variations in hypothalamic dopamine and serotonin metabolism in adult male rats. **Experimental Brain Research**, v. 149, n. 2, p. 200-206, 2003.

LAI, M.; LÜ, B. Tissue Preparation for Microscopy and Histology. In: PAWLISZYN, J (Ed). **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**, vol. 3. Amsterdam: Academic Press, 2012. p 53-93.

LAU, C.; ANITOLE, K.; HODES, C. LAI, D.; PFAHLES-HUTCHENS, A.; SEED, J. Perfluoroalkyl Acids: A Review of Monitoring and Toxicological Findings. **Toxicological Sciences**, v. 99, n. 2, p. 366-394, 2007.

LAWSON, A.; SCHOENWOLF, G. C. Neurulation. In: SQUIRE, L. R (Ed). **Encyclopedia of Neuroscience**. Amsterdam: Academic Press, 2009, p. 1107-1113.

LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. Carbohydrates. In: SUVARNA, S.K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. (Eds). **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**, 8^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 176-197.

LE DRÉAU, G.; MARTÍ, E. Dorsal-ventral patterning of the neural tube: a tale of three signals. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 12, p. 1471-1481, 2012.

LECLERC, C.; NÉANT, I.; MOREAU, M. The calcium: an early signal that initiates the formation of the nervous system during embryogenesis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 5, n. 3, 2012.

LEE, W. C.; FISHER, M.; DAVIS, K.; ARBUCKLE, T. E.; SINHA, S. K. Identification of chemical mixtures to which Canadian pregnant women are exposed: The MIREC Study. **Environment International**. v. 99, p. 321-330, 2017.

LEE, Y. J.; KIM, M-K.; BAE, J.; YANG, J-H. Concentrations of perfluoroalkyl compounds in maternal and umbilical cord sera and birth outcomes in Korea. **Chemosphere**, v. 90, p. 1603-1609, 2013.

LEITÃO, C. A. E. Working Optimally with Serial Sections in Glycol Methacrylate Resin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, e18180103, 2018.

LENER, M. R.; RESZKA, E.; MARCINIAK, W.; LESICKA, M.; BASZUK, P.; JABŁOŃSKA, E.; BIAŁKOWSKA, K.; MUSZYŃSKA, M.; PIETRZAK, S.; DERKACZ, R.; GRODZKI, T.; WÓJCIK, J.; WOJTYS, M.; DĘBNIAK, T.; CYBULSKI, C.; GRONWALD, J.; KUBISA, B.; PIERÓG, J.; WALOSZCZYK, P.; SCOTT, R. J.; JAKUBOWSKA, A.; NAROD, S. A.; LUBIŃSKI, J. Blood cadmium levels as a marker for early lung cancer detection. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 64, 126682, 2021.

LI, A.; ZHUANG, T.; SHI, J.; LIANG, Y.; SONG, M. Heavy metals in maternal and cord blood in Beijing and their efficiency of placental transfer. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 89, p. 99-106, 2019.

LI, K.; GAO, P.; XIANG, P.; ZHANG, X.; CUI, X.; MA, L. Q. Molecular mechanisms of PFOA-induced toxicity in animals and humans: Implications for health risks. **Environmental International**, v. 99, p. 43-54, 2017.

LI, X.; BAO, C.; MA, Z.; XU, B.; LIU, X.; YING, X.; ZHANG, X. Perfluorooctanoic acid stimulates ovarian cancer cell migration, invasion via ERK/NF- κ B/MMP-2/-9 pathway. **Toxicology Letters**, v. 294, p. 44-50, 2018.

LI, Y.; HUO, X.; LIU, J.; PENG, L.; LI, W.; XU, X. Assessment of cadmium exposure for neonates in Guiyu, an electronic waste pollution site of China. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 117, n. 1-4, p. 343-351, 2011.

LI, Y.; LI, N.; YU, X.; HUANG, K.; ZHENG, T.; CHENG, X.; ZENG, S.; LIU, X. Hematoxylin and eosin staining of intact tissues via delipidation and ultrasound. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 12259, 2018.

LIEN, G-W.; HUANG, C-C.; WU, K-Y.; CHEN, M-H.; LIN, C-Y.; CHEN, C-Y.; HSIEH, W-S.; CHEN, P-C. Neonatal-maternal factors and perfluoroalkyl substances in cord blood. **Chemosphere**, v. 92, p. 843-850, 2013.

LIU, J.; CAO, Q.; YUAN, J.; ZHANG, X.; YU, L.; SHI, H. Histological observation on unique phenotypes of malformation induced in *Xenopus tropicalis* larvae by tributyltin. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 24, n. 2, p. 195-202, 2012.

LIU, X., JIN, Y., LIU, W., WANG, F., HAO, S. Possible mechanism of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate on the release of calcium ion from calcium stores in primary cultures of rat hippocampal neurons. **Toxicology In Vitro**, v. 25, p. 1294-1301, 2011.

LONG, K. R.; HUTTNER, W. B. How the extracellular matrix shapes neural development. **Open Biology**, v. 9, 180216, 2019.

LONG, M.; GHISARI, M.; KJELDSSEN, L.; WIELSØE, M.; NØRGAARD-PEDERSEN, B.; MORTENSEN, E. L.; ABDALLAH, M. W.; BONEFELD-JØRGENSEN, E. C. Autism spectrum disorders, endocrine disrupting compounds, and heavy metals in amniotic fluid: a case-control study. **Molecular autism**, v. 10, p. 1-19, 2019.

LÓPEZ, E.; FIGUEROA, S.; OSET-GASQUE, M. J.; GONZÁLEZ, M. P. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, n. 5, p. 901–911, 2003.

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

LUZIO, A.; MONTEIRO, S. M.; ROCHA, E.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. A.; COIMBRA, A. M. Development and recovery of histopathological alterations in the gonads of zebrafish (*Danio rerio*) after single and combined exposure to endocrine disruptors (17 α -ethinylestradiol and fadrozole). **Aquatic Toxicology**, v. 175, p. 90–105, 2016.

LV, N.; YUAN, J.; JI, A.; SHI, L.; GAO, M.; CUI, L.; JIANG, Q. Perfluorooctanoic acid-induced toxicities in chicken embryo primary cardiomyocytes: Roles of PPAR alpha and Wnt5a/Frizzled2. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 381, 114716, 2019.

MALATESTA, P.; HARTFUSS, E.; GÖTZ, M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. **Development**, v. 127, p. 5253–5263, 2000.

MANZANO-SALGADO, C. B.; CASAS, M.; LOPEZ-ESPINOSA, M-J.; BALLESTER, F.; BASTERRECHEA, M.; GRIMALT, J. O.; JIMÉNEZ, A-M.; KRAUS, T.; SCHETTGEN, T.; SUNYER, J.; VRIJHEID, M. Transfer of perfluoroalkyl substances from mother to fetus in a Spanish birth cohort. **Environmental Research**, v. 142, p. 471-478, 2015.

MASON, F. M.; TWOROGGER, M.; MARTIN, A. C. Apical domain polarization localizes actin-myosin activity to drive ratchet-like apical constriction. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 926-936, 2013.

MATENAERS, C.; POPPER, B.; RIEGER, A.; WANKE, R.; BLUTKE, A. Practicable methods for histological section thickness measurement in quantitative stereological analyses. **PLoS One**, v. 13, n. 2, e0192879, 2018.

MATHIESEN, L.; BUERKI-THURNHERR, T.; PASTUSCHEK, J.; AENGENHEISTER, L.; KNUDSEN, L. E. Fetal exposure to environmental chemicals; insights from placental perfusion studies. **Placenta**, v. 106, p. 58-66, 2021.

MATOVIC, V.; BUHA, A.; DUKIC-COSIC, D.; BULAT, Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 130-140, 2015.

MATT, G. E.; QUINTANA, P. J. E.; HOH, E.; DODDER, N. G.; MAHABEE-GITTENS, E. M.; PADILLA, S.; MARKMAN, L.; WATANABE, K. Tobacco smoke is a likely source of lead and cadmium in settled house dust. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 63, 126656, 2021.

MCCLELLAND, K. S.; NG, E. T.; BOWLES, J. Agarose/gelatin immobilisation of tissues or embryo segments for orientated paraffin embedding and sectioning. **Differentiation**, v. 91, n. 4-5, p. 68-71, 2016.

MCMILLAN, D. B.; HARRIS, R. J. **An Atlas of Comparative Vertebrate Histology**. Amsterdam: Academic Press, 2018.

MCSHANE, S. G.; MOLÈ, M. A.; SAVERY, D.; GREENE, N. D. E.; TAM, P. P. L.; COPP, A. J. Cellular basis of neuroepithelial bending during mouse spinal neural tube closure. **Developmental Biology**, v. 404, p. 113-124, 2015.

MELA, M.; RANDI, M. A. F.; VENTURA, D. F.; CARVALHO, C. E. V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, p. 426-435, 2007.

MILES, A. E. W.; LINDER, J. E. POLYETHYLENE GLYCOLS AS HISTOLOGICAL EMBEDDING MEDIA: WITH A NOTE ON THE DIMENSIONAL CHANGE OF TISSUE DURING EMBEDDING IN VARIOUS MEDIA. **Journal of the Royal Microscopical Society**, v. 72, n. 4, 1952.

MINER, J. H.; YURCHENCO, P. D. Laminin functions in tissue morphogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, p. 255-284, 2004.

MIYATA, T. Development of three-dimensional architecture of the neuroepithelium: Role of pseudostratification and cellular 'community'. **Development, Growth & Differentiation**, v. 5, n. s1, p. s105-s112, 2008.

MOISEENKO, T. I.; GASHKINA, N. A. Biogeochemistry of Cadmium: Anthropogenic Dispersion, Bioaccumulation, and Ecotoxicity. **Geochemistry International**, v. 56, n. 8, p. 798-811, 2018.

MOK, G. F.; ALREFAEI, A. F.; MCCOLL, J.; GROCCOTT, T.; MÜNSTERBERG, A. Chicken as a Developmental Model. In: **Encyclopedia of Life Sciences (eLS)**. Chichester: John Wiley & Sons, 2015. p. 1-8.

MOLÈ, M. A. **Cell dynamics and cell-matrix interactions during neural tube closure**. 182 f. Thesis (PhD in Developmental Biology & cancer). Developmental Biology, UCL Great Ormond Street Institute of Child health, 2016.

MOLÈ, M. A.; GALEA, G. L.; ROLO, A.; WEBERLING, A.; NYCHYK, O.; DE CASTRO, S. C.; SAVERY, D.; FÄSSLER, R.; YBOT-GONZÁLEZ, P.; GREENE, N. D. E.; COPP, A. J. Integrin-Mediated Focal Anchorage Drives Epithelial Zippering during Mouse Neural Tube Closure. **Developmental Cell**, v. 52, p. 321-334, 2020.

MOWERY, J.; CHESNER, J.; SPANGENBERGER, S.; HIXSON, D. C. Rapid low molecular weight polyethylene glycol embedding protocol for immunocytochemistry. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1549-1552, 1989.

MÜLLER, Y. M. R.; RIVERO, L. B. D.; CARVALHO, M. C.; KOBUS, K.; FARINA, M.; NAZARI, E. M. Behavioral impairments related to lead-induced developmental neurotoxicity in chicks. **Archives of Toxicology**, v. 82, p. 445-451, 2008.

NAYAK, R. **Histopathology Techniques and Its Management**. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2018.

NEEDHAM, L. L.; GRANDJEAN, P.; HEINZOW, B.; JØRGENSEN, P. J.; NIELSEN, F.; PATTERSON JR, D. G.; SJÖDIN, A.; TURNER, W. E.; WEIHE, P. Partition of Environmental Chemicals between Maternal and Fetal Blood and Tissues. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 1121-1126, 2011.

NIKOLOPOULOU, E.; GALEA, G. L.; ROLO, A.; GREENE, N. D. E.; COPP, A. J. Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. **Development**, v. 144, p. 552-566, 2017.

NISHIMURA, T.; HONDA, H.; TAKEICHI, M. Planar Cell Polarity Links Axes of Spatial Dynamics in Neural-Tube Closure. **Cell**, v. 149, p. 1084-1097, 2012.

NOIVA, R. M.; MENEZES, A. C.; PELETEIRO, M. C. Influence of temperature and humidity manipulation on chicken embryo development. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 234, 2014.

NOLAN, L. A.; NOLAN, J. M.; SHOFER, F. S.; RODWAY, N. V.; EMMETT, E. A. Congenital anomalies, labor/delivery complications, maternal risk factors and their relationship with perfluorooctanoic acid (PFOA)-contaminated public drinking water. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 147-155, 2010.

NWEKE, C. O.; OGBONNA, C. J. Statistical models for biphasic dose-response relationships (hormesis) in toxicological studies. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 12, n. 1, p. 39-55, 2017.

OH, J.; BENNETT, D. H.; CALAFAT, A. M.; TANCREDI, D.; ROA, D. L.; SCHMIDT, R. J.; HERTZ-PICCIOTO, I.; SHIN, H-M. Prenatal exposure to per- and polyfluoroalkyl substances in association with autism spectrum disorder in the MARBLES study. **Environmental International**, v. 147, 106328, 2021.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; GROTZNER, S. R.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; RIOS, F. S. Pré-microscopia. In: OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; REIS FILHO, H. S.; GRÖTZNER, S. R. (Eds). **Técnicas e Métodos para Utilização Prática em Microscopia** São Paulo: Santos, 2012. p. 41-64.

OLIVEIRA, F. G.; LIROLA, J. R.; SALGADO, L. D.; DE MARCHI, G. H.; PADIAL, A. A.; GUIMARÃES, A. T. B.; CESTARI, M. M.; ASSIS, H. C. S. Toxicological effects of anthropogenic activities in *Geophagus brasiliensis* from a coastal river of southern Brazil: A biomarker approach. **Science of The Total Environment**, v. 667, p. 371-383, 2019.

OMOIKE, O. E.; PACK, R. P.; MAMUDU, H. M.; LIU, Y.; STRASSER, S; ZHENG, S.; OKORO, J.; WANG, L. Association between per and polyfluoroalkyl

substances and markers of inflammation and oxidative stress. **Environmental Research**, In Press, 110361, 2020.

OU, L.; WANG, H.; WU, Z.; WANG, P.; YANG, L., LI, X.; SUN, K.; ZHU, X.; ZHANG, R. Effects of cadmium on osteoblast cell line: Exportin 1 accumulation, p-JNK activation, DNA damage and cell apoptosis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, 111668, 2021.

PAMIES, D.; MARTÍNEZ, C. E.; SOGORB, M. A.; VILANOVA, E. Mechanism-based models in reproductive and developmental toxicology. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Reproductive and Developmental Toxicology**. Elsevier, 2011. p. 135-146.

PARK, E.; KIM, S.; SONG, S-H.; LEE, C-W.; KWON, J-T.; LIM, M. K.; PARK, E. Y.; WON, Y-J.; JUNG, K-W.; KIM, B. Environmental exposure to cadmium and risk of thyroid cancer from national industrial complex areas: A population-based cohort study. **Chemosphere**, v. 268, 128819, 2021.

PARK, K.; HAN, E. J.; AHN, G.; KWAK, I-S. Effects of combined stressors to cadmium and high temperature on antioxidant defense, apoptotic cell death, and DNA methylation in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Science of the Total Environment**, v. 716, 137130, 2020.

PENG, L.; WANG, X.; HUO, X.; XU, X.; LIN, K.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; WU, K. Blood cadmium burden and the risk of nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in Chinese Chaoshan population. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 16, p. 12323-12331, 2015.

PÉREZ, F.; NADAL, M.; NAVARRO-ORTEGA, A.; FÀBREGA, F.; DOMINGO, J. L.; BARCELÓ, D.; FARRÉ, M. Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. **Environment International**, v. 59, p. 354-362, 2013.

PICÓ, Y.; FARRÉ, M.; LLORCA, M.; BARCELÓ, D. Perfluorinated Compounds in Food: A Global Perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 7, 2011.

PIEROZAN, P.; JERNEREN, F.; KARLSSON, O. Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure promotes proliferation, migration and invasion potential in human breast epithelial cells. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 5, p. 1729-1739, 2018.

PINKAS, A.; SLOTKIN, T. A.; BRICK-TURIN, Y.; VAN DER ZEE, E. A.; YANAI, J. Neurobehavioral teratogenicity of perfluorinated alkyls in an avian model. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, p. 182-186, 2010.

POOTHONG, S.; BOONTANON, S. K.; BOONTANON, N. Determination of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid in food packaging using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 205-206, p. 139-143, 2012.

POPEK, E. Environmental Chemical Pollutants. In: POPEK, E (Ed). Sampling and Analysis of Environmental Chemical Pollutants, 2 ed. Elsevier, 2018, p. 13-69.

POULSEN, L. L. C.; SIERSBÆK, M.; MANDRUP, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 23, p. 631–639, 2012.

POWNALL, M. E.; SAHA, M. S. Histological observation of teratogenic phenotypes induced in frog embryo assays. **Methods in Molecular Biology**, v. 1797, p. 309-323, 2019.

POZZI, A.; YURCHENCO, P. D.; IOZZO, R. V. The nature and biology of basement membranes. **Matrix Biology**, v. 57-58, p. 1-11. 2017.

PREFUMO, F.; IZZI, C. Fetal abdominal wall defects. **Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 28, n. 3, p. 391-402, 2014.

RAHIMZADEH, M. R.; RAHIMZADEH, M. R.; KAZEMI, S.; MOGHADAMNIA, A. A. Cadmium toxicity and treatment: An update. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 8, n. 3, p. 135-145, 2017.

RAHMAN, M. A.; BAOYINDELIGEER; IWASAWA, A.; YOSHIZAKI. Mechanism of chalaza formation in quail eggs. **Cell and tissue research**, v. 330, n. 3, p. 535-543, 2007.

RANKIN, K.; MABURY, S. A.; JENKINS, T. M.; WASHINGTON, J. W. A North American and global survey of perfluoroalkyl substances in surface soils: Distribution patterns and mode of occurrence. **Chemosphere**, v. 161, p. 333-341, 2016.

REKLER, D.; KALCHEIM, C. From Neural Crest to Definitive Roof Plate: The Dynamic Behavior of the Dorsal Neural Tube. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, 3911, 2021.

RIBATTI, D. The use of the chick embryo chorioallantoic membrane as experimental model to study virus growth and to test the clonal selection hypothesis. The contribution of Sir Mac Farlane Burnet. **Immunology Letters**, v. 200, p. 1-4, 2018.

RICE, D.; BARONE JR, S. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, s. 3, p. 511-533, 2000.

RIDER, C. V.; DINSE, G. E.; UMBACH, D. M.; SIMMONS, J. E.; HERTZBERG, Predicting mixture toxicity with models of additivity. In: Rider, C.V.; Simmons, J. E. (Eds.). **Chemical Mixtures and Combined Chemical and Nonchemical Stressors**. Springer, Cham, 2018.

ROLO, A.; ESCUIN, S.; GREENE, N. D. E.; COPP, A. J. Rho GTPases in mammalian spinal neural tube closure. **Small GTPases**, v. 8, n. 4, 2018.

ROSS TECH. **Como investigar as práticas de incubação**. 2010. Disponível em http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/Ross-Tech-SET-2010.pdf>. Acesso em 24/10/2018.

ROSZKO, I.; SAWADA, A.; SOLNICA-KREZEL, L. Regulation of convergence and extension movements during vertebrate gastrulation by the Wnt/PCP pathway. **Seminars in Cell & Development**, v. 20, p. 986-997, 2009.

ROTMAN, N.; MICHALIK, L.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. PPARs in fetal and early postnatal development. **Advances in Developmental Biology**, v. 16, p. 33-64, 2006.

ROVIRA, J.; MARTÍNEZ, M. A.; SHARMA, R. P.; ESPUIS, T.; NADAL, M.; KUMAR, V.; COSTOPOULOU, D.; VASSILIADOU, I.; LEONDIADIS, L.; DOMINGO, J. L.; SCHUHMACHER, M. Prenatal exposure to PFOS and PFOA in a pregnant women cohort of Catalonia, Spain. **Environmental Research**, v. 175, p. 384-392, 2019.

RUBIO-VARGAS, D. A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FILIPAK NETO, F.; CORDEIRO, A. L.; CESTARI, M. M.; SOUZA, A. C.; MARTINS, C. C.; SILVA, C. P.; CAMPOS, S. X.; GARCIA, J. R. E.; PRODOCIMO, M. M. Exposure to pollutants present in Iguaçú River Southern Brazil affect the health of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758): Assessment histological, genotoxic and biochemical. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 87, 103682, 2021.

SADLER, T. W. The embryonic origin of ventral body wall defects. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 19, n. 3, p. 209-214, 2010.

SAITSU, H.; YAMADA, S.; UWABE, C.; ISHIBASHI, M.; SHIOTA, K. Development of the posterior neural tube in human embryos. **Anatomy and Embryology**, 209, p. 107-117, 2004.

SAKAMOTO, M.; YASUTAKE, A.; DOMINGO, J.L.; CHAN, H. M.; KUBOTA, M.; MURATA, K. Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: Potential use as indicators for prenatal exposure. **Environment International**, v. 60, p. 106-111, 2013.

SALVATORI, F.; TALASSI, C. B.; SALZGEBER, S. A.; SPINOSA, H. S. BERNARDI, M. M. Embryotoxic and long-term effects of cadmium exposure during embryogenesis in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, p. 673-680, 2004.

SANTANA, M. S.; YAMAMOTO, F. Y.; SANDRINI-NETO, L.; FILIPAK NETO, F.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; PRODOCIMO, M. M. Diffuse sources of contamination in freshwater fish: Detecting effects through active biomonitoring and multi-biomarker approaches. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p. 173-181, 2018.

SANTOS, G. S.; PIANCINI, L. D.; TINCANI, F. H.; KLINGELFUS, T.; YAMAMOTO, F. Y.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; GUILOSKI, I. C.; ASSIS, H.;

CESTARI, M. M. Liver Damage in Two Neotropical Fish Species from a Polluted Estuarine Area. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 13, n. 1, p. 39-50, 2018.

SARCHIELLI, E.; PACINI, S.; MORUCCI, G.; PUNZI, T.; MARINI, M.; VANNELLI, G.B.; GULISANO, M. Cadmium induces alterations in the human spinal cord morphogenesis. **Biometals**, v. 25, n. 1, p. 63-74, 2012.

SAVITZ, D. A.; STEIN, C. R.; BARTER, S. M.; ELSTON, B.; GONG, J.; SHIN, H. – M.; WELLENIUS, G. A. Perfluorooctanoic Acid Exposure and Pregnancy Outcome in a Highly Exposed Community. **Epidemiology**, v. 23, n. 3, p. 386-392, 2012.

SAVORY, J. G. A.; MANSFIELD, M.; RIJLI, F. M.; LOHNES, D. Cdx mediates neural tube closure through transcriptional regulation of the planar cell polarity gene Ptk7. **Development**, v. 138, p. 1361-1370, 2011.

SCHOENWOLF, G. C. Contributions of the chick embryo and experimental embryology to understanding the cellular mechanisms of neurulation. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 62, n. 1-2-3, p. 49-55, 2018.

SCHOENWOLF, G. C. **Laboratory Studies of Vertebrate and Invertebrate Embryos**. 8 ed. Prentice Hall, 2001.

SCHOENWOLF, G. C. Observations on closure of the neuropores in the chick embryo. **The American Journal of Anatomy**, v. 155, n. 4, p. 445-465, 1979.

SCHOENWOLF, G. C. **The avian embryo: a model for descriptive and experimental embryology**. In: MOODY, S. A. Cell lineage and fate determination. San Diego: Academic Press, 644p, 1999.

SCHOENWOLF, G. C.; DELONGO, J. Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo. **The American Journal of Anatomy**, v. 158, p. 43-63, 1980.

SCHOENWOLF, G. C.; MATHEWS, W. W. **Atlas of Descriptive Embryology**. 6 ed. Pearson Education, 2003.

SHARIAT, S. Z. A. S.; RASTQAR, A.; JABBARI, M.; TAHERI, M.; KESHVARI, M. Cadmium Concentration in Cigarette Brands, Tobacco Leaves, and Smokers' Blood Samples. **Herbal Medicines Journal**, v. 4, n. 1, p. 11-17, 2019.

SHARIFF, S.; KALER, A. K. **Principles & Interpretation of Laboratory Practices in Surgical Pathology**. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2016.

SHARMA, V.; MCNEILL, J. H. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 6, p. 907-921, 2009.

SHIMOKITA, E.; TAKAHASHI, Y. Secondary neurulation: fate-mapping and gene manipulation of the neural tube in tail bud. **Development, Growth & Differentiation**, v. 53, p. 401-410, 2011.

SHINDO, A. Models of convergent extension during morphogenesis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 7, n. 1, p. 293-310, 2018.

SHYAMALA, K.; YANDURI, S.; GIRISH, H. C.; MURGOD, S. Neural crest: the fourth germ layer. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v.19, n. 2, p. 221-229, 2015.

SIDERIDOU, I. D.; ACHILIAS, D. S.; KARAVA, O. Reactivity of Benzoyl Peroxide/Amine System as an Initiator for the Free Radical Polymerization of Dental and Orthopaedic Dimethacrylate Monomers: Effect of the Amine and Monomer Chemical Structure. **Macromolecules**, v. 39, n. 6, p. 2072-2080, 2006.

SIDMAN, R. L.; MOTTOLA, P. A.; FEDER, N. Improved polyester wax embedding for histology. **Stain Technology**, v. 36, n. 5, 1961.

SIMÕES-COSTA, M.; BRONNER, M. E. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. **Development**, v. 142, n. 2, p. 242-257, 2015.

SINGHRAO, S. K.; NICHOLSON, K.; CREAN, S. Informed choices for challenging specimens when choosing methacrylate resin systems for histology. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 5, p. 576-585, 2012.

SKOGLUND, P.; KELLER, R. Integration of Planar Cell Polarity and ECM Signaling in Elongation of the Vertebrate Body Plan. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 5, p. 589-596, 2010.

SLACK, J. M. W. Evolution and Development. **Essential developmental biology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2013. p. 419-439.

SMIRNOVA, A.; MENTOR, A.; RANEFALL, P.; BORNEHAG, C-G.; BRUNSTRÖM, B.; MATTSSON, A.; JÖNSSON, M. Increased apoptosis, reduced Wnt/ β -catenin signaling, and altered tail development in zebrafish embryos exposed to a human-relevant chemical mixture. **Chemosphere**, v. 264, n. pt1, p. 128467, 2021.

SMITH, P. J.; WARFIELD, J. L. Specimen handling and preparation for routine diagnostic histopathology. In: BURNETT, D.; CROCKER, J. (Eds). **The Science of Laboratory Diagnosis**, 2^a ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2005. p. 3-15.

SMITH, S. M.; FLENTKE, G. R.; GARIC, A. Avian Models in Teratology and Developmental Toxicology. **Methods in Molecular Biology**, n. 889, p. 85-103, 2012.

SMITHSON, K. G.; MACVICAR, B. A.; HATTON, G. I. Polyethylene glycol embedding: a technique compatible with immunocytochemistry, enzyme

histochemistry, histofluorescence and intracellular staining. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 7, n. 1, p. 27-41, 1983.

SOFTELAND, L.; KIRWAN, J. A.; HORI, T. S. F.; STORSETH, T. R.; SOMMER, U.; BERNTSSEN, M. H. G.; VIANT, M. R.; RISE, M. L.; WAAGBO, R.; TORSTENSEN, B. E.; BOOMAN, M.; OLSVIK, P. A. Toxicological effect of single contaminants and contaminant mixtures associated with plant ingredients in novel salmon feeds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 73, p. 157-174, 2014.

SORKUN, H. C.; BIR, F.; AKBULUT, M.; DIVRIKLI, U.; ERKEN, G.; DEMIRHAN, H.; DUZCAN, E.; ELCI, L.; CELIK, I.; YOZGATLI, U. The effects of air pollution and smoking on placental cadmium, zinc concentration and metallothionein expression. **Toxicology**, v. 238, n. 1, p. 15-22, 2007.

SOUZA, T. L.; BRAGA, A. A.; LÓPEZ-GREGO, L. S.; NUNES, E. T. Functional morphology of the male reproductive system in *Callichirus major* (Crustacea: Decapoda: Axiidea): Evidence of oocytes in the gonad. **Acta Zoologica**, v. 99, n.1, 2018.

SPEAR, P. C.; ERICKSON, C. A. Interkinetic nuclear migration: A mysterious process in search of a function. **Development, Growth & Differentiation**, v. 54, n. 3, p. 306-316, 2012.

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.

STEENLAND, K.; FLETCHER, T.; STEIN, C. R.; BARTELL, S. M.; CARROW, L.; LOPEZ-ESPINOSA, M. – J.; RYAN, P. B.; SAVITZ, D. A. Review: Evolution of evidence on PFOA and health following the assessments of the C8 Science Panel. **Environment International**, v. 145, 16125, 2020.

STEIN, C. R.; SAVITZ, D. A.; ELSTON, B.; THORPE, P. G.; GILBOAC, S. M. Perfluorooctanoate exposure and major birth defects. **Reproductive Toxicology**, v. 47, p. 15-20, 2014.

STERN, C. D. The Chick: A Great Model System Becomes Even Greater. **Developmental Cell**, v. 8, n. 1, p. 9-17, 2005.

STIRLING, J. W.; WOODS, A. E. Resin (plastic) embedding for microscopy and tissue analysis. In: SUVARNA, S. K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. (Eds). **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**, 8^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 96-113.

STOJSAVLJEVIC, A.; ROVCANIN, M.; MIKOVIC, Z.; PEROVIC, M.; JEREMIC, A.; ZECEVIC, N.; MANOJLOVIC, D. Analysis of essential, toxic, rare earth, and noble elements in maternal and umbilical cord. **Environmental Science and Pollution Research**, 2022.

STRUNGARU, S. A.; PLAVAN, G.; NICOARA, M. A short overview about cadmium and its toxicity focused on humans, bioindicators and model organisms. **Journal of Survey in Fisheries Sciences**, v. 2, n. 2, p. 1-15, 2016.

SULLIVAN-BROWN, J.; BISHOP, M. E.; BURDINE, R. D. Embedding, Serial Sectioning and Staining of Zebrafish Embryos Using JB-4TM Resin. **Nature Protocols**, v. 6, n. 1, p. 46-55, 2011

SUTHERLAND, A.; KELLER, R.; LESKO, A. Convergent extension in mammalian morphogenesis. In: DAVEY, J. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2020. p. 199-211.

SUZUKI, M.; MORITA, H.; UENO, N. Molecular mechanisms of cell shape changes that contribute to vertebrate neural tube closure. **Development, Growth & Differentiation**, v. 54, p. 266-276, 2012.

SZNAJDER-KATARZYŃSKA, K.; SURMA, M.; CIEŚLIK, I. A review of Perfluoroalkyl Acids (PFAAs) in terms of sources, applications, human exposure, dietary intake, toxicity, legal regulation, and methods of determination. **Journal of Chemistry**, v. 2019, ID 2717528, 2019.

TANG, J.; JIA, T.; GAO, N.; WU, Y.; LIU, Z.; LU, X.; DU, Q.; HE, J.; LI, N.; CHEN, B.; JIANG, J.; LIU, W.; DING, Y.; ZHU, W.; ZHANG, H. Role of the Nrf2-ARE pathway in perfluorooctanoic acid (PFOA)-induced hepatotoxicity in *Rana nigromaculata*. **Environmental Pollution**, v. 238, p. 1035-1043, 2018.

TANG, M., XU, C., LIN, N., LIU, K., ZHANG, Y., YU, X., LIU, W. Lead, mercury, and cadmium in umbilical cord serum and birth outcomes in Chinese fish consumers. **Chemosphere**, v. 148, p. 270-275, 2016.

TAYLOR, C.M., EMOND, A.M., LINGAM, R., GOLDING, J. Prenatal lead, cadmium and mercury exposure and associations with motor skills at age 7 years in a UK observational birth cohort. **Environment International**, v. 117, p. 40-47, 2018.

TEMPLETON, D. M.; LIU, Y. Effects of cadmium on the actin cytoskeleton in renal mesangial cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 91, n. 1, p. 1-7, 2013.

TENG, X.; TOYAMA Y. Apoptotic force: active mechanical function of cell death during morphogenesis. **Development Growth & Differentiation**, v. 53, p. 269-276, 2011.

THOMPSON, J. M.; BANNIGAN, J. G. Omphalocele induction in the chick embryo by administration of cadmium. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 42, p. 1703-1709, 2007.

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

TONG, Q.; ROMANINI, C. E.; EXADAKTYLOS, V.; BAHR, C.; BERCKMANS, D.; BERGOUG, H.; ETERRADOSSI, N.; ROULSTON, N.; VERHELST, R.; MCGONNELL, I. M.; DEMMERS, T. Embryonic development and the physiological factors that coordinate hatching in domestic chickens. **Poultry Science**, v. 92, p. 620-628, 2013.

TRAORÉ, T.; FORHAN, A.; SIROT, V.; KADAWATHAGEDARA, M.; HEUDE, B.; HULIN, M.; DE LAUZON-GUILLAIN, B.; BOTTON, J.; CHARLES, M. A.; CRÉPET, A. To which mixtures are French pregnant women mainly exposed? A combination of the second French total diet study with the EDEN and ELFE cohort studies. **Food and Chemical Toxicology: An international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 111, p. 310-328, 2018.

TRAPANI, V.; BONALDO, P.; CORALLO, D. Role of ECM in notochord formation, function and disease. **Journal of Cell Science**, v. 130, p. 3203-3211, 2017.

TSUJI, R.; CROFTON, K. M. Developmental neurotoxicity guideline study: Issues with methodology, evaluation and regulation. **Congenital Anomalies**, v. 52, n. 3, p. 122-128, 2012.

UENO, N.; GREENE, N. D. E. Planar cell polarity genes and neural tube closure. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 69, n. 4, p. 318-324, 2003.

URRY, L. A.; CAIN, M. L.; WASSERMAN, S. A.; MINORSKY, P. V.; ORR, R. B.; CAMPBELL, N. A. **Campbell Biology**. 12 ed. Londres: Pearson Education, 2021.

VAISERMAN, A. Early-life Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and Later-life Health Outcomes: An Epigenetic Bridge? **Aging and Disease**, v. 5, n. 6, p. 419-429, 2014.

VAN DE VEN, L. J.; BALLER, L.; VAN WAGENBERG, A. V.; KEMP, B.; VAN DE BRAND, H. Effects of egg position during late incubation on hatching parameters and chick quality. **Poultry Science**, v. 90, n. 10, p. 2342-2347, 2011.

VAN STRAATEN, H. W. M.; JANSSEN, H. C. J. P.; PEETERS, M. C. E.; COPP, A. J.; HEKKING, J. W. M. Neural tube closure in the chick embryo is multiphasic. **Developmental Dynamics**, v. 207, p. 309-318, 1996.

VEERIAH, V.; SARAN, U.; SWAMINATHAN, A.; BALAGURU, U. M.; THANGARAJ, P.; NAGARAJAN, S.; RAJENDRAN, V. K.; CHATTERJEE, S. Cadmium-Induced Embryopathy: Nitric Oxide Rescues Teratogenic Effects of Cadmium. **Toxicological Sciences**, v. 144, n. 1, p. 90-104, 2015.

VIEIRA, C.; POMBERO, A.; GARCÍA-LOPEZ, R.; GIMENO, L.; ECHEVARRIA, D.; MARTÍNEZ, S. Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, p. 7-20, 2010.

VIERKE, L.; STAUDE, C.; BIEGEL-ENGLER, A.; DROST, W.; SCHULTE, C. Perfluorooctanoic acid (PFOA) - main concerns and regulatory developments in Europe from an environmental point of view. **Environmental Sciences Europe**, v. 24, n. 16, 2012.

WACHHOLZ, G. E.; RENGEL, B. D.; VARGESSON, N.; FRAGA, L. R. From the Farm to the Lab: How Chicken Embryos Contribute to the Field of Teratology. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 666726, 2021.

WANG, B.; CHEN, Q.; SHEN, L.; ZHAO, S. PANG, W.; ZHANG, J. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in cord blood of newborns in Shanghai, China: Implications for risk assessment. **Environment International**, v. 97, p. 7-14, 2016.

WANG, H.; ENGSTROM, A. K.; XIA, Z. Cadmium impairs the survival and proliferation of cultured adult subventricular neural stem cells through activation of the JNK and p38 MAP kinases. **Toxicology**, v. 380, p. 30-37, 2017.

WANG, J. X.; WHITE, M. D. Mechanical forces in avian embryo development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 120, p. 133-146, 2021.

WANG, Y.; WANG, L., CHANG, W.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, W. Neurotoxic effects of perfluoroalkyl acids: Neurobehavioral deficit and its molecular mechanism. **Toxicology Letters**, v. 305, p. 65-72, 2019.

WANG, Y.; ZHONG, Y.; LI, J.; ZHANG, J.; LYU, B.; ZHAO, T.; WU, Y. Occurrence of perfluoroalkyl substances in matched human serum, urine, hair and nail. **Journal of Environmental Sciences**, v. 67, p. 191-197, 2018.

WANG, Z.; YANG, C. Metal carcinogen exposure induces cancer stem cell-like property through epigenetic reprogramming: A novel mechanism of metal carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 57, p. 95-104, 2019.

WANG, Z.; ZHANG, T.; WU, J.; WEI, X.; XU, A.; WANG, S.; WANG, Z. Male reproductive toxicity of perfluorooctanoate (PFOA): Rodent studies. **Chemosphere**, v. 270, 128608, 2021.

WEI, Z.; SHAIKH, Z. A. Cadmium stimulates metastasis-associated phenotype in triple-negative breast cancer cells through integrin and β -catenin signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 328, p. 70-80, 2017.

WHITEHEAD, H. D.; VENIER, M.; WU, Y.; EASTMAN, E.; URBANIK, S.; DIAMOND, M. L.; SHALIN, A.; SCHWARTZ-NARBONNE, H.; BRUTON, T. A.; BLUM, A.; WANG, Z.; GREEN, M.; TIGHE, M.; WILKINSON, J. T.; MCGUINNESS, S.; PEASLEE, G. F. Fluorinated Compounds in North American Cosmetics. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 8, n. 7, p. 538-544, 2021.

WHO. Exposure do cadmium: a major public health concern. World Health Organization, 2019. Disponível em <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329480/WHO-CED-PHE-EPE-19.4.3-eng.pdf>>. Acesso em 21/03/2022.

WIKSTRÖM, S.; HUSSEIN, G.; KARLSSON, A. L.; LINDH, C. H.; BORNEHAG, C. – G. Exposure to perfluoroalkyl substances in early pregnancy and risk of sporadic first trimester miscarriage. **Scientific Reports**, v. 11, 3568, 2021.

WIKSTRÖM, S.; LIN, P. – I.; LINDH, C. H.; SHU, H.; BORNEHAG, C. – G. Maternal serum levels of perfluoroalkyl substances in early pregnancy and offspring birth weight. **Pediatric Research**, v. 87, p. 1093-1099, 2020.

WILLHITE, C. C.; MIRKES, P. E. Developmental Toxicology. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)**. Academic Press, 2014. p. 14-44.

WILSON, J. Current status of teratology: general principles and mechanisms derived from animal studies. In: WILSON, J.; FRASER, F. (Eds). **Handbook of Teratology**. New York: Plenum Press, 1977. p. 47-74.

WILSON, J.; BERNTSEN, H. F.; ZIMMER, K. E.; FRIZZELL, C.; VERHAERGEN, S.; ROPSTAD, E.; CONNOLLY, L. Effects of defined mixtures of persistent organic pollutants (POPs) on multiple cellular responses in the human hepatocarcinoma cell line, HepG2, using high content analysis screening. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 294, p. 21-31, 2016.

WINKENS, K.; GIOVANOULIS, G.; KOPONEN, J.; VERTERGREN, R.; BERGER, U.; KARVONEN, A. M.; PEKKANEN, J.; KIVIRANTA, H.; COUSINS, I. T. Perfluoroalkyl acids and their precursors in floor dust of children's bedrooms – Implications for indoor exposure. **Environmental international**, v. 119, p. 493-502, 2018.

WITESKA, M.; SARNOWSKI, P.; LUGOWSKA, K.; KOWAL, E. The effects of cadmium and copper on embryonic and larval development of the *Leuciscus idus* L. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 151-163, 2014.

WITTIG, J. G.; MÜNSTERBERG, A. The Early Stages of Heart Development: Insights from Chicken Embryos. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, v. 3, n. 2, 2016.

WOLF, C. J.; FENTON, S. E. ; SCHMID, J. E.; CALAFAT, A. M.; KUKLENYIK, Z.; BRYANT, X. A.; THIBODEAUX, J.; DAS, K. P.; WHITE, S. S.; LAU, C. S.; ABBOTT, B. D. Developmental toxicity of perfluorooctanoic acid in the CD-1 mouse after cross-foster and restricted gestational exposures. **Toxicological Sciences**, v. 95, p. 462-473, 2007.

WOLFE, D. Tissue Processing. In: SUVARNA, S. K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. (Eds). **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**, 8^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 73-83.

WOLOSEWICK, J. J. Polyethylene Glycon Embedding Protocol for Immunofluorescence Microscopy. **Methods in Enzymology**, v. 134, p. 580-591, 1986.

WOODRUFF, J. M.; GREENFIELD, S. A. Advantages of Glycol Methacrylate Embedding Systems for Light Microscopy. **Journal of Histotechnology**, v. 2, n. 4, p. 164-167, 1979.

WU, C.; ZHANG, Y.; CHAI, L.; WANG, H. Oxidative stress, endocrine disruption, and malformation of *Bufo gargarizans* embryo exposed to sub-lethal cadmium concentrations. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 49, p. 97-104, 2017.

WU, K.; XU, X.; PENG, L.; LIU, J.; GUO, Y.; HUO, X. Association between maternal exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) from electronic waste recycling and neonatal health outcomes. **Environment International**, v. 48, n. 1, p. 1-8, 2012.

XU, G.; LIU, S.; HUANG, M.; JIANG, X.; YANG, M. Cadmium induces apoptosis of human granulosa cell line KGN via mitochondrial dysfunction-mediated pathways. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 220, 112341, 2021.

XU, L.; GE, J.; HUO, X.; ZHANG, Y.; LAU, A. T. Y.; XU, X. Differential proteomic expression of human placenta and fetal development following e-waste lead and cadmium exposure *in utero*. **Science of The Total Environment**, v. 550, p.1163-1170, 2016.

YAMAGUCHI, Y.; MIURA, M. How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70 70, p. 3171-86, 2013.

YAMAGUCHI, Y.; SHINOTSUKA, N.; NONOMURA, K.; TAKEMOTO, K.; KUIDA, K.; YOSIDA, H.; MIURA, M. Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, p. 1047–1060, 2011.

YAMAMOTO, F. Y.; FILIPAK NETO, F.; FREITAS, P. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Cadmium effects on early development of chick embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 548–555, 2012.

YAN, Y.; WANG, G.; HUANG, J.; ZHANG, Y.; CHENG, X.; CHUAI, M.; BRAND-SABERI, B.; CHEN, G.; JIANG, X.; YANG, X. Zinc oxide nanoparticles exposure-induced oxidative stress restricts cranial neural crest development during chick embryogenesis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 194, 110415, 2020.

YBOT-GONZALEZ, P.; SAVERY, D.; GERRELLI, D.; SIGNORE, M.; MITCHELL, C. E.; FAUX, C. H.; GREENE, N. D.; COPP, A. J. Convergent extension, planar-cell-polarity signalling and initiation of mouse neural tube closure. **Development**, v. 134, n. 4, p. 789-99, 2007.

YE, F.; ZUSHI, Y.; MASUNAGA, S. Survey of perfluoroalkyl acids (PFAAs) and their precursors present in Japanese consumer products. **Chemosphere**, v. 127, p. 262-268, 2015.

YEUNG, E. C.; CHAN, C. K. W. Glycol methacrylate: the art of embedding and serial sectioning. **Botany**, v. 93, n. 1, p. 1-8, 2015.

YUAN, Y.; JIANG, C.-Y.; XU, H.; SUN, Y.; HU, F.-F.; BIAN, J.-C.; LIU, X.-Z.; GU, J.-H.; LIU, Z.-P. Cadmium-induced apoptosis in primary rat cerebral cortical neurons culture is mediated by a calcium signaling pathway. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64330, 2013.

YUAN, Z.; LUO, T.; LIU, X.; HUA, H.; ZHUANG, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; XU, W.; REN, J. Tracing anthropogenic cadmium emissions: From sources to pollution. **Science of The Total Environment**, v. 676, p. 87-96, 2019.

ZAGRIS, N. Extracellular matrix in development of the early embryo. **Micron**, v. 32, p. 427-438, 2001.

ZHANG, G-B.; WANG, H.; HU, J.; GUO, M-Y.; WANG, Y.; ZHOU, Y.; YU, Z.; FU, L.; CHEN, Y-H.; XU, D-X. Cadmium-induced neural tube defects and fetal growth restriction: Association with disturbance of placental folate transport. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 306, p. 79-85, 2016.

ZHANG, J.; JIAO, J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. **BioMed Research International**, v. 2015, 727542, 2015.

ZHANG, W.; LIN, Z.; HU, M.; WANG, X.; LIAN, Q.; LIN, K.; DONG, Q.; HUANG, C. Perfluorinated chemicals in blood of residents in Wenzhou, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 6, p. 1787-1793, 2011.

ZHOU, C. J.; JI, Y.; REYNOLDS, K.; MCMAHON, M.; GARLAND, M. A.; ZHANG, S.; SUN, B.; GU, R.; ISLAMA, M.; LIU, Y.; ZHAO, T.; HSU, G.; IWASA, J. Non-neural surface ectodermal rosette formation and F-actin dynamics drive mammalian neural tube closure. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 526, n. 3, p. 647-653, 2020.

ZHU, B.; LIU, L.; LI, D-J.; LING, F.; WANG, G-X. Developmental toxicity in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos exposed to Cu, Zn and Cd. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 269-277, 2014.

ZHU, M.; MIAO, S.; ZHOU, W.; ELNESR, S. S.; DONG, X.; ZOU, X. MAPK, AKT/FoxO3a and mTOR pathways are involved in cadmium regulating the cell cycle, proliferation and apoptosis of chicken follicular granulosa cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 214, 112091, 2021.

ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in neural development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 2, p. 194–204, 2011.

ZIMTA, A.-A.; SCHITCU, V.; GURZAU, E.; STAVARU, C.; MANDA, G.; SZEDLACSEK, S.; BERIDAN-NEAGOE, I. Biological and molecular modifications induced by cadmium and arsenic during breast and prostate cancer development. **Environmental Research**, v. 178, 108700, 2019.

ZOSEN, D.; HADERA, M. G.; LUMOR, J. S.; ANDERSEN, J. M.; PAULSEN, R. E. Chicken embryo as animal model to study drug distribution to the developing brain. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 112, 107105, 2021.

ANEXO 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Setor de Ciências Biológicas
 Comissão de Ética no Uso de Animais
 (CEUA)



Nº 1098

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.192793/2017-62

APROVADO/APPROVAL: 19/09/2017 – R.O. 08/2017

TÍTULO: Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico no desenvolvimento do sistema nervoso de embriões de ave (*Gallus gallus*).

TITLE: Assessment of the effects of cadmium and perfluorooctanoic acid on the development of the nervous system of avian embryos (*Gallus gallus*).

AUTORES/AUTHORS: Claudia Feijó Ortolani-Machado, Melyssa Kmecick, Carla Vermeulen Carvalho Grade.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Biologia Celular

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA

ANEXO 2

POSIÇÃO NORMAL E MÁ POSIÇÕES DE NASCIMENTO

Posição normal de nascimento.



Região dorsal do embrião está paralela ao eixo mais comprido do ovo e o bico fica posicionado embaixo da asa direita. A ponta do bico fica direcionada para a câmara de ar, na extremidade arredondada do ovo. Dessa forma, a asa afasta a membrana na casca da face do embrião e proporciona mais liberdade de movimento ao bico. A asa também ajuda a esticar a membrana interna da casca e auxilia na perfuração dessa membrana pelo bico. Assim, o embrião consegue acesso à câmara de ar e inicia a respiração pulmonar.

O embrião assume essa posição no 19º dia de incubação.



Má posição 1 – Cabeça entre as coxas.

É a posição normal da maioria dos embriões de 18 dias de incubação, quando a cabeça começa a virar para a câmara de ar para assumir a posição normal de nascimento. Embriões mortos nesse posicionamento provavelmente representam embriões que morreram por volta do 18º dia de incubação.



Má posição 2 – Cabeça na parte menor do ovo.

É facilmente identificada ao abrir o ovo pela câmara de ar de ovos não eclodidos. É possível visualizar o saco da gema, o umbigo do embrião e as pernas. Essa má posição ocorre comumente em ovos incubados com a extremidade menor do ovo para cima e com mais frequência em ovos que foram incubados na posição horizontal quando comparado com os ovos incubados com a câmara de ar para cima. Pode ocorrer também quando a temperatura da incubadora está alta (superior a 38°C) ou quando o ângulo de viragem é pequeno.



Má posição 3 – Cabeça virada para a esquerda.

Prevalece em ovos incubados com a extremidade larga do ovo para cima. Em muitos casos, o bico fica acima da asa esquerda. Essa posição reduz a eclodibilidade em aproximadamente 20%.



Má posição 4 – Bico afastado da câmara de ar.

A ocorrência dessa posição é cinco vezes maior em ovos incubados horizontalmente e é considerada quase sempre letal. É uma má posição difícil de reconhecer.

**Má posição 5 – Pé acima da cabeça.**

Um pé ou ambos ficam presos entre a cabeça e a casca e impede o movimento para trás normal da cabeça que é necessário para perfurar a casca. Os pés podem também impedir a rotação final do embrião enquanto corta a parte de cima da casca para eclodir. Assim, se essa posição não impedir a perfuração da casca, ela pode impedir a rotação final e saída do embrião. É a segunda má-posição mais comum, representando aproximadamente 20% do total de embriões mal posicionados.

**Má posição 6 – Bico acima da cabeça.**

É considerada uma variação natural da posição normal de nascimento, representando aproximadamente 50% ou mais do total de embriões mal posicionados.

FONTE: Adaptado de ROSS TECH, 2010.