

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARILIZA CRISTINE VIEIRA DA COSTA

AÇÃO DO CHUMBO, CÁDMIO E ÁCIDO PERFLUOROOCETANÓICO, DE
MANEIRA ISOLADA E EM MISTURA, SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DA
REGIÃO CEFÁLICA DE *GALLUS GALLUS*

CURITIBA

2022

MARILIZA CRISTINE VIEIRA DA COSTA

AÇÃO DO CHUMBO, CÁDMIO E ÁCIDO PERFLUOROOCTANÓICO, DE
MANEIRA ISOLADA E EM MISTURA, SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DA
REGIÃO CEFÁLICA DE *GALLUS GALLUS*

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Claudia Feijó Ortolani-
Machado

CURITIBA

2022

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

Costa, Mariliza Cristine Vieira da.

Ação do chumbo, cádmio e ácido perfluorooctanóico, de maneira isolada e em mistura, sobre o desenvolvimento da região cefálica de Gallus Gallus. / Mariliza Cristine Vieira da Costa. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientadora: Claudia Feijó Ortolani-Machado.

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

1. Desenvolvimento embrionário. 2. Toxicologia. 3. Teratógenos. 4. Crista Neural. 5. Contaminação química. I. Título. II. Ortolani-Machado, Claudia Feijó. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

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 **MARILIZA CRISTINE VIEIRA DA COSTA** intitulada: **AÇÃO DO CHUMBO, CÁDMIO E ÁCIDO PERFLUOROOCTANÓICO, DE MANEIRA ISOLADA E EM MISTURA, SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA REGIÃO CEFÁLICA DE 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, 25 de Novembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

07/12/2022 14:05:45.0

CLAUDIA FEIJÓ ORTOLANI MACHADO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

07/12/2022 13:34:57.0

PATRICIA FRANCHI DE FREITAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

09/12/2022 10:12:45.0

CÉLIA REGINA CAVICHIOLO FRANCO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/12/2022 14:27:06.0

MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/12/2022 13:49:05.0

RUBENS BERTAZOLLI FILHO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico esta Tese:

Ao meu sobrinho Joaquim.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dr^a. Claudia Feijó Ortolani-Machado, pela paciência, por todo incentivo, mas especialmente por seu entusiasmo, sua amizade e seu exemplo. Obrigada por todos os conselhos profissionais e para a vida. Agradeço por me incentivar e por acreditar em mim, até mesmo quando eu não acreditei.

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

À minha mãe Suzana, pelo imenso amor em cada momento de minha vida e por me ensinar o que é ser valente e altruísta.

Aos meus irmãos Rafa e Gabe, por estarem sempre comigo, pelas brigas que me tornaram mais forte e pela cumplicidade que apenas irmãos podem proporcionar.

À minha cunhada Rebeca, por se tornar a irmã que eu nunca tive.

Ao meu melhor amigo e companheiro de jornada, Jean, por ter paciência e sempre amparar minhas lágrimas durante esta jornada em tantos outros momentos.

À minha amiga Mel, por compartilhar tantos momentos de felicidade e ansiedade. Obrigada pelo apoio, pelas leituras de relatórios, discussões construtivas e pelos experimentos na madrugada.

À minha amiga Paula, pela força e auxílio e conselhos, sua alegria tornou essa fase mais tranquila.

Aos colegas do Laboratório de Embriotoxicologia, pelos experimentos, lanches e risadas compartilhados. Em especial aos alunos de iniciação científica: Eduardo e Sandra. Obrigada pela amizade e por me ensinarem um pouco do que significa ensinar. Agradeço muito pela oportunidade de aprender tanto sendo sua coorientadora.

Aos amigos que mesmo distantes sempre me incentivaram e me deram forças para enfrentar todos os contratempos.

Aos demais professores, amigos e colegas do Grupo de Toxicologia Celular. Obrigada pelas enriquecedoras discussões científicas, pelas confraternizações e desabafos. Em especial à Patrícia, Aliciane, Micheli e ao Claudemir, pelas discussões construtivas sobre ciência.

Ao CTAF, que contribuiu grandemente com meu aprendizado sobre microscopia e que possibilitou a aquisição das imagens de fluorescência.

Ao departamento de fisiologia e às técnicas Hely e Débora, pelo auxílio com o criostato.

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 minha segunda casa, pelas oportunidades e por me proporcionar sete anos de formação de qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Enfim, minha gratidão a todos que me acompanharam e que de muitas formas contribuíram para a realização deste trabalho.

“A melhor coisa para quando se está triste”, respondeu Merlin, dando um suspiro profundo, “é aprender algo. É a única coisa que nunca falha” ... “Aprender porquê o mundo gira e o quê o faz girar. Essa é a única coisa da qual a mente nunca ficará exausta, nunca se alienará, pela qual nunca será torturada, nunca temerá ou desacreditará e nunca sonhará em voltar atrás. Aprender é a única coisa para você. Olhe quantas coisas temos para aprender.”

A Espada na Pedra

T. H. White

RESUMO

Os organismos vivos estão expostos, no ambiente, a uma mistura de poluentes, sendo que muitos compostos podem interagir e gerar efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos. O chumbo (Pb), o cádmio (Cd) e o ácido perfluorooctanóico (PFOA) são poluentes comumente encontrados no ambiente e que podem bioacumular e biomagnificar pois são resistentes à degradação. A exposição a esses contaminantes pode comprometer o desenvolvimento embrionário e induzir malformações no sistema nervoso e região encefálica e, dependendo da região afetada, pode alterar estruturas e processos funcionais ao longo do desenvolvimento. Apesar de serem potencialmente embriotóxicos e interferirem no desenvolvimento normal, poucos estudos relatam os efeitos desses compostos em concentrações realistas e em mistura, principalmente em relação aos processos celulares. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, inicialmente *in silico*, os efeitos do Pb, Cd e PFOA, de forma isolada e em misturas, sobre o desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus*, nos estádios 10HH e 14HH, em diferentes níveis axiais da região cefálica. Foi observado que esses contaminantes afetam vias de sinalização relacionadas a proliferação, apoptose, migração e moléculas de adesão celular. A partir desses resultados, foram analisados os impactos da exposição dos contaminantes *in ovo* sobre a mortalidade e morfologia cefálica, através de análise quantitativa. Alguns processos celulares apontados pelos resultados *in silico*, como proliferação, apoptose, migração das células da crista neural (CN) e observação de moléculas de adesão celular, como β -catenina, N- e E-caderina, foram analisados com imunomarcção fluorescente nos diferentes níveis axiais da região cefálica, em embriões de *Gallus gallus* nos estádios 10HH e 14HH. Foi observado aumento significativo na mortalidade apenas na concentração intermediária de Pb e malformações na região cefálica, após exposição de todos os contaminantes. Houve, nos diferentes níveis axiais da região cefálica, redução significativa na proliferação, apoptose, número e migração de células da CN e na expressão de E-caderina em ambos os estádios de desenvolvimento, bem como na β -catenina e N-caderina, no estádio 14HH, após a exposição a quase todos os contaminantes, de maneira isolada e em mistura. O Cd demonstrou efeito dependente da concentração em quase todos os processos avaliados. Além disso, os grupos expostos às misturas demonstraram contribuição dos contaminantes que as compõem, especialmente na redução da proliferação e na expressão de β -catenina (estádio 14) e N-caderina. Outro achado relevante é que o estádio 10HH parece ser mais susceptível aos efeitos dos contaminantes, principalmente do prosencéfalo até o rombômero 1, independente da concentração ou mistura. Porém, os níveis do rombômero 3 ao 5 são menos afetados pela exposição. Nos dois estádios avaliados foi observado a presença de grupamentos celulares atípicos, destacando-se do epitélio do tubo neural e invadindo seu lúmen. Até o momento, relatos sobre o impacto desses contaminantes sobre o desenvolvimento da região cefálica, especialmente em diferentes níveis axiais, são inéditos na literatura. Alterações nessa região, no início do desenvolvimento, poderiam explicar muitas alterações morfológicas e funcionais observadas em outros estudos, após a exposição a esses contaminantes. Sugere-se que muitos mecanismos podem estar envolvidos nos efeitos observados, como a alteração na homeostase de cálcio, na transição epitélio-mesenquimal e na via Wnt canônica.

Palavras-chave: Embriotoxicologia; Teratógenos; Crista neural; Níveis axiais; Processos celulares.

ABSTRACT

Living organisms are exposed to a mixture of pollutants in the environment. Several of these compounds can interact and generate additive, synergistic or antagonistic effects. Lead (Pb), cadmium (Cd), and perfluorooctanoic acid (PFOA) are common environmental pollutants that can bioaccumulate and biomagnify because they are resistant to degradation. Exposure to these contaminants can compromise embryonic development and induce malformations in the nervous system and brain region. These alterations modify structures and functional processes throughout development, depending on the affected region. Despite being potentially embryotoxic and interfering with normal development, few studies report the effects of these compounds in realistic concentrations and combined exposure, mainly concerning cellular processes. Thus, the present work aimed to evaluate, the effects of Pb, Cd, and PFOA, isolated and in mixtures, on the embryonic development of the cephalic region in *Gallus gallus*. *In silico*, it was observed that these contaminants affect signaling pathways related to proliferation, apoptosis, migration, and cell adhesion molecules. Based on these results, the impacts of *in ovo* exposure to contaminants were evaluated. Mortality and cephalic morphology were assessed through quantitative analysis. Also, some cellular processes pointed out by the *in silico* results were analyzed with fluorescent immunostaining. These processes, such as proliferation, apoptosis, neural crest (NC) cell migration, and cell adhesion molecules (β -catenin, N- and E-cadherin), were evaluated in different axial levels of the cephalic region, in *Gallus gallus* embryos at stages 10HH and 14HH. A significant increase was observed in mortality, only in the intermediate concentration of Pb, and malformations in the cephalic region, after exposure to all contaminants. There was a significant reduction in the proliferation, apoptosis, number and migration of NC cells, at the different axial levels of the cephalic region, and in the expression of E-cadherin in both stages, after exposure to almost all contaminants, isolated and mixed. In the same way, there was a reduction in N-cadherin and β -catenin at stage 14HH. Cd exposure showed a concentration-dependent effect in almost all evaluated processes. In addition, the groups exposed to the mixtures revealed the contribution of the contaminants that compose them, especially in the reduction of proliferation and expression of N-cadherin (stage 14HH) and β -catenin. Another relevant finding is that stage 10HH seems to be more susceptible to the effects of contaminants, mainly from the forebrain to rhombomere 1, regardless of concentration or mixture. However, levels of rhombomere 3 to 5 are less affected by exposure. In the two stages evaluated, the presence of atypical cell groups was observed, standing out from the neural tube epithelium and invading its lumen. So far, reports on the impact of these contaminants on the development of the cephalic region, especially at different axial levels, are unpublished in the literature. Alterations in this region, at the beginning of development, could explain many morphological and functional alterations observed in other studies, after exposure to these contaminants. It is suggested that many mechanisms may be involved in the observed effects, such as changes in calcium homeostasis, the epithelial-mesenchymal transition, and the canonical Wnt pathway.

Keywords: Embryotoxicology; Teratogens; Neural crest; Axial levels; Cellular processes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – MEMBRANAS EXTRAEMBRIONÁRIAS EM EMBRIÕES DE AVES E MAMÍFEROS.....	28
FIGURA 2 – SEGMENTAÇÃO NOS EMBRIÕES DE AVE.....	29
FIGURA 3 – MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ATRAVÉS DA LINHA PRIMITIVA E NÓ DE HENSEN EM UMA GÁSTRULA DE GALINHA.....	30
FIGURA 4 – FORMAÇÃO DO ENCÉFALO DE EMBRIÃO DE AVE DE 2 E 3 DIAS DE DESENVOLVIMENTO.....	31
FIGURA 5 - DIVISÃO DIDÁTICA DAS PRINCIPAIS REGIÕES DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÃO DE AVE.....	33
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA.....	34
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GÂNGLIOS CRANIANOS.....	35

Capítulo I

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO BIOLÓGICA.....	51
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE REDES BIOLÓGICAS E SEUS PRINCIPAIS ELEMENTOS.....	51
FIGURA 3 – TOTAL DE GENES CURADOS MANUALMETNE E QUE SOFREM <i>DOWNREGULATION</i> OU <i>UPREGULATION</i>	54

Capítulo II

FIGURA 1 – PERÍODOS DE SUSCEPTIBILIDADE A AÇÃO DE TERATÓGENOS EM DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS.....	77
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CÂMARA DE AR NO OVO E POSIÇÃO DOS OVOS NA INCUBADORADA.....	81

FIGURA 3 – EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NOS ESTÁDIOS 10HH e 14HH, COM DESTAQUE PARA AS REGIÕES DE CORTE.....	84
FIGURA 4 – DISPOSIÇÃO DOS CORTES NA LÂMINA.....	84
FIGURA 5 – TAXA DE MORTALIDADE.....	86
FIGURA 6 - MALFORMAÇÕES NA REGIÃO CEFÁLICA.....	88
FIGURA 7 - OCORRÊNCIA DE MALFORMAÇÕES NA REGIÃO CEFÁLICA.....	89
FIGURA 8 - PROLIFERAÇÃO NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH.....	91
FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS KI67+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10HH.....	93
FIGURA 9 (CONTINUAÇÃO) - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS KI67+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10HH.....	94
FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS KI67+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14HH.....	95
FIGURA 10 (CONTINUAÇÃO) - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS KI67+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14HH.....	96
FIGURA 11 – APOPTOSE NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH.....	98
FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS C-CASPASE-3+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10HH.....	100
FIGURA 12 (CONTINUAÇÃO) - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS C-CASPASE-3+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10HH.....	101
FIGURA 13 – DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS C-CASPASE-3+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14HH.....	102
FIGURA 13 (CONTINUAÇÃO) - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS C-CASPASE-3+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14HH.....	103

Capítulo III

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL (EMT).....	112
FIGURA 2 – SUBSTITUIÇÃO TEMPORAL DE E- PARA N-CADERINA NO EMBRIÃO DE <i>G. GALLUS</i>	114
FIGURA 3 – CÉLULAS DA CRISTA NEURAL NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH.....	118
FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS HNK-1 + NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10 HH.....	120
FIGURA 4 (CONTINUAÇÃO) - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS HNK-1 + NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10 HH.....	121
FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS HNK-1 + NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14 HH.....	122
FIGURA 5 (CONTINUAÇÃO) - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS HNK-1 + NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14 HH.....	123
FIGURA 6 - DISTÂNCIA LINEAR DE MIGRAÇÃO DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10 HH.....	126
FIGURA 6 (CONTINUAÇÃO) - DISTÂNCIA LINEAR DE MIGRAÇÃO DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10 HH.....	127
FIGURA 7 - DISTÂNCIA LINEAR DE MIGRAÇÃO DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14 HH.....	128
FIGURA 7 (CONTINUAÇÃO) - DISTÂNCIA LINEAR DE MIGRAÇÃO DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14 HH.....	129
FIGURA 8 – EXPRESSÃO DE β -CATENINA NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH.....	131
FIGURA 9 – β -CATENINA EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10 HH.....	133

FIGURA 9 (CONTINUAÇÃO) – β -CATENINA EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10 HH.....	134
FIGURA 10 – β -CATENINA EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14 HH.....	135
FIGURA 10 (CONTINUAÇÃO) – β -CATENINA EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14 HH.....	136
FIGURA 11 – EXPRESSÃO DE N-CADERINA NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH.....	138
FIGURA 12 – N-CADERINA EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10 HH.....	140
FIGURA 12 (CONTINUAÇÃO) – N-CADERINA EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10 HH.....	141
FIGURA 13 – N-CADERINA EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14 HH.....	142
FIGURA 13 (CONTINUAÇÃO) – N-CADERINA EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14 HH.....	143
FIGURA 14 – EXPRESSÃO DE E-CADERINA NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH.....	145
FIGURA 15 – E-CADERINA EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10 HH.....	146
FIGURA 15 (CONTINUAÇÃO) – E-CADERINA EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 10 HH.....	147
FIGURA 16 – E-CADERINA EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14 HH.....	148
FIGURA 16 (CONTINUAÇÃO) – E-CADERINA EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> NO ESTÁDIO 14 HH.....	149
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	
FIGURA 1 – RESUMO DOS TÓPICOS AVALIADOS.....	156

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROPRIEDADES COMPARATIVAS DE DIFERENTES SISTEMAS MODELO EM PESQUISA.....	22
---	----

TABELA 2 – PROPRIEDADES COMPARATIVAS DE DIFERENTES MODELOS <i>IN VIVO</i>	25
---	----

TABELA 3 – CONTRIBUIÇÃO DE CADA POPULAÇÃO DA CRISTA NEURAL EM DIFERENTES NEUROCRISTOPATIAS.....	36
---	----

Capítulo II

TABELA 1 - GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	80
--------------------------------------	----

TABELA 2 – ANTICORPOS.....	85
----------------------------	----

Capítulo III

TABELA 1 – ANTICORPOS.....	116
----------------------------	-----

LISTA DE QUADROS

Capítulo I

QUADRO 1 - PRINCIPAIS VIAS AFETADAS PELO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA SEPARADAS DE ACORDO COM SUA ATUAÇÃO.....56

QUADRO 2 – NÚMERO DE GENES DESREGULADOS POSITIVAMENTE E NEGATIVAMENTE POR VIA BIOLÓGICA APÓS A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA ISOLADOS E EM MISTURA.....57

Capítulo II

QUADRO 1 –MORTALIDADE EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS*.....87

QUADRO 2 – OCORRÊNCIA DE MALFORMAÇÕES NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS*.....90

QUADRO 3 – PROLIFERAÇÃO CELULAR NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA.....97

QUADRO 4 – APOPTOSE NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA.....104

Capítulo III

QUADRO 1 – NÚMERO DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA.....124

QUADRO 2 – DISTÂNCIA LINEAR DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA.....130

QUADRO 3 – EXPRESSÃO DE β -CATENINA NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA.....137

QUADRO 4 – EXPRESSÃO DE N-CADERINA NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA.....144

QUADRO 5 – EXPRESSÃO DE E-CADERINA NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA.....150

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca Registrada
µm	Micrometro
µM	Micromolar
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ATSDR	Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças
BAX	Proteína X associada a Bcl-2
BCL-2	Linfoma de células B-2
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BSA	Soro Albumina Bovina
Ca ²⁺	Cálcio
Cd	Cádmio
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CN	Crista Neural
CTD	Banco de Dados Toxicogenômico Comparativo
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
ErbB	Oncogene B Eritroblástico
FAS	Nome oficial TNFRSF6

FASL	Ligante de Fas
FGF	Fatores de Crescimento de Fibroblastos
FOXO	Proteínas Forkhead Box O-class
GDF	Fatores de Crescimento e Diferenciação
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GO	Ontologia Genética
GSK-3 β	Glicogênio Sintase Quinase-3 β
HH	Classificação de Hamburger e Hamilton
HNK-	Anticorpo monoclonal que reconhece um oligossacarídeo [sulfato-3-GlcA β (1 $\rightarrow$ 3)Gal β (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc β (1 $\rightarrow$ 3)Gal β (1 $\rightarrow$ 4)Glc β (1 $\rightarrow$ 1)-ceramida] de superfície celular de células da crista neural
IGF	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
JAK/STAT	Janus quinase/Proteína de Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
KEGG	Enciclopédia Kyoto de genes e genomas
KI67	Anticorpo policlonal contra o antígeno Ki-67
MAPK	Proteínas Quinase Ativada Por Mitógeno
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteases
NaCl	Cloreto de Sódio
NOTCH	Receptores transmembrana individuais que interagem com ligantes Notch ligados à membrana

p53	Proteína de 53 kilodaltons
Pb	Chumbo
PFA	Paraformaldeído
PFC	Compostos Perfluorados
PFOA	Ácido perfluorooctanóico
PI3K/AKT	Phosphatidylinositol-3 Kinase/ Protein Kinase B
PPAR	Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma
PR	Paraná
r	Rombômero
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SHH	Sonic Hedgehog
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF- β	Fator De Crescimento Transformador β
TN	Tubo Neural
WHO	Organização Mundial de Saúde
WNT	Wingless
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	SISTEMAS MODELO PARA TOXICOLOGIA	21
2.1.1	Embrião de ave como modelo animal	25
2.2	DESENVOLVIMENTO INICIAL DE <i>GALLUS GALLUS</i> : DO BLASTODISCO À GÁSTRULA.....	27
2.2.1	Desenvolvimento das células da crista neural	32
2.3	CONTAMINANTES.....	37
2.3.1	Chumbo (Pb).....	37
2.3.2	Cádmio (Cd).....	39
2.3.3	Ácido perfluorooctanóico (PFOA).....	41
2.3.4	Mistura de poluentes	43
3	JUSTIFICATIVA.....	45
4	OBJETIVOS.....	46
4.1	OBJETIVO GERAL.....	46
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
Capítulo I - Análise de redes: Interação do chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA) com vias potencialmente relevantes para o desenvolvimento da região cefálica de <i>Gallus gallus</i>.....		47
RESUMO		48
1	INTRODUÇÃO	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	COLETA DE DADOS CTD E FERRAMENTAS WEB.....	52
2.2	ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL	53
3	RESULTADOS.....	53
3.1	ELUCIDAÇÃO SISTEMÁTICA DO MECANISMO DO Pb, Cd E PFOA ISOLADOS E EM MISTURA	53

3.2	ENRIQUECIMENTO DE FUNÇÕES E VIAS	54
4	DISCUSSÃO	59
	APÊNDICE 1 - VIAS NEGATIVAMENTE REGULADAS PELO Pb, Cd e PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA	64
	APÊNDICE 2 - VIAS POSITIVAMENTE REGULADAS PELO Pb, Cd e PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA	65
	APÊNDICE 3 - VIAS ENVOLVIDAS COM OS GENES DIFERENTEMENTE EXPRESSOS APÓS A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd, PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA	66
	Capítulo II - Efeitos do chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA) no desenvolvimento inicial de <i>Gallus gallus</i> e seu impacto na proliferação e apoptose da região cefálica	74
	RESUMO	75
1	INTRODUÇÃO	76
2	MATERIAIS E MÉTODOS	78
2.1	MODELO ANIMAL E CONCENTRAÇÃO DOS CONTAMINANTES	78
2.2	DESENHO EXPERIMENTAL	80
2.3	MÉTODO DE EXPOSIÇÃO.....	81
2.4	COLETA DOS EMBRIÕES	81
2.5	AVALIAÇÃO DA TAXA DE MORTALIDADE E OCORRÊNCIA DE MALFORMAÇÕES	82
2.6	DETERMINAÇÃO DA REGIÃO DE CORTE, EMBLOCAGEM E CRIOMICROTOMIA	83
2.7	IMUNOMARCAÇÃO	84
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	85
3	RESULTADOS	86
3.1	TAXA DE MORTALIDADE.....	86
3.2	MALFORMAÇÕES NA REGIÃO CEFÁLICA.....	87
3.3	PROLIFERAÇÃO.....	90
3.4	APOPTOSE	97

4	DISCUSSÃO.....	104
	Capítulo III - Efeitos do chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA) nas células da crista neural de <i>Gallus gallus</i> e seu impacto nos mecanismos de adesão celular na região cefálica.....	110
	RESUMO	111
1	INTRODUÇÃO	112
2	MATERIAIS E MÉTODOS	115
3	RESULTADOS.....	117
3.1	CÉLULAS DA CRISTA NEURAL.....	117
3.1.1	Número de células migratórias da crista neural	118
3.1.2	Distância linear de migração das células da crista neural	124
3.2	MOLÉCULAS DE ADESÃO.....	130
3.2.1	β -catenina.....	130
3.2.2	N-caderina.....	137
3.2.3	E-caderina	144
4	DISCUSSÃO.....	150
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	155
	CONCLUSÕES.....	157
	REFERÊNCIAS.....	158

1 INTRODUÇÃO

Os poluentes persistentes podem bioacumular e biomagnificar ao longo da cadeia trófica e, no ambiente, são onipresentes e resistentes à degradação, o que reflete em sua ampla persistência ambiental e na contaminação contínua para os organismos vivos. Essa classe inclui os metais pesados inorgânicos e os poluentes orgânicos persistentes (BERK *et al.*, 2014; EGENDORF *et al.*, 2020; LIAO, G. *et al.*, 2021; CDC, 2022).

Durante o desenvolvimento pré-natal os indivíduos são mais suscetíveis ao efeito dos contaminantes, uma vez que nesse período há uma alta taxa de proliferação e diferenciação celular e os sistemas de destoxificação ainda não estão completamente desenvolvidos. Além disso, alguns contaminantes como chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA) possuem a capacidade de atravessar a barreira placentária e se bioacumular no embrião/feto. Esses compostos também já foram detectados simultaneamente no sangue de cordão umbilical, revelando a exposição concomitante a esses poluentes durante o desenvolvimento inicial (CAI *et al.*, 2020; KABAMBA; TUAKUILA, 2020).

Trabalhos anteriores já mostraram que os contaminantes acima, isolados e em mistura, podem promover alterações morfológicas no organismo embrionário, especialmente na região cefálica e do tronco (KMECICK *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021) e, o Pb, até mesmo em populações celulares específicas, como as células da crista neural (CN) (DA COSTA *et al.*, 2021). No entanto, as alterações a nível celular e seus efeitos sobre o desenvolvimento, particularmente sobre as células da CN, ainda não foram completamente elucidadas e os efeitos causados por uma exposição conjunta foram pouco explorados.

Sabe-se que o desenvolvimento inicial dos vertebrados apresenta diversas similaridades e é nesse período que ocorre a formação das células da CN. Deste modo, entender as possíveis alterações nos processos celulares frente a exposição ao Pb, Cd e PFOA torna-se de extrema importância, uma vez que os dados encontrados podem ser extrapolados para outros organismos. Além disso, pode, futuramente, nortear novas regulamentações sobre a produção e emissão desses poluentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMAS MODELO PARA TOXICOLOGIA

A escolha de um modelo experimental deve ser realizada de maneira bastante crítica, de modo a responder da forma mais adequada os questionamentos de uma pesquisa. Concomitantemente, a incorporação de diferentes tecnologias tem alimentado o desenvolvimento e validação de sistemas alternativos, em especial nas avaliações toxicológicas (GIANNACCINI *et al.*, 2014).

Os maiores objetivos para utilização de modelos alternativos são reduzir o uso de animais e identificar os efeitos mais relevantes para o ambiente e organismos que nele habitam, incluindo humanos. Nesse contexto, a busca por alternativas está em consonância com as legislações de boas práticas de experimentação, como o princípio dos 3Rs (Substituição, Refinamento e Redução - do inglês *Replacement, Refinement, Reduction*) (GAN *et al.*, 2022). Adicionalmente, o emprego de modelos não convencionais satisfaz a diretiva 2010/63/EU, que versa sobre a proteção dos animais utilizados para fins científicos e atesta que as experimentações com animais devem ser substituídas por alternativas sempre que possível e o número deve ser reduzido ao mínimo necessário (PARLIAMENT, EUROPEAN AND COUNCIL, EUROPEAN, 2010). Pensando nesses pontos, diferentes sistemas podem ser empregados, dependendo do desenho experimental a ser executado, como por exemplo avaliações *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Os métodos *in silico*, quando comparados a outros modelos, são recentes e apresentam baixo custo, além de estarem progredindo a tal ponto que os *softwares* disponíveis comercialmente fornecem contribuições substanciais para diversas avaliações. Atualmente, para estudos toxicológicos, estão disponíveis bancos de dados extensos e mais complexos que utilizam abordagem computacionais avançadas, como inteligência artificial e aprendizado de máquina (GAN *et al.*, 2022).

Os estudos *in vitro*, baseados em cultura de células, são ensaios rápidos, eficientes e apresentam custos relativamente baixos, sendo considerados modelos simples que permitem a realização de experimentos utilizando células de várias espécies e com controle rígido das condições experimentais (IRVINE *et al.*, 2021; RIVERA; MEAKIN; HOLSGROVE, 2022). Ainda, foram desenvolvidos modelos bidimensionais (2D) que permitem o isolamento completo do tipo de célula de interesse e tridimensionais (3D), que englobam mais de um tipo celular e podendo reproduzir alguns atributos teciduais. Apesar de suas muitas vantagens,

mesmo os modelos mais recentes, não fornecem uma avaliação completa da interação com o organismo como um todo (GIANNACCINI *et al.*, 2014).

Os modelos *ex vivo* consistem em tecidos ou órgãos extraídos de animais ou humanos, cultivados em um ambiente artificial (SHI; WANG; WEBSTER, 2019). Esse modelo apresenta arquitetura tecidual natural, com heterogeneidade celular, interações célula-célula e célula-matriz, refletindo mais de perto a organização *in vivo* do órgão. Assim como os sistemas *in vitro*, permite condições experimentais mais controladas e reproduzíveis (SAND *et al.*, 2022). No entanto, manter os modelos *ex vivo* por um longo período de tempo ainda é um desafio, seus resultados fornecem respostas a um determinado tecido e muitas vezes não podem considerar outros fatores que contribuem para a toxicidade em organismos inteiros (GAN *et al.*, 2022).

Em contrapartida, trabalhos que empregam sistemas *in vivo* apresentam grande confiabilidade, pois abordam o efeito geral na fisiologia e anatomia do organismo e, portanto, constituem uma plataforma bastante relevante para diversos estudos (GAN *et al.*, 2022), o que muitas vezes não pode ser alcançado utilizando outros sistemas (SHI; WANG; WEBSTER, 2019). Para efeito comparativo, na tabela 1 estão organizados diferentes sistemas modelos utilizados em pesquisa.

TABELA 1 – PROPRIEDADES COMPARATIVAS DE DIFERENTES SISTEMAS MODELOS EM PESQUISA

Modelo	Far/ADME	Modelo de doença humana	Custo	Questão ética
<i>In silico</i>	-	-	Baixo	Nenhum
Cultura <i>in vitro</i> 2D	Nenhum	Nenhum	Baixo	Nenhum
Cultura <i>in vitro</i> 3D	Nenhum	Baixo	Baixo	Nenhum
Cultura/explantes <i>ex vivo</i>	Baixo	Médio	Alto	Médio
Não mamíferos	Alto	Médio	Médio	Baixo
Mamíferos	Alto	Alto	Alto	Alto

Far: Farmacocinética; ADME: Absorção, distribuição, metabolismo e excreção. FONTE: Adaptado de GIANNACCINI e colaboradores (2014).

Devido aos altos custos e limitações éticas, a utilização de humanos e outros primatas como modelos torna-se inviável. Os modelos de animais mais comumente estudados, como camundongos, ratos e peixes, são relativamente baratos de manter e adequados para manipulação experimental (GIANNACCINI *et al.*, 2014). Além disso, há um grau notável de

similaridade nos mecanismos de desenvolvimento de todos os animais (HILL, 2021), não apenas genes e proteínas individuais, mas também vias inteiras de sinalização e resposta, bem como em suas funções no desenvolvimento de embriões, que se mostram altamente conservadas ao longo da evolução (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000; GAN *et al.*, 2022). Isso significa que embora a embriologia de animais considerados mais simples possa parecer superficialmente muito diferente da de humanos, o conhecimento obtido a partir desses modelos pode, muitas vezes, ser aplicado diretamente para a compreensão dos mecanismos de desenvolvimento humano. Por outro lado, existem atributos fisiológicos e de desenvolvimento importantes que podem ser investigados apenas em vertebrados, ou em mamíferos, como placentação e lactação (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000).

Porém, para a Embriotoxicologia, diferentes modelos vertebrados podem ser empregados, entre eles algumas espécies de roedores, anfíbios, peixes e aves. Os roedores são a primeira ordem de mamíferos a ser considerada, em especial camundongos, principalmente por razões econômicas, como necessidade de pequeno espaço de criação e manutenção e custo animal relativamente baixo. Além disso, o pequeno tamanho do animal, tempo de vida (~2 anos), curto período de gestação (~20 dias), grande tamanho da ninhada (10-12 filhotes) e seu fenótipo bem caracterizado o tornam bastante interessante (CLEMENTS *et al.*, 2022).

O *Xenopus laevis*, uma espécie de anfíbio anuro, tem sido utilizado na Biologia Celular e do Desenvolvimento desde a década de 1950 e foi amplamente empregado para a pesquisa da embriologia clássica, além de apresentar alta conservação de genes e mecanismos moleculares de desenvolvimento (MEDINA-CUADRA; MONSORO-BURQ, 2021). Do ponto de vista experimental, os embriões são robustos (1-1,2mm a 1cm), gerados em grande número em cada fecundação (milhares), apresentam curto tempo de desenvolvimento (3 dias para atingir o estágio de girino), desenvolvimento externo ao corpo da mãe (GIANNACCINI *et al.*, 2014) e foi caracterizado em 23 estágios de desenvolvimento bem descritos (WEISZ, 1945). Porém, os embriões não são transparentes e a produção de modelos transgênicos é complexa devido ao seu genoma tetraploide (GIANNACCINI *et al.*, 2014; GAN *et al.*, 2022).

O peixe zebrafish (*Danio rerio*) é visto como um dos mais recentes modelos para estudos de desenvolvimento de vertebrados (HILL, 2021), além de ser utilizado em estudos comportamentais, genéticos e toxicológicos. São embriões relativamente pequenos (0,7µm na fase zigoto), que podem ser gerados em grande número em cada fecundação (centenas), com rápido desenvolvimento (BRITO *et al.*, 2022; HUANG; WU; WU, 2022) e apresenta estágios bem caracterizados (KIMMEL *et al.*, 1995). São embriões transparentes, facilitando uma avaliação direta e não invasiva do crescimento e órgãos internos (GIANNACCINI *et al.*, 2014).

O embrião de galinha ou *Gallus gallus* (*G. gallus*) detém o recorde de longevidade como modelo experimental para estudos de Embriologia, porque data dos estudos anatômicos aristotélicos (GIANNACCINI *et al.*, 2014). Muitos conceitos e nomes de estruturas anatômicas do embrião devem-se aos trabalhos realizados nesse modelo, e permitiram o estabelecimento dos primeiros *insights* sobre como o desenvolvimento pode ocorrer (STERN, 2005). A crista neural, por exemplo, foi identificada e descrita neste modelo por His, em 1868, e continua sendo estudada até hoje (LE DOUARIN, 2004; MONROY *et al.*, 2022). O embrião de galinha ainda é amplamente utilizado para estudos de Embriologia e Biologia do Desenvolvimento (MOK *et al.*, 2015; WANG; WHITE, 2021), Farmacologia (ZOSEN *et al.*, 2021), Toxicologia (GUO *et al.*, 2022), além de ter levado a grandes avanços conceituais em Virologia, Imunologia, Genética e Biologia Celular (STERN, 2005; WANG *et al.*, 2021). A membrana corioalantóica mostra-se como um modelo a parte, sendo um sistema ideal para formação experimental de vasos sanguíneos (RIBATTI, 2022), bem como um modelo *ex ovo* bem caracterizado para testes de toxicidade (WILLIAMS; SAUKA-SPENGLER, 2021). São embriões com grande tamanho (2-3mm) quando comparados aos anteriores, apresentam uma pequena prole (1-2 embriões por dia) e o tempo de desenvolvimento é relativamente rápido (~21 dias). Diferente dos mamíferos, seu desenvolvimento é externo ao corpo da mãe, o que facilita sua acessibilidade para manipulação e observação. Outro ponto relevante é que diferentes compostos podem ser adicionados diretamente ao embrião, contornando assim os efeitos modificadores do metabolismo materno e transferência placentária seletiva (como ocorre com mamíferos) ou a diluição na água de criação e manutenção dos embriões (como ocorre com peixes e anfíbios) (KHOSRAVI *et al.*, 2018; VILCHES-MOURE, 2019; ZOSEN *et al.*, 2021).

Na tabela 2 estão listadas algumas propriedades comparativas entre os modelos animais citados acima.

TABELA 2 – PROPRIEDADES COMPARATIVAS DE DIFERENTES MODELOS *IN VIVO*

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>X. laevis</i>	<i>D. rerio</i>	<i>G. gallus</i>
Tamanho¹	0,1 mm	0,1 mm	1-1,2 mm	0,7 mm	2-3 mm
Desenvolvimento externo	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Tempo de desenvolvimento²	274	20	38	5	21
Disponibilidade de fecundação	1 a 2	5 a 15	milhares	Centenas	1 a 2/dia
Homologia com humano	-	Sim	Sim	Sim	Sim
Embriões transgênicos	Não	Sim	Sim (raro)	Sim	Sim
Ploidia	2n	2n	pseudo-4n	pseudo-4n	2n
Sistema de estadiamento	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Custo	-	Médio	Baixo	Baixo	Baixo
Questão ética	Muito alto	Alto	Médio	Médio	Médio

¹Fase de zigoto. ²Tempo em dias. Fonte: Adaptado de WEISZ (1945); SLACK (2013); GIANNACCINI e colaboradores (2014) e GAN e colaboradores (2022).

2.1.1 Embrião de ave como modelo animal

O embrião *G. gallus* tem uma longa e distinta história, que abrange mais de 2000 anos, como um importante sistema modelo. O ovo de galinha é uma fonte comum e acessível de embriões (WANG *et al.*, 2021). Até meados do século 19, as observações de embriões de galinha em diferentes estágios foram usadas no intenso debate entre as teorias de pré-formação (o adulto é pré-formado em miniatura desde o momento da fertilização ou mesmo antes e, apenas cresce) e epigênese (o embrião aumenta em complexidade e novos órgãos se formam à medida que se desenvolve) (BEDNARCZYK *et al.*, 2021). Posteriormente, foram estudadas as ilhotas de sangue e a diferença funcional entre artérias e veias, que foram propostas para serem conectadas entre si por vasos capilares (STERN, 2005). O progresso subsequente acompanhou novos avanços técnicos, com microscópios aprimorados e as primeiras tentativas de seccionamento, que permitiram a descoberta de células germinativas e os primeiros indícios de interações entre eles, que posteriormente levaram ao conceito de indução. Em meados de 1800, uma nova geração de histologistas comparativos conseguiu descrever, detalhadamente, as mudanças na estrutura do embrião ao longo do desenvolvimento, graças a introdução de vários corantes seletivos e métodos de seccionamento mais sofisticados para a época (RASHIDI; SOTTILE, 2009).

Além das vantagens descritas no item 2.1 para o embrião de ave, outro ponto relevante é que Hamburger e Hamilton (1951) estabeleceram uma série definitiva de 46 estádios, baseada nas mudanças morfológicas que ocorrem ao longo do desenvolvimento embrionário de *G. gallus*. Este trabalho ainda é o esteio dos estudos de desenvolvimento nessa espécie.

O embrião de ave se desenvolve, inicialmente, como um disco transparente e plano na superfície da gema (ou vitelo), o que o torna facilmente acessível para manipulações e imagens *in ovo*, sem a necessidade de procedimentos cirúrgicos (MOK *et al.*, 2015). Nos três primeiros dias após a postura do ovo, o embrião passa pelos principais processos morfológicos de gastrulação, neurulação e somitogênese e, então, ocorre um complexo dobramento para formar o cérebro, o intestino e o coração (GILBERT, 2019; SLACK, 2013). Enquanto os embriões de camundongo formam um cilindro durante os estágios iniciais de desenvolvimento, outros embriões mamíferos (incluindo humanos) também se desenvolvem em formato de disco achatado, como visto nos embriões de ave. Portanto, neste quesito, o embrião de *G. gallus* se assemelha mais aos humanos durante os processos morfológicos iniciais (WANG *et al.*, 2021). Além da semelhança anatômica, possuem um âmnio que circunda o embrião, apresentam similaridades em diferentes processos envolvidos na morfogênese tanto a nível celular quanto molecular (KAIN *et al.*, 2014; FLENTKE; SMITH, 2018) e são endotérmicos, uma característica relevante, visto que algumas enzimas e proteínas são adaptadas a temperaturas mais elevadas, o que não ocorre em modelos ectotérmicos como, por exemplo, o *X. laevis* (GILBERT, 2019). No entanto, é importante observar as diferenças farmacocinéticas entre aves e mamíferos, uma vez que a barreira placentária pode impedir a passagem de algumas substâncias da mãe para o embrião/feto e, dependendo do composto avaliado, os resultados não podem ser mimetizados em *G. gallus* (BJØRNSTAD *et al.*, 2015).

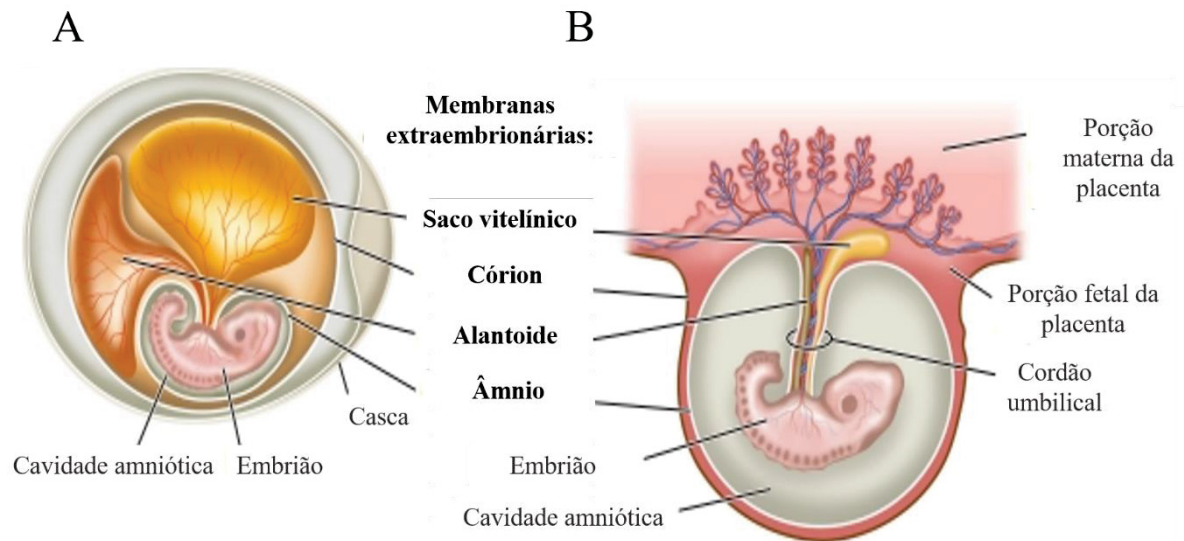
Estudar o desenvolvimento embrionário frente à exposição a contaminantes é um desafio e, neste contexto, os embriões de *G. gallus* vêm sendo empregados (ROVASIO; BATTIATO, 2002; MÜLLER *et al.*, 2012; SMITH; FLENTKE; GARIC, 2012; ZHANG *et al.*, 2017) com resultados satisfatórios (THOMPSON; BANNIGAN, 2008; KMECICK *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021; MONROY *et al.*, 2022). Assim, uma extrapolação dos resultados obtidos com esse modelo para outros organismos, em especial humanos, torna-se bastante interessante, e pode ser feita já que apresentam certo grau de similaridade (IRIE; KURATANI, 2011; HILL, 2021). Sendo assim, o emprego de embriões de *G. gallus* em Embriotoxicologia mostra-se muito oportuno.

2.2 DESENVOLVIMENTO INICIAL DE *GALLUS GALLUS*: DO BLASTODISCO À GÁSTRULA

O desenvolvimento embrionário em vertebrados é molecular e morfolologicamente semelhante nas fases iniciais. Assim, de maneira geral, todos apresentam características que os tornam muito parecidos e exibem especificidades de embriões de cordados como notocorda, tubo neural dorsal, somitos, coração ventral e arcos branquiais (SLACK, 2012). Os genes codificadores do embrião de galinha apresentam alta similaridade com genes humanos, sendo que apenas duas famílias de proteínas do *G. gallus* não estão presentes na estrutura genética humana (STERN, 2005). Além disso, a semelhança morfológica está relacionada a genes altamente conservados entre as espécies, como os genes da família *Hox*, que geram um padrão corporal semelhante (SLACK; HOLLAND; GRAHAM, 1993).

Assim como os répteis e mamíferos, as aves são amniotas. Elas apresentam um conjunto de membranas extraembrionárias, sendo que o âmnio, membrana que nomeia esse grupo, é formado no início do desenvolvimento e propicia um ambiente fluido que protege o embrião do ressecamento. O saco vitelínico permite a absorção de nutrientes e o desenvolvimento do sistema circulatório. O alantoide se desenvolve na extremidade posterior do embrião e tem por função armazenar resíduos. Já o córion é responsável pela troca gasosa. Todas essas membranas e o embrião são envoltos por uma casca, permitindo que o desenvolvimento do embrião ocorra externamente ao organismo materno (GILBERT, 2019) (FIGURA 1).

FIGURA 1 – MEMBRANAS EXTRAEMBRIONÁRIAS EM EMBRIÕES DE AVES E MAMÍFEROS

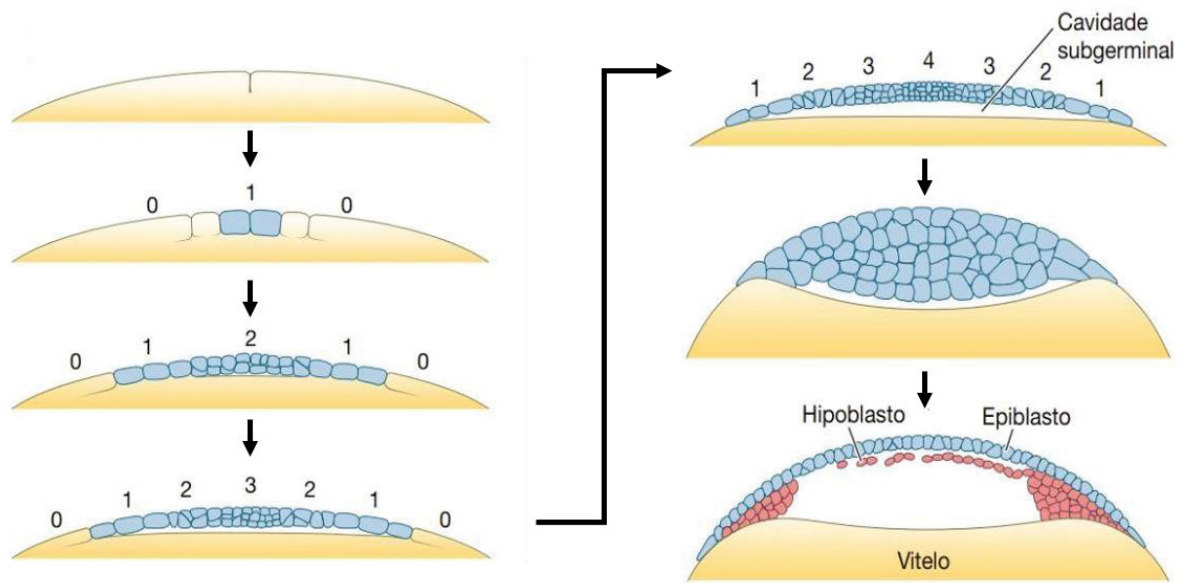


Modelo de embrião de ave (A) e de mamífero (B). Em negrito estão destacadas as membranas extraembrionárias comuns aos dois vertebrados amniotas. Fonte: Adaptado de GILBERT (2019).

Em aves, a maior parte do desenvolvimento embrionário ocorre externo ao corpo da fêmea, porém a ovulação, o processo de fertilização, secreção de albumina e casca, além do início do desenvolvimento (até a clivagem), ocorrem ainda no oviduto da fêmea. Seus ovos são do tipo telolécito (apresenta grande quantidade de vitelo), com um pequeno disco de citoplasma (blastodisco) que se apoia sobre o vitelo (GILBERT, 2019). Durante o primeiro dia de desenvolvimento ocorre a clivagem no blastodisco, classificada como meroblástica discoidal, pois fica restrita a uma área discoide no polo animal do ovo, onde é formado um aglomerado de células denominado blastoderma ou disco germinativo (SHENG, 2014). Entre a região central do blastoderma e o vitelo existe um espaço chamado de cavidade subgerminativa. As células mais profundas do centro do blastoderma parecem descamar e morrem, deixando uma área mais clara (área pelúcida), enquanto que as regiões marginais, onde as células não descamam, são denominadas de área opaca. Entre a área pelúcida e opaca existe uma fina camada de células chamada de zona marginal (GILBERT, 2019). Na postura, o embrião já se encontra na fase de blastoderme (ou blástula).

Após a postura do ovo, o embrião continuará seu desenvolvimento se houver condições adequadas de temperatura, ventilação e umidade, dando início à gastrulação. Nesse estágio o embrião apresenta duas camadas celulares, o epiblasto na porção dorsal e o hipoblasto na porção ventral (SALMITO-VANDERLEY; SANTANA, 2015) (FIGURA 2).

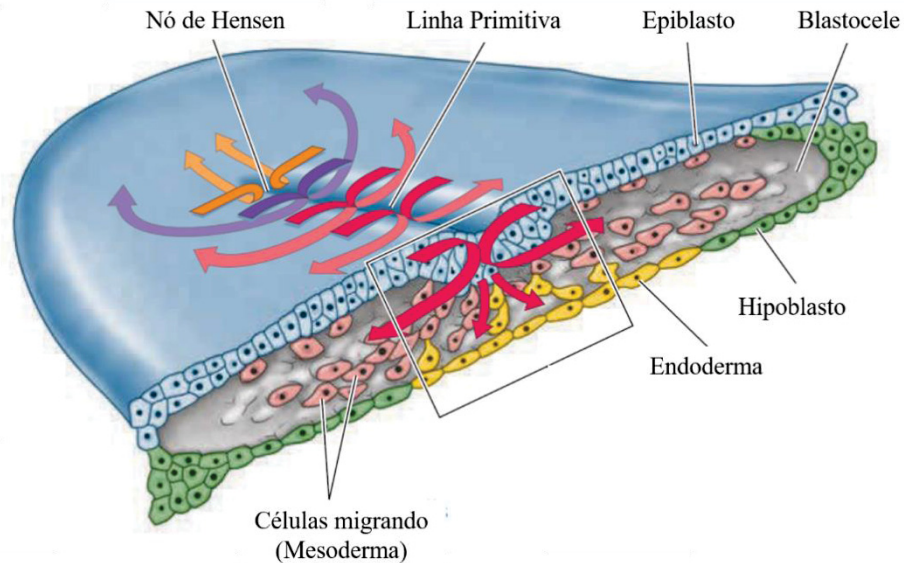
FIGURA 2 – SEGMENTAÇÃO NOS EMBRIÕES DE AVE



Representação esquemática das divisões celulares que ocorrem no processo de segmentação. Os números indicam a quantidade de camadas celulares. Fonte: GILBERT (2019).

No início da gastrulação ocorre o espessamento do epiblasto, pelo acúmulo de células devido à proliferação, na região central e posterior da área pelúcida, dando origem à linha primitiva, estrutura particular da gastrulação de amniotas (BERTOCCHINI *et al.*, 2013; GILBERT, 2019). No meio da linha primitiva é formada uma depressão chamada de sulco primitivo, enquanto na sua porção mais anterior ocorre um espessamento celular denominado nó de Hensen, em cujo centro há uma depressão chamada fosseta primitiva. Através do sulco primitivo e da fosseta primitiva as células migram do epiblasto para diferentes regiões do blastocele (entre o epiblasto e hipoblasto) (GILBERT, 2019) (FIGURA 3). Essas células migram para formar o endoderma e mesoderma, enquanto as células remanescentes do epiblasto proliferam para dar origem ao ectoderma. Cada uma dessas populações é capaz de formar diferentes tipos celulares (NÁJERA; WEIJER, 2020).

FIGURA 3 – MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ATRAVÉS DA LINHA PRIMITIVA E NÓ DE HENSEN EM UMA GÁSTRULA DE GALINHA



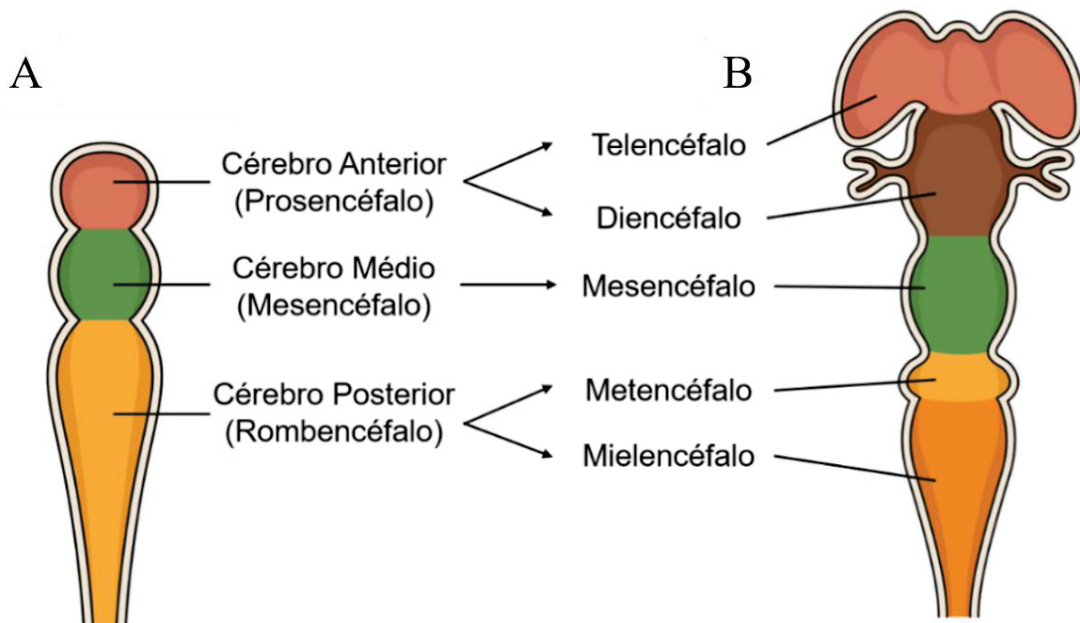
Representação esquemática mostrando a relação entre a linha primitiva, as células migratórias e o hipoblasto e epiblasto do bastoderma, na gastrulação do embrião de galinha. Setas amarelas: Alongamento anterior (cefálico) da linha primitiva. Setas roxas: Convergência e migração das células do epiblasto pela fosseta primitiva do nó de Hensen, em direção a região cefálica (essas células formarão o intestino anterior, o mesoderma cefálico e a notocorda). Setas rosas: Convergência e migração das células do epiblasto para o sulco da linha primitiva (vão formar a maioria dos tecidos endodérmicos e mesodérmicos do embrião). Fonte: Adaptado de GILBERT (2019).

O desenvolvimento dos embriões de aves (e mamíferos) apresenta um gradiente anteroposterior, ou seja, enquanto as células das porções posteriores ainda são parte da linha primitiva e estão entrando no embrião, as células na porção anterior já começaram a formar os órgãos (SLACK, 2013; GILBERT, 2019). Dessa forma, os processos acontecem simultaneamente, a neurulação inicia na região anterior antes do término da gastrulação, que está ocorrendo na região posterior. Na neurulação ocorre a formação da placa neural na linha média do embrião, que se invagina formando o sulco neural, com as pregas neurais nas laterais. A fusão das pregas dará origem ao tubo neural (TN) (GARCÍA, 2017; NIKOLOPOULOU *et al.*, 2017). A porção mais cefálica do TN originará o encéfalo, enquanto o restante de sua extensão dará origem à medula espinhal. As células contidas nas extremidades das dobras neurais irão segregar e formar uma população distinta de células, a crista neural (CN) (SCHOENWOLF, 1999; BELLAIRS; OSMOND; 2014).

O TN passa por uma especialização regional, sendo dividido em quatro regiões rostro-caudais: o prosencéfalo (cérebro anterior), o mesencéfalo (cérebro médio), o rombencéfalo (cérebro posterior) e a medula espinhal (FIGURA 4A). Cada uma dessas regiões formará áreas especializadas do sistema nervoso (SCHOENWOLF, 1999). Em embriões de ave, as vesículas encefálicas primárias começam a ser formadas no estágio 9HH (29-33 horas) (HAMBURGER;

HAMILTON, 1951), na extremidade mais anterior do TN. No estágio 10HH (33-38 horas) o cérebro encontra-se dividido em prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Posteriormente, as vesículas encefálicas primárias são subdivididas, sendo que no estágio 11HH (40-45 horas) o rombencéfalo forma o metencéfalo (que originará o cerebelo e ponte pertencente ao tronco cerebral) e o mielencéfalo (que formará a medula oblongada), enquanto o restante da extensão do TN formará a medula espinhal (FIGURA 4B). Nos estádios seguintes (12 e 13HH, que correspondem de 45 a 49 e 48 a 52 horas, respectivamente) o prosencéfalo se divide em telencéfalo (que formará os hemisférios cerebrais) e diencefalo (precursor do tálamo). O mesencéfalo não se divide, porém aumenta bastante de tamanho por volta do estágio 18HH (65-69 horas) e torna-se claramente marcado antes do rombencéfalo por uma região mais estreita, o istmo (BELLAIRS; OSMOND, 2014).

FIGURA 4 – FORMAÇÃO DO ENCÉFALO DE EMBRIÃO DE AVE DE 2 E 3 DIAS DE DESENVOLVIMENTO



Modelo esquemático da formação do encéfalo de embriões de *Gallus gallus*. A: Embrião com 2 dias de desenvolvimento, formação das vesículas encefálicas primárias. B: Embrião com 3 dias de desenvolvimento, formação das vesículas encefálicas secundárias. FONTE: Adaptado de GILBERT (2019).

Desse modo, a morfogênese da cabeça de vertebrados é um processo que envolve o crescimento rápido e comportamentos dinâmicos de várias populações celulares para formar a face, a mandíbula e os arcos branquiais. Essas populações incluem o ectoderma, o mesoderma e a crista neural (CN), que devem ser coordenadas para produzir um padrão axial adequado da região cefálica (MCKINNEY *et al.*, 2020).

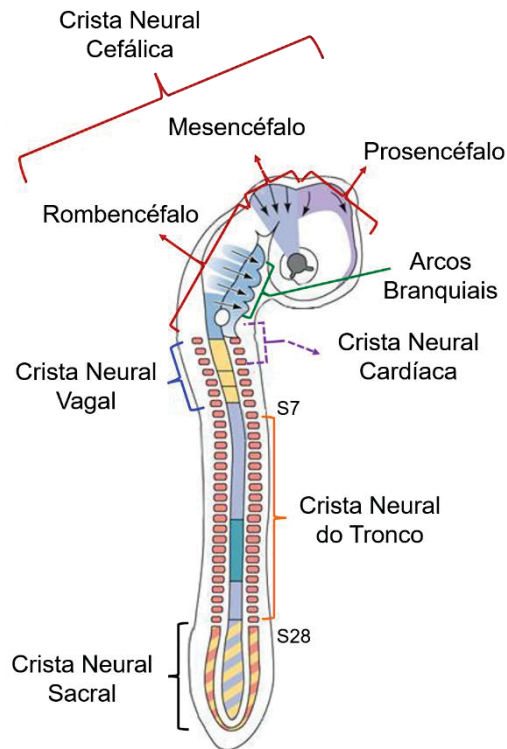
2.2.1 Desenvolvimento das células da crista neural

A formação das células da CN ocorre simultaneamente ao fechamento do TN. Em embriões de *G. gallus* isso ocorre aproximadamente a partir do estágio 8HH (26 a 29 horas) (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). As células da CN apresentam grande capacidade de migração, proliferação e pluripotencialidade (LE DOUARIN *et al.*, 2004) e devido a essas características migram para várias regiões e originam diferentes tipos celulares. Desta forma, essas células são um excelente modelo para estudo, englobando quase todas as características do desenvolvimento, como formação, determinação, diferenciação e migração direcionada (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999).

As células da CN distinguem-se das células do TN, pois apresentam transição epitélio-mesenquimal (*EMT*, do inglês: *Epithelial Mesenchymal Transition*) devido a alterações em moléculas de adesão, de sua morfologia e perda da lâmina basal, adquirindo, assim, ampla capacidade migratória (STROBL-MAZZULLA; BRONNER, 2012; PIACENTINO; BRONNER, 2020). O processo de migração é bastante complexo e envolve a interação de uma série de moléculas, como glicoproteínas de adesão, integrinas e componentes de matriz como fibronectina, laminina e colágeno do tipo I, IV e VI (SHAH; TANEYHILL, 2015; HUANG *et al.*, 2016; LEONARD; TANEYHILL, 2020). Isto permite que as células da CN migrem para diversos lugares no corpo do embrião para alcançar seu local alvo, deslocando-se através da densa matriz extracelular e mesoderma subjacente ao ectoderma (MCKINNEY *et al.*, 2020).

Em aves, a CN pode ser dividida didaticamente em: 1- crista neural cefálica (compreende a crista neural localizada ao nível do prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo), 2- vagal (região entre os somitos 1 e 7), 3- do tronco (do somito 8 até o 27) e 4- sacral (do somito 28 em diante) (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999). Tem-se, ainda, a crista neural cardíaca, que origina precursores que vão participar da septação do trato de efluxo do coração (MIYAGAWA-TOMITA *et al.*, 1991) e se encontra colocalizada com as cristas cefálica e vagal, se estendendo da região correspondente à metade da vesícula óptica até o somito 3 (KURATANI; KIRBY, 1991) (FIGURA 5).

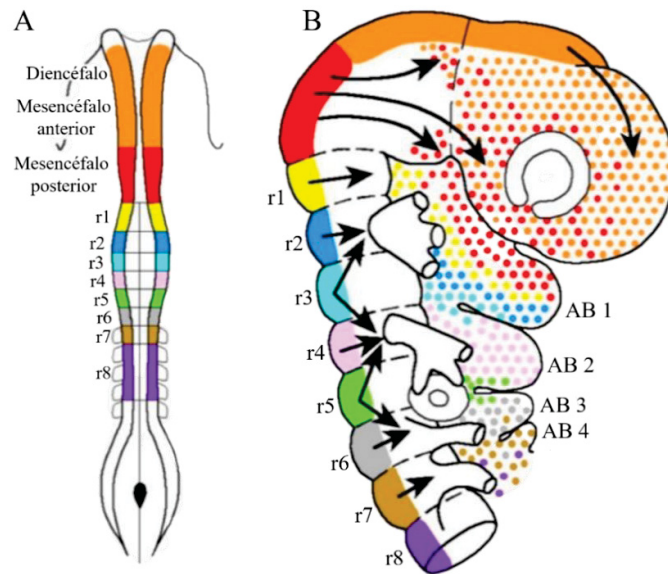
FIGURA 5 - DIVISÃO DIDÁTICA DAS PRINCIPAIS REGIÕES DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÃO DE AVE



Região cefálica (chaves vermelhas): Prosencéfalo, Mesencéfalo, Rombencéfalo. Região vagal (chave azul). Região do tronco (chave laranja). Região sacral (chave preta). Crista neural cardíaca (chave roxa pontilhada). Arcos branquiais (chave verde). FONTE: Adaptado de GILBERT (2019).

A migração das células da CN tem início aproximadamente no estágio 10HH. Na região cefálica a migração é bem estabelecida e ocorre pela via dorsolateral (LE DOUARIN; KALCHEIN, 1999). Ao nível do prosencéfalo, essas células migram em direção a porção anterior da cabeça, contornando as vesículas ópticas. A partir do mesencéfalo posterior migram lateralmente pela ectoderme a partir do estágio 12HH e colonizam o primeiro arco branquial para originar partes da mandíbula. Já as células da CN dos rombômeros (r1-r7) migram para formar três fluxos de células que colonizam os arcos branquiais (LE DOUARIN; KALCHEIN, 1999; BELLAIRS; OSMOND; 2014) (FIGURA 6).

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA



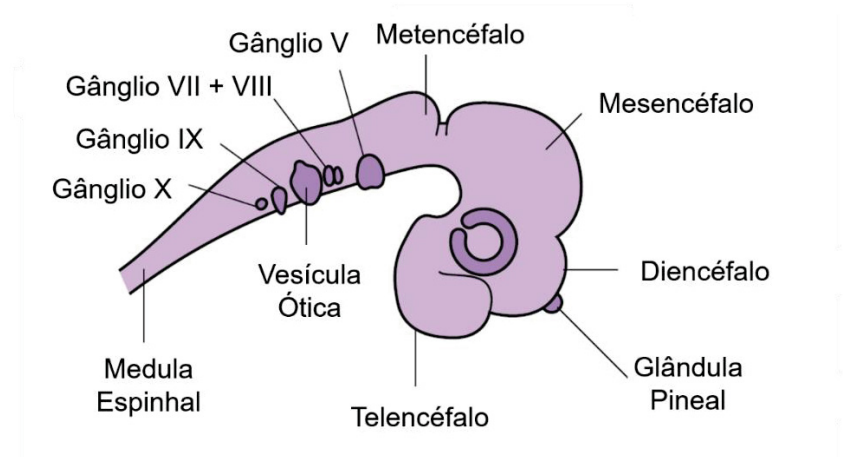
A: Modelo esquemático da divisão de cada região cefálica, diferenciada por cores. B: Mapa de migração das células da crista neural cefálica. Ao nível do mesencéfalo anterior e posterior do prosencéfalo (laranja) contribuem para formação das regiões frontonasal e periocular. As células da CN do segmento posterior do mesencéfalo (vermelho) também preenchem parte do primeiro arco branquial (AB) junto com as células que migram dos rombômeros r1 (amarelo) e r2 (azul escuro). A maior contribuição para o segundo AB vem do r4 (lilás). Células dos r6 (cinza) e r7 (marrom) migram para o terceiro e quarto AB, respectivamente. As células do r3 (azul claro) migram para o primeiro e segundo AB e as do r5 (verde) migram para o segundo e terceiro AB. As setas indicam o caminho percorrido pelas células da crista neural conforme sua região de origem. Os pontos coloridos indicam as regiões colonizadas pelas células da crista de acordo com seu nível axial de origem. FONTE: Adaptado de LE DOUARIN; KALCHEIM (1999).

O primeiro fluxo migratório formado pelas células da CN cefálica se inicia ao nível do mesencéfalo, r1 e r2, que povoam o primeiro arco branquial. O segundo fluxo ocorre ao nível de r4 e as células da CN contribuem para a colonização do segundo arco branquial. Finalmente, o terceiro fluxo migratório é formado por células da CN ao nível de r6 e r7, que preenchem o terceiro e quarto arcos branquiais. Poucas células migram a partir do nível de r3 e r5, sendo que essas juntam-se aos fluxos migratórios anterior e posterior à região da qual emergem. Ou seja, as células que migram a partir de r3 contribuem para preencher o primeiro e segundo arcos branquiais. De maneira similar, as células que migram a partir de r5 contribuem para preencher o segundo e terceiro arcos branquiais. As regiões imediatamente adjacentes a r3 e r5 permanecem sem células da CN (KUO; ERICKSON, 2010; LE DOUARIN; DUPIN, 2018). Estudos mostraram que a formação dos fluxos migratórios segregados e a escassez de células da CN originárias de r3 e r5 é resultado da apoptose mediada, principalmente, pela proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4) (LUMSDEN; SPRAWSON; GRAHAN, 1991; SMITH; GRAHAM, 2001) e por fatores inibitórios, como semaforinas e o receptor tirosina quinase

ErbB4 (SECHRIST; SCHERSON; BRONNER-FRASER, 1994; MELLOTT; BURKE, 2008; THEVENEAU; MAYOR, 2014).

As células da CN cefálica migram extensamente nessas três correntes estereotipadas para modelar estruturas da face e pescoço. Essas células ocupam as regiões laterais, ventrais e mediais dos arcos branquiais. A partir do estágio 17HH (52-64 horas) a migração cessa e as células iniciam o processo de diferenciação para formar tecido conjuntivo (BELLAIRES; OSMOND, 2014). Outras células da CN cessam sua migração ventral próxima ao TN, e a partir de 12HH começam a agregar e posteriormente (14HH, de 50 a 53 horas) são unidas e formam vários gânglios cranianos (MCKEOWN; WALLACE; ANDERSON, 2003) (FIGURA 7).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GÂNGLIOS CRANIANOS



Modelo esquemático de um embrião de ave indicando alguns dos gânglios cranianos formados com a contribuição de células da crista neural. Gânglio V: Trigêmeo. Gânglio VII e VIII: Facial e acústico ou vestibulococlear. Gânglio IX: Glossofaríngeo. Gânglio X: Vago. FONTE: Adaptado de BELLAIRS; OSMOND (2014).

Alterações no padrão de formação e migração ou diferenciação da CN podem ocasionar uma série de perturbações na formação dos embriões de vertebrados. Em humanos, essas condições são denominadas neurocristopatias (TABELA 3) e podem acontecer em decorrência de anomalias genéticas (VEGA-LOPEZ *et al.*, 2018), como as síndromes de DiGeorge e Treacher Collins, que estão relacionadas a malformações da face (SNIDER; MISHINA, 2014). Além disso, alterações na migração das células da CN foram descritas como promotoras de alterações na formação da medula espinhal, comprimento reduzido do corpo e tamanho diminuído do cérebro (ZAYDMAN *et al.*, 2021). Em embriões de ave foram relatadas alterações na formação de ossos cranianos e comprimento encurtado do corpo (JIAO *et al.*, 2019; YAN *et al.*, 2020).

TABELA 3 – CONTRIBUIÇÃO DE CADA POPULAÇÃO DA CRISTA NEURAL EM DIFERENTES NEUROCRISTOPATIAS

População CN	Nome	Gene	Papel na Crista Neural	Mecanismo
Craniana	Treacher Collins	<i>TCOF1, POLR1C, POLR1D</i>	Formação	Sobrevivência do NCC; biogênese de ribossomo deficiente
Craniana	Síndrome de Miller	<i>DHODH</i>	Formação	Envolvido na síntese de uracila; proliferação celular
Craniana	Síndrome de Waardenburg	<i>PAX3</i>	Formação	Proliferação de melanoblastos de formação
Craniana	Síndrome Brânquio-Óculo-Facial	<i>SLUG, EDNRB, EDN3, SOX10</i>	Migração	EMT de migração, interações para migração adequada
Craniana	Síndrome Brânquio-Óculo-Facial	<i>TFAP2A</i>	Migração	Papel na EMT
Craniana/ Cardíaca	Síndrome de Mowat-Wilson	<i>SIP1</i>	Migração	Papel na EMT
Craniana/ Cardíaca	Síndrome de DiGeorge	<i>TBX1</i>	Migração	Sinalização do endoderma para NCC
Craniana/Tronco/ Cardíaca	Piebaldismo	<i>KIT, SLUG</i>	Migração	Papel na EMT (<i>Snail2</i>), migração de melanócitos e sobrevivência (<i>KIT</i>)
Cardíaca/Sacral	Doença de Hirschsprung	<i>RET, GDNF, NTN, EDNRB, EDN3, SOX10, SIP1, L1CAM</i>	Migração	Sinais para orientação do NCC durante a migração; papéis na sobrevivência e proliferação
		<i>PHOX2B, HASH1, HAND2</i>	Diferenciação	Diferenciação neuronal
Craniana	Síndrome de Bamforth-Lazarus	<i>FOXE1</i>	Diferenciação	Papel na condrogênese; interage com <i>MSX1</i> e <i>TGFβ3</i>
Craniana	Síndrome Branquio-oto-renal	<i>EYAI, SIX1, SIX5</i>	Formação e Diferenciação	Regulação da proliferação de progenitores neurais placodais e subsequente diferenciação neuronal; <i>Six1</i> tem um papel na formação do NCC

NCC: Células da crista neural. EMT: Transição epitélio-mesenquimal. FONTE: Adaptado de WATT e TRAINOR (2014); VEGA-LOPEZ e colaboradores (2018); PILON (2021).

2.3 CONTAMINANTES

2.3.1 Chumbo (Pb)

O Pb é um metal pesado (ATKINS; JONES, 2001) encontrado naturalmente no ambiente (FRANK *et al.*, 2019), porém as principais fontes disseminadoras desse metal são resultantes da atividade humana. No ambiente, o Pb não é degradado e pode ser bioacumulado (LIAO, J. *et al.*, 2021). Além disso, é usado em vários processos industriais (WHO, 2019a), sendo utilizado como protetor radiológico (HAYRE *et al.*, 2017), na confecção de baterias automotivas e balanceamento de pneus (BOCCHI; FERRACIN; BIAGGIO, 2000), em tintas e pigmentos (NJATI; MAGUTA, 2019), entre outros. Mesmo com esforços para diminuir a emissão antrópica, ainda é um contaminante bastante preocupante (EFSA, 2012; FRY *et al.*, 2020). Independente dos limites regulamentares sobre o teor de Pb em diversos países, alguns trabalhos revelaram níveis significativos desse metal em tintas, muito acima dos limites permitidos (KUMAR; GOTTFELD, 2008; NGANGA *et al.*, 2012; NJATI; MAGUTA, 2019). Devido a eliminação progressiva de tintas à base de Pb, foi criada a *Lead Paint Alliance* (aliança global para eliminar a tinta com Pb), Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente e da Organização Mundial da Saúde, com o objetivo de evitar a exposição de crianças a tintas que contêm Pb e minimizar a exposição ocupacional a essas tintas (UNEP, 2021). Uma fonte mais recente de contaminação de Pb, que vem gerando grande preocupação, é o descarte inadequado de equipamentos eletroeletrônicos, pois estima-se que 30-60% da massa desses equipamentos sejam constituídas por compostos de Pb (PASCALE, 2016; NARAYANASAMY *et al.*, 2021; WHO, 2021; MA *et al.*, 2022).

O Pb é bastante tóxico, classificado em 2º lugar no ranque de prioridade da lista de substâncias perigosas da Agência Americana para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2019). Seu uso generalizado e o descarte inadequado de diferentes materiais têm causado extensa contaminação ambiental e problemas de saúde em muitas partes do mundo, já que é um tóxico cumulativo e que afeta os sistemas corporais (EPA, 2022; WHO, 2019a).

A exposição humana ao Pb ocorre através da inalação, ingestão ou via cutânea, e sua absorção depende tanto da via de exposição quanto do tamanho da partícula e hidrofobicidade do composto (OLLSON *et al.*, 2017). É considerado um metal não essencial (DARTEY *et al.*, 2017), pois não apresenta funções fisiológicas descritas (COLLIN *et al.*, 2022) e pode levar à intoxicação crônica (VALENT *et al.*, 2004; CDC, 2022) ou aguda (TONG; VON SCHIRNDING; PRAPAMONTOL, 2000; CDC, 2022).

A toxicidade celular induzida pelo Pb ocorre através de diferentes percursos, incluindo inativação e alteração de enzimas e outras macromoléculas e interação, mimetização ou substituição de íons essenciais (FANG *et al.*, 2021), principalmente cálcio, zinco, magnésio e ferro. Sua entrada na célula ocorre por diferentes canais ou bombas percorridas por esses íons (BRESSLER *et al.*, 2007; FLORA; AGRAWAL, 2017), onde atua como os componentes citados em eventos celulares (GARZA; VEJA; SOTO, 2006; FLORA *et al.*, 2007; FLOREA *et al.*, 2013). Pode ocasionar alterações nas membranas celulares e mitocondriais, na síntese e função de neurotransmissores, no estado redox da célula e no metabolismo de nucleotídeos (CAROCCI *et al.*, 2016). Além disso, o Pb altera a expressão de moléculas de adesão (HU *et al.*, 2011) e reduz a capacidade das células aderirem a componentes de matriz, como fibronectina e vitronectina (GIULIANI *et al.*, 2005). Assim, ao alterar os mecanismos citados, pode promover inúmeras patologias nos organismos.

No início do desenvolvimento os embriões humanos são mais susceptíveis aos efeitos nocivos do Pb (WHO, 2006), já que este metal atravessa a barreira placentária e possui efeito cumulativo no feto (MAS; AROLA, 1985; LI, A. *et al.*, 2019). Ele promove atraso no crescimento (HONG *et al.*, 2014), alterações no sistema imune (CRINNION, 2009) e déficits intelectuais e cognitivos (JEDRYCHOWSKI *et al.*, 2008; TAYLOR *et al.*, 2017). As concentrações placentárias de Pb podem variar de acordo com a região geográfica em que os indivíduos se encontram. Foi demonstrado que os níveis deste metal variaram de 0,0018 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, sendo que na América do Sul, Ásia e no norte da África ainda são observados níveis muito elevados de Pb placentário (ESTEBAN-VASALLO *et al.*, 2012, CERRILOS *et al.*, 2019). Além disso, a concentração de Pb foi quantificada no sangue materno (0,0245 a 0,0451 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), cordão umbilical (0,0148 a 0,0444 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), leite materno (0,00029 a 0,02308 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) e no sangue do recém-nascido até 3 meses (0,0086 a 0,0153 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) (SAKAMOTO *et al.*, 2012; BAEYENS *et al.*, 2014; GUNDACKER *et al.*, 2021; BERNASCONI *et al.*, 2022; NASPOLINI *et al.*, 2022). No entanto, não há uma concentração "segura" conhecida de Pb no sangue (WHO, 2019a) e a literatura não descreve, sequer, um nível seguro para exposição ao Pb (SHEFA; HÉROUX, 2017; ZAYNAB *et al.*, 2022).

Em embriões de *G. gallus* foram relatados alguns efeitos deste contaminante, principalmente na região cefálica (BORGES, 2017; DA COSTA *et al.*, 2021). Também são descritos o fechamento incompleto do TN, a presença de extrusão visceral, e diversos tipos de malformações generalizadas (DURSKA, 2001; SCHATZ, 2003; ZHONG *et al.*, 2010; BORGES, 2017). Além disso, hemorragias intra e extraembrionárias são frequentes e também é possível encontrar casos de necrose na região cefálica (NARBAITZ; MARINO; SARKAR,

1985; SCHATZ, 2003). Além das alterações morfológicas, a exposição ao Pb está associada ao aumento na mortalidade (BORGES, 2017; DA COSTA *et al.*, 2021), problemas na resposta imune (VALLVERDÚ-COLL *et al.*, 2015), aumento de células apoptóticas no córtex medular e redução na expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no sistema nervoso dos embriões (SCHATZ, 2003; MÜLLER *et al.*, 2012). Também está associada a alterações comportamentais (RIVERO *et al.*, 2006) e comprometimento em processos cognitivos e de memória (ZHONG *et al.*, 2010). Outro achado bastante relevante e que pode responder, parcialmente, as alterações morfológicas na região cefálica descritas anteriormente é a redução no número e na migração das células da CN cefálica, após a exposição dos embriões ao Pb (DA COSTA *et al.*, 2021).

2.3.2 Cádmiio (Cd)

O Cd é um metal pesado (ATKINS; JONES, 2001) que provém de fontes naturais, como atividade vulcânica e erosão de solos e rochas, e antrópicas devido a sua utilização em vários processos industriais, como produção de baterias, pigmentos, tintas, soldas e fertilizantes fosfatados (CDC, 2019; HUANG *et al.*, 2017). A queima de combustíveis fósseis, a incineração de resíduos urbanos e o despejo de esgoto também aumentam a dispersão desse metal no ambiente (WHO, 2019b). Fontes mais recentes de exposição ao Cd são preocupantes para o risco de contaminação e impacto futuro na saúde global, como, por exemplo, a reciclagem inadequada de lixo eletrônico, que está expondo crianças e adultos, em países em desenvolvimento, a níveis extremos de Cd (SCHMIDT, 2006; LI *et al.*, 2011). Além disso, o Cd não se decompõe no meio ambiente (EGENDORF *et al.*, 2020) e pode permanecer no solo, ar e água.

O Cd não é um metal essencial, sendo altamente tóxico e classificado em 7º lugar no ranque de prioridade da lista de substâncias perigosas da ATSDR (2019). Apresenta capacidade de bioacumulação e biomagnificação, sendo que os organismos no topo da cadeia trófica, como os humanos, podem assimilar altas concentrações do contaminante, resultando em riscos à saúde (ABDEL-BAKI; DKHIL; AL-QURAISHY, 2011). Sua exposição pode ocorrer via oral, por inalação ou absorção dérmica. Em não fumantes a principal fonte não ocupacional de exposição ao Cd é proveniente da dieta, no entanto, o tabagismo ainda é bastante preocupante (OLSON, 2014), pois as folhas do tabaco acumulam altos níveis desse metal (DA SILVA *et al.*, 2016). Após ser absorvido, se acumula principalmente no fígado, pulmão e rins (CHANG *et al.*, 2012; TÊTE *et al.*, 2014).

Durante o período gestacional o Cd atravessa a barreira placentária (RONCO; ARGUELLO; GRAS, 2005; RUDGE *et al.*, 2009), podendo ser retido pela placenta, se acumular em altos níveis, e, então, ser transferido da mãe para o embrião/feto (NAKAMURA; OHBA; OHTA, 2012; FLANNERY; SCHAEFER; MIDDLETON, 2022). Dependendo da população, as concentrações de Cd no sangue materno variam de 0,000233 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a 0,0085 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e no cordão umbilical variam de 0,0002 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a 0,0075 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (TANG *et al.*, 2016; CABRERA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018; TAYLOR *et al.*, 2018; MOTAS *et al.*, 2021).

Várias vias podem estar envolvidas no transporte do Cd para as células, como a difusão facilitada ou transporte ativo. Nas células, sua captação ocorre por transportadores e receptores para formas livres e complexas de muitos metais essenciais (CHOONG; LIU; TEMPLETON, 2014). Além disso, o Cd pode interagir com outros elementos como cobre, ferro, zinco e cálcio (MATOVIC *et al.*, 2015). Sua toxicidade é induzida por diferentes mecanismos e apresenta vários efeitos na remodelação do citoesqueleto, sinalização e morte celular, devido, principalmente, a sua similaridade físico-química com íons cálcio (CHOONG; LIU; TEMPLETON, 2014). O Cd pode atuar sobre diferentes processos celulares como proliferação, diferenciação, progressão do ciclo celular, apoptose, replicação e reparo do DNA (BERTIN; AVERBERCK, 2006). Além disso, pode afetar proteínas estruturais como actina, tubulina e/ou proteínas de ligação célula-célula como caderinas (CHOONG; LIU; TEMPLETON, 2014).

Ao longo do desenvolvimento, o Cd pode causar diferentes níveis de comprometimento (SALVATORI *et al.*, 2004; THOMPSON *et al.*, 2005; THOMPSON; BANNIGAN, 2007; ZHU *et al.*, 2011), como defeitos no TN, ou interferindo no crescimento fetal, com redução no peso e comprimento do feto (ZHANG *et al.*, 2016). Em *G. gallus* já foram relatadas alterações no fechamento da parede do corpo, 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). No trabalho realizado por Kmecick e colaboradores (2019) foi observada maior incidência de alterações encefálicas após a exposição ao Cd, porém, até o momento não existe na literatura relatos sobre os efeitos do Cd sobre as células da CN.

2.3.3 Ácido perfluorooctanóico (PFOA)

Poluentes emergentes são classificados como substâncias que apresentam potencial tóxico, mas com efeitos pouco esclarecidos (WANG; CHANG *et al.*, 2019). Nesta classe de contaminantes encontram-se os compostos perfluorados (PFCs), que são considerados poluentes organopersistentes emergentes, que podem bioacumular e biomagnificar, sendo potencialmente tóxicos aos humanos e animais (VIERKE *et al.*, 2012; ZHONG *et al.*, 2020). A degradação de PFCs de cadeias carbônicas maiores gera como produto final diferentes compostos perfluorados menores (ARVANITI; STASINAKIS, 2015; OLATUNDE *et al.*, 2020). Entre esses compostos está o PFOA, um dos mais encontrados no ambiente (WINKENS *et al.*, 2017). Como os PFCs apresentam características físicas e químicas únicas, incluindo estabilidade química, térmica (WANNINAYAKE, 2021) e natureza anfipática (BUCK *et al.*, 2011), são utilizados para fins industriais (WU *et al.*, 2012).

O PFOA é um composto amplamente utilizado na fabricação de fluoropolímeros para revestimento antiaderente de placas (como Teflon®), como aditivo antiestático, além de ser empregado na indústria de eletrônicos (WU *et al.*, 2012; SINGH; CHAUHAN; 2021), em inseticidas e revestimentos de embalagens de alimentos (BEGLEY *et al.*, 2008; BUCK *et al.*, 2011; POOTHONG; BOONTANON; BOONTANON, 2012). É classificado em 155º lugar no ranque de prioridade da lista de substâncias perigosas da ATSDR (2019). Esse composto já foi detectado em uma variedade de matrizes ambientais e amostras biológicas em todo o mundo (LAU *et al.*, 2007), refletindo na ampla disseminação da poluição com o PFOA. No ambiente, sua liberação ocorre pela produção, uso e descarte de produtos que contenham PFOA ou seus PFCs precursores (LAU *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2017). Em consequência de sua ocorrência global, persistência e bioacumulação em humanos e outros organismos, o PFOA torna-se de interesse público.

A exposição não ocupacional ao PFOA ocorre por via oral e respiratória (MURRAY; THOMAS; BODOUR, 2010; HEO *et al.*, 2014; SCHWANZ, 2016). No organismo pode se acumular, sendo o sangue e fígado seus principais alvos (JONES *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2017). No entanto, além de hepatotoxicidade (BIEGEL *et al.*, 2001), outros efeitos como imunotoxicidade (GUO *et al.*, 2021), cardiotoxicidade (JIANG *et al.*, 2016), desregulação endócrina (WHITE; FENTON; HINES, 2011), embriotoxicidade (LAU *et al.*, 2004; LAU *et al.*, 2006; LAU *et al.*, 2007) e carcinogenicidade (ANDERSEN *et al.*, 2008) já foram associados a exposição a esse contaminante.

A exposição pré-natal ao PFOA afeta a saúde e o desenvolvimento neonatal, no entanto, os efeitos biológicos e os potenciais riscos do PFOA para neonatos ainda precisam ser avaliados (WU *et al.*, 2012). Vários estudos mediram a concentração sérica de compostos perfluorados em amostras de sangue materno, do cordão ou do recém-nascido e demonstraram que esses compostos são capazes de atravessar a placenta e chegar ao feto. Esses estudos detectaram o PFOA em quase todas as amostras (MONROY *et al.*, 2008; BEESOON *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2011; LIU, J. *et al.*, 2011; PAN *et al.*, 2017; HALL *et al.*, 2022), sendo que a transferência do PFOA do sangue materno para o fetal é de 76 a 86% (LEE *et al.*, 2013; BLAKE; FENTON, 2020). No cordão umbilical a concentração média desse contaminante pode variar entre 0,36 a 7,73 ng.mL⁻¹ (LEE *et al.*, 2013; CARIOU *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016; BAO *et al.*, 2022).

Durante o desenvolvimento o PFOA pode promover, em humanos, malformações no sistema nervoso (STEIN *et al.*, 2014), nascimento prematuro, baixo peso ao nascer e natimortos (WU *et al.*, 2012). Em embriões de *G. gallus* expostos ao PFOA *in ovo* foram observadas cardiotoxicidade (JIANG *et al.*, 2012), alterações neurocomportamentais (PINKAS *et al.*, 2010) e ocorrência de malformações congênitas, como defeitos do TN, falha no fechamento da parede do corpo e alterações encefálicas (KMECICK *et al.*, 2019).

Os mecanismos de toxicidade do PFOA ainda não estão bem esclarecidos. Acredita-se que os compostos perfluorados possam aumentar a permeabilidade endotelial através do remodelamento dos filamentos de actina ou comprometimento das junções endoteliais aderentes. Concomitantemente, foi observada a alteração na expressão de VE-caderina (proteína de adesão específica do endotélio) após a exposição a esse composto (LIU *et al.*, 2018). A exposição ao PFOA também pode afetar a migração e invasão celular. Li e colaboradores (2018), ao avaliar células de câncer de ovário expostas ao PFOA, constataram que este contaminante afeta a migração e invasão de células cancerosas pelo endométrio.

Outra alteração possível, baseada na estrutura química tipo surfactante do PFOA, é que ele modularia fisicamente a integridade da membrana celular e a adesão célula-célula. Choi e colaboradores (2013) realizaram cultura 3D de células de neuroblastoma e observaram que o PFOA induziu a apoptose e necrose via ativação da caspase-3, sendo a necrose o principal mecanismo de lesão. Também notaram alteração na estrutura dos esferóides (formados por células agrupadas em dimensão 3D), resultando em morte celular e células destacadas e isoladas. Além disso, verificaram diminuição na expressão de E-caderina e conexina 43, o que pode explicar a alteração na morfologia dos esferóides.

Adicionalmente, foi descrita a capacidade do PFOA de promover elevação na concentração de íons de cálcio, liberado de reservas intracelulares (LIU, X. *et al.*, 2011). A alteração na homeostase do cálcio pode ser considerada um dos elementos cruciais na ativação da morte celular relacionada à mitocôndria. As mitocôndrias sobrecarregadas com íons de cálcio medeiam, como resultado, a liberação do citocromo c e a ativação da caspase-9 e posteriormente da caspase-3. Com base nessa via de sinalização, a captação mitocondrial de cálcio pode induzir um processo potencialmente prejudicial que pode desencadear a morte celular (KLESZCZYŃSKI; SKŁADANOWSKI, 2011). Além disso, o PFOA também pode promover apoptose através de regulação positiva da expressão de Fas (receptor associado aos receptores de morte celular relacionado ao fator de morte tumoral) e de Bax (proteína pró-apoptótica) e regulação negativa na expressão de Bcl-2 (proteína antiapoptótica) (FENG *et al.*, 2009). O aumento de Bcl-2 leva a liberação do citocromo c da mitocôndria, que desencadeia a execução final de morte celular pela cascata de caspases. O receptor Fas quando ligado a seu ligante Fas L desencadeia clivagem da pró-caspase-3 mediada pela caspase-8.

Apesar da grande preocupação com poluentes emergentes, poucos estudos relatam os efeitos do PFOA sobre o desenvolvimento embrionário inicial, e até o momento não há na literatura relatos das implicações desse contaminante em relação às células da CN.

2.3.4 Mistura de poluentes

Organismos vivos encontram-se constantemente expostos a uma complexa mistura de poluentes no ambiente e por isso o estudo do seu impacto de maneira isolada torna-se menos expressivo. A interação de diferentes compostos em mistura pode gerar efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (WILSON *et al.*, 2016; RIDER *et al.*, 2018), podendo alterar o potencial tóxico e bioacumulação dos componentes, quando comparados a exposição isolada (SØFTELAND *et al.*, 2014). De acordo com Wilson e colaboradores (2016), avaliar isoladamente os efeitos dos poluentes pode levar a má interpretação do risco de exposição a determinados compostos. Assim, a avaliação dos compostos em misturas permite simular de maneira mais realista uma exposição ambiental, uma vez que fornece informações sobre as interações entre as substâncias e seus efeitos.

Os contaminantes utilizados no presente trabalho apresentam como fonte em comum o lixo eletrônico (LI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2012; GRANT *et al.*, 2013; PASCALE, 2016), não são degradados (EGENDORF *et al.*, 2020; LIAO, J. *et al.*, 2021; CDC, 2022), sendo sua

interação duradoura, o que pode refletir em contaminação contínua para o ambiente e organismos que nele habitam.

Além disso, de maneira isolada, todos possuem a capacidade de atravessar a barreira placentária e se bioacumular no embrião/feto (CAI *et al.*, 2020; KABAMBA; TUAKUILA, 2020). Em mistura, já foi demonstrada a presença simultânea do Cd e PFOA em sangue de cordão umbilical, revelando que indivíduos em desenvolvimento sofrem uma exposição concomitante a esses poluentes (NEEDHAN *et al.*, 2011). A mistura estudada (Pb, Cd e PFOA) foi escolhida pois em estudos materno-infantil sobre produtos químicos ambientais (MIREC – do inglês: *Maternal-Infant Research on Environment Chemicals*) foi identificado que esses compostos estão nos principais grupos de misturas químicas as quais gestantes canadenses e francesas encontram-se expostas (LEE *et al.*, 2017; TRAORÉ *et al.*, 2018). Esses estudos baseiam-se em análises de componente principal (PCA) usada para extrair os produtos químicos com padrões semelhantes e pesquisar padrões entre os contaminantes que são potencialmente e altamente correlacionados, reduzindo, assim, resultados falso positivos e permitindo a avaliação real da mistura (LEE *et al.*, 2017; LONG *et al.*, 2019). Isto demonstra que as misturas escolhidas são encontradas em gestantes e neonatos, replicando a realidade de uma exposição ambiental e/ou dietética.

Embriões de *G. gallus*, quando expostos *in ovo* isoladamente ao Pb (BORGES, 2017; DA COSTA *et al.*, 2021), Cd e PFOA (KMECICK *et al.*, 2019) apresentaram diferentes malformações, incluindo alterações na região cefálica. Kmecick e colaboradores (2019), ao expor embriões na mistura de Cd e PFOA, observaram as mesmas alterações.

3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento inicial dos vertebrados é altamente sensível a agentes externos e é nesse período que ocorre a organogênese e neurulação. Nessa fase, os embriões amniotas apresentam diversas similaridades, como a formação dos órgãos e diferentes populações celulares. Entre estas populações estão as células da crista neural (CN), que possuem grande capacidade de migração, proliferação e pluripotencialidade, originando diversos tipos celulares e contribuindo para a formação de estruturas no organismo embrionário. O Pb, o Cd e o PFOA são poluentes persistentes no ambiente e podem se bioacumular na cadeia trófica. Trabalhos mostraram que esses contaminantes são capazes de alterar a morfologia, especialmente da região cefálica e do tronco, do embrião de ave. Sendo assim, a análise dos efeitos desses compostos sobre o desenvolvimento embrionário é de extrema importância. Além disso, apesar de estudos indicarem a capacidade desses poluentes de interferirem em diferentes mecanismos, seus efeitos sobre o desenvolvimento, particularmente sobre as células da CN, ainda não foram completamente elucidados e os efeitos causados por uma exposição conjunta foram pouco explorados.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a região cefálica dos embriões de *Gallus gallus*, após a exposição *in ovo* ao chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA), isoladamente e em mistura, com ênfase no padrão migratório das células da crista neural cefálica e vias de sinalização envolvidas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO I

- Simular, *in silico*, quais vias de sinalização envolvidas no processo de desenvolvimento embrionário são afetados pelo Pb, Cd e PFOA, isoladamente e em mistura.

CAPÍTULO II

- Avaliar se a exposição ao Pb, Cd e PFOA, isolada e em mistura, afeta a mortalidade e promove malformações na região cefálica de *Gallus gallus*.
- Analisar se a exposição aos contaminantes, isolados e em mistura, altera a proliferação e induz a morte celular por apoptose na região cefálica e em seus diferentes níveis axiais, nos estádios 10HH e 14HH.

CAPÍTULO III

- Investigar se as exposições, isoladas e em mistura, interferem no número e na migração das células da crista neural cefálica, nos estádios 10HH e 14HH.
- Investigar se as moléculas envolvidas no processo de transição epitélio-mesenquimal (β -catenina, N-caderina e E-caderina) são afetadas pela exposição aos contaminantes.
- Correlacionar as alterações nos diferentes níveis axiais, se houver, com as anormalidades morfofuncionais de derivados dos gânglios cranianos descritas na literatura.

Capítulo I

Análise de redes: Interação do chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA) com vias potencialmente relevantes para o desenvolvimento da região cefálica de *Gallus gallus*

RESUMO

O chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA) são compostos tóxicos, considerados teratógenos e que podem alterar os processos normais do desenvolvimento. Apesar de muitos trabalhos avaliarem as diferentes vias biológicas que podem ser relacionadas e, possivelmente, alteradas por esses compostos, sua avaliação em conjunto ainda é inédita na literatura. Avaliações experimentais podem ser difíceis, pois existem barreiras éticas e financeiras, além do grande número de moléculas que podem ser alvos potenciais para a ação dos contaminantes. Para otimizar os trabalhos experimentais, o emprego de ensaios *in silico* é bastante pertinente e pode ser considerado um passo essencial para compreensão dos processos celulares. Assim, o objetivo foi avaliar quais genes e/ou proteínas podem ser afetados pelo Pb, Cd e PFOA, isoladamente e em conjunto, nas vias de sinalização envolvidas no processo de desenvolvimento embrionário. Empregou-se a busca por dados públicos de genes cuja expressão é afetada pelos xenobióticos no *Comparative Toxicogenomics Database* (CTD). Em seguida, foram analisadas as associações de genes e comparação de *data sets* para os compostos químicos. 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. Foi observado que 18 vias podem ser significativamente afetadas pela exposição ao Pb, Cd e PFOA, sendo que se destacam as vias de sinalização MAPK, p53, TGF- β , interação com a matriz e receptores de adesão, Wnt e sinalização por cálcio. Essas diferentes vias culminam em processos essenciais, como migração, proliferação, apoptose e adesão celular.

Palavras-chave: Teratógenos; *In silico*, Redes biológicas; Desenvolvimento embrionário

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que muitos contaminantes ambientais podem levar a alterações no processo de desenvolvimento (GENG; WANG, 2019; KMECICK *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021). A identificação de um teratógeno e seus mecanismos moleculares é um processo complexo e multidisciplinar, mas entender esses pontos permite a compreensão de diversas embriopatias (KOWALSKI *et al.*, 2019) e por isso é extremamente relevante.

Alguns teratógenos mostram-se particularmente interessantes, especialmente por serem persistentes e extensamente dispersos no ambiente, como os metais pesados chumbo (Pb) e cádmio (Cd) e os compostos perfluorados como o ácido perfluorooctanóico (PFOA). O Pb e Cd são metais pesados considerados muito tóxicos, compreendidos no 2º e 7º lugar na lista do ranque de prioridade de substâncias tóxicas, respectivamente (ATSDR, 2019) e a exposição, mesmo em baixas concentrações, pode afetar vários sistemas do corpo (ZAYNAB *et al.*, 2022). Estudos mostram que esses metais podem interferir com metais essenciais como zinco, magnésio, selênio, cálcio e ferro (GENCHI *et al.*, 2020; COLLIN *et al.*, 2022) e, assim, gerar diversos efeitos adversos. Tanto o Pb quanto o Cd têm o potencial de afetar o desenvolvimento morfológico e comportamental (ESPART *et al.*, 2018; KMECICK *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021; LIAO, G. *et al.*, 2021) e também possuem a capacidade de migrar da mãe para o feto/embrião (CHEN *et al.*, 2014; GENG; WANG, 2019).

O PFOA, apesar de ocupar apenas o 155º lugar na lista de substâncias tóxicas (ATSDR, 2019), pode ser transferido da mãe para o feto, persiste no ambiente (APPEL *et al.*, 2022) e é considerado um contaminante emergente (MAHONEY *et al.*, 2022). Seu uso e produção foram proibidos em 2020, pela União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2020). Entre os efeitos adversos estão a diminuição da resposta a vacinação, redução do peso fetal, distúrbios no metabolismo lipídico e alterações morfológicas (WU *et al.*, 2012; STEIN *et al.*, 2014; KMECICK *et al.*, 2019; APPEL *et al.*, 2022).

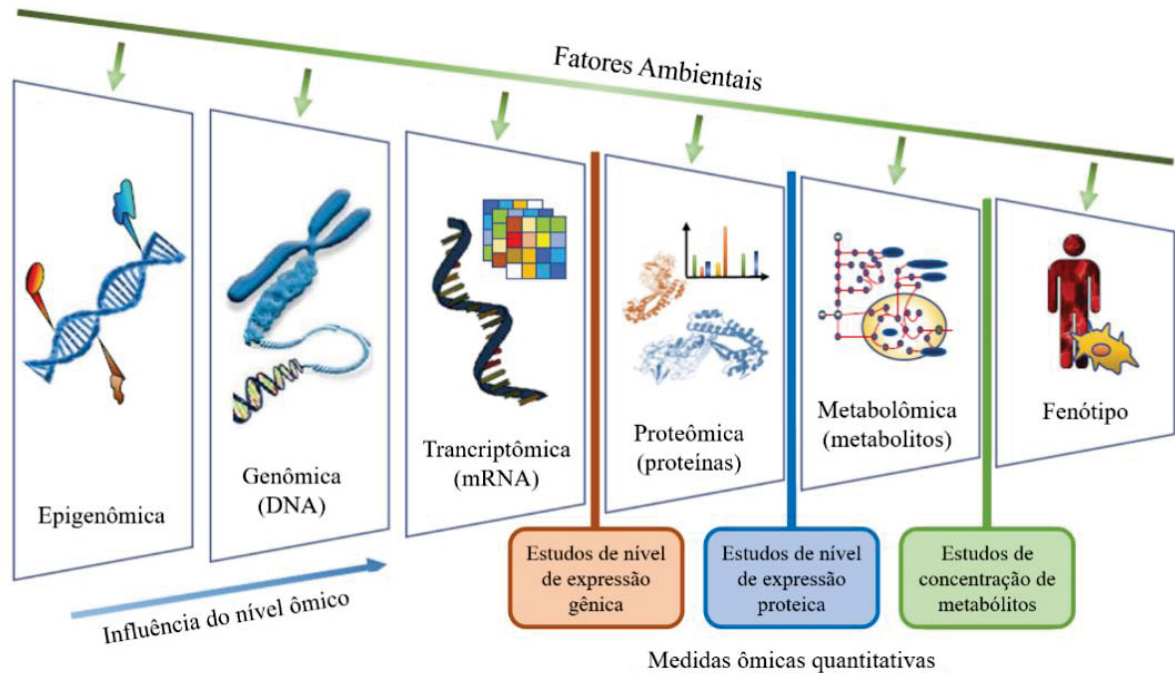
Supõe-se que produtos químicos com estruturas e/ou modo de ação semelhante compartilhem efeitos biológicos similares, incluindo seus efeitos toxicológicos (PLANT *et al.*, 2015). Sendo assim, o Pb, Cd e PFOA, mesmo parecendo distantes, compartilham alguns impactos celulares prejudiciais, como alterações na homeostase do cálcio, nas membranas celulares e mitocondriais, na expressão de moléculas de adesão e apoptose (HU *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2013; CHOONG; LIU; TEMPLETON, 2014; CARROCCI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018, GENCHI *et al.*, 2020; LIAO, G. *et al.*, 2021). Apesar dessas evidências, estudos que avaliam as vias biológicas essenciais ao desenvolvimento que podem ser afetadas por esses

contaminantes são escassos na literatura (WU; ACHEBOUCHE; AUDOUZE, 2020; HUANG *et al.*, 2021) e, até o momento, não foram identificados trabalhos que explorem, simultaneamente, esses três contaminantes, especialmente durante o desenvolvimento. Entretanto, os três contaminantes apresentam como fonte em comum o lixo eletrônico e a literatura mostra que não são degradados, apresentando uma interação duradoura, atravessam a barreira placentária e se bioacumulam no embrião/feto (CAI *et al.*, 2020; KABAMBA; TUAKUILA, 2020). Em estudos materno-infantil sobre produtos químicos ambientais foi identificado que esses compostos estão nos principais grupos de misturas químicas encontradas em gestantes e neonatos (LEE *et al.*, 2017; TRAORÉ *et al.*, 2018).

Estudos experimentais com misturas embriotóxicas podem ser difíceis, pois existem muitas barreiras éticas e financeiras. Além disso, é necessário considerar a alta complexidade experimental e devem ser avaliadas inúmeras moléculas que são alvos potenciais para um ou mais teratógenos e que podem interagir entre si (KOWALSKI *et al.*, 2019; KNUDSEN *et al.*, 2020). Também se deve considerar que o impacto dos teratógenos, na grande maioria das vezes, não é consequência da alteração de um único gene ou proteína, mas o efeito a jusante da desregulação de uma ou mais vias de sinalização que estão envolvidas no desenvolvimento embrionário (PLANT, 2015; YAHYA *et al.*, 2021). Para substituir os trabalhos experimentais, o emprego de ensaios *in silico*, que permitem integrar e conectar dados, melhorar a previsibilidade dos efeitos de um composto químico e gerar hipóteses, viabilizando o direcionamento posterior de análises experimentais (PLANT, 2015; KOWALSKI *et al.*, 2019), é uma ótima alternativa.

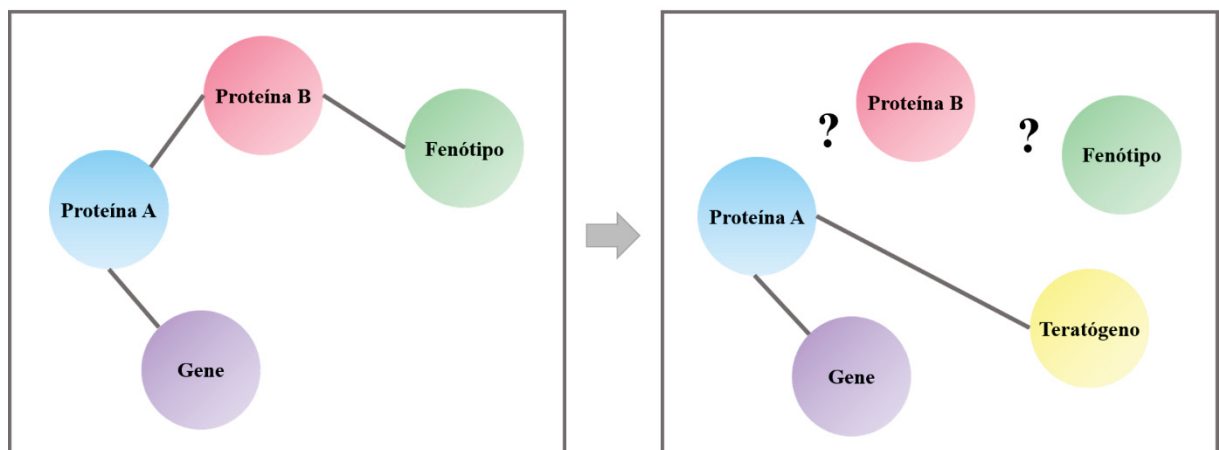
A tecnologia e a compreensão biológica vêm melhorando e, atualmente, é possível projetar experimentos de complexidade e resoluções crescentes, aumentando a riqueza de dados (PLANT, 2015). Com o advento da bioinformática e da biologia computacional, técnicas computacionais e matemáticas podem fornecer simulações precisas de processos biológicos (ANGIONE, 2019). A biologia de sistemas, por exemplo, integra dados experimentais por meio de metodologias computacionais para entender como os componentes moleculares de um organismo interagem em diferentes escalas (HOOD *et al.*, 2008; PLANT, 2015) (FIGURA 1). Nesse tipo de estudo, as redes biológicas são descritas como o centro das pesquisas. Porém, essas redes são, muitas vezes, pensadas apenas como uma ilustração gráfica, mas na verdade são representações de todo um conhecimento prévio experimental para um determinado processo biológico (KOWALSKI *et al.*, 2019) (FIGURA 2).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO BIOLÓGICA



O fenótipo é resultado de interações complexas e *loops* de *feedback* entre várias camadas ômicas, cada uma influenciada por perturbações ambientais. Em ordem de "distância" do fenótipo celular, são epigenômica (marcadores epigenéticos que afetam a atividade e expressão gênica), genômica (DNA contendo o código genético da célula), transcriptômica (o RNA codificado pelo genoma), proteômica (o conjunto de proteínas produzidas como resultado da expressão gênica e subsequentes modificações pós-traducionais) e metabolômica (o conjunto de metabólitos e reações metabólicas que ocorrem na célula). Fonte: Adaptado de ANGIONE (2019).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE REDES BIOLÓGICAS E SEUS PRINCIPAIS ELEMENTOS



As redes biológicas são compostas por nós (círculos) que representam os componentes e linhas que representam as interações entre os nós. As linhas podem conectar nós de diferentes classes, ou seja, gene-proteína, proteína-droga; portanto, ao estudar um processo teratogênico, tanto o teratógeno quanto as proteínas/genes desreguladas pelo agente de exposição são considerados nós. O teratógeno pode afetar a rede, rompendo ou modificando as linhas. Fonte: Adaptado de KOWALSKI e colaboradores (2019).

A modelagem computacional dos dados experimentais pode gerar novas hipóteses, por inferência de rede e simulações. Esses modelos podem ser utilizados na avaliação do desenvolvimento embrionário normal, sendo possível adicionar um fator de interferência, responsável por uma desregulação nesse processo (LE NOVÈRE, 2015; JI *et al.*, 2017; KOWALSKI *et al.*, 2019). Contudo, um método computacional nunca pode substituir uma abordagem experimental e/ou epidemiológica (TABOUREAU; EL M'SELMI; AUDOUZE, 2020). Porém, mostra-se como uma alternativa geradora de hipóteses barata, que permite a economia de muito esforço e tempo se o trabalho tiver como foco um alvo específico e biologicamente relevante. Essa estratégia pode ser direcionada e testada em modelos experimentais (CUMMINGS; KOVLOCK, 2005; DOUGHERTY; PAPIN, 2020). Para permitir avaliações experimentais concomitantes é importante realizar a busca pelo modelo de interesse. Nesse sentido, os embriões de *Gallus gallus* (*G. gallus*) são relevantes, pois é um modelo vertebrado que apresenta muitas facilidades, além de ter homologia considerável com o humano, com apenas duas famílias de proteínas não presentes na estrutura genética humana, o que permite a extrapolação dos resultados (STERN, 2005).

Nesse contexto, o objetivo foi avaliar a interferência do Pb, Cd e PFOA, *in silico*, em vias essenciais do desenvolvimento embrionário de *G. gallus*, integrando a informação químico-genética na regulação gênica, através da busca de dados toxicogenômicos, análise de redes e enriquecimento funcional. Essa estrutura gerada pode ser valiosa para a avaliação de risco e compreensão mecanicista dos efeitos desses contaminantes no desenvolvimento, além de direcionar futuras análises experimentais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DE DADOS CTD E FERRAMENTAS WEB

Foi realizada uma busca no *Comparative Toxicogenomics Database* (CTD <http://ctdbase.org>) por dados públicos de genes cuja expressão é afetada pela exposição ao Pb, Cd e PFOA, disponíveis em julho de 2022 (revisão 16872). Como o CTD é atualizado mensalmente com novos conteúdos, as contagens aqui descritas podem mudar ao longo do tempo. O módulo *VennViewer* (CTD) foi utilizado para avaliar a associação de genes e comparação de *data sets* para os compostos químicos Pb, Cd e PFOA, de maneira isolada e em conjunto. Todas as interações resultantes da busca nesse banco de dados foram curadas manualmente 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 Pb, Cd e PFOA na espécie *Gallus gallus* foi utilizada para as análises de rede de interação e enriquecimento funcional.

2.2 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 aplicativo *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) (DAVIS *et al.*, 2013). 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*”.

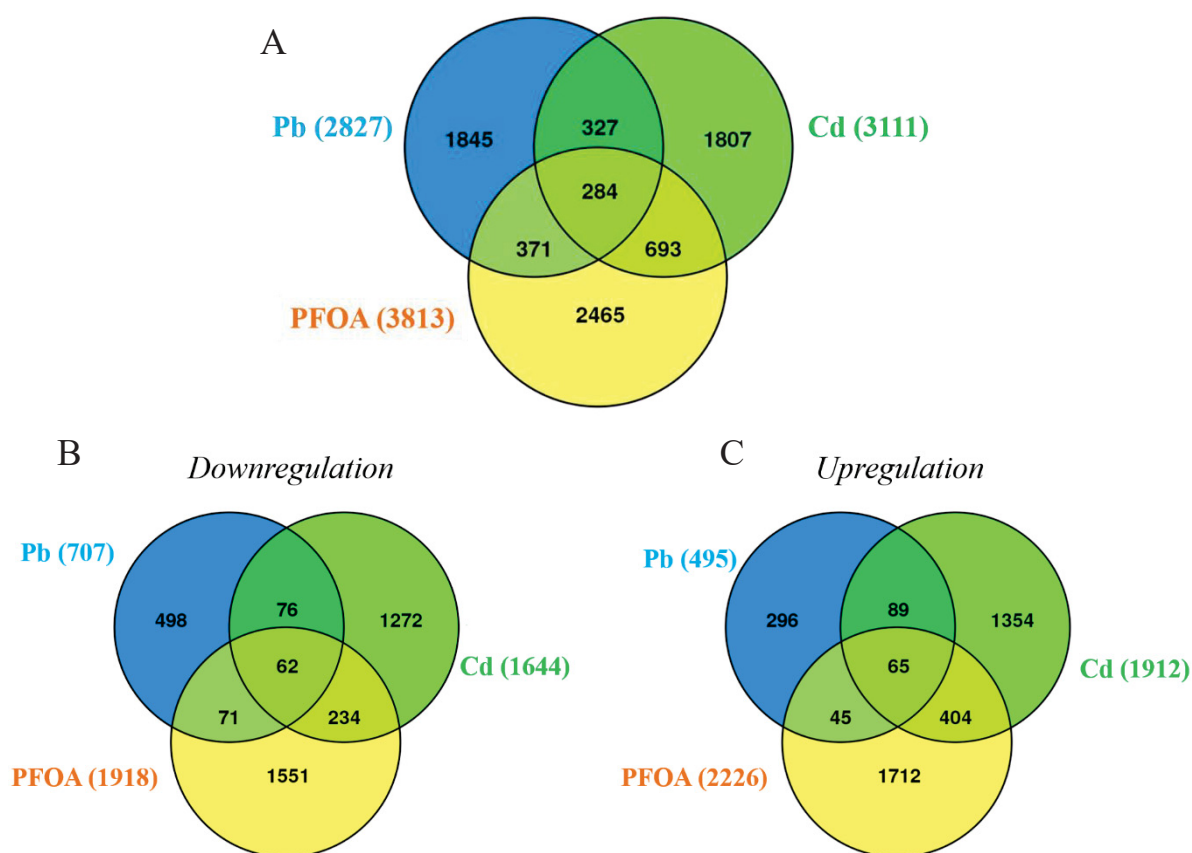
3 RESULTADOS

3.1 ELUCIDAÇÃO SISTEMÁTICA DO MECANISMO DO Pb, Cd E PFOA ISOLADOS E EM MISTURA

A partir da busca realizada no CTD para a espécie *Gallus gallus*, um total de 9751 genes foram influenciados pelos contaminantes, sendo que o Pb, Cd e PFOA interferiram em 2827, 3111 e 3813 genes, respectivamente. Com o emprego da ferramenta *VennViewer*, foi gerado um diagrama indicando genes que são alterados pela interação entre os contaminantes (FIGURA 3A). Posteriormente, os genes foram separados em duas categorias, os que sofreriam regulação negativa (*downregulation*) (4269 genes) ou regulação positiva (*upregulation*) (4633 genes) devido a influência dos contaminantes, sendo que genes ortólogos de *G. gallus* repetidos e genes sem ortólogo foram excluídos. Sendo assim, foi possível observar que a regulação negativa ocorreu em 707, 1644 e 1918 genes, para o Pb, Cd e PFOA, respectivamente. A

intersecção entre os contaminantes indica os genes que têm sua expressão negativamente afetada pela mistura Pb+Cd (76 genes), Pb+PFOA (71genes), Cd+PFOA (234 genes) e Pb+Cd+PFOA (62 genes) (FIGURA 3B). Já a regulação positiva foi identificada em 495, 1912 e 2226, frente a exposição de Pb, Cd e PFOA, respectivamente. As misturas de Pb+Cd mostraram afetar positivamente 89 genes, Pb+PFOA 45, Cd+PFOA 404 e Pb+Cd+PFOA 65 genes (FIGURA 3C).

FIGURA 3 – TOTAL DE GENES CURADOS MANUALMENTE E QUE SOFREM *DOWNREGULATION* OU *UPREGULATION*



Comparative Toxicogenomics Database, 2022 Aug 22.

Diagrama representando o total de genes curados que sofreram qualquer alteração ou *downregulation* ou *upregulation* relacionados à exposição ao Pb, Cd e PFOA e suas misturas, obtido com a ferramenta *VennViewer* do CTD. A: Total de genes; B: *downregulation*; C: *upregulation*. Os complementos dos conjuntos representam o número de genes afetados exclusivamente pelos compostos isolados. A intersecção dos conjuntos indica o número de genes afetados pela combinação dos contaminantes. FONTE: A autora (2022).

3.2 ENRIQUECIMENTO DE FUNÇÕES E VIAS

No *software* *Cytoescape* foi avaliada a interação entre os genes afetados e feita a construção das redes de acordo com as vias que fazem parte das proteínas codificadoras pelos

genes, agrupando-as. Foram identificadas 95 vias reguladas negativamente pelo Pb, 97 pelo Cd, 121 pelo PFOA, pelas misturas Pb+Cd e Pb+PFOA 16 vias cada, 23 vias pelo Cd+PFOA e 11 vias pelo Pb+Cd+PFOA (APÊNDICE 1). A regulação positiva foi induzida em 51 vias pelo Pb, 106 pelo Cd, 117 pelo PFOA, 17 pela mistura Pb+Cd, 2 pelo Pb+PFOA, 81 pelo Cd+PFOA e 28 pelo Pb+Cd+PFOA (APÊNDICE 2). Em seguida, foram filtrados genes descritos na literatura como tendo importante papel para os mecanismos de desenvolvimento (APÊNDICE 3).

Nesse contexto, foram identificadas 18 principais vias afetadas pelos contaminantes estudados e suas misturas. São elas 1) via de sinalização das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK); 2) oncogene B eritroblástico (ErbB); 3) p53; 4) Notch; 5) fator de crescimento transformador beta (TGF- β); 6) interação com receptores de matriz extracelular; 7) moléculas de adesão celular; 8) junções aderentes; 9) junções de oclusão; 10) junções GAP; 11) regulação do citoesqueleto de actina; 12) via de sinalização Wnt; 13) ciclo celular; 14) apoptose; 15) via de sinalização por cálcio; 16) via de sinalização PPAR; 17) metabolismo do retinol; e 18) via de sinalização FoxO. Essas vias envolvidas com os genes diferentemente expressos têm importante papel durante o desenvolvimento embrionário e foram significativamente afetadas pelos contaminantes isolados e em mistura.

As vias encontradas neste trabalho podem ser reunidas em quatro grupos, de acordo com sua função no desenvolvimento. No grupo 1 estão vias relacionadas a proliferação, diferenciação, sobrevivência, migração, motilidade e morte celular e incluem as vias de sinalização MAPK (TALLEY *et al.*, 2021), ErbB, p53 (KRUSE; GU, 2009), Notch (ZHANG *et al.*, 2023), TGF- β (ZHOU *et al.*, 2019), receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) (ROTMAN *et al.*, 2006), FoxO (SPREITZER *et al.*, 2022), ciclo celular e apoptose. No grupo 2 se encontram as interações com receptores de matriz extracelular, moléculas de adesão celular; junções aderentes, de oclusão, junções GAP e regulação do citoesqueleto de actina, que propiciam a arquitetura e montagem da matriz extracelular (MEC) em espaços intersticiais embrionários e podem fornecer a integridade estrutural necessária para promover e, em alguns casos, restringir os movimentos celulares, limitar a difusão de morfógenos e fornecer sítios de ligação para várias famílias de receptores de superfície. A sinalização Wnt, responsável pela polarização do embrião, no estabelecimento dos eixos do corpo, divisão celular e especificação do destino e função em um subconjunto de células (HABIB; ACEBRÓN, 2022), e o metabolismo do retinol, que tem papel na formação de moléculas ativas implicadas no controle molecular da morfogênese e organogênese embrionárias, bem como na padronização dos eixos corporais (MARCEAU *et al.*, 2007) estão incluídas no grupo 3. Já a via

de sinalização por cálcio, que é indiretamente responsável por uma grande variedade de processos do desenvolvimento, incluindo especificação de destino celular e morfogênese (SLUSARSKI; PELEFRI, 2007) faz parte do grupo 4 (QUADRO 1).

QUADRO 1 - PRINCIPAIS VIAS AFETADAS PELO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA, SEPARADAS DE ACORDO COM SUA ATUAÇÃO

	Atuação	Vias
Grupo 1	- Proliferação - Diferenciação - Sobrevivência - Migração - Motilidade - Morte celular	Apoptose Ciclo Celular ErbB FoxO MAPK Notch p53 PPAR TGF-B
Grupo 2	- Arquitetura e montagem da matriz extracelular (MEC) em espaços intersticiais embrionários - Integridade estrutural - movimentos celulares, difusão de morfógenos - Sítios de ligação	Interações com Receptores de Matriz Junções Aderentes Junções de Oclusão Junções GAP Moléculas de Adesão Celular Regulação do Citoesqueleto de Actina
Grupo 3	- Polarização do embrião e padrão de eixos corporais. - Divisão celular e especificação do destino e função celular - Controle molecular da morfogênese e organogênese embrionárias	Metabolismo do Retinol Sinalização Wnt
Grupo 4	- Desenvolvimento - especificação de destino celular e morfogênese	Sinalização por Cálcio

FONTE: A autora (2022).

Nessas vias foram observados diversos genes que podem promover, concomitantemente, a desregulação positiva e negativa em muitas vias. Esses genes são resumidos no quadro 2.

QUADRO 2 – NÚMERO DE GENES DESREGULADOS POSITIVAMENTE E NEGATIVAMENTE POR VIA BIOLÓGICA APÓS A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA

		Pb		Cd		PFOA		Pb+Cd		Pb+ PFOA	Cd + PFOA		Pb+Cd+PFOA
1	Apoptose	16	18	41	59	28	38	8	7	8	10	19	9
	Ciclo Celular	12	7	29	26	29	28				11	12	
	ErbB	15	15	29	32	24	16	7		7	7	7	6
	FoxO	16	18	48	60	33	31	5	6	5	11	17	8
	MAPK	28	25	63	87	45	59					23	11
	Notch	5	5		6	8							
	p53	8	7	24	25	17	20				7	20	10
	PPAR			15	25	39	48				11	18	
2	TGF-β		8	20	24	13	13					6	
	Interações com Receptores de Matriz	5		14	25	13	10					10	
	Junções Aderentes	10	7	16	24	19	9					4	
	Junções de Oclusão	13	8	27	31	23	18						
	Junções GAP	14	13	17	19	16	16		6			5	5
	Moléculas de Adesão Celular	7		14	11	24	5				5		
	Regulação do Citoesqueleto de Actina	11	9	26	41	26	26					11	
	Metabolismo do Retinol			9	7	16	14			3			

3	Sinalização Wnt	12	13	25	27	20	15		6								
4	Sinalização por Cálcio	18	14	26	25	19	23										

FONTE: A autora (2022).

4 DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento embrionário, diversas vias são imprescindíveis para a formação adequada de inúmeras estruturas, porém, estas podem estar sob os efeitos negativos de contaminantes (SHARMA *et al.*, 2019). Trabalhos anteriores (THOMPSON *et al.*, 2005; KMECICK *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021; YADAV *et al.*, 2022) já mostraram que o Pb, Cd e PFOA interferem no correto desenvolvimento embrionário, porém que mecanismos moleculares estariam envolvidos ainda não estavam completamente elucidados. Assim, empregando a pesquisa na base CTD, foram identificadas 18 vias principais alteradas pelos contaminantes, sendo que não foram identificados padrões regulatórios específicos, ou seja, para uma mesma via foi possível detectar tanto a regulação positiva quanto negativa. Este resultado pode estar relacionado com a concentração e/ou tempo de exposição aos contaminantes (WILSON, 1959; CONLEY; RICHARDS, 2008). Além disso, essas vias podem atuar de maneira independente ou interligadas, sendo que sequências de eventos alterados de desenvolvimento podem resultar em diversas anomalias, pois muitos dos membros dessas vias atuam como proteínas sinalizadoras, desempenhando um papel vital na fisiologia celular (WU; HILL, 2009; KUWABARA *et al.*, 2018; IROEGBU *et al.*, 2021).

Curiosamente, os contaminantes podem promover, concomitantemente, a desregulação positiva e negativa em muitas vias. Resumidamente, nota-se que as misturas afetaram menor número de vias quando comparados aos contaminantes isolados. O grupo Pb+PFOA interferiu aumentando apenas a expressão do metabolismo do retinol. Todos os outros grupos podem interferir aumentando ou reduzindo a expressão de oncogene B eritroblástico (ErbB), proteínas forkhead box O-class (FoxO), junções GAP e apoptose. O grupo Cd+PFOA afetou um maior número de vias e pode promover, também, aumento ou redução na via p53 e ciclo celular. Outro achado interessante foi que apesar do Pb, Cd e PFOA afetarem isoladamente a via de sinalização por cálcio, a mistura dos três contaminantes não demonstrou alterar essa via.

Os tecidos craniofaciais dos vertebrados são derivados de todas as camadas germinativas (ectoderma, mesoderma, endoderma, juntamente com células da crista neural) (SZABO-ROGERS *et al.*, 2010) e padrões de expressão gênica e vias de sinalização controlam os processos morfogênicos que moldam os tecidos embrionários (JOHN; RAUZI, 2021). Contaminantes ambientais, como Pb, Cd e PFOA, interferem nesses processos, pois podem promover a ativação da via das MAPKs e induzir estresse oxidativo (LEONARD; BOWER; SHI, 2004; LEONARD; HARRIS; SHI, 2004; YIN *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2020; KHAN *et al.*,

2021), além de regular várias moléculas sinalizadoras, como fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fator de crescimento semelhante a insulina (IGFs), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), sonic hedgehog (Shh), entre outras (YIN *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2019). Concomitantemente, a sinalização ErbB regula a proliferação celular, migração, diferenciação, apoptose e motilidade celular mediando a via PI3K/Akt, a via JAK/STAT e a via de sinalização MAPK (HOLBRO; HYNES, 2004). A via de sinalização Notch é uma via evolutivamente conservada, contribui para o desenvolvimento embrionário, determinação do destino celular e manutenção da homeostase tecidual (KUWABARA *et al.*, 2018). Além disso, está envolvida principalmente na regulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação de células-tronco neurais durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (ZHANG *et al.*, 2023). O Pb (KASTEN-JOLLY; LAWRENCE, 2017), Cd (XIE *et al.*, 2020) e PFOA (POTESER *et al.*, 2020) também promovem a ativação da via Notch e levam ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS).

A superfamília de fatores de crescimento contém mais de 30 membros, incluindo TGF- β s, elementos-chave na embriogênese inicial e organogênese (WU; HILL, 2009). Os ligantes e seus componentes da via são extremamente bem conservados durante a evolução e regulam diversas funções celulares, como crescimento, adesão, migração, apoptose e diferenciação (ZHOU *et al.*, 2019). Os membros da família TGF- β são bem conhecidos por sua capacidade de induzir a transição epitelial-mesenquimal (EMT) (YANG; WEINBERG, 2008). A sinalização da superfamília TGF- β continua a funcionar em organismos totalmente desenvolvidos, onde é necessária para a homeostase do tecido (TEN DIJKE; ARTHUR, 2007). No desenvolvimento, os metais pesados e o PFOA foram associados a alterações na via de sinalização de TGF- β (STONE *et al.*, 2021). O estudo de Kasten-Jolly e colaboradores (2012) mostrou que a exposição ao Pb promoveu o aumento de TGF- β no cérebro como um todo, podendo alterar a proliferação e diferenciação de células-tronco neurais durante a isquemia. Já foi descrito que a exposição crônica ao Cd pode provocar a migração, invasão celular e, potencialmente, induzir a EMT (HU *et al.*, 2021), e que o PFOA regulou negativamente a via de sinalização TGF- β (LI *et al.*, 2020).

A apoptose pode estar associada a citotoxicidade induzida por Pb (DOU; ZHANG, 2011), Cd (XU *et al.*, 2022) e PFOA (ZHOU *et al.*, 2022) no desenvolvimento embrionário. A regulação desse mecanismo envolve a proteína p53, que altera o equilíbrio na família Bcl-2 através de mecanismos dependentes e independentes de transcrição. A proteína p53 tem sido associada à indução de uma variedade de resultados celulares, incluindo parada do ciclo celular, senescência e apoptose, em resposta a uma variedade de insultos celulares, incluindo danos ao

DNA e estresse oncogênico (KRUSE; GU, 2009). Embora um papel sugerido para p53 no desenvolvimento possa ser obtido a partir de uma variedade de estudos, demonstrações definitivas de contribuições de p53 para o desenvolvimento de vertebrados não são claras (BARTHELERY; MANFREDI, 2016).

A matriz extracelular (MEC) é multifuncional e pode influenciar vários processos bioquímicos e mecânicos simultaneamente. A arquitetura e montagem da MEC em espaços intersticiais embrionários podem fornecer a integridade estrutural necessária para promover e, em alguns casos, restringir os movimentos celulares, limitar a difusão de morfógenos e fornecer sítios de ligação para várias famílias de receptores de superfície celular para a MEC, incluindo integrinas, lamininas, sindecans, entre outras (ROZARIO; DESIMONE, 2010). A formação de contatos mecânicos robustos com outras células e com o ambiente extracelular permite a transmissão da força do citoesqueleto para impulsionar mudanças na forma do tecido. As duas principais estruturas adesivas envolvidas na propagação da força da actomiosina são as junções aderentes, que medeiam a adesão célula-célula e as adesões focais responsáveis pela adesão célula-matriz (CLARKE; MARTIN, 2021). Os principais receptores de adesão na junção aderente são as caderinas, compostas por repetições de domínio de adesão extracelular dependente de cálcio que interagem, homotipicamente, com caderinas em células adjacentes (SHAPIRO; WEIS, 2009). Nas adesões focais se destacam as integrinas, formadas por heterodímeros contendo uma subunidade α e uma β , que interagem com uma variedade de componentes da MEC através de seus grandes domínios extracelulares (HYNES, 2002; HUMPHRIES; BYRON; HUMPHRIES, 2006). Além de servir como centros de sinalização importantes para a sobrevivência e polaridade celular, as adesões célula-MEC também são cruciais para a morfogênese (BRYAN *et al.*, 2020; MOLÈ *et al.*, 2020). De acordo com Grunwald (2018), as moléculas de adesão celular são alvos de compostos tóxicos para o desenvolvimento. Alguns trabalhos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que cátions bivalentes, como Pb e Cd, podem interromper a função da caderina, provavelmente deslocando Ca^{2+} de seus locais de ligação para moléculas de caderina (MOUSA, 2004; GIULIANI *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2011). Além disso, os efeitos indiretos dos metais pesados podem ser mediados por várias vias, incluindo sinalização intracelular, perturbações no citoesqueleto de actina e regulação da expressão gênica (GRUNWALD, 2018). Também foi descrita a capacidade do Cd de promover ruptura de junções de oclusão através da via $\text{TGF}\beta 3/\text{p38}$ MAP quinase (THOMPSON; BANNIGAN, 2008). O PFOA, por sua vez, pode inibir a comunicação intercelular das junções comunicantes (ZHOU *et al.*, 2020), bem como alterar as junções de oclusão (WU *et al.*, 2022).

Durante o desenvolvimento embrionário, a especificação do destino celular e os movimentos morfogênicos são rigidamente controlados por uma rede de cascatas de sinalização. A sinalização Wnt tem sido predominantemente associada a decisões sobre o destino da célula, controle e coordenação da polaridade celular e a formação adequada de lamelipódios e filopódios em vários movimentos morfogênicos, incluindo a gastrulação e migração da CN (KÖHLER; SCHAMBONY; WEDLICH, 2007). Essa via também desempenha múltiplos papéis na regulação da EMT das células da CN, como por exemplo, induzindo a supressão de E-caderina e caderina 6B (PIACENTINO; BRONNER, 2020), sendo que modificações da sinalização Wnt pode prejudicar a diferenciação do epitélio e do mesênquima (ZHANG *et al.*, 2022). A alteração de genes relacionados a via Wnt pode ser promovida por metais pesados (COBBINA *et al.*, 2015), pois foi relatado a redução na expressão desses genes após o tratamento com Cd em peixes e camundongos (HANSON *et al.*, 2010; SONNACK *et al.*, 2017). De modo oposto, em embriões de *G. gallus*, o PFOA aumentou a expressão de Wnt (LV *et al.*, 2019).

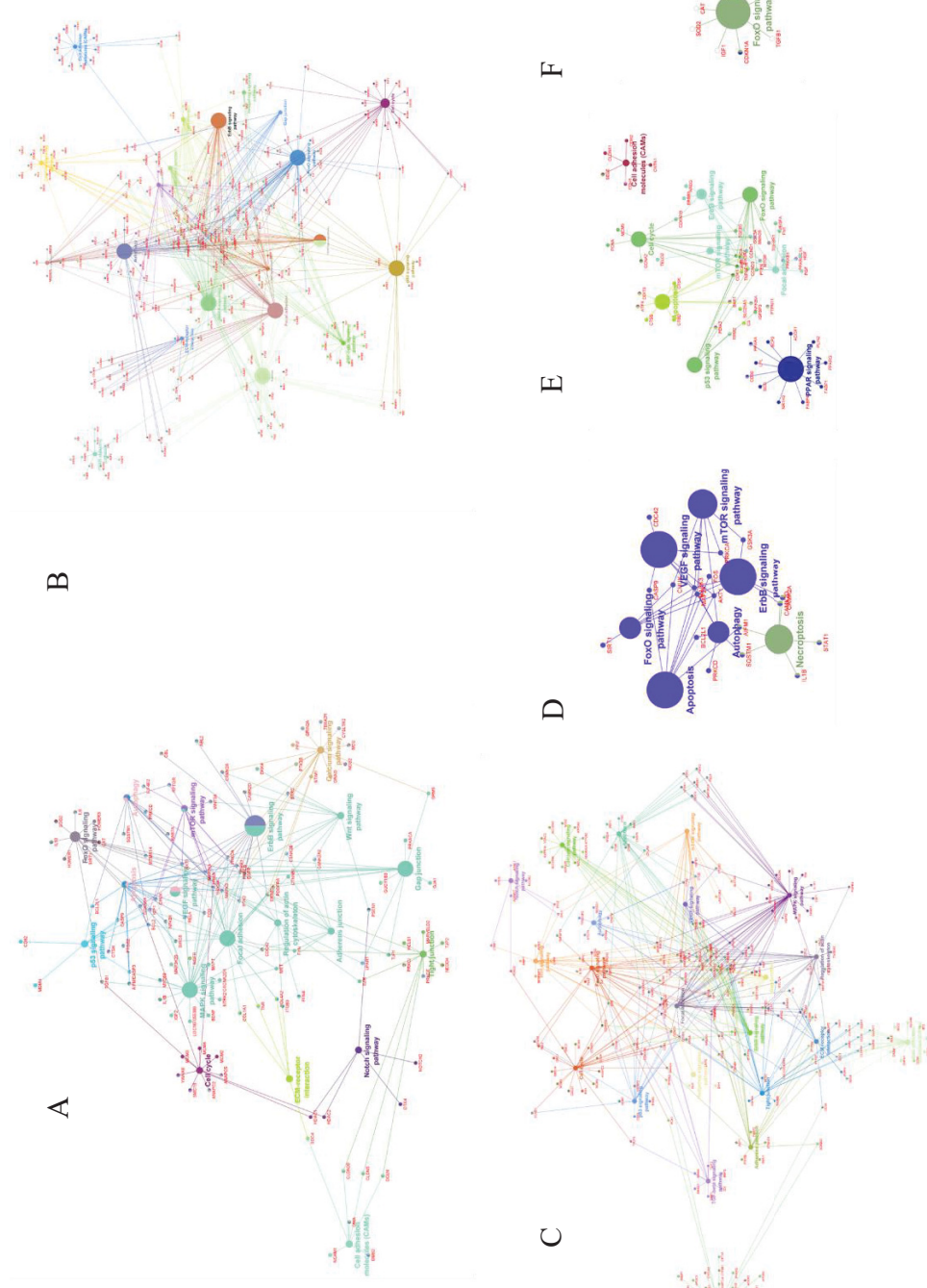
A sinalização célula-célula regulada pelo ácido retinóico, Wnt/ β -catenina e FGF é importante durante a extensão do eixo corporal e interações entre essas vias têm sido sugeridas (ZHAO; DUESTER, 2009). O ácido retinóico é essencial para diversas funções fisiológicas, incluindo visão, resposta imune, mineralização óssea, reprodução, diferenciação celular e crescimento (DEFO; SPEAR; COUTURE, 2014). A interrupção da expressão de genes envolvidos na homeostase dos retinóides promovida por metais pesados leva ao acúmulo de ésteres de retinol, o que pode ocorrer devido a regulação positiva do fotorreceptor associado ao retinol desidrogenase tipo 2, gene envolvido no metabolismo dos retinóides (DEFO; SPEAR; COUTURE, 2014). Já os compostos perfluorados são conhecidos por ativar e regular a expressão de receptores nucleares, como PPAR α e PPAR γ , que, uma vez ativados, formam heterodímeros com receptores de ácido retinóico (LIU *et al.*, 2015).

Uma grande variedade de processos de desenvolvimento, desde a fertilização até a formação e funcionalidade dos órgãos, é dependente da liberação dinâmica de íons Ca^{2+} , incluindo muitas das vias celulares anteriormente descritas. Os íons Ca^{2+} não são metabolizados, em vez disso atuam como um segundo mensageiro na célula, formando gradientes iônicos dentro ou fora da célula, que são originados pela mobilização do Ca^{2+} pelas membranas celulares. O aumento desses íons resulta em eventos de sinalização locais ou globais que implementam respostas celulares, ativando proteínas quinases, fosfatases, transportadores de íons e proteínas do citoesqueleto, entre outras (SLUSARSKI; PELEFRI, 2007). O Pb reduz níveis de Ca^{2+} intracelular (AYYALASOMAYAJULA *et al.*, 2020) e o Cd também interage

com o cálcio (MATOVIC *et al.*, 2015). Devido à similaridade entre os metais e o íon, pode haver remodelação do citoesqueleto, morte celular e interferência em moléculas de adesão (CHOONG; LIU; TEMPLETON, 2014). Em contrapartida, o PFOA pode aumentar os níveis de Ca^{2+} (LIU, X. *et al.*, 2011), porém não há dados que indiquem como esse aumento ocorre.

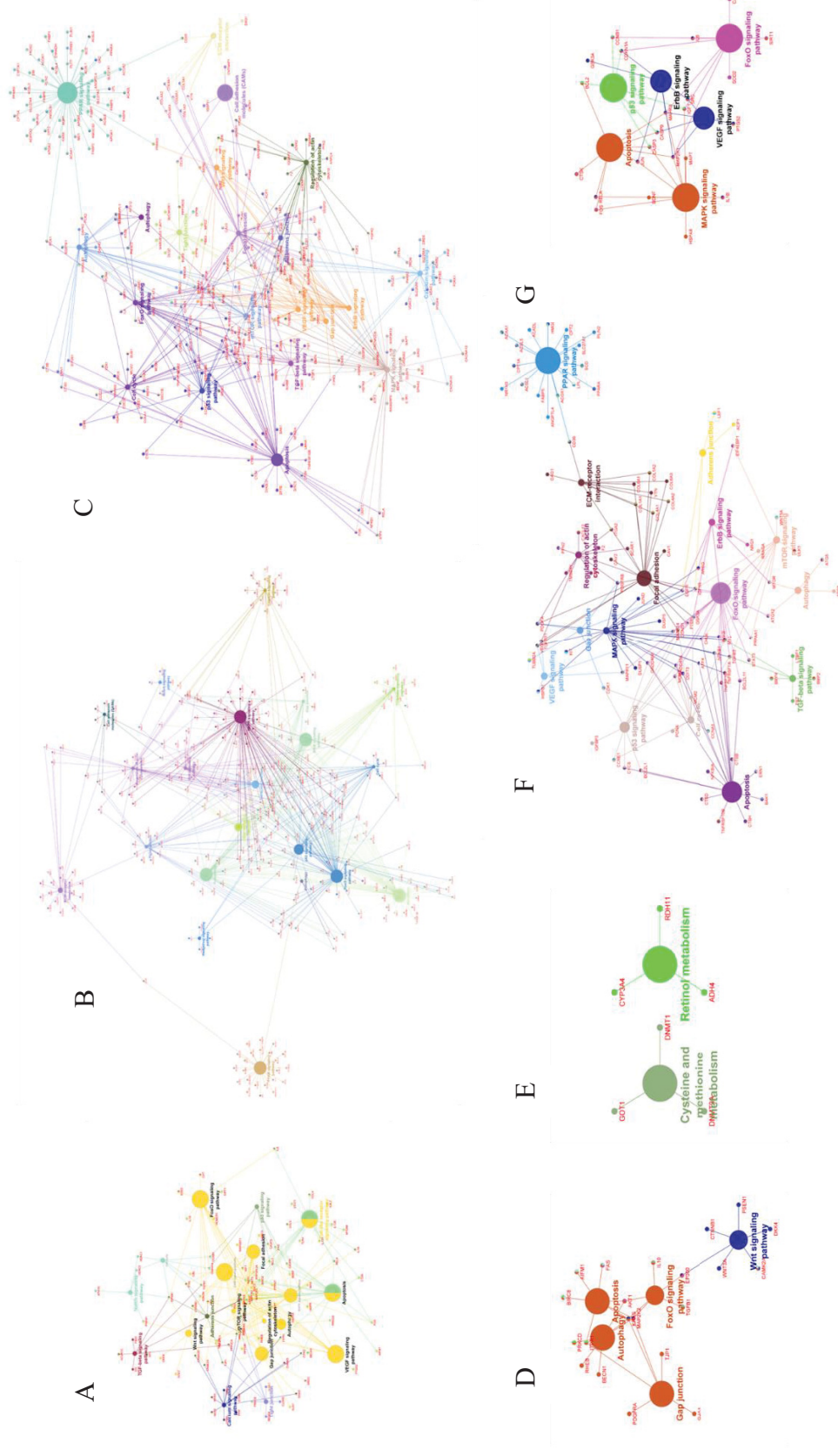
Muitas das alterações descritas não estão restritas ao desenvolvimento embrionário, porém, considerando que os eventos de desenvolvimento devem ocorrer de maneira precisa, esses mecanismos tornam-se imprescindíveis. As diferentes vias indicadas na análise de rede culminam em processos essenciais, como migração, proliferação, apoptose e adesão celular.

APÊNDICE 1 - VIAS NEGATIVAMENTE REGULADAS PELO Pb, Cd e PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA



Rede construída no *software Cytoscape* com o aplicativo *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. A: Pb. B: Cd. C: PFOA. D: Pb+PFOA. E: Cd+PFOA. F: Pb+Cd+PFOA. As imagens podem ser observadas com detalhes através do link: https://www.canva.com/design/DAFMUL3GKwQ/ry4evSyIK6ZYECoFvZ4A/view?utm_content=DAFMUL3GKwQ&utm_campaign=designshare&utm_medium=link2&utm_source=sharebutton. FONTE: A autora (2022).

APÊNDICE 2 - VIAS POSITIVAMENTE REGULADAS PELO Pb, Cd e PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA



Rede construída no *software Cytoscape* com o aplicativo *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. A: Pb. B: Cd. C: PFOA. D: Pb+Cd. E: Pb+PFOA. F: Cd+PFOA. G: Pb+Cd+PFOA. As imagens podem ser observadas com detalhes através do link: https://www.canva.com/design/DAFMUL3GKwQ/ry4evSyIiKE6ZYECofvZ4A/view?utm_content=DAFMUL3GKwQ&utm_campaign=designshare&utm_medium=link2&utm_source=sharebutton. FONTE: A autora (2022).

APÊNDICE 3 - VIAS ENVOLVIDAS COM OS GENES DIFERENTEMENTE EXPRESSOS APÓS A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd, PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA

Vias e Funções	Composto	Número de genes	Genes negativamente afetados	Número de genes	Genes positivamente afetados
Via de sinalização MAPK	Pb	28	AKT1, BDNF, CACNA2D1, CASP3, CDC42, CHUK, EGFR, ERBB2, FOS, HRAS, IGF1, IGF2, IL1B, LOC107055388, MAP2K1, MAP3K20, MAPK3, MAPT, MET, MYD88, NFKB1, NGFR, NTRK2, PDGFRA, PRKCA, PRKCB, RELA, TGFB1	25	AKT1, AKT3, BDNF, CASP3, FAS, FOS, HSPA8, IGF1, IL1B, JUN, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK3, MAPT, MAX, MYD88, NFATC1, NGFR, NLK, PDGFRA, PRKCA, PTPN7, RELA, TGFB1
	Cd	63	AKT1, ANGPT2, AREG, ATF4, BDNF, BRAF, CACNA1E, CASP3, CDC42, CHUK, DDIT3, DUSP1, EFNA5, EGFR, ERBB2, ERBB3, FGF1, FGF2, FGF23, FGF2, FLNA, FLT1, FOS, HGF, IGF1, IGF1R, IGF2, IL1B, JUN, KIT, KRAS, LOC107050551, MAP2K1, MAP3K7, MAPK13, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MAPK9, MAPKAPK3, MAPT, MYC, NFKB1, NFKB2, NGF, NR4A1, PDGFA, PDGFRA, PDGFRB, PGF, PLA2G4A, PPP3R1, PRKCA, RAF1, RAPGEF2, RELA, TGFA, TGFB1, TGFB3, TGFBRI, TNFRSF1A, VEGFA	87	AKT1, AREG, ATF4, BDNF, CACNA1E, CASP3, CDC42, CHUK, DDIT3, DUSP1, DUSP10, DUSP4, DUSP5, DUSP6, EFNA5, EGF, EGFR, FAS, FASLG, FGF1, FGF23, FGF4, FGF6, FGFRI, FLNA, FLNB, FLT1, FOS, GADD45A, GADD45B, GADD45G, GRB2, HSPA2, HSPA8, HSPB1, IGF1, IGF1R, IGF2, IKBKB, IL1B, IL1RAP, INSR, JUN, JUND, KIT, KRAS, LOC107050551, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K14, MAP3K6, MAP3K7, MAPK11, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MAPK9, MAPT, MET, MYC, NFKB1, NGF, NR4A1, NTRK2, PAK1, PAK2, PDGFA, PDGFRA, PDGFRB, PGF, PLA2G4A, RAC1, RAC2, RAC3, RAF1, RASGRP1, RELA, STMN1, TGFB1, TGFB3, TGFBRI, TGFBRI2, TNFRSF1A, TRADD, TRAF2, TRAF6, VEGFA
	PFOA	45	AREG, ATF4, CACNA1D, CASP3, CSF1, DDIT3, DUSP6, EGF, EGFR, ERBB2, ERBB3, FGF4, GADD45G, GRB2, HGF, HRAS, HSPA2, HSPB1, IGF1, IGF2, IL1R1, KDR, KITLG, LOC107055388, MAP3K1, MAP3K14, MECOM, NFATC1, NFATC3, NFKB1, NR4A1, NTRK1, PDGFRA, PGF, PRKACB, PRKCB, RELA, STMN1, TEK, TGFB1, TGFB3, TGFBRI, TGFBRI2, TRAF2, VEGFA	59	AREG, ATF2, ATF4, BDNF, CACNA1H, CACNA1S, CACNA2D4, CACNB2, CASP3, CHUK, CRK, DDIT3, DUSP1, DUSP5, EGFR, EPHA2, FGF2, FGF2, FOS, GADD45A, GADD45B, HGF, HSPA2, HSPA8, HSPB1, IGF1, IGF1R, IKBKB, IL1B, IL1R1, JUN, JUND, KIT, KITLG, MAP2K1, MAP3K13, MAP3K3, MAPK11, MAPK14, MAPK3, MAPKAPK3, MAPT, MKNK2, MYC, NFKB1, PDGFA, PDGFD, PDGFRB, PRKCA, PRKCB, RASGRF1, RASGRP3, RELA, TGFB2, TGFB3, TNFRSF1A, VEGFA, VEGFC, VEGFD
	Cd+PFOA			23	AREG, ATF4, CHUK, DDIT3, DUSP1, DUSP5, EGFR, GADD45A, GADD45B, HSPB1, IGF1R, IKBKB, JUND, KIT, MAPK11, MAPK14, MYC, NFKB1, PDGFA, PDGFRB, TGFB3, TNFRSF1A, VEGFA
	Pb+Cd+PFOA			11	BDNF, CASP3, FOS, HSPA8, IGF1, IL1B, JUN, MAP2K1, MAPK3, MAPT, RELA
Via de sinalização ErbB	Pb	15	ABL2, AKT1, CAMK2A, CAMK2D, CBL, CDKN1A, EGFR, ERBB2, GSK3A, HRAS, MAP2K1, MAPK3, PRKCA, PRKCB, PTK2	15	AKT1, AKT3, CAMK2A, CAMK2D, CBL, CDKN1A, GSK3A, JUN, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK3, PRKCA, SHC2, SRC

Via de sinalização p53	Cd	29	AKT1, AREG, BRAF, BTC, CAMK2A, CAMK2D, CDKN1A, CDKN1B, EGFR, EIF4EBP1, ERBB2, ERBB3, GSK3A, JUN, KRAS, LOC107050551, MAP2K1, MAPK3, MAPK8, MAPK9, MTOR, MYC, PIK3CA, PIK3R1, PRKCA, RAF1, RPS6KB1, SRC, TGFA	32	ABL2, AKT1, AREG, CAMK2A, CAMK2G, CDKN1A, CDKN1B, EGFR, EIF4EBP1, GRB2, GSK3A, HBEGF, JUN, KRAS, LOC107050551, MAP2K1, MAP2K2, MAPK3, MAPK8, MAPK9, MTOR, MYC, NRG1, PAK1, PAK2, PAK3, PIK3CA, RAF1, RPS6KB1, SHC1, SRC
	PFOA	24	AREG, CBLB, CDKN1A, CDKN1B, EGF, EGFR, ERBB2, ERBB3, GRB2, GSK3A, HRAS, MTOR, NRG1, PIK3CA, PIK3R1, PRKCB, STAT5A	16	AREG, CDKN1A, CRK, EGFR, EIF4EBP1, GSK3A, JUN, MAP2K1, MAPK3, MTOR, MYC, NRG1, PRKCA, PRKCB, SHC4, SRC
	Pb+Cd	7	AKT1, CAMK2A, CAMK2D, GSK3A, MAP2K1, MAPK3, PRKCA		
	Pb+PFOA	7	AKT1, CAMK2A, CAMK2D, GSK3A, MAP2K1, MAPK3, PRKCA		
	Cd+PFOA	7	AREG, CDKN1B, ERBB3, GSK3A, MTOR, PIK3CA, PIK3R1	7	AREG, EGFR, EIF4EBP1, GSK3A, MTOR, MYC, NRG1
Via de sinalização Notch	Pb+Cd+PFOA			6	CDKN1A, GSK3A, JUN, MAP2K1, MAPK3, SRC
	Pb	8	BCL2, BCL2L1, CASP3, CASP9, CD82, CDKN1A, IGF1, MDM4	7	BCL2, CASP3, CASP9, CCNB1, CDKN1A, FAS, IGF1
	Cd	24	AIFM2, BCL2, BCL2L1, BID, CASP3, CASP8, CASP9, CCNB1, CCND1, CCND3, CCNE2, CDK1, CDKN1A, CHEK1, CYCS, GTSE1, IGF1, IGFBP3, MDM2, PMAIP1, PTEN, RRM2, SESN3, THBS1	25	BCL2, BCL2L1, BID, CASP3, CASP8, CASP9, CCNB1, CCND1, CCND3, CCNE1, CCNE2, CDK1, CDKN1A, CYCS, FAS, GADD45A, GADD45B, GADD45G, IGF1, IGFBP3, MDM2, PMAIP1, PTEN, SESN2, THBS1
	PFOA	17	ATM, BCL2, CASP3, CCNB1, CCND1, CCND3, CCNE1, CCNG2, CD82, CDK1, CDKN1A, DDB2, GADD45G, IGF1, IGFBP3, PTEN, RRM2	20	BCL2, BCL2L1, CASP3, CASP9, CCNB1, CCND1, CCNE1, CCNG1, CDK1, CDK6, CDKN1A, CYCS, GADD45A, GADD45B, IGF1, IGFBP3, MDM2, PTEN, RRM2, SERPINB5
	Cd+PFOA	7	CCNB1, CCND1, CCND3, CDK1, IGFBP3, PTEN, RRM2	20	BCL2, BCL2L1, CASP3, CASP9, CCNB1, CCND1, CCNE1, CCNG1, CDK1, CDK6, CDKN1A, CYCS, GADD45A, GADD45B, IGF1, IGFBP3, MDM2, PTEN, RRM2, SERPINB5
	Pb+Cd+PFOA			10	BCL2L1, CCND1, CCNE1, CDK1, CYCS, GADD45A, GADD45B, IGFBP3, MDM2, PTEN
	Pb	5	DTX4, HDAC1, HDAC2, NOTCH2, PSEN1	5	APH1A, EP300, HDAC1, HDAC2, PSEN1
	Cd			6	DLL1, EP300, HES4, HES5, NCOR2, PSEN1

PFOA	8	ADAM17, CTBP1, DTX3L, DVL1, DVL2, HDAC2, MAMLI1, NCOR2		
Pb	8	ACVR1C, EP300, FBN1, ID2, MAPK3, PPP2CA, SP1, TGFB1		
Via de sinalização TGF- β	20	BMP2, BMP4, BMP6, FBN1, FST, GREM2, INHBB, LTBP1, MAPK3, MYC, PITX2, ROCK1, RPS6KB1, SMAD3, SMAD9, SP1, TGFB1, TGFB3, TGFBRI1, THBS1	24	BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, CDKN2B, EP300, FBN1, FST, GREM2, INHBB, INHBB, LTBP1, MAPK3, MYC, RPS6KB1, SMAD2Z, SMAD3, SP1, TGFB1, TGFB3, TGFBRI1, TGFBRI2, TGIF1, THBS1
	13	BMP2, BMP7, CDKN2B, ID3, INHBA, SMAD1, SMAD3, TFDP3, TGFB1, TGFB3, TGFBRI1, TGFBRI2, TGIF2	13	BMP2, BMP4, FST, ID1, INHBE, LTBP1, MAPK3, MYC, RGMA, RGM, SMAD6, TGFB2, TGFB3
Cd+PFOA	6			BMP2, BMP4, FST, LTBP1, MYC, TGFB3
Pb	5	COL1A1, COL4A2, ITGB3, SDC4, TNF		
Interação com receptor de matriz extracelular	14	CD36, CD47, COL1A2, COL4A1, COL4A2, COL6A1, COL6A2, COL6A3, FN1, IBSP, LAMA1, SPP1, THBS1, THBS2	25	CD36, CD44, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL4A1, COL4A2, COL6A1, COL6A2, COL6A3, DAG1, FN1, GP1BB, IBSP, ITGA2, ITGA3, ITGA6, ITGB1, ITGB4, LAMB3, SPP1, THBS1, THBS2, VTN, VWF
PFOA	13	AGRN, CD36, DAG1, FN1, ITGA1, ITGA6, ITGB8, LAMA5, LAMB2, LOC107049666, SDC1, SDC4, VTN	10	CD36, COL1A1, COL1A2, COL4A1, COL4A2, COL6A1, COL6A3, DAG1, ITGA2, VTN
Cd+PFOA			10	CD36, COL1A1, COL1A2, COL4A1, COL4A2, COL6A1, COL6A3, DAG1, ITGA2, VTN
Pb	7	CLDN20, CLDN5, DMA, DMB2, NCAM1, OCLN, SDC4		
Cd	14	CADM3, CDH1, CDH2, CLDN11, CNTN1, NCAM1, NLGN4Y, OCLN, PECAM1, PTPRC, SELE, VCAM1, VCAN, VTCN1	11	ALCAM, CD274, CDH1, CDH2, ITGA6, ITGB1, NCAM1, NECTIN3, OCLN, VCAM1, VTCN1

	PFOA	24	ALCAM, BF2, CADM1, CD80, CDH1, CDH2, CLDN1, CLDN11, CLDN14, CLDN15, CLDN8, CNTN1, GLG1, ITGA6, ITGB8, JAM3, LOC107049666, OCLN, PTPRF, PTPRM, SDC1, SDC2, SDC4, SELE	5	CNTN1, CNTNAP1, IGSF11, OCLN, PTPRF
	Cd+PFOA	5	CDH1, CDH2, CLDN11, CNTN1, SELE		
Juncões aderentes	Pb	10	CDC42, CSNK2A2, CSNK2B, CTNNB1, EGFR, ERBB2, FYN, MAPK3, MET, TJPI	7	CTNNB1, EP300, FYN, MAPK3, NLK, SRC, TJPI
	Cd	16	CDC42, CDH1, CTNNB1, EGFR, ERBB2, IGF1R, LEF1, MAP3K7, MAPK3, SMAD3, SNAI1, SRC, TCF7, TCF7L1, TGFBRI, TJPI	24	ACPI, CDC42, CDH1, CTNNB1, EGFR, EP300, FGFR1, IGF1R, INSR, LEF1, MAP3K7, MAPK3, MET, NECTIN3, RAC1, RAC2, RAC3, SMAD3, SNAI1, SRC, TCF7, TGFBRI, TGFBRI2, TJPI
	PFOA	19	ACPI, ACTB, ACTRT2, BAIAP2, CDH1, CTNNB1, CTNND1, EGFR, ERBB2, FARP2, PTPRB, PTPRF, PTPRM, SMAD3, SNAI1, SORBS1, TGFBRI, TGFBRI2, TJPI	9	ACPI, ACTB, EGFR, IGF1R, LEF1, MAPK3, PTPRF, SRC, VCL
	Cd+PFOA			4	ACPI, EGFR, IGF1R, LEF1
	Pb	13	CDC42, CLDN20, CLDN5, ERBB2, EZR, HCLS1, MARVELD2, NEDD4, OCLN, PRKCE, PRKCI, TJPI, TJP2	8	CLDN5, JUN, LLGL1, NEDD4, PPP2CA, PRKCE, SRC, TJPI
Juncões de oclusão	Cd	27	ACTR2, CCND1, CD1B, CDC42, CFTR, CLDN11, ERBB2, JUN, LOC107050551, MAPK8, MAPK9, MYH10, MYL2, OCLN, PCNA, PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAG3, RAPGEF2, ROCK1, ROCK2, SCRIB, SRC, STK11, TJPI	31	ACTR3, AMOTL2, ARHGAP17, CCND1, CDC42, EZR, HSPA4, ITGB1, JUN, LOC107050551, MAGI1, MAPK8, MAPK9, MYH9, MYL12A, OCLN, PCNA, PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAG1, PRKAG2, PRKAG3, PRKCE, PRKCZ, RAC1, SRC, STK11, TJPI, VASP
	PFOA	23	ACTB, ACTRT2, CACNA1D, CCND1, CLDN1, CLDN11, CLDN14, CLDN15, CLDN8, ERBB2, HSPA4, JAM3, MAP3K1, MPDZ, MYL12A, MYL9, OCLN, PCNA, PRKAB1, PRKACB, RAB8B, TJPI, TUBA4A	18	ACTB, BVES, CCND1, CFTR, CTTN, DLG2, EZR, JUN, MARVELD3, MPDZ, OCLN, PCNA, PPP2R2D, PRKAA1, SLC9A3R1, SRC, TJAP1, YBX3
Juncões GAP	Pb	14	EGFR, GJA1, GRM5, GUCY1B3, HRAS, ITPR1, LPAR1, MAP2K1, MAPK3, PDGFRA, PRKACA, PRKCA, PRKCB, TJPI	13	DRD2, GJA1, GNAS, ITPR1, ITPR2, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK3, PDGFRA, PRKCA, SRC, TJPI
	Cd	17	ADRB1, CDK1, DRD1, DRD2, EGFR, GJA1, KRAS, MAP2K1, MAPK3, PDGFRA, PDGFRB, PRKACA, PRKCA, RAF1, SRC, TJPI	19	ADCY7, CDK1, EGF, EGFR, GJA1, GRB2, ITPR1, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK3, PDGFA, PDGFRA, PDGFRB, RAF1, SRC, TJPI, TUBB2A, TUBB3

Regulação do citoesqueleto de actina	PFOA	16	CDK1, EGF, EGFR, GJA1, GNAI2, GRB2, GUCY1A3, HRAS, PDGFRA, PLCB4, PRKACA, PRKACB, PRKCB, TJP1, TUBA4A, TUBB2A	16	CDK1, DRD2, EGFR, GNAI1, GNAS, ITPR3, MAP2K1, MAPK3, PDGFA, PDGFD, PDGFRB, PLCB1, PRKCA, PRKCB, SRC, TUBB2A
	Pb+Cd			6	GJA1, ITPR1, KRAS, MAP2K2, PDGFRA, TJP1
	Cd+PFOA			5	CDK1, EGFR, PDGFA, PDGFRB, TUBB2A
	Pb+Cd+PFOA	5	EGFR, GJA1, PDGFRA, PRKACA, TJP1		
Via de sinalização Wnt	Pb	11	CDC42, EGFR, EZR, HRAS, ITGB3, LPAR1, MAP2K1, MAPK3, PDGFRA, PFN4, PTK2	9	CHRM3, FN1, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK3, PDGFRA, PP1R12A, SRC
	Cd	26	ARHGAP35, ARHGEF6, ARPC4, BRAF, CDC42, CXCL12, EGFR, FGF1, FGF2, FGF23, FGFR2, FN1, GSN, KRAS, MAP2K1, MAPK3, MYL2, PDGFA, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, PIK3R1, RAF1, ROCK1, ROCK2, SRC	41	BCAR1, CDC42, CXCL12, CXCR4, EGF, EGFR, EZR, F2, FGF1, FGF23, FGF4, FGF6, FGFR1, FN1, GSN, ITGA2, ITGA3, ITGA6, ITGB1, ITGB4, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK3, MYL12A, PAK1, PAK2, PAK3, PDGFA, PDGFRA, PDGFRB, PFN2, PIK3CA, RAC1, RAC2, RAC3, RAF1, SRC, TGFB1I1, TMSB4X, TMSB4Y
	PFOA	26	ACTB, ACTRT2, BAIAP2, BCAR1, CFL2, CXCL12, EGF, EGFR, FGFR4, FN1, HRAS, ITGA1, ITGA6, ITGB8, KNG1, LOC107049666, MYL12A, MYL9, MYLK2, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PP1R12C, SLC9A1, TGFB1I1, TMSB4X	26	ACTB, ARHGAP35, ARPC4, BCAR1, CRK, CXCL12, EGFR, EZR, F2, FGF2, FGFR2, GNAI3, IQGAP2, ITGA2, LIMK2, MAP2K1, MAPK3, NCKAP1, PDGFA, PDGFD, PDGFRB, PFN2, SRC, TGFB1I1, TMSB4Y, VCL
	Cd+PFOA			11	BCAR1, CXCL12, EGFR, EZR, F2, ITGA2, PDGFA, PDGFRB, PFN2, TGFB1I1, TMSB4Y
	Pb	12	BTRC, CAMK2A, CAMK2D, CSNK2A2, CSNK2B, CTNNB1, DKK4, GSK3A, PRKCA, PRKCB, PSEN1, WNT3A	13	CAMK2A, CAMK2D, CTNNB1, DKK4, EP300, GSK3A, JUN, NFATC1, NLK, PRKCA, PSEN1, SOST, WNT3A
Ciclo Celular	Cd	25	CACYBP, CAMK2A, CAMK2D, CCND1, CCND3, CTBP1, CTNNB1, FZD2, GSK3A, JUN, LEF1, MAP3K7, MAPK8, MAPK9, MYC, PPP3CB, PPP3R1, PRKCA, ROCK2, TCF7, TCF7L1, VANGL2, WNT3A, WNT4, WNT5A	27	CAMK2A, CAMK2G, CCND1, CCND3, CTNNB1, DKK4, EP300, GSK3A, JUN, LEF1, MAP3K7, MAPK8, MAPK9, MYC, PRICKLE1, PSEN1, RAC1, RAC2, RAC3, RSPO3, SERPINF1, SFRP2, TCF7, WNT11, WNT3A, WNT5A, WNT6
	PFOA	20	AXIN2, CCND1, CCND3, CTBP1, CTNNB1, DVLL1, DVLL2, FZD9, GSK3A, IGR4, MMP7, NFATC1, NFATC3, PLCB4, PPARD, PRKACB, PRKCB, SERPINF1, WNT11, WNT3A	15	AXIN2, CACYBP, CCND1, FZD2, GSK3A, JUN, LEF1, MYC, PLCB1, PPARD, PRKCA, PRKCB, ROR2, WIF1, WNT5A
	Pb+Cd			6	CAMK2A, CTNNB1, DKK4, EP300, PSEN1, WNT3A
	Pb	12	ANAPC2, ANAPC5, CDKN1A, GSK3A, HDAC1, HDAC2, MCM2, MCM3, MCM4, SMC1B, TGFB1, YWHAB	7	CCNB1, CDKN1A, EP300, GSK3A, HDAC1, HDAC2, TGFB1
Ciclo Celular	Cd	29	BUB1, BUB1B, CCNA2, CCNB1, CCND1, CCND3, CCNE2, CDC20, CDK1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2C, CHEK1, E2F1, GSK3A, MAD2L1, MCM4, MCM5, MCM6, MDM2, MYC, PCNA, PLK1, PTTG2, SKP2, SMAD3, TGFB1, TGFB3, WEE1	26	CCNA1, CCNB1, CCND1, CCND3, CCNE1, CCNE2, CDK1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2B, EP300, GADD45A, GADD45B, GADD45G, GSK3A, MCM2, MDM2, MYC, PCNA, PTTG2, SMAD2Z, SMAD3, TGFB1, TGFB3, YWHAZ, ZBTB17

Apoptose	PFOA	29	ANAPC2, ATM, CCNA2, CCNB1, CCND1, CCND3, CCNE1, CCNH, CDC27, CDK1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2B, GADD45G, GSK3A, HDAC2, MCM3, MCM4, MCM5, ORC1, PCNA, RBL1, RBL2, SMAD3, SMC1A, SMC3, TFPD3, TGFB1, TGFB3	28	BUB1, CCNA1, CCNA2, CCNB1, CCND1, CCNE1, CDC20, CDC27, CDK1, CDK6, CDKN1A, FZR1, GADD45A, GADD45B, GSK3A, HDAC1, MCM2, MCM3, MCM5, MDM2, MYC, ORC6, PCNA, SMC1B, TGFB2, TGFB3, WEE1, YWHAG
	Cd+PFOA	11	CCNA2, CCNB1, CCND1, CCND3, CDK1, CDKN1B, GSK3A, MCM5, PCNA, SMAD3, TGFB3	12	CCNA1, CCND1, CCNE1, CDK1, GADD45A, GADD45B, GSK3A, MCM2, MDM2, MYC, PCNA, TGFB3
	Pb	16	AIFM1, AKT1, BCL2, BCL2L1, BIRC8, CASP3, CASP9, CHUK, CTSH, FOS, HRAS, ITPR1, MAP2K1, MAPK3, NFKB1, RELA	18	AIFM1, AKT1, AKT3, BCL2, BCL2L1, BIRC8, CASP3, CASP9, CTSH, FOS, ITPR1, ITPR2, JUN, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK3, RELA
	Cd	41	AIFM1, AKT1, ATF4, BAK1, BCL2, BCL2L1, BID, BIRC3, CASP3, CASP7, CASP8, CASP9, CHUK, CTSE, CTSD, CTSK, CTSS, CTSS, CYCS, DDIT3, EIF2AK3, ERN1, FOS, JUN, KRAS, MAP2K1, MAPK3, MAPK8, MAPK9, NFKB1, NFKBIA, NGF, PARP1, PIK3CA, PIK3R1, PMAIP1, RAF1, RELA, SPTAN1, TNFRSF1A, TNFSF10	59	AIFM1, AKT1, ATF4, BAK1, BCL2, BCL2L1, BCL2L1L1, BID, BIRC3, BIRC8, CAPN2, CASP3, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CHUK, CTSE, CTSD, CTSH, CTSK, CTSS, CYCS, DDIT3, EIF2AK3, ENDOG, ERN1, FAS, FASLG, FOS, GADD45A, GADD45B, GADD45G, IKBKB, ITPR1, JUN, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAP3K14, MAPK3, MAPK8, MAPK9, MCL1, NFKB1, NFKBIA, NGF, PARP1, PDPK1, PIK3CA, PMAIP1, RAF1, RELA, TNFRSF10B, TNFSF1A, TNFSF10, TRADD, TRAF2
	PFOA	28	ACTB, ACTR12, ATF4, ATM, BAK1, BCL2, CASP3, CASP6, CFLAR, CTSC, CTSD, CTSK, CTSS, CTSS, DDIT3, GADD45G, HRAS, MAP3K14, NFKB1, NFKBIA, NTRK1, PIK3CA, PIK3R1, PRF1, RELA, TNFSF10, TRAF2, TUBA4A	38	ACTB, ATF4, BAK1, BCL2, BCL2L1, BCL2L1L1, BIRC5, CASP2, CASP3, CASP9, CHUK, CTSE, CTSD, CTSH, CTSK, CTSS, CYCS, DDIT3, DFFB, DIABLO, EIF2S1, ERN1, FOS, GADD45A, GADD45B, HTRA2, IKBKB, ITPR3, JUN, LMNA, MAP2K1, MAPK3, NFKB1, NFKBIA, RELA, TNFRSF10B, TNFRSF1A, TNFSF10
	Pb+Cd	8	AIFM1, AKT1, BCL2L1, CASP9, CHUK, FOS, MAP2K1, MAPK3	7	AIFM1, AKT1, BIRC8, FAS, ITPR1, KRAS, MAP2K2
	Pb+PFOA	8	AIFM1, AKT1, BCL2L1, CASP9, CHUK, FOS, MAP2K1, MAPK3		
	Cd+PFOA	10	ATF4, BAK1, CTSD, CTSK, CTSS, DDIT3, NFKBIA, PIK3CA, PIK3R1, TNFSF10	19	ATF4, BAK1, BCL2L1, BCL2L1L1, CHUK, CTSE, CTSD, CTSH, CYCS, DDIT3, ERN1, GADD45A, GADD45B, IKBKB, NFKB1, NFKBIA, TNFRSF10B, TNFRSF1A, TNFSF10
	Pb+Cd+PFOA			9	BCL2, CASP3, CASP9, CTSK, FOS, JUN, MAP2K1, MAPK3, RELA
	Via de sinalização por cálcio	Pb	18	CAMK2A, CAMK2D, CYSLTR2, EGFR, ERBB2, GRIN2A, GRM5, ITPR1, MCU, NOS2, ORAI3, PDGFRA, PPIF, PRKCA, PRKCB, PTK2B, STIM1, TBXA2R	14
Cd		26	ADRB1, ATP2B1, CACNA1E, CALM1, CALML3, CAMK2A, CAMK2D, DRD1, DRD5, EGFR, ERBB2, ERBB3, HRH1, HRH2, LHCGR, NOS1, NOS2, PDE1C, PDGFRA, PDGFRB, PLN, PPP3CB, PPP3R1, PRKCA, SLC25A5, VDACC	25	ADCY7, ADORA2A, ADORA2B, ADRA1D, ATP2A3, CACNA1E, CALML3, CAMK2A, CAMK2G, CXCR4, EGFR, ITPR1, NOS1, NOS2, P2RX4, P2RX7, PDGFRA, PDGFRB, PPIF, PTAFR, SLC25A4, SPHK1, TACR1, VDACC, VDACC2

Via de sinalização PPAR	PFOA	19	ADORA2A, ADRA1B, ATP2A2, ATP2B2, AVPR1A, CACNA1D, EGFR, ERBB2, ERBB3, MCU, MYLK2, NOS2, PDGFRA, PLCB4, PRKACB, PRKCB, SLC25A5, SLC25A6, VDAC2	23	ADRB2, ATP2B2, CACNA1H, CACNA1S, DRD5, EGFR, GNAS, ITPKA, ITPR3, P2RX1, PDGFRB, PHKA2, PLCB1, PLCE1, PP1F, PRKCA, PRKCB, PTGFR, SLC25A4, SLC25A5, TRDN, VDAC1, VDAC2
	Cd	15	ACOX1, CD36, DBI, FABP1, FABP4, FABP5, GK2, LPL, NRIH3, PLIN2, PPARA, PPARG, SCD, SCP2, SLC27A1	25	ACAA1, ACADL, ACOX1, ACSL1, ACSL5, ANGPTL4, CD36, CPT1A, CPT2, DBI, FABP4, FABP5, HMGCS2, ILK, LPL, MMP1, NRIH3, PDPK1, PLIN2, PPARA, PPARG, SCD, SCP2, SLC27A1, SLC27A6
	PFOA	39	ACOX1, ACOX2, ACOX3, ACSL5, ACSL6, ADIPOQ, ANGPTL4, APOA1, APOA2, APOA5, APOC3, CD36, CPT1A, CYP27A1, CYP7A1, CYP8B1, EHHADH, FABP1, FABP2, FABP3, FABP4, FABP6, FABP7, FADS2, HMGCS1, HMGCS2, LPL, ME1, NRIH3, PCK1, PLIN2, PPARA, PPARG, SCD, SCP2, SLC27A1, SLC27A2, SORBS1	48	ACAA1, ACADL, ACOX1, ACOX2, ACSL1, ACSL3, ACSL4, ACSL5, ACSL6, ADIPOQ, ANGPTL4, APOA1, APOA2, APOA5, AQP7, CD36, CPT1A, CPT2, CYP7A1, CYP8B1, DBI, EHHADH, FABP1, FABP2, FABP3, FABP4, FABP5, FABP7, FADS2, GK2, HMGCS1, HMGCS2, LPL, ME1, NRIH3, PCK1, PCK2, PLIN1, PLIN2, PLTP, PPARA, PPARG, PPARG, RXRA, SCD, SLC27A1, SLC27A2, SLC27A4
	Cd+PFOA	11	ACOX1, CD36, FABP1, FABP4, LPL, NRIH3, PLIN2, PPARA, PPARG, SCD, SCP2	18	ACAA1, ACADL, ACOX1, ACSL1, ACSL5, ANGPTL4, CD36, CPT1A, CPT2, DBI, FABP5, HMGCS2, LPL, NRIH3, PLIN2, PPARA, SCD, SLC27A1
	Metabolismo do retinol				
Via de sinalização FoxO	Cd	9	ADH4, ADH6, ALDH1A1, ALDH1A2, CYP1A1, CYP26A1, CYP26B1, RETSAT, UGT1A1	7	ALDH1A1, ALDH1A2, BCO1, CYP1A1, RETSAT, RPE65, SDR16C5
	PFOA	16	ADH1C, ADH4, ADH6, CYP1A1, CYP1A2, CYP26B1, CYP2C18, CYP3A4, CYP3A5, LOC100859726, RDH11, RDH16, RDH5, RETSAT, UGT1A1, UGT2A1	14	ADH4, ADH6, ALDH1A1, AOX1, BCO1, CYP1A1, CYP1A2, CYP26B1, CYP3A4, DHRS4, LOC101751434, RDH11, RETSAT, UGT1A1
	Pb+PFOA			3	ADH4, CYP3A4, RDH11
Via de sinalização FoxO	Pb	16	AKT1, CAT, CDKN1A, CHUK, EGFR, HOMER1, HOMER3, HRAS, IGF1, IL10, IL6, MAP2K1, MAPK3, SIRT1, SOD2, TGFB1	18	AKT1, AKT3, CAT, CCNB1, CDKN1A, EP300, HOMER1, IGF1, IL10, IL6, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK3, NLK, SIRT1, SOD2, TGFB1

Cd	48	AKT1, ATG12, BNIP3, BRAF, CAT, CCNB1, CCND1, CDKN1A, CDKN1B, CHUK, EGFR, FOXO1, FOXO3, IGF1, IGF1R, IL10, IL6, IRS2, KLF2, KRAS, MAP2K1, MAPK13, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MAPK9, MDM2, PIK3CA, PIK3R1, PLK1, PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAG3, PTEN, RAF1, SGK2, SIRT1, SKP2, SMAD3, SOD2, STAT3, STK11, TGFB1, TGFB3, TGFBRI, TNFSF10	60	AKT1, ATG12, BCL2L11, BCL6, BNIP3, CAT, CCNB1, CCND1, CDKN1A, CDKN1B, CHUK, EGFR, IGF1, IGF1R, EP300, FASLG, FOXO1, FOXO3, GADD45A, GADD45B, GADD45G, GRB2, IGF1, IGF1R, IKBKB, IL10, IL6, IL7R, INSR, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK11, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MAPK9, MDM2, PDPK1, PIK3CA, PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAG1, PRKAG2, PRKAG3, PTEN, RAF1, SGK1, SIRT1, SMAD3, SOD2, STAT3, STK11, TGFB1, TGFB3, TGFBRI, TGFBRI2, TNFSF10
	33	ATM, CAT, CCNB1, CCND1, CCNG2, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2B, EGF, EGFR, FBXO32, G6PC, GADD45G, GRB2, HRAS, IGF1, IL10, IL6, PCK1, PIK3CA, PIK3R1, PLK2, PRKAB1, PTEN, RBL2, SGK1, SMAD3, SOD2, TGFB1, TGFB3, TGFBRI, TGFBRI2, TNFSF10	31	ATG12, BCL2L11, CAT, CCNB1, CCND1, CDKN1A, CHUK, EGFR, G6PC, GABARAPL1, GADD45A, GADD45B, IGF1, IGF1R, IKBKB, IL6, MAP2K1, MAPK11, MAPK14, MAPK3, MDM2, PCK1, PCK2, PRKAA1, PTEN, SIRT1, SOD2, STAT3, TGFB2, TGFB3, TNFSF10
Pb+Cd	5	AKT1, CHUK, MAP2K1, MAPK3, SIRT1	6	AKT1, EP300, IL10, KRAS, MAP2K2, TGFB1
Pb+PFOA	5	CCNB1, CCND1, CDKN1B, PIK3CA, PIK3R1, PRKAB1, PTEN, SMAD3, TGFB3, TGFBRI, TNFSF10		
Cd+PFOA	11	CCNB1, CCND1, CDKN1B, PIK3CA, PIK3R1, PRKAB1, PTEN, SMAD3, TGFB3, TGFBRI, TNFSF10	17	ATG12, BCL2L11, CCND1, CHUK, EGFR, GADD45A, GADD45B, IGF1R, IKBKB, MAPK11, MAPK14, MDM2, PRKAA1, PTEN, STAT3, TGFB3, TNFSF10
Pb+Cd+PFOA	8	CAT, CDKN1A, EGFR, IGF1, IL10, IL6, SOD2, TGFB1	9	CAT, CCNB1, CDKN1A, IGF1, IL6, MAP2K1, MAPK3, SIRT1, SOD2

Enriquecimento funcional. Fonte: A autora (2022).

Capítulo II

Efeitos do chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA) no desenvolvimento inicial de *Gallus gallus* e seu impacto na proliferação e apoptose da região cefálica

RESUMO

Muitos compostos podem ser encontrados naturalmente no ambiente, como metais pesados, porém as atividades antrópicas vêm agravando a sua contaminação ambiental e gerando também poluentes sintéticos. Compostos tóxicos, como chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA) mostram-se como poluentes de interesse, pois são ambientalmente persistentes e podem se bioacumular. A exposição a essas substâncias pode comprometer o desenvolvimento embrionário e induzir malformações no sistema nervoso e região cefálica, alterando estruturas e processos funcionais ao longo do desenvolvimento, dependendo da região afetada. Apesar de serem potencialmente embriotóxicos e interferirem no desenvolvimento normal, poucos estudos relatam os efeitos desses contaminantes em concentrações realistas, sobretudo em relação aos processos celulares afetados. Desse modo, o objetivo desse capítulo foi avaliar os efeitos do Pb (0,0015, 0,015 e 0,15 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), Cd (0,05, 0,5 e 5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e PFOA (0,5, 5 e 50 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$), de forma isolada e em misturas, *in ovo*, em embriões de *Gallus gallus* nos estádios 10HH e 14HH. Foram avaliados os efeitos desses compostos sobre a mortalidade embrionária, morfologia cefálica, proliferação e apoptose, nos diferentes níveis axiais dessa região. A mortalidade e as malformações cefálicas foram quantificadas durante a coleta dos embriões e os diferentes processos celulares foram avaliados com imunomarcção fluorescente. Foi observado aumento significativo na mortalidade e nas malformações na região cefálica. Nos diferentes níveis axiais da região cefálica, houve redução significativa na proliferação e apoptose, após a exposição a quase todos os contaminantes, de maneira isolada e em mistura. Na avaliação geral dos estádios 10HH e 14HH o Cd teve efeito dependente da concentração, especialmente ao nível do rombômero 1 e 7. Além disso, houve efeito de mistura, especialmente na redução da proliferação. O estágio 10HH se mostrou mais susceptível aos efeitos dos contaminantes, principalmente do prosencéfalo até o rombômero 1, independente da concentração ou mistura. Até o momento, relatos sobre o impacto desses contaminantes sobre o desenvolvimento da região cefálica, especialmente em diferentes níveis axiais, são inéditos na literatura. Alterações nessas regiões, no início do desenvolvimento, poderiam explicar muitas alterações morfológicas e funcionais observadas em outros estudos, após a exposição a esses contaminantes. Sugere-se que muitos mecanismos podem estar envolvidos nos efeitos observados, como a alteração na homeostase de cálcio, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), regulação negativa de *BCL2* e deficiência de *p53*, bloqueio da cadeia mitocondrial de transferência de elétrons e alteração do perfil de expressão gênica.

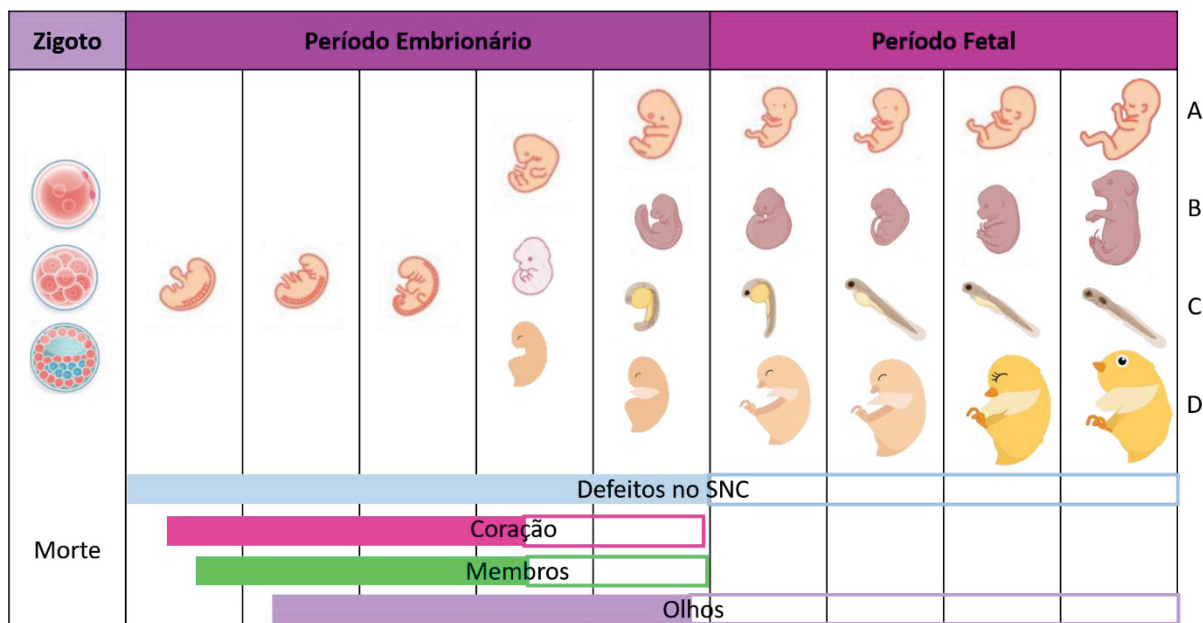
Palavras-chave: Embriotoxicidade; Contaminantes persistentes; Mistura de poluentes; Níveis axiais; Alterações celulares.

1 INTRODUÇÃO

Os embriões de galinha (*Gallus gallus*) vêm sendo utilizados para estudos de teratologia e toxicologia do desenvolvimento (KMECICK *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021; YADAV *et al.*, 2022). As similaridades morfológicas e moleculares com outros vertebrados, especialmente no período filotípico (HILL, 2021), são essenciais quando se estuda o efeito da exposição a substâncias químicas no desenvolvimento embrionário, pois permite a extrapolação dos achados para outras espécies, incluindo humanos. Além disso, os embriões são um excelente modelo para estudos embriológicos devido à facilidade de manutenção em laboratório, desenvolvimento rápido e independente do corpo da mãe (MOK *et al.*, 2015).

O desenvolvimento embrionário envolve uma cuidadosa sequência de eventos biológicos específicos, que devem ocorrer de maneira precisa (DESESSO; WILLIANS, 2018). Esses eventos iniciais são semelhantes entre os vertebrados, o que permite determinar os diferentes períodos críticos do desenvolvimento para várias espécies (HILL, 2021). Esses períodos podem ser utilizados para determinar a susceptibilidade dos indivíduos (GILBERT, 2019), especialmente para avaliar os efeitos de xenobióticos (DESESSO; WILLIANS, 2018). O período do desenvolvimento em que ocorre uma injúria é determinante para o aparecimento de anormalidades morfofuncionais (TAMM; CECCATELLI, 2017). Quando ocorre no período mais inicial, o dano pode resultar em morte embrionária, enquanto em fases posteriores pode gerar uma série de alterações nos sistemas em desenvolvimento (FIGURA 1). O sistema nervoso central (SNC) é descrito como um dos mais afetados, tanto estrutural quanto funcionalmente, especialmente porque seu desenvolvimento começa na organogênese e continua após o nascimento (DESESSO; WILLIANS, 2018; GILBERT, 2019). No entanto, é importante ressaltar que toda a região cefálica pode ser afetada e, como o seu desenvolvimento segue o eixo anteroposterior (céfalo-caudal), é possível supor alterações (SZABO-ROGERS *et al.*, 2010; MCKINNEY *et al.*, 2020). Ainda, a susceptibilidade do SNC a danos causados por xenobióticos também ocorre devido a imaturidade da barreira hematoencefálica, ao aumento dos níveis de proliferação, migração e diferenciação celular, bem como pela complexidade das interações célula-célula (WANG *et al.*, 2022).

FIGURA 1 – PERÍODOS DE SUSCEPTIBILIDADE A AÇÃO DE TERATÓGENOS EM DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS



No início do período embrionário há pouca diferença morfofuncional no desenvolvimento dos vertebrados, essas diferenças são mais acentuadas em fases posteriores. Quando a injúria ocorre em fases mais iniciais, o dano pode ser estrutural (quadro preenchido), mas em períodos posteriores, geralmente, observa-se dano funcional (quadro sem preenchimento). Em momentos críticos, como durante a formação do zigoto, muitas vezes o dano é irreversível e pode ser incompatível com a sobrevivência embrionária. Representação esquemática de *H. sapiens* (A); *M. musculus* (B); *D. rerio* (C) e *G. gallus* (D). Fonte: Adaptado de GILBERT (2019) e SLACK (2013).

Muitos contaminantes são encontrados naturalmente no ambiente, porém a contaminação por produtos químicos e metais pesados foi agravada por atividades humanas intensivas (FRAZZOLI *et al.*, 2022), que levam a grande sobrecarga de compostos tóxicos, como chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA) no meio ambiente (JANTZEN *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2017). Essa contaminação torna-se ainda mais ostensiva, pois esses compostos não são degradados por ácidos fortes, bases ou agentes oxidantes e, portanto, são persistentes (CAI *et al.*, 2020; KABAMBA; TUAKUILA, 2020). Sua presença já foi detectada em todo o mundo (RAMÍREZ-MALULE; QUIÑONES-MURILLO; MANOTAS-DUQUE, 2020). Além disso, podem bioacumular na cadeia alimentar, sendo que espécies mais altas na cadeia trófica têm níveis aumentados desses compostos em seus tecidos (HOJJATI-NAJAFABADI *et al.*, 2022).

O Pb e Cd são metais pesados, considerados como contaminantes altamente tóxicos e compartilham com o PFOA alto poder de promover neurotoxicidade (WANG; WANG *et al.*, 2019; KOTHAPALLI, 2021) pois a região cefálica é uma das mais afetadas (YAMAMOTO *et al.*, 2012; KMECICK *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021). Sugere-se que esses xenobióticos podem prejudicar uma série de processos celulares e vias de sinalização (SFAKIANIKIS *et al.*,

2015; LEE *et al.*, 2019; LIANG *et al.*, 2022; ZHOU *et al.*, 2022), gerando diferentes anormalidades morfológicas (MÜLLER *et al.*, 2012; SFAKIANIKIS *et al.*, 2015; JANTZEN *et al.*, 2016; KMECICK *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021). A proliferação celular e apoptose foram propostos como mecanismos que promovem essas alterações (JANTZEN *et al.*, 2016; DA COSTA *et al.*, 2021).

A proliferação celular e apoptose são eventos normais e contínuos no controle de populações celulares (GILBERT, 2019; VIGNES; VEGENA-PANTOULA; VERMOT, 2022). Também são cruciais para os processos de desenvolvimento normal em organismos multicelulares (GILBERT, 2019). Porém, esses mecanismos podem ser induzidos, de maneira anormal, por uma variedade de xenobióticos, resultando na anormalidade de muitas populações celulares (RANA, 2008). O Pb, Cd e PFOA, isoladamente, já foram descritos por alterar esses processos em diferentes populações celulares durante o desenvolvimento (PIEROSAN; JERNEREN; KARLSSON, 2018; LIANG *et al.*, 2022; MCCOULEY *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2022). No entanto, até o momento, não há na literatura trabalhos que abordem as possíveis alterações causadas pela mistura desses três contaminantes, especialmente no início do desenvolvimento, bem como na região cefálica em diferentes níveis axiais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), sob o certificado de número 1210, processo 23075.045.626/2018-12, aprovado em 18 de setembro de 2018.

2.1 MODELO ANIMAL E CONCENTRAÇÃO DOS CONTAMINANTES

Para a determinação das concentrações foi empregado o cálculo de extrapolação alométrica, utilizando a taxa metabólica basal para diferentes matrizes biológicas (aves não passeriformes e mamíferos placentários) conforme demonstrado no cálculo 1.

Para realizar os cálculos de extrapolação interespecies de exposição ao Pb, Cd e PFOA, foi definida a taxa metabólica basal de embriões humanos para o período entre a 3ª e 8ª semanas de desenvolvimento e, portanto, a dosagem correspondente para embriões de galinha no mesmo período filotípico (DA COSTA *et al.*, 2021).

CÁLCULO 1 - EXTRAPOLAÇÃO ALOMÉTRICAS INTERESPÉCIES

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

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

$$Dose_{TMB_{ref}} = \frac{\text{Total da dose de referência (mg)}}{TMB_{ref}}$$

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

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.

As concentrações médias dos contaminantes foram escolhidas com base em estudos anteriores do laboratório de Embriotoxicologia-UFPR (KMECICK *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021) e correspondem com a extrapolação do nível médio de Pb (ESTEBAN-VASALLO *et al.*, 2012; SAKAMOTO *et al.*, 2012; CERRILLOS *et al.*, 2019); Cd e PFOA (YU *et al.*, 2011; GARCIA-ESQUINAS *et al.*, 2013; CARIOU *et al.*, 2015) detectados na placenta humana, cordão umbilical, sangue materno e recém-nascido, simulando uma exposição pré-natal a esses contaminantes. Além disso, essas concentrações induziram alterações morfológicas e/ou celulares em embriões de *G. gallus*, como alterações morfológicas na região cefálica e falha no fechamento do tubo neural (TN) (KMECICK *et al.*, 2019) e no número e migração das células da crista neural (CN) (DA COSTA *et al.*, 2021).

Adicionalmente, foram utilizadas concentrações 10 vezes maiores e 10 vezes menores, bem como a mistura dos contaminantes na concentração média, buscando traçar um perfil dos possíveis efeitos dos contaminantes a nível celular, especialmente para avaliar se há uma relação dependente da concentração.

Foram utilizados ovos fertilizados de *G. gallus*, doados por empresa especializada, localizada na Lapa (PR). Ao chegar no laboratório os ovos foram higienizados e pesados. Em seguida, foram identificados com lápis na casca de acordo com os grupos experimentais (TABELA 1).

TABELA 1 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupos Experimentais	Ovos
Grupo Controle (C)	NaCl 0,9%
Grupo Exposto (E1)	Pb(NO ₃) ₂ [Pb]* = 0,0015 µg.ml ⁻¹
Grupo Exposto (E2)	Pb(NO ₃) ₂ [Pb]* = 0,015 µg.ml ⁻¹
Grupo Exposto (E3)	Pb(NO ₃) ₂ [Pb]* = 0,15 µg.ml ⁻¹
Grupo Exposto (E4)	CdCl ₂ [Cd]** = 0,05 µg.ml ⁻¹
Grupo Exposto (E5)	CdCl ₂ [Cd]** = 0,5 µg.ml ⁻¹
Grupo Exposto (E6)	CdCl ₂ [Cd]** = 5 µg.ml ⁻¹
Grupo Exposto (E7)	PFOA = 0,5 ng.ml ⁻¹
Grupo Exposto (E8)	PFOA = 5 ng.ml ⁻¹
Grupo Exposto (E9)	PFOA = 50 ng.ml ⁻¹
Grupo Exposto (E10)	Pb(NO ₃) ₂ [Pb]*+ CdCl ₂ [Cd]** (0,015 µg.ml ⁻¹ +0,5 µg.ml ⁻¹)
Grupo Exposto (E11)	Pb(NO ₃) ₂ [Pb]*+ PFOA (0,015 µg.ml ⁻¹ +5 ng.ml ⁻¹)
Grupo Exposto (E12)	CdCl ₂ [Cd]**+ PFOA (0,5 µg.ml ⁻¹ +5 ng.ml ⁻¹)
Grupo Exposto (E13)	Pb(NO ₃) ₂ [Pb]*+ CdCl ₂ [Cd]**+ PFOA (0,015 µg.ml ⁻¹ +0,5 µg.ml ⁻¹ + 5 ng.ml ⁻¹)

*[Pb] se refere a concentração final de Pb na solução de Pb(NO₃)₂ injetada. FONTE: DA COSTA e colaboradores (2021).

**[Cd] se refere a concentração final de Cd na solução de CdCl₂ injetada. FONTE: KMECICK e colaboradores (2019).

2.2 DESENHO EXPERIMENTAL

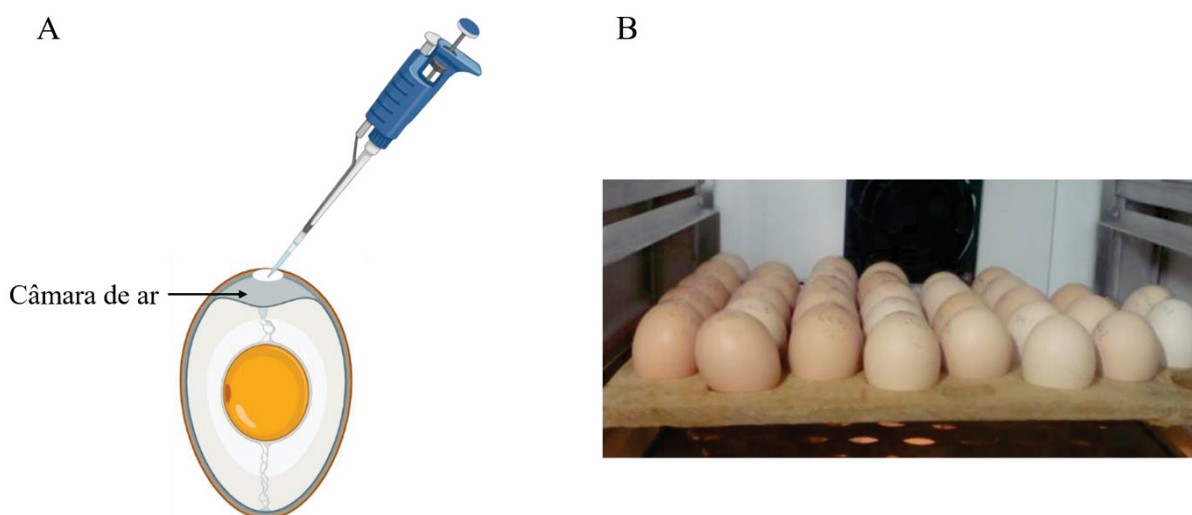
Os embriões foram divididos em 14 grupos, como observado na Tabela 1. Os ovos do grupo controle foram injetados com solução fisiológica (NaCl 0,9%), a solução veículo dos contaminantes. Não foram incubados ovos não injetados (controle fechado), pois Kmecick e colaboradores (2019) já demonstraram não haver diferença significativa, em parâmetros morfológicos, entre os controles injetados com solução fisiológica e os não injetados. As soluções dos contaminantes utilizadas para a exposição foram preparadas diluindo-se o nitrato de chumbo (Pb(NO₃)₂) (Sigma-Aldrich), o cloreto de cádmio (CdCl₂) (Alfa Aesar) e o PFOA (Sigma-Aldrich) em solução de NaCl 0,9%.

Foram realizados 14 experimentos independentes, utilizando-se embriões dos 14 grupos experimentais para cada análise executada. Cada lote de ovos recebido consistiu em um experimento independente. No total foram utilizados 968 ovos.

2.3 MÉTODO DE EXPOSIÇÃO

Os ovos foram injetados na câmara de ar do ovo (FIGURA 2A), que é o local que permite melhor dispersão dos contaminantes no embrião (YAMAMOTO *et al.*, 2012). Inicialmente, no fluxo laminar, foi feito um orifício na casca, com agulha de grande calibre (1,00 X 30 mm) e, posteriormente, foram administradas as respectivas soluções. Após a injeção, os ovos foram selados com fita adesiva, posicionados com a câmara de ar voltada para cima e incubados randomicamente em incubadora BOD (SL-224, SOLAB Científica), em temperatura controlada a 38°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$), com umidade e ventilação constantes (FIGURA 2B).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CÂMARA DE AR NO OVO E POSIÇÃO DOS OVOS NA INCUBADORADA



A: Desenho esquemático da administração das soluções na câmara de ar do ovo de *G. gallus*, FONTE: Adaptado de DAVA FOODS (2017). B: Posição dos ovos na incubadora BOD (SL-224, SOLAB Científica). FONTE: A autora (2022).

2.4 COLETA DOS EMBRIÕES

Os embriões foram incubados por 33-38 horas e 50-53 horas, aproximadamente, até atingirem os estádios 10HH e 14HH, respectivamente. Vinte minutos antes da abertura, os ovos foram colocados na posição horizontal, na incubadora, para que o embrião se posicione na parte superior do ovo, possibilitando sua visualização pela janela da casca. Como a capacidade de nocicepção ocorre somente a partir do 7º dia de incubação (ROSENBRUCH, 1997), não foi necessária a utilização de fármaco anestésico (ALEKSANDROWICZ; HERR, 2015; CONCEA, 2015) nos estádios utilizados no presente trabalho.

Após a remoção dos ovos da incubadora foram retirados 3 ml de albúmen para reduzir o volume do conteúdo interno do ovo, promovendo, assim, o descolamento da membrana interna e, conseqüentemente, a descida do embrião. Com o auxílio de tesoura cirúrgica foi realizada uma abertura na casca, de aproximadamente 2x2cm, para observação e acesso aos embriões conforme descrito por Korn e Cramer (2007). Em seguida, foram retirados e colocados em placa de Petri com salina tamponada com fosfato (PBS), sobre placa de gelo. Sob estereomicroscópio, as membranas extraembrionárias foram retiradas e o estágio do embrião determinado de acordo com os critérios estabelecidos por Hamburger e Hamilton (1951).

2.5 AVALIAÇÃO DA TAXA DE MORTALIDADE E OCORRÊNCIA DE MALFORMAÇÕES

A viabilidade dos embriões foi determinada após a abertura do ovo. Os mortos foram contabilizados para a taxa de mortalidade e descartados e os vivos coletados para as análises posteriores. Os embriões foram considerados vivos se apresentassem coloração rósea e brilhante, batimentos cardíacos e vasos sanguíneos extraembrionários íntegros. Foram considerados mortos os embriões que apresentavam: membrana vitelínica numa coloração esbranquiçada e opaca, ausência de batimentos cardíacos e vasos sanguíneos extraembrionários não íntegros; 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 coleta. Alguns embriões, tanto do grupo exposto quanto do grupo controle indistintamente, foram classificados como não tendo o desenvolvimento retomado com a incubação, o que significa que o desenvolvimento foi encerrado antes do período de incubação.

A presença ou ausência de malformações foi observada após a retirada das membranas extraembrionárias e estadiamento dos embriões, sob estereomicroscópio Discovery.V12, Zeiss. A análise morfológica foi realizada seguindo os critérios descritos por Hamburger e Hamilton (1951), observando-se principalmente os aspectos morfológicos da região cefálica, tubo neural, curvatura do corpo e vesículas ópticas e auditivas.

Nessas análises foram considerados todos os estádios embrionários que os embriões estavam no momento da coleta, pois mesmo com a incubação por tempo definido foram encontrados embriões nos estádios de 7HH até 16HH. Mesmo que todos os ovos sejam colocados na incubadora ao mesmo tempo, variações entre idade cronológica e estrutural podem ser observadas. Isso ocorre devido a fatores como diferenças sazonais na viabilidade dos embriões, no estágio de desenvolvimento quando a incubação é iniciada, no lapso de tempo

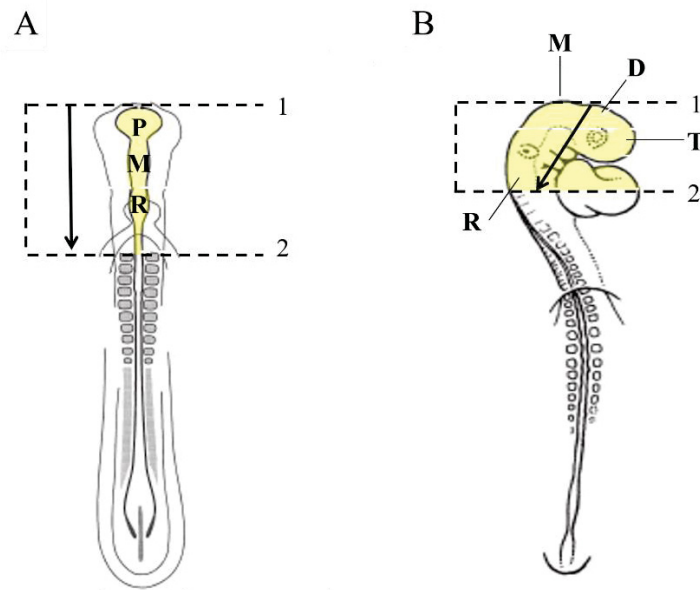
entre a postura e incubação, no tamanho individual dos ovos, na temperatura dos ovos quando colocados na incubadora e até mesmo na temperatura dentro da incubadora, bem como diferenças genéticas na taxa de desenvolvimento (HAMBURGER; HAMILTON, 1951).

2.6 DETERMINAÇÃO DA REGIÃO DE CORTE, EMBLOCAGEM E CRIOMICROTOMIA

Os embriões, nos estádios 10 e 14HH, foram fixados em paraformaldeído (PFA) 2% por 2 horas, passaram por 3 banhos de sacarose (Sigma-Aldrich) 5% e 10%, durante 2 horas e 15% *overnight*, a 4°C. Posteriormente, foram embebidos e emblocados em solução de gelatina 5% (Sigma-Aldrich) e sacarose 15% em moldes plásticos. Em seguida, os moldes foram submersos em banho de nitrogênio líquido. No criostato (Leica Biosystems), os blocos foram fixados com Tissue-Tek (Jung) e cortados transversalmente. Os cortes foram colocados sobre lâminas previamente gelatinizadas e armazenadas em freezer -20°C até o momento da imunomarcção.

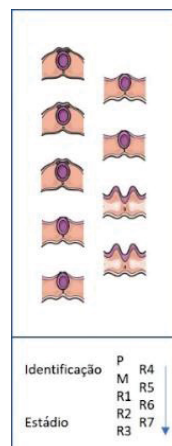
A análise morfométrica, em estereomicroscópio, da região cefálica foi realizada em trabalho anterior (DA COSTA *et al.*, 2021). Os cortes, para o estágio 10HH, foram realizados a partir do prosencéfalo (FIGURA 3A) e para o estágio 14 HH a partir do diencéfalo e indo até o nível do primeiro somito (FIGURA 3B). Foram realizados cortes de 5 µm, coletados em intervalos de 90µm e 130 µm, para os estádios 10HH e 14HH, respectivamente, de forma que cada corte representasse o prosencéfalo, mesencéfalo e cada um dos sete rombômeros (FIGURA 4). Em cada experimento, durante a microtomia, cortes alternados foram retirados e colocados sobre lâminas correspondentes aos controles (branco e secundário).

FIGURA 3 – EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH e 14HH, COM DESTAQUE PARA AS REGIÕES DE CORTE



Representação esquemática das regiões dos cortes. Embrião no estágio 10HH (A) e 14HH (B). Porção cefálica: região entre o ápice da porção cefálica (1) e o primeiro somito (2). Área amarela: Região a ser analisada nos cortes. Seta: Orientação dos cortes. P: Prosencéfalo. M: Mesencéfalo. D: Diencéfalo. T: Telencéfalo. R: Rombencéfalo. FONTE: Adaptado de BELLAIRS; OSMOND (2014).

FIGURA 4 – DISPOSIÇÃO DOS CORTES NA LÂMINA



Foram coletados cortes alternados da região cefálica dos embriões no estágio 10HH e 14HH. Os cortes foram dispostos sobre as lâminas previamente gelatinizadas, de forma que cada corte represente uma porção específica da região cefálica. P: Prosencéfalo. M: Mesencéfalo. R1-R7: Rombômeros de 1-7. FONTE: A autora (2018).

2.7 IMUNOMARCAÇÃO

Foram utilizados 3 embriões de cada estágio (10-14HH), por grupo experimental. As lâminas com cortes congelados foram retiradas do freezer (-20°C) e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente foram colocadas em câmara úmida e lavadas em PBS pH 7,4 e os cortes refixados em PFA 2%, bloqueados com soro albumina bovina (BSA) 1% e

glicina 0,1M e permeabilizados com Triton X-100 0,03%. Em seguida os cortes foram incubados, separadamente, com os anticorpos primários (Tabela 2), em câmara úmida, *overnight* a 4°C. Posteriormente foram lavados e incubados com os respectivos anticorpos secundários, diluídos em PBS pH 7,4, por 2 horas à temperatura ambiente, no escuro. Na sequência, vinte minutos antes de retirar o anticorpo secundário foi adicionado o marcador nuclear DAPI na concentração 100ng.ml⁻¹ (Santa Cruz Biotechnology). Os cortes foram lavados em PBS pH7,4 e água Mili-Q e montados com lamínula e Gel/Mount® (Biomeda).

As lâminas foram fotografadas com câmera axiocam 503 color (Zeiss) acoplada ao microscópio de epifluorescência (Olympus), modelo BX51 (CTAF-UFPR). As imagens foram analisadas utilizando-se o *software* ImageJ Fiji (National Institutes of Health - NIH). Nesta etapa foi realizada análise qualitativa e quantitativa, buscando identificar diferenças nos processos de proliferação e apoptose entre os embriões controle e expostos.

TABELA 2 – ANTICORPOS

Finalidade	Anticorpo	Fonte	Conjugado	Diluição	Marca
Proliferação celular	Anti-KI-67 (IgG)	Coelho	-	1:500	Santa Cruz Biotechnology
	Policlonal ¹				
	Anti-IgG de coelho ²	Cabra	Alexa-Fluor® 568	1:100	Sigma-Aldrich
Apoptose	Anti-c-Caspase	Camundongo	-	1:300	Sigma-Aldrich
	Policlonal (IgG) ¹				
	Anti-IgG de Camundongo ²	Coelho	Alexa-Fluor® 594	1:100	Sigma-Aldrich

1: Anticorpo primário. 2: Anticorpo secundário. FONTE: A autora (2018).

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados no *software* GraphPad Prism 9.0. A análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA), com pós-teste de Tukey para dados com distribuição normal foi realizada para comparar taxas de mortalidade e malformações entre os grupos. Os dados da imunomarcagem foram submetidos ao teste D'agostino-Pearson ou Kolmogorov-Smirnov, dependendo do número de amostra obtida. Após os testes de normalidade, foi aplicada a análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA), com pós-teste de Tukey para dados com distribuição normal. Os grupos expostos ao Pb, Cd e PFOA foram comparados entre si para identificar o efeito dependente da concentração. Os dados de cada grupo exposto foram

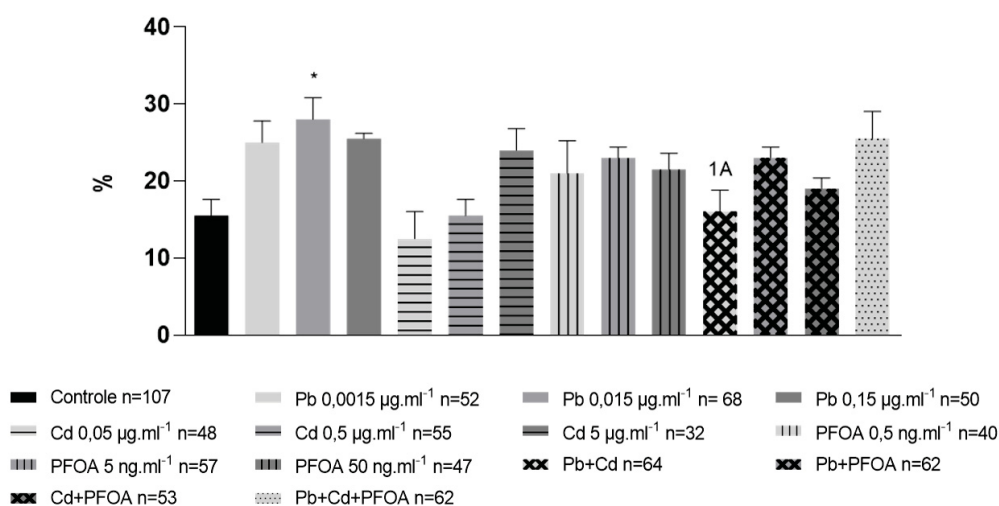
comparados com o grupo controle. Os grupos expostos às misturas foram comparados com o controle e com os grupos de exposição isolada (Pb 0,015 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Cd 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e PFOA 5 ng.ml^{-1}). Foi considerado $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 TAXA DE MORTALIDADE

Para avaliação da taxa de mortalidade foram considerados todos os estádios embrionários que os embriões estavam no momento da coleta. Os resultados estão resumidos no quadro 1. Foi observado que 15,5% dos embriões controle estavam inviáveis na coleta. Nos grupos expostos, apenas no grupo exposto à concentração média de Pb houve aumento estatisticamente significativo em comparação ao controle. Em nenhum dos grupos expostos a mistura demonstraram diferença significativa em relação ao controle. Porém, no grupo Pb+Cd o Pb na concentração de 0,015 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ mostrou interferir significativamente para a redução na mortalidade (FIGURA 5).

FIGURA 5 – TAXA DE MORTALIDADE



n= Número de ovos por grupo. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: $*p < 0,05$. O número 1 representa o grupo de Pb 0,015 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e a letra A indica significância estatística de $p < 0,05$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de uma via (*One-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2019).

QUADRO 1 –MORTALIDADE EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS*

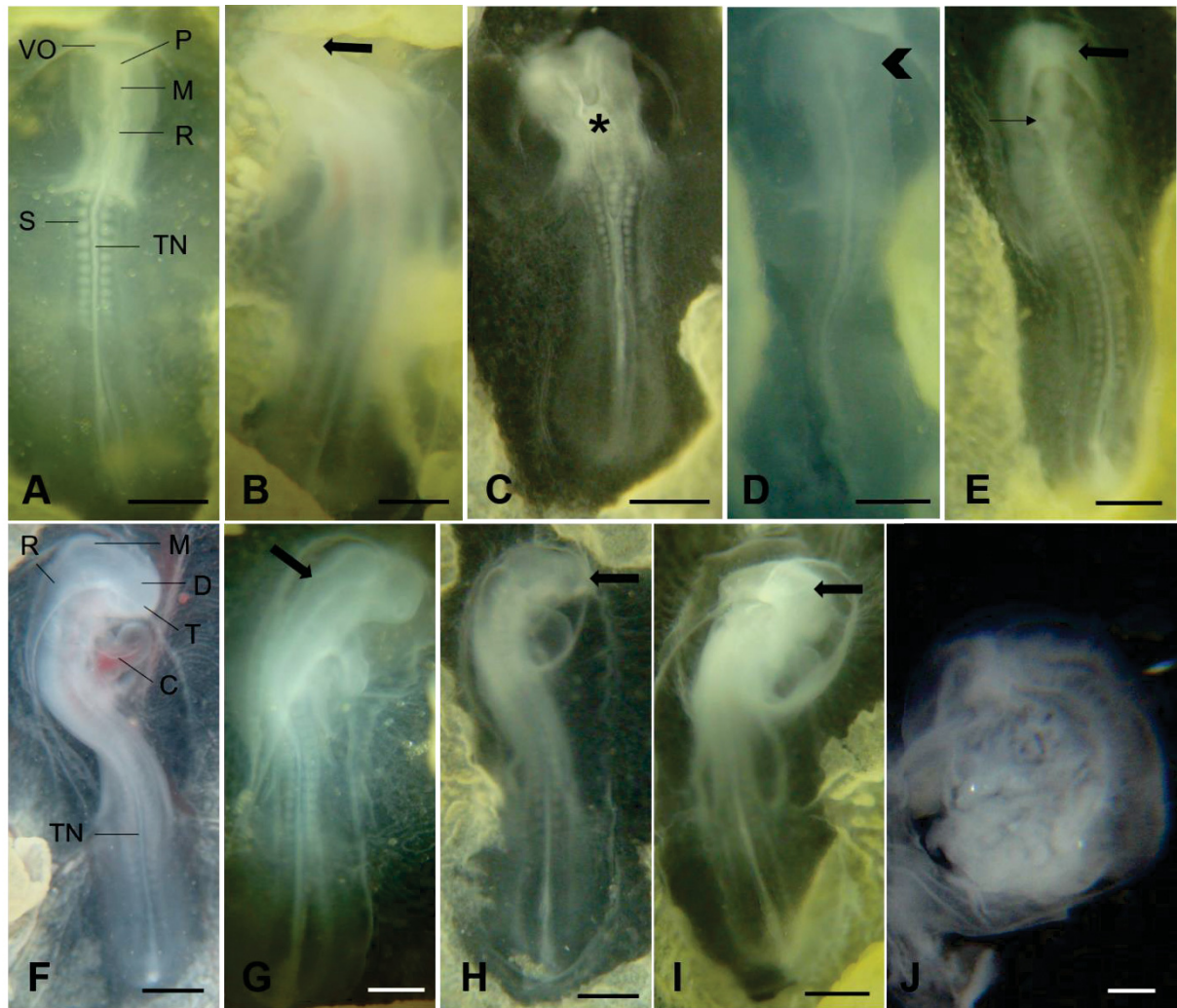
	Controle	Pb 0,0015	Pb 0,015	Pb 0,15	Cd 0,05	Cd 0,5	Cd 5	PFOA 0,5	PFOA 5	PFOA 50	Pb+Cd	Pb+PFOA	Cd+PFOA	Pb+Cd+PFOA
Mortalidade	15,5	25	28	25,5	12,5	15,5	21,5	21	23	13	16 ↓ Pb	23	19	25,5

Dados em porcentagem. Sombreado em verde: aumento significativo em relação ao controle. Seta: redução significativa em relação ao Pb 0,015µg.ml⁻¹. FONTE: A autora (2022).

3.2 MALFORMAÇÕES NA REGIÃO CEFÁLICA

Durante a coleta dos embriões foram avaliadas as características morfológicas descritas por Hamburger e Hamilton (1951), conforme o estágio de desenvolvimento encontrado no momento da coleta. De maneira geral, os embriões controle apresentaram características morfológicas dentro da normalidade para o estágio de desenvolvimento, sendo observadas vesículas encefálicas com subdivisões evidentes (FIGURA 6A e F), porém nos embriões expostos, independente do contaminante, alterações na forma dessas subdivisões foram frequentes (FIGURA 6B, E, G-I), além de aumento no tamanho da região cefálica (FIGURA 6D e I) e rombencéfalo dilatado (FIGURA 9E). Além disso, alguns embriões estavam totalmente malformados (FIGURA 6J). Um achado interessante, mesmo não sendo frequente, foi a dicefalia (duas cabeças unidas por um único corpo) observada em dois embriões expostos ao Cd na maior concentração (FIGURA 6C). Para avaliação estatística das malformações cefálicas, os embriões não foram separados por estágio embrionário.

FIGURA 6 - MALFORMAÇÕES NA REGIÃO CEFÁLICA

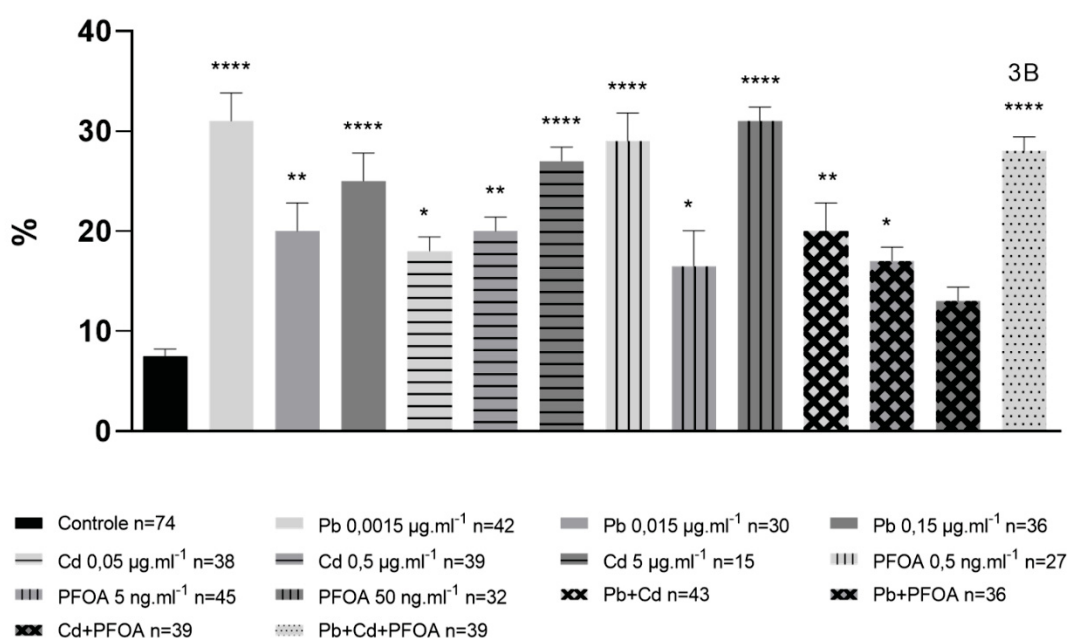


Embriões fotografados em estereomicroscópio. Embriões controle: A (10HH) e F (14HH). Embriões expostos ao Pb 0,015 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: B e G. Embriões expostos ao Cd 5 e 0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: C e H, respectivamente. Embriões expostos ao PFOA 5 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$: D e I. Embriões expostos ao Pb+Cd+PFOA: E e J. P: Prosencéfalo; M: Mesencéfalo; R: Rombencéfalo; T: Telencéfalo; D: Diencefalo; VO: Vesícula óptica; TN: Tubo neural; C: Coração; S: Somitos. Seta larga: Subdivisões incorretas das vesículas encefálicas; Asterisco: Duas cabeças em um único corpo; Estrela: Somitos disformes; Cabeça de seta: Região cefálica aumentada; Seta fina: rombencéfalo dilatado. Barras de escala: 1 mm. Fonte: A autora (2018).

Foram avaliados os embriões que apresentaram alterações na região cefálica, independente da presença ou ausência de outras alterações. Os resultados da ocorrência de malformações cefálicas estão compilados na figura 7. O grupo controle apresentou taxa de malformação cefálica de 7,5%, enquanto no grupo exposto ao Pb nas concentrações de 0,0015, 0,015 e 0,15 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, a taxa foi de 31%, 20% e 25%, respectivamente, sendo significativamente superior ao controle em todas as concentrações. No grupo exposto ao Cd nas concentrações de 0,05, 0,5 e 5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, a região cefálica estava alterada em 18%, 20% e 27% dos embriões, respectivamente, sendo que pode ser observado um aumento significativamente progressivo. Para os embriões expostos ao PFOA nas concentrações de 0,5, 5 e 50 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$, a taxa de

alterações na região cefálica foi de 37%, 16% e 31%, respectivamente, sendo que todos apresentaram aumento significativo em comparação ao controle. Nos grupos das misturas Pb+Cd, Pb+PFOA, Cd+PFOA e Pb+Cd+PFOA a região cefálica apresentou incidência de alterações de 20, 17, 13 e 28%, respectivamente, sendo que nos grupos Pb+Cd, Pb+PFOA e Pb+Cd+PFOA foi observado aumento significativo nas malformações. Além disso, apenas o PFOA isolado demonstrou relação significativa com as malformações encontradas no grupo Pb+Cd+PFOA.

FIGURA 7 - OCORRÊNCIA DE MALFORMAÇÕES NA REGIÃO CEFÁLICA



n= Número de embriões por grupo. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. O número 3 representa o grupo de PFOA 5 ng.ml⁻¹ e a letra B indica significância estatística de $p < 0.01$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de uma via (*One-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2019).

Os resultados da ocorrência de malformações na região cefálica estão resumidos no quadro 2.

QUADRO 2 – OCORRÊNCIA DE MALFORMAÇÕES NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS*

	Controle	Pb 0,0015	Pb 0,015	Pb 0,15	Cd 0,05	Cd 0,5	Cd 5	PFOA 0,5	PFOA 5	PFOA 50	Pb+Cd	Pb+PFOA	Cd+PFOA	Pb+Cd+PFOA
Malformações	7,5	31	20	25	18	20	27	37	16	31	20	17	13	↑ 28 PFOA

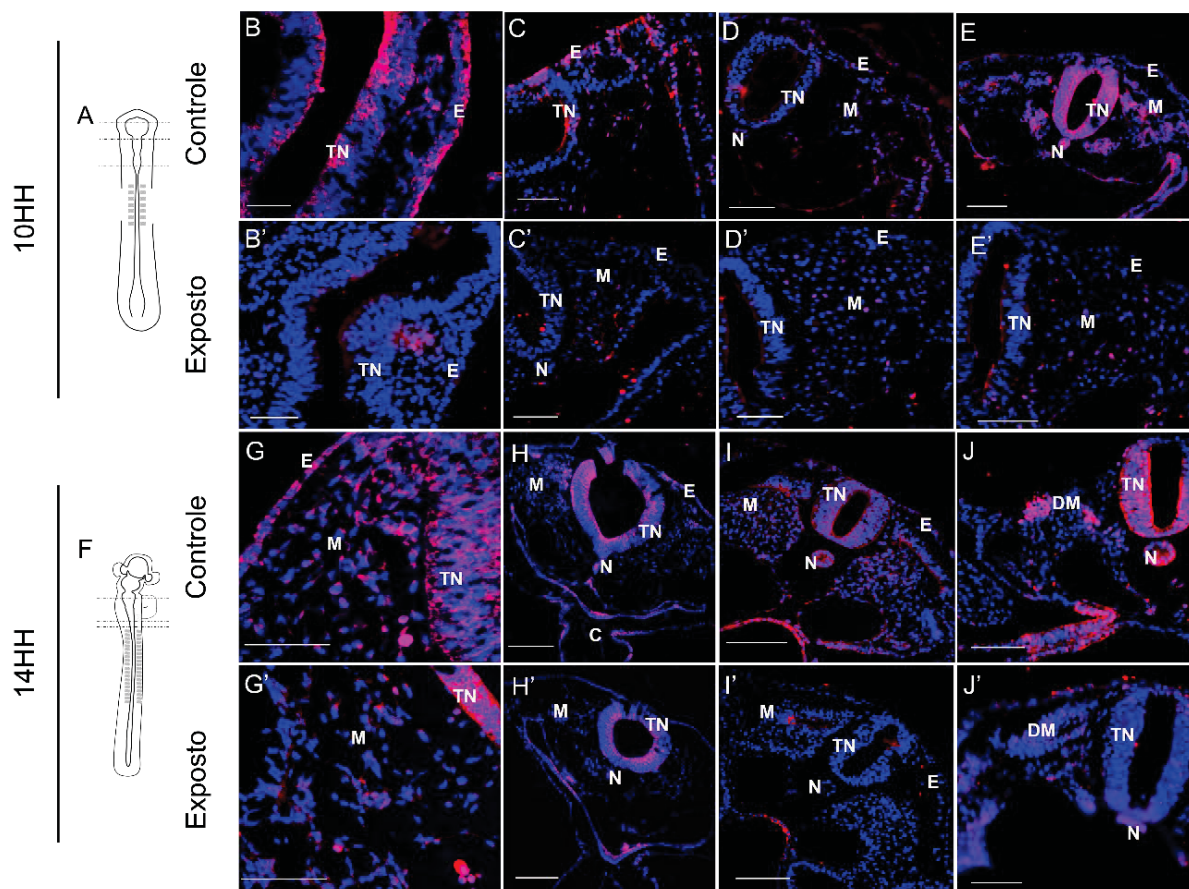
Dados em porcentagem. Sombreado em verde: aumento significativo em relação ao controle. Seta horizontal: Aumento progressivo dentro do grupo do contaminante com aumento da concentração. Seta vertical seguida do PFOA: aumento significativo em relação ao contaminante indicado. FONTE: A autora (2022).

3.3 PROLIFERAÇÃO

Para análise de proliferação celular foi utilizado o imunomarcador anti-KI67. Inicialmente a região cefálica foi avaliada como um todo e, posteriormente, os diferentes níveis axiais (prosencéfalo -10HH ou diencéfalo - 14HH, mesencéfalo e rombômeros de 1 a 7 – r1 a r7) foram examinados separadamente, para detectar possíveis relações com alterações futuras na morfogênese cefálica embrionária.

Foi observada redução aparente na proliferação nos grupos expostos quando comparados ao controle (FIGURA 8B-E e G-J), principalmente no tubo neural (TN) (FIGURA 8B', E', G' e J'). Porém, também pôde ser visualizada redução na ectoderme (FIGURA 8C' e D'), na mesoderme (FIGURA 8H' e I') e também nos dermatomiótomos (FIGURA 8J').

FIGURA 8 - PROLIFERAÇÃO NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH



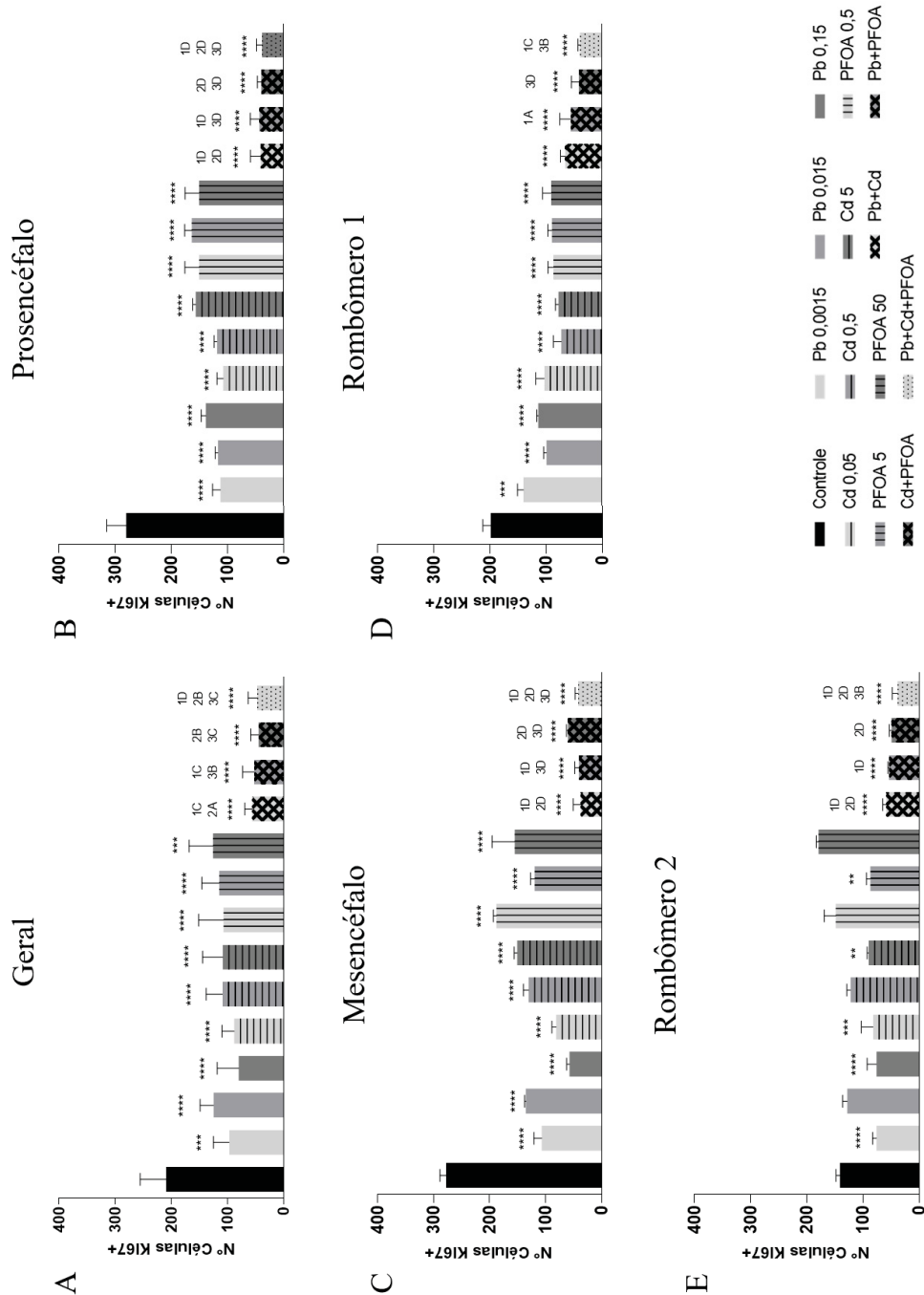
Cortes histológicos de embriões de *G. gallus*. A (10HH) e F (14HH): Desenho esquemático mostrando os diferentes níveis axiais representados nas colunas da prancha. Embriões controle: B-E e G-J. Embriões expostos ao Pb 0,015 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: B' e G'. Embriões expostos ao Cd 0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: C' e H'. Embriões expostos ao PFOA 5 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$: D' e I'. Embriões expostos ao Pb+Cd+PFOA: E' e J'. TN: Tubo neural; N: Notocorda; E: Ectoderme; M: Mesênquima; C: Coração; DM: Dermatomiótomo. Imunofluorescência com anticorpo Anti-KI67 (vermelho) e marcação nuclear com DAPI (azul). Barras de escala: 100 μm . Fonte: A autora (2021).

No estágio 10HH houve redução na proliferação em todos os grupos expostos aos contaminantes, isolados e em mistura. Os níveis de r2 e r3 foram menos afetados pelos contaminantes, seguido pelo nível de r5 e r4, respectivamente. Foi observado que o Pb, na concentração intermediária, não apresentou redução significativa entre os níveis de r2 a r5. Adicionalmente, os compostos isolados estão interferindo negativamente nas misturas que compõem, sendo que esse efeito é observado mais frequentemente para o Pb (FIGURA 9).

No estágio 14HH, a redução na proliferação é menos frequente em comparação ao estágio 10HH, porém também ocorre para todos os grupos expostos. Ao avaliar toda a região cefálica, percebe-se que com o aumento da concentração de Cd e PFOA houve redução progressiva na proliferação, no entanto isso não é identificado quando são considerados os níveis axiais individuais. O diencéfalo e mesencéfalo são mais afetados pelos contaminantes, sendo que, nessas regiões, o Pb e o PFOA na menor concentração também reduziram

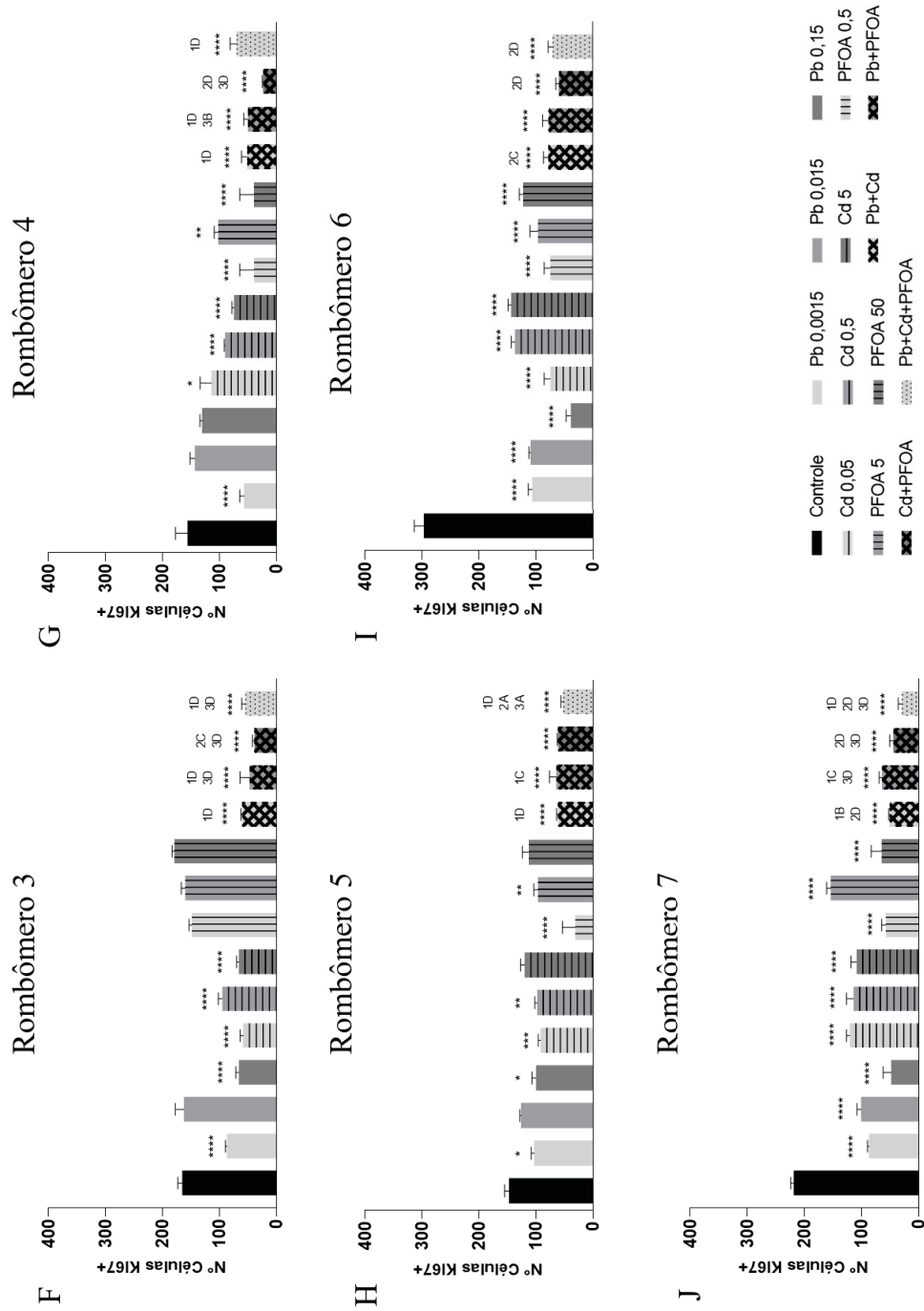
significativamente a proliferação, diferente do observado para as mesmas concentrações nos outros níveis axiais. Os grupos de mistura, também são afetados mais frequentemente nas regiões citadas, bem como nos níveis de r6 e r7. Porém no estágio 14HH, apenas o PFOA interfere significativamente na redução da proliferação nas misturas, sendo seu efeito restrito aos níveis de r1, r4 e r7 (FIGURA 10). Os resultados da proliferação celular estão resumidos no quadro 3.

FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS KI67+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10HH



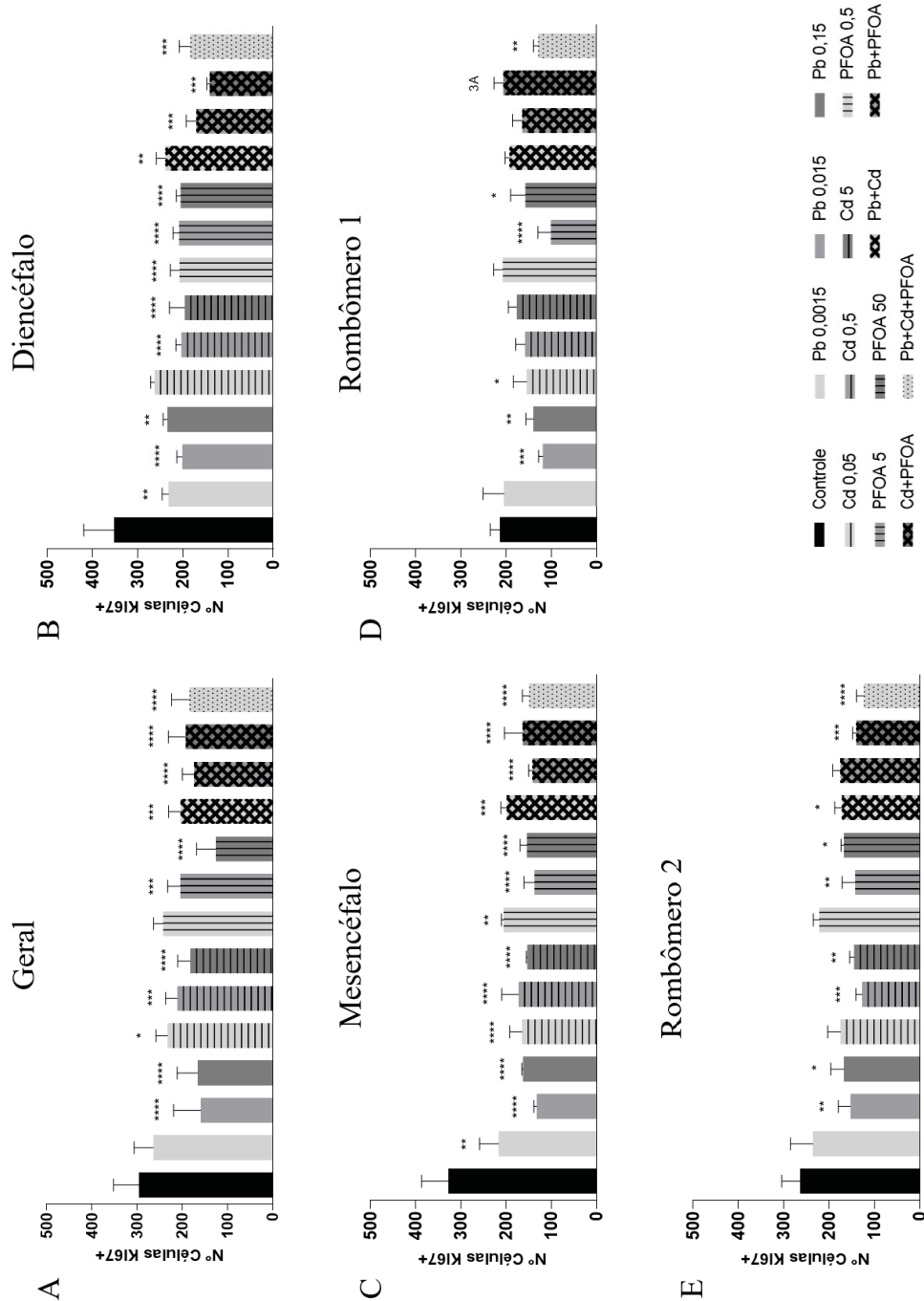
A: Proliferação celular na região cefálica geral. B: Prosencéfalo. C: Mesencéfalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001. Os números 1, 2 e 3 representam os grupos de Pb 0,015 µg.ml⁻¹, Cd 0,5 µg.ml⁻¹ e PFOA 5 ng.ml⁻¹, respectivamente e as letras A, B, C e D indicam significância estatística de p < 0.05; p < 0.01; p < 0.001; p < 0.0001, respectivamente. Valores = Média ± Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way* ANOVA) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2021).

FIGURA 9 (CONTINUAÇÃO) - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS KI67+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10HH



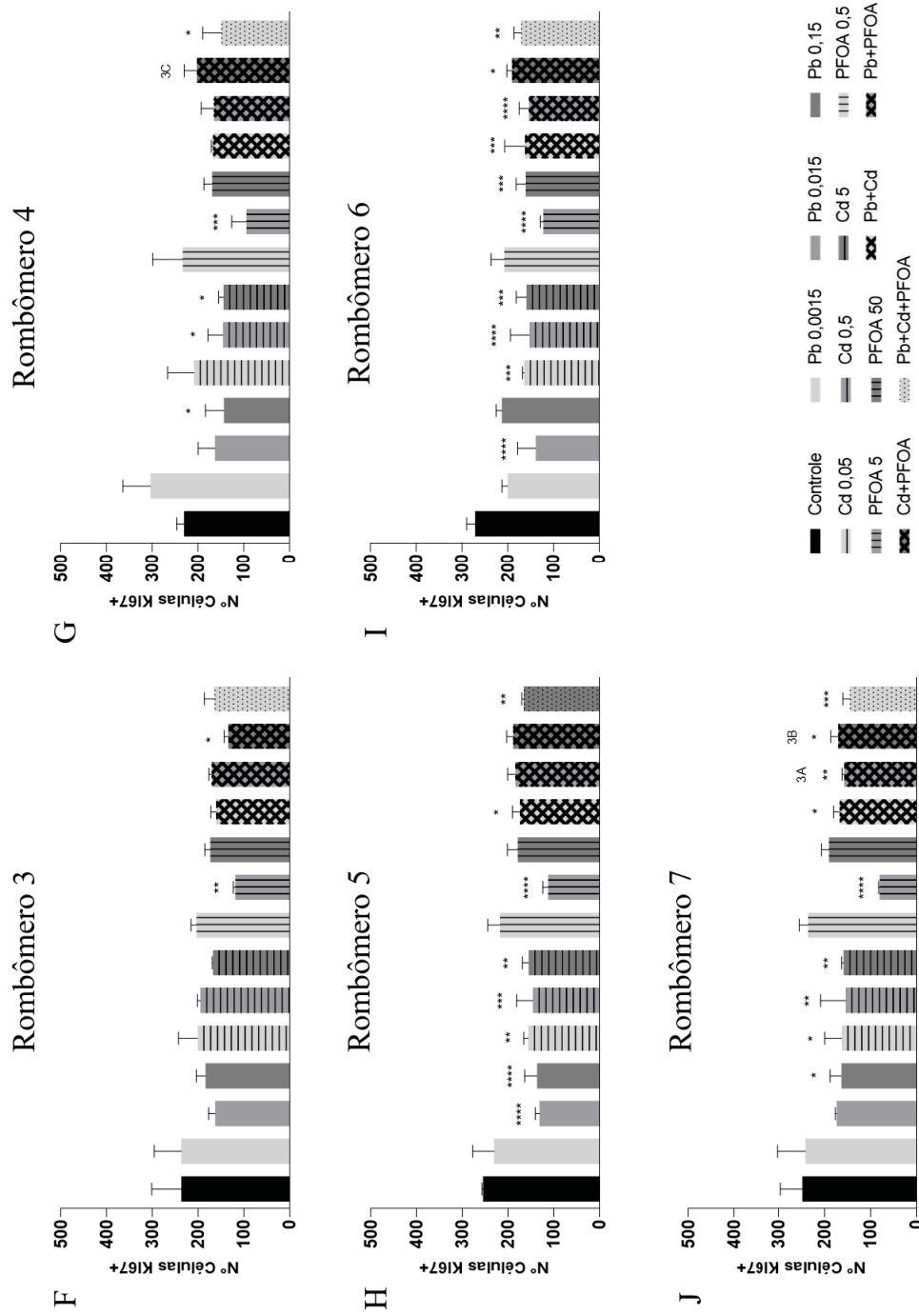
F: Rombômero 3. G: Rombômero 4. H: Rombômero 5. I: Rombômero 6. J: Rombômero 7. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Os números 1, 2 e 3 representam os grupos de Pb 0,015 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Cd 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e PFOA 5 ng.ml^{-1} , respectivamente e as letras A, B, C e D indicam significância estatística de $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$, respectivamente. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2021).

FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS KI67+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14HH



A: Proliferação celular na região cefálica geral. B: Diencéfalo. C: Mesencéfalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001. O número 3 representa o grupo de PFOA 5 ng ml⁻¹ e a letra A indica significância estatística de p < 0,05. Valores = Média ± Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2021).

FIGURA 10 (CONTINUAÇÃO) - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS KI67+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14HH



F: Rombômero 3. G: Rombômero 4. H: Rombômero 5. I: Rombômero 6. J: Rombômero 7. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. O número 3 representa o grupo de PFOA 5 ng.ml^{-1} e as letras A, B e C indicam significância estatística de $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$, respectivamente. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way* ANOVA) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2021).

QUADRO 3 – PROLIFERAÇÃO CELULAR NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA

		Pb 0,0015	Pb 0,015	Pb 0,15	Cd 0,05	Cd 0,5	Cd 5	PFOA 0,5	PFOA 5	PFOA 50	Pb+Cd	Pb+PFOA	Cd+PFOA	Pb+Cd+PFOA
10HH	Geral										↓ Pb; Cd	↓ Pb; PFOA	↓ Cd; PFOA	↓ Pb; Cd; PFOA
	Prosencéfalo										↓ Pb; Cd	↓ Pb; PFOA	↓ Cd; PFOA	↓ Pb; Cd; PFOA
	Mesencéfalo										↓ Pb; Cd	↓ Pb; PFOA	↓ Cd; PFOA	↓ Pb; Cd; PFOA
	R1											↓ Pb	↓ PFOA	↓ Pb; PFOA
	R2										↓ Pb; Cd	↓ Pb	↓ Cd	↓ Pb; Cd; PFOA
	R3										↓ Pb	↓ Pb; PFOA	↓ Cd; PFOA	↓ Pb; PFOA
	R4										↓ Pb	↓ Pb; PFOA	↓ Cd; PFOA	↓ Pb
	R5										↓ Pb	↓ Pb		↓ Pb; Cd; PFOA
14HH	R6										↓ Cd		↓ Cd	↓ Cd
	R7										↓ Pb; Cd	↓ Pb; PFOA	↓ Cd; PFOA	↓ Pb; Cd; PFOA
	Geral													
	Diencefalo													
	Mesencéfalo													
	R1												↓ PFOA	
	R2													
	R3													
	R4												↓ PFOA	
	R5													
	R6													
	R7											↓ PFOA	↓ PFOA	

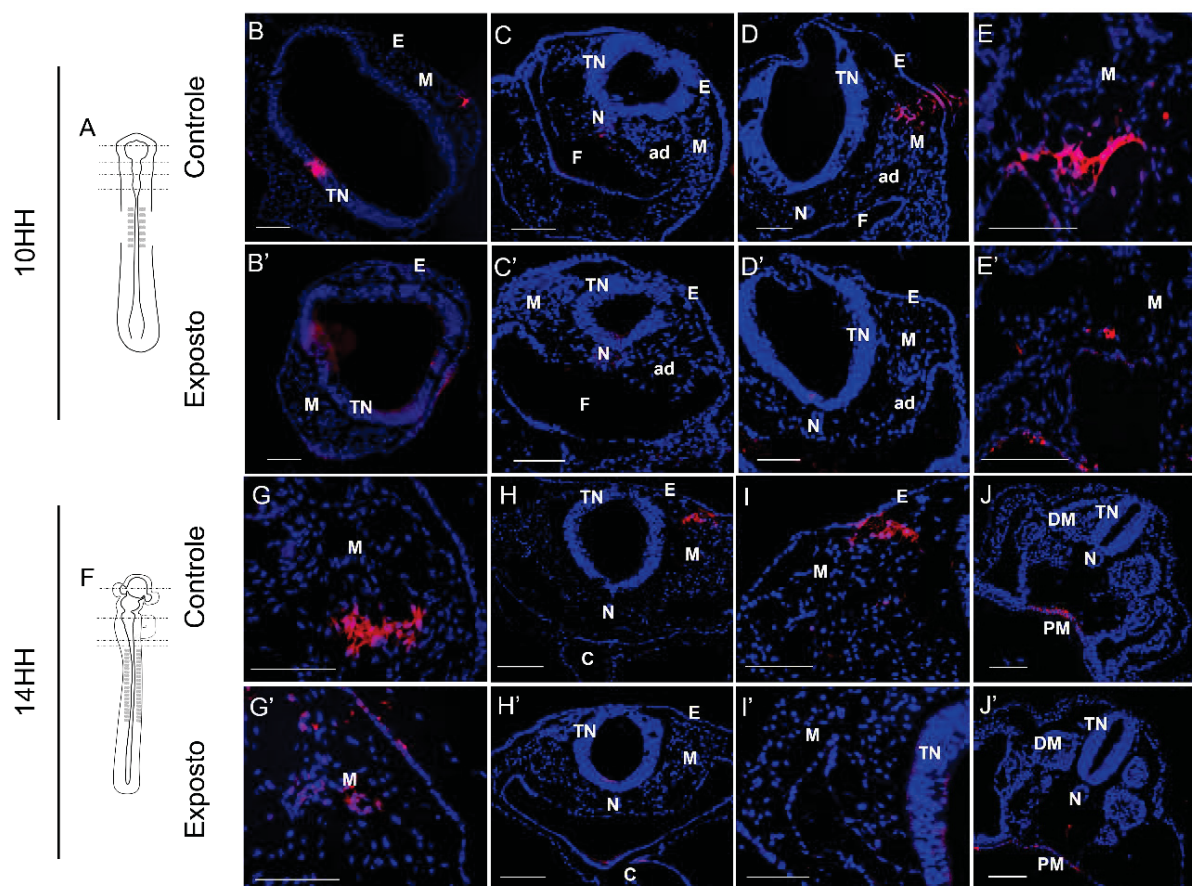
Avaliação da proliferação na região cefálica geral e por nível axial. Sombreado em vermelho: redução significativa em relação ao controle. Seta vertical seguida do nome do contaminante: redução significativa em relação ao contaminante indicado. Seta horizontal: Redução progressiva dentro do grupo do contaminante. FONTE: A autora (2022).

3.4 APOPTOSE

A apoptose foi avaliada com o imunomarcador anti-c-Caspase-3 ativa.

Foi observada redução das células em apoptose nos grupos expostos quando comparados ao controle (FIGURA 11B-E e G-J), principalmente no mesênquima (FIGURA 11D', E', G', H' e I'). Houve redução menos expressiva no TN (FIGURA 11B'), na ectoderme (FIGURA 11B', D' e I') e na mesoderme da placa lateral esplâncnica (FIGURA 11J').

FIGURA 11 – APOPTOSE NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH



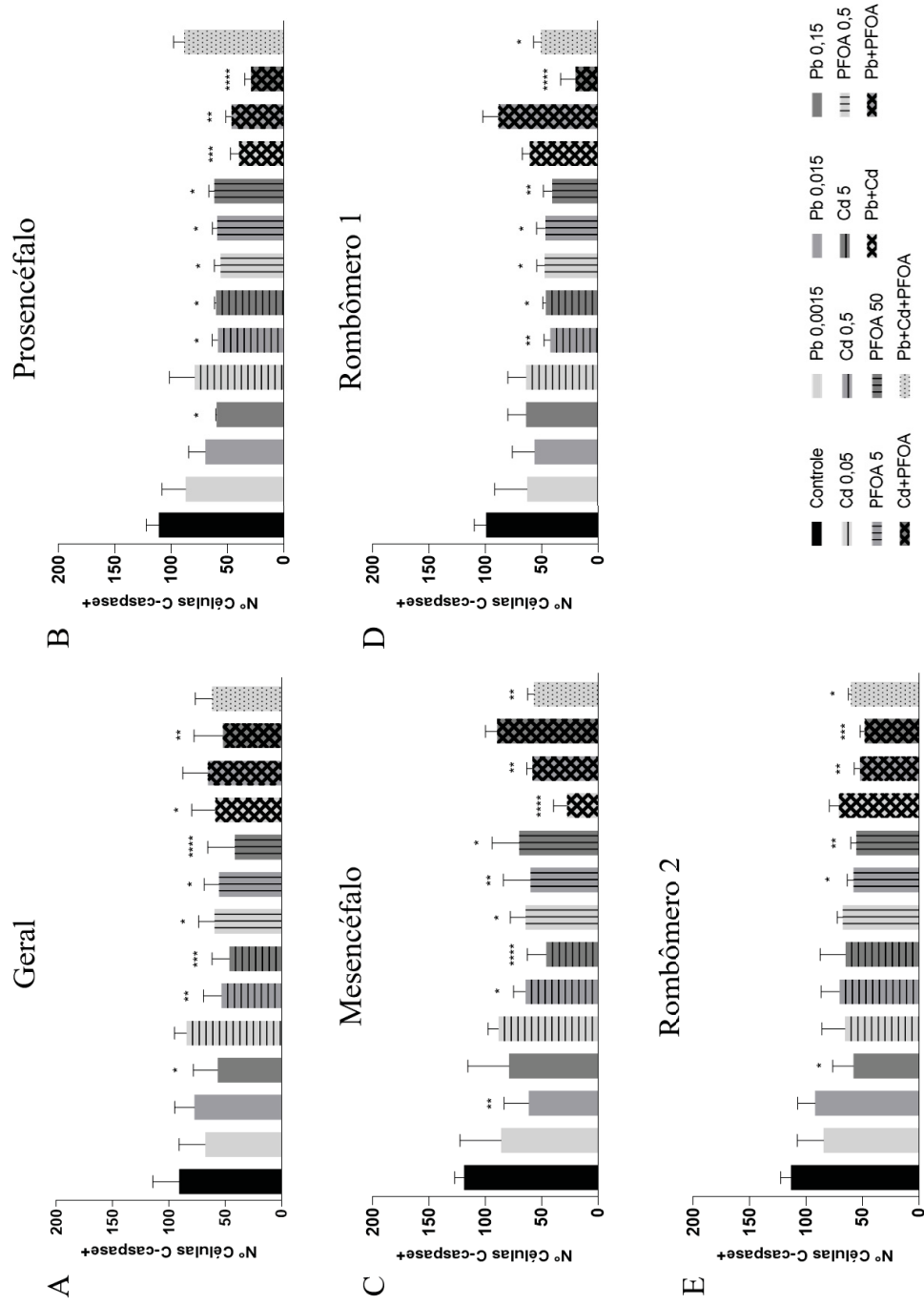
Cortes histológicos de embriões de *G. gallus*. A (10HH) e F (14HH): Desenho esquemático mostrando os diferentes níveis axiais representados nas colunas da prancha. Embriões controle: B-E e G-J. Embriões expostos ao Pb 0,015 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: C' e H'. Embriões expostos ao Cd 0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: D' e I'. Embriões expostos ao PFOA 5 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$: E' e J'. Embriões expostos ao Pb+Cd+PFOA: B' e G'. TN: Tubo neural; N: Notocorda; E: Ectoderme; M: Mesênquima; ad: Aorta dorsal; F: Faringe; C: Coração; DM: Dermatomiótomo; PM: Mesoderme da placa lateral esplâncica. Imunofluorescência com anticorpo Anti-C-caspase-3 (vermelho) e marcação nuclear com DAPI (azul). Barras de escala: 100 μm . Fonte: A autora (2021).

Ao analisar toda a região cefálica no estágio 10HH é observada redução progressiva na apoptose com o aumento da concentração de Cd. Em nenhum nível axial houve redução significativa na apoptose frente a exposição da menor concentração de Pb e Cd, já a concentração intermediária de Pb apresentou redução significativa apenas no mesencéfalo. O PFOA na maior concentração demonstrou redução significativa em todos os níveis axiais. De maneira geral, os níveis mais afetados por todos os contaminantes foram o prosencéfalo, mesencéfalo e r6. As misturas também apresentaram redução mais frequentes nesses níveis, além de em r2. Dentre as misturas, o grupo Cd+PFOA está afetando uma maior extensão dentro dos diferentes níveis na região cefálica. Porém, não houve contribuição na redução das misturas de nenhum contaminante isolado que as compõem (FIGURA 12).

A apoptose no estágio 14HH é menos afetada em comparação ao estágio 10HH, sendo que ao nível do diencéfalo e r3 a r5 nenhum contaminante, isolado ou em mistura, afetou a apoptose. Esse processo celular é mais susceptível ao efeito dos contaminantes ao nível de r1 e r6, onde apresentou redução significativa frente a todas as exposições. Nota-se que a redução progressiva na apoptose dos grupos expostos a concentrações crescentes de Cd, ocorreu não apenas na avaliação geral, mas também nos níveis de r1 e r7. O grupo Pb+Cd+PFOA afetou um número maior de níveis axiais, porém não foi identificada relação significativa dos contaminantes isolados com nenhum grupo de mistura (FIGURA 13).

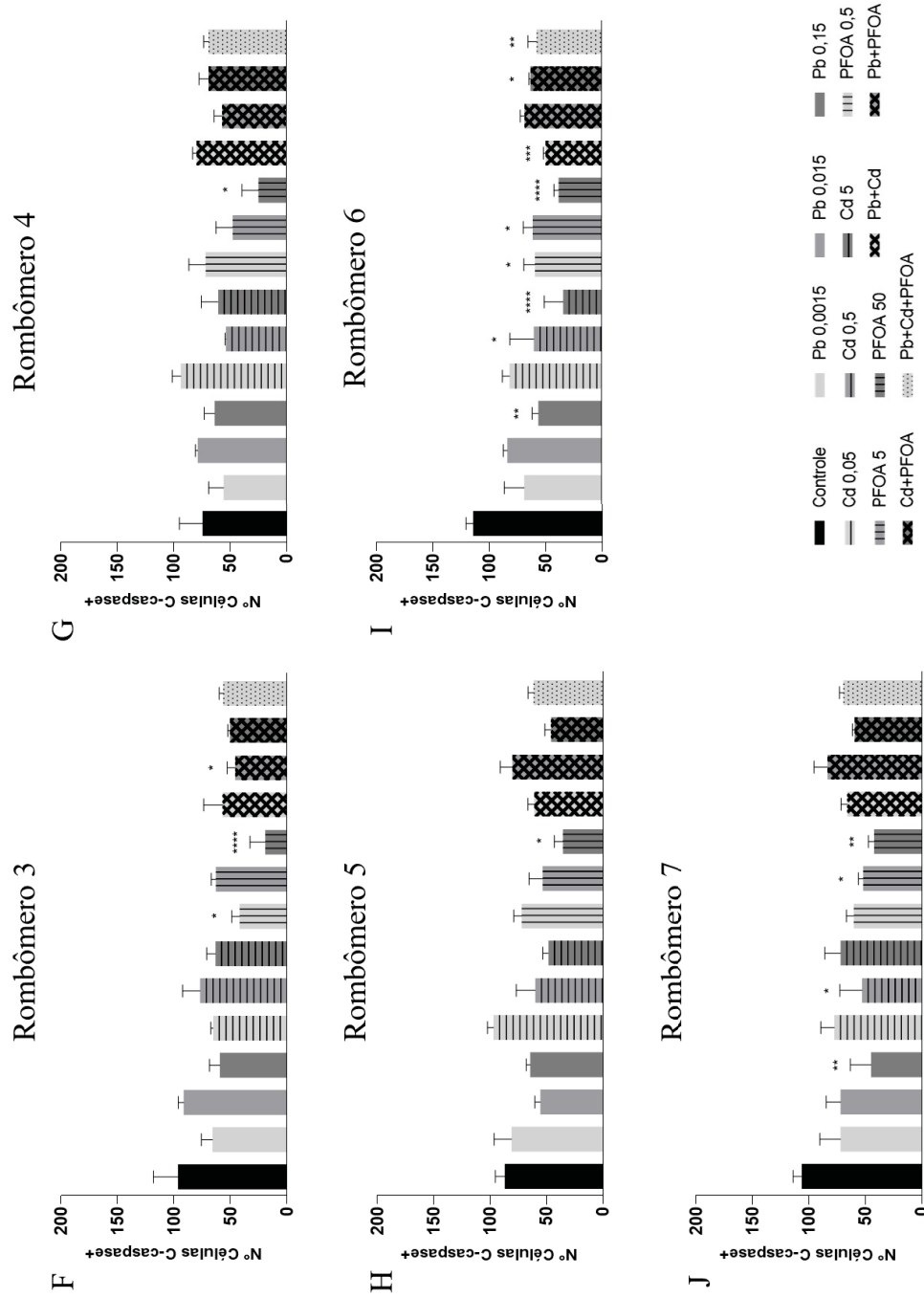
Os resultados sobre a ocorrência de apoptose em células da região cefálica estão resumidos no quadro 4.

FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS C-CASPASE-3+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10HH



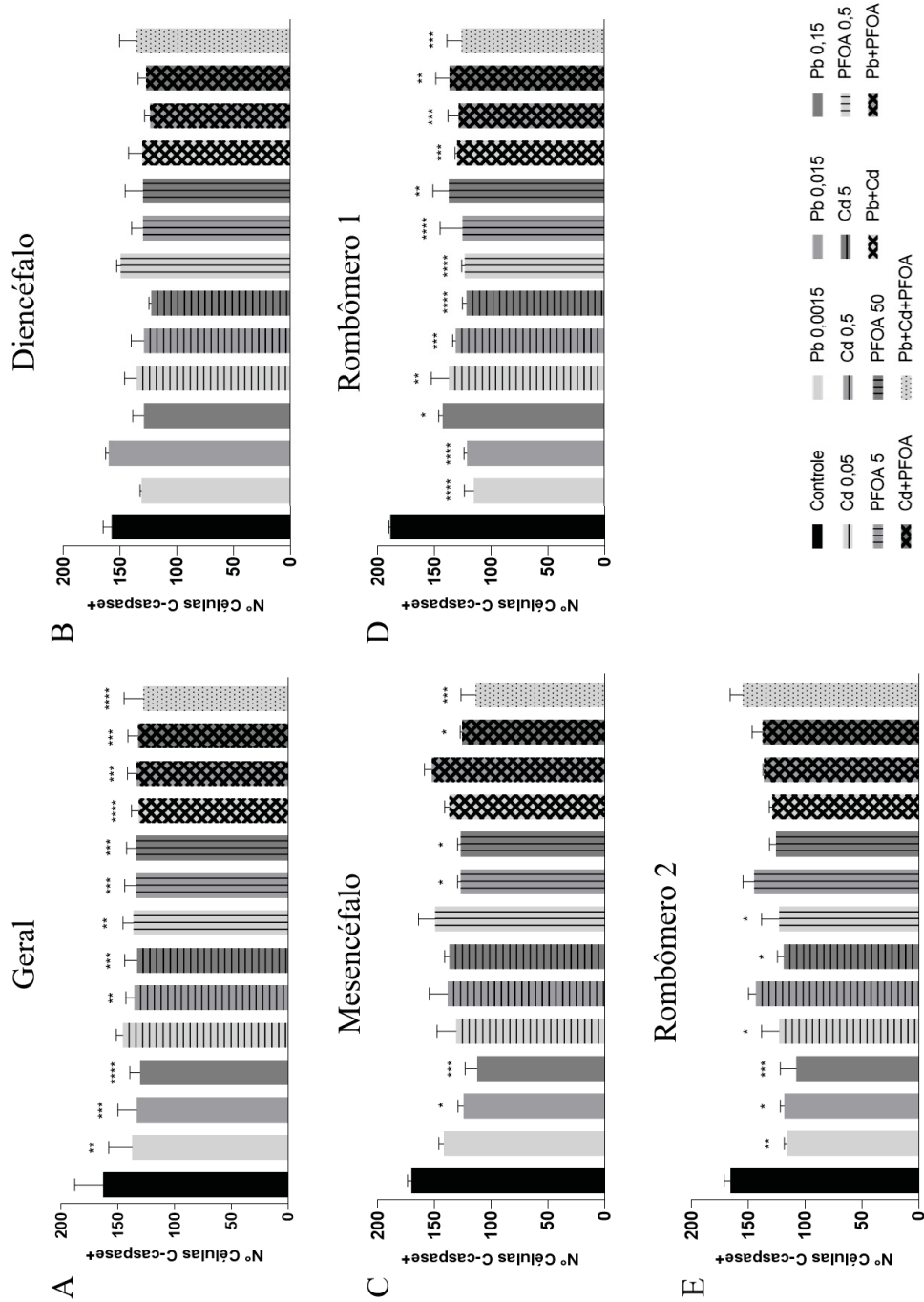
A: Apoptose na região cefálica geral. B: Prosencéfalo. C: Mesencéfalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2021).

FIGURA 12 (CONTINUAÇÃO) - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS C-CASPASE-3+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10HH



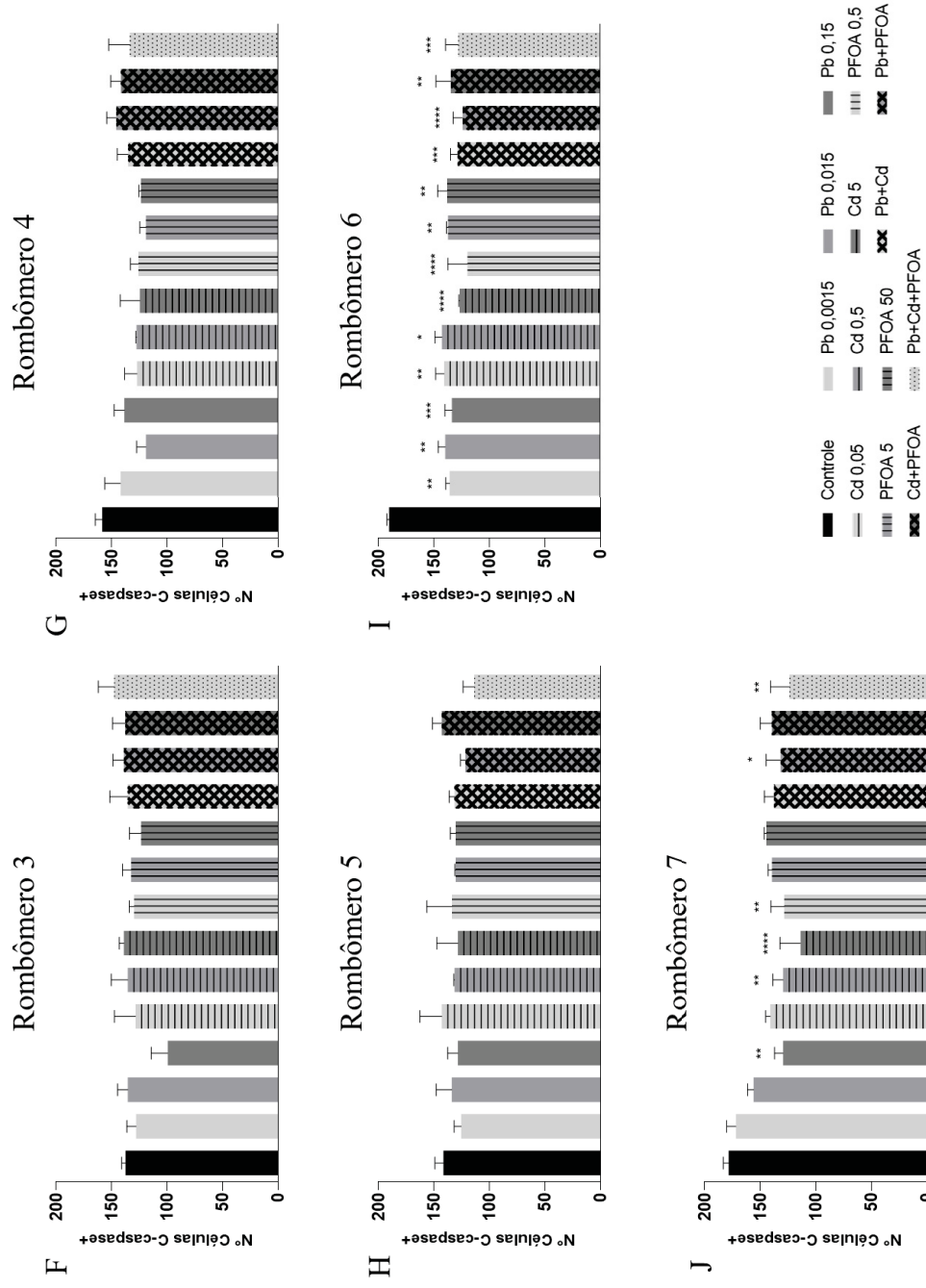
F: Rombômero 3. G: Rombômero 4. H: Rombômero 5. I: Rombômero 6. J: Rombômero 7. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way* ANOVA) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2021).

FIGURA 13 – DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS C-CASPASE-3+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14HH



A: Apoptose na região cefálica geral. B: Diencéfalo. C: Mesencéfalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001. Valores = Média ± Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2021).

FIGURA 13 (CONTINUAÇÃO) - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS C-CASPASE-3+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14HH



F: Rombômero 3. G: Rombômero 4. H: Rombômero 5. I: Rombômero 6. J: Rombômero 7. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2021).

QUADRO 4 – APOPTOSE NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA

		Pb 0,0015	Pb 0,015	Pb 0,15	Cd 0,05	Cd 0,5	Cd 5	PFOA 0,5	PFOA 5	PFOA 50	Pb+Cd	Pb+PFOA	Cd+PFOA	Pb+Cd+PFOA
10HH	Geral				→									
	Prosencéfalo													
	Mesencéfalo													
	R1													
	R2													
	R3													
	R4													
	R5													
	R6													
	R7													
14HH	Geral				→									
	Diencefalo													
	Mesencéfalo													
	R1				→									
	R2													
	R3													
	R4													
	R5													
	R6													
	R7				→									

Avaliação da apoptose na região cefálica geral e por nível axial. Sombreado em vermelho: redução significativa em relação ao controle. Seta: Redução progressiva dentro do grupo do contaminante. FONTE: A autora (2022).

4 DISCUSSÃO

O chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA) são poluentes comumente encontrados no ambiente. A exposição desses compostos durante o desenvolvimento pode promover diversas alterações, como malformações no sistema nervoso e região encefálica. Além disso, todos possuem a capacidade de atravessar a barreira placentária e, assim, atingir o embrião/feto (MAS; AROLA, 1985; RUDGE *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2017). Neste estudo foi demonstrado que esses contaminantes, em concentrações realistas, são tóxicos para os embriões de *G. gallus* nos estágios iniciais de desenvolvimento e, portanto, teratogênicos. Esses dados são confirmados por estudos anteriores realizados no laboratório de Embriotoxicologia-UFPR (KMECICK *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021) e descritos por outros autores (CULLINANE; BANNIGAN; THOMPSON, 2009; MÜLLER *et al.*, 2012).

A taxa de mortalidade encontrada para os embriões controle foi condizente com o descrito para condições laboratoriais (YAMAMOTO *et al.*, 2012; KMECICK *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021). Em relação aos contaminantes, foi observado aumento significativo na

mortalidade apenas após a exposição ao Pb 0,015 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Esse achado difere parcialmente da literatura, que demonstrou que os 3 contaminantes, de maneira isolada, interferem na viabilidade embrionária (RIVERO *et al.*, 2006; CULLINANE; BANNIGAN; THOMPSON, 2009; YAMAMOTO *et al.*, 2012; KMECICK *et al.*, 2019). Essa diferença pode estar ocorrendo pois nenhum dos trabalhos citados utilizaram embriões em estádios tão iniciais de desenvolvimento. De acordo com Conley e Richards (2008), a duração da exposição de um teratígeno é um fator bastante importante, pois uma duração suficientemente longa pode inviabilizar o organismo ou produzir alterações tão intensas que, eventualmente, o organismo morrerá. Contudo, em exposições mais curtas, o teratígeno pode interromper os processos normais de desenvolvimento e produzir malformações em diferentes estruturas. Sendo assim, não é possível descartar o aumento na taxa de mortalidade em indivíduos expostos por períodos mais longos, como observado nos trabalhos citados.

Neste estudo foram avaliadas as malformações exclusivamente na região cefálica. Foi observado que apenas a mistura de Cd+PFOA não apresentou aumento significativo para alterações nessa região. Efeitos neurotóxicos com alteração na morfologia cefálica já foram demonstrados após exposição isolada ao Pb (SFAKIANAKIS *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2021), Cd (CHOW *et al.*, 2008; GENG; WANG, 2019) e PFOA (KIM *et al.*, 2013) e na mistura de Cd e PFOA (KMECICK *et al.*, 2019), porém não há relatos sobre a análise dos três contaminantes juntos. Como descrito anteriormente, o tempo de exposição é crítico para o aparecimento de uma injúria (CONLEY; RICHARDS, 2008), mas não é o único fator que pode explicar as alterações identificadas. De acordo com Alwan e Chambers (2015), a suscetibilidade a teratógenos depende do estágio de desenvolvimento do embrião no momento da exposição e as anormalidades do desenvolvimento dependem da dose e duração de uma exposição teratogênica, especialmente para o desenvolvimento do sistema nervoso (DESESSO; WILLIAMS, 2018). Os resultados obtidos, especialmente para o Cd, estão em consonância com essa afirmação, visto que as alterações foram dependentes da concentração. No presente trabalho, as misturas Pb+Cd, Pb+PFOA e Pb+Cd+PFOA demonstraram aumentar significativamente as malformações quando comparadas ao controle e, ainda, apenas o PFOA isolado mostrou diferença significativa em relação ao efeito observado na mistura Pb+Cd+PFOA. As alterações morfológicas mostram-se relacionadas ao efeito do PFOA pois foi significativamente diferente da mistura. Kmecick e colaboradores (2019) identificaram que as alterações morfológicas exibidas após a exposição à mistura Cd+PFOA, em embriões de 3 dias, estavam relacionadas aos efeitos do PFOA. Porém, ao reduzirmos o tempo de exposição

e incluímos o Pb, os mecanismos de toxicidade desses contaminantes podem sofrer alterações devido a interação dos diferentes componentes da mistura (SØFTELAND *et al.*, 2014).

A interação de diferentes compostos em mistura pode gerar efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (WILSON *et al.*, 2016; RIDER *et al.*, 2018) podendo alterar o potencial tóxico e bioacumulação dos componentes, quando comparados a exposição isolada (SØFTELAND *et al.*, 2014). De maneira geral, o Pb e Cd pertencem a mesma classe de compostos e podem interagir entre si e com estruturas biológicas, em vez de simplesmente exercer seu próprio efeito (HEYS *et al.*, 2016). Em alguns trabalhos foi demonstrado que a interação de metais pesados aumenta os efeitos tóxico, como taxa de mortalidade (ZHU *et al.*, 2011) e toxicidade embrionária (XU *et al.*, 2011). Porém, a co-exposição de metais pesados com outros tipos de contaminantes pode levar a efeitos de combinação únicos (HEYS *et al.*, 2016). Desse modo, com a adição do PFOA, os mecanismos de toxicidade podem ser alterados, especialmente porque pertencem a diferentes classes de compostos e, até o momento, não há na literatura relatos que demonstrem se compartilham ou competem por sítios biológicos alvo, interagem e interferem no metabolismo e/ou detoxificação do Pb e Cd. Supõe-se que devido aos diferentes modos de toxicidade, as respostas biológicas entre o Pb e Cd e o PFOA são diferentes e a toxicidade da mistura indica um efeito aditivo, ou seja, soma dos efeitos dos compostos isolados. No entanto, sabe-se que a exposição a múltiplos compostos depende da aplicação de um modelo específico de aditividade para prever a resposta de várias doses e compostos das misturas (RIDER *et al.*, 2018), porém para afirmar o tipo de efeito observado é necessário empregar um desenho experimental específico, que não foi possível realizar neste trabalho. Assim, outros experimentos serão necessários para avaliar os efeitos da exposição conjunta a essas substâncias no desenvolvimento embrionário e confirmar o realmente o efeito da mistura.

Muitos processos podem afetar funcional ou morfológicamente o desenvolvimento. No presente trabalho foi observada a redução da proliferação das células da região cefálica em todos os grupos de contaminantes isolados e em quase todos os níveis axiais. O Pb, mesmo em baixas concentrações, pode ativar a proteína quinase C (isoformas clássicas), ocasionando perturbações subsequentes dos mecanismos homeostáticos celulares, incluindo a proliferação celular (GIORDANO; COSTA, 2012). Além disso, já foi relatado que o Cd, na concentração de 2 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, também pode afetar a proliferação celular durante o desenvolvimento de *G. Gallus*, especialmente no tecido ectodérmico (THOMPSON *et al.*, 2005). Ao se avaliar toda a região cefálica, ficou evidente que a redução na proliferação foi dependente da concentração de exposição de Cd e PFOA. Até o momento, a literatura não descreve os efeitos do PFOA sobre a proliferação celular durante o desenvolvimento da região cefálica. Porém, assim como o Pb,

ele pode interferir na ativação da proteína quinase C (WANG; WANG *et al.*, 2019; YADAV *et al.*, 2021). Esses dados responderiam a redução encontrada e são importantes, visto que durante o desenvolvimento embrionário inicial em vertebrados a região cefálica é subdividida em prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo e medula, sendo que em cada região várias células com identidade própria são geradas em número e posições precisas e todo um circuito é formado. Quando isso não ocorre de maneira adequada, podem surgir anormalidades morfológicas, como subdivisões incorretas ou ausentes. Além disso, a sinalização intercelular é crucial para o controle da especificação, do destino e da proliferação celular no desenvolvimento embrionário (MIYAKE *et al.*, 2005). Ao avaliar a proliferação nos grupos das misturas, no estágio mais precoce (10HH), observou-se que os contaminantes que as compõem apresentam, possivelmente, um efeito sinérgico, uma vez que a mistura de dois compostos gerou um efeito significativamente superior ao efeito observado nos compostos isolados (WILSON *et al.*, 2016; RIDER *et al.*, 2018).

O papel essencial da apoptose como um mecanismo para correspondência quantitativa, modelagem e exclusão de estruturas anatômicas, regulando o número de células e eliminando células defeituosas ou com tendência a erros já foi descrito na literatura (FUCHS; STELLER, 2011; YAMAGUCHI; MIÚRA, 2015). Em quase todos os tecidos embrionários há uma perda contínua de células por meio da apoptose. Essas células morrem em um local específico do embrião, em momento específico do desenvolvimento e desempenham um papel importante na morfogênese (BELLAIRES; OSMOND, 2014), o que representa o processo fisiológico normal, como ocorre para a formação dos dígitos das mãos. No entanto, a desregulação desse processo pode alterar a morfogênese (SZABO-ROGERS *et al.*, 2010). Neste trabalho foi observado que os contaminantes isolados podem reduzir a apoptose nos 2 estádios analisados. O Cd apresentou efeito dependente da concentração. No entanto, trabalhos que avaliaram a apoptose após a exposição a altas concentrações de Pb em embriões de zebrafish (PARK *et al.*, 2020) e Cd em embriões de *G. gallus* (THOMPSON *et al.*, 2005), observaram aumento da apoptose e, como consequência, alterações morfológicas no desenvolvimento embrionário. No entanto, para o Cd, o estudo de Deng e colaboradores (2020) demonstrou que alterações na taxa de proliferação e apoptose estavam sujeitos a variações na concentração e tempo de exposição do metal, sendo que a apoptose não foi observada após a exposição a inferiores a 2 μ M por menos de 5 dias, enquanto a exposição a 4 μ M levou ao aumento na morte celular nesse mesmo período, e o tratamento com doses superiores a 6 μ M tornaram essas células inviáveis. A literatura não descreve, até o momento, essas alterações para embriões expostos ao PFOA, porém, em células de câncer de mama e hepático em cultivo foi observada redução da morte celular em

concentrações baixas, seguidas de um aumento progressivo em altas concentrações (PIEROZAN; JERNEREN; KARLSSON, 2018; LIU; IRUDAYARAJ, 2020). O trabalho de Du e colaboradores (2022) demonstraram, em células trofoblásticas, que o PFOA em baixas concentrações aumenta a viabilidade celular, porém, com o aumento da concentração a viabilidade é reduzida. A exposição de embriões no estágio 10HH a outros contaminantes, como as nanopartículas de zinco, aumentaram a apoptose (YAN *et al.*, 2021), enquanto o ácido ocaídoico (JIAO *et al.*, 2019) reduziu esse processo. Em ambos são encontradas alterações morfológicas, como falha no fechamento do TN e alterações craniofaciais, como observada nesse trabalho. Essas informações corroboram com as malformações encontradas, pois a desregulação do processo apoptótico pode, em parte, ser responsável pelo fenótipo aberrante descrito (JIAO *et al.*, 2019; YAN *et al.*, 2021), como o aumento no tamanho da região cefálica em alguns embriões e a dilatação do rombencéfalo, por exemplo. Além da apoptose, outro tipo de morte celular bastante relacionado a exposição ao Pb, Cd e PFOA é a necrose. A exposição ao Pb, por exemplo, causa aumento da morte celular por necrose em células cultivadas (MANSEL *et al.*, 2019), Thompson e Bannigan (2008) descreveram que o Cd também pode iniciar a apoptose por ativação da via intrínseca e, em exposição a maiores concentrações, pode ocorrer necrose tanto no sistema reprodutivo quanto em embriões. Isso também foi relatado para o PFOA, em células pancreáticas e de neuroblastoma, sendo que a necrose foi o principal mecanismo de lesão encontrado (CHOI *et al.*, 2013; ABUDAYYAK; ÖZTAŞ; ÖZHAN, 2021).

A toxicidade celular dos contaminantes aqui estudados pode ocorrer através de diferentes processos. O Pb e Cd têm em comum a mimetização, interação e/ou substituição de cátions divalentes, como o Ca^{2+} (JAISHANKAR *et al.*, 2014; MATOVIC *et al.*, 2015), interferindo em sua função (CHOONG; LIU; TEMPLETON, 2014). O PFOA pode aumentar o influxo de Ca^{2+} (LIAO *et al.*, 2008) e induzir sua liberação dos estoques de cálcio através dos receptores de inositol 1,4,5-trifosfato e receptores de rianodina (WANG; WANG *et al.*, 2019). Assim, a alteração na homeostase do Ca^{2+} promovida pelos contaminantes poderia explicar os achados de redução na proliferação e apoptose.

Apesar do destaque para as alterações na homeostase do Ca^{2+} , esse não é o único mecanismo de toxicidade pelo qual o Pb, Cd e PFOA podem afetar a proliferação e apoptose. Para os contaminantes isolados, foi relatada a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), regulação negativa de Bcl-2 e deficiência de p53, bloqueio da cadeia mitocondrial de transferência de elétrons, alteração do perfil de expressão gênica juntamente com a alteração dos componentes epigenéticos (incluindo o silenciamento do reparo do DNA e genes supressores de tumor) (TAMM; CECATELLI, 2017; YIN *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2019;

BLAKE; FENTON, 2020; GENCHI *et al.*, 2020; KOTHAPALLI, 2021; ESPARTERO *et al.*, 2022; ZHOU *et al.*, 2022). Porém, a avaliação das misturas nesse processo não é relatada na literatura, tornando essas avaliações um campo de interesse para pesquisas futuras.

Deve-se ressaltar que uma limitação desse capítulo foi a avaliação exclusiva da morte celular por apoptose, sendo que a necrose celular não foi investigada, o que poderia subestimar os resultados para morte celular. Sendo assim, sugere-se que seja realizada a avaliação da histoquímica nuclear pelo método de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling*), que não faz distinção entre a célula necrótica e a apoptótica (CHARRIAUT-MARLANGUE; BEN-ARI, 1995), o que complementaria os dados aqui expostos.

Ainda, é importante destacar que as concentrações realistas dos contaminantes e os efeitos celulares e morfológicos mostram-se de grande preocupação, considerando a onipresença do Pb, Cd e PFOA, sua não degradação e consequente acumulação (CAI *et al.*, 2020; KABAMBA; TUAKUILA, 2020). Os resultados do presente trabalho indicam possíveis problemas para os organismos em desenvolvimento e salienta a importância de mitigar as liberações antrópicas dos contaminantes, além de prevenir a contaminação (ATSDR, 2019; CDC, 2022).

Capítulo III

Efeitos do chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA) nas células da crista neural de *Gallus gallus* e seu impacto nos mecanismos de adesão celular na região cefálica

RESUMO

As células da crista neural (CN) são uma população celular exclusiva dos vertebrados, que apresentam grande capacidade migratória e proliferativa. A migração dessas células segue um padrão espaçotemporal bem determinado, para originar diferentes tipos celulares no organismo embrionário. Na região cefálica, originam grande parte das cartilagens e ossos faciais e contribuem para a formação dos gânglios cranianos. Para a determinação e migração correta dessas células são necessárias a presença de diversas moléculas e interações célula-célula e célula-matriz. Alterações nesses processos podem interferir com o ambiente e com as células, promovendo anormalidades morfofuncionais. Diferentes contaminantes apresentam a capacidade de perturbar essas interações, porém há poucos relatos sobre misturas de poluentes. O chumbo (Pb), cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA) são poluentes persistentes, bioacumuláveis e que podem ser encontrados simultaneamente no ambiente, portanto, seu efeito sobre as células da CN, torna-se de interesse. Por isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do Pb, Cd e PFOA, em diferentes concentrações, no número e migração das células da CN, bem como nas moléculas de adesão β -catenina, N-caderina e E-caderina, nos estádios 10HH e 14HH, em diferentes níveis axiais da região cefálica. A avaliação imunohistoquímica demonstrou redução significativa no número e migração de células da CN e na expressão de E-caderina, em ambos os estádios. No estádio 14HH ocorreu redução na expressão na N-caderina e β -catenina e no estádio 10HH, houve aumento, após a exposição a quase todos os contaminantes, de maneira isolada e em mistura. O Pb e Cd demonstraram efeito dependente da concentração em quase todos os processos avaliados. Além disso, os grupos expostos às misturas demonstraram contribuição dos contaminantes que as compõem, especialmente na redução da proliferação e na expressão de β -catenina, E-caderina (estádio 14) e N-caderina. Essas alterações poderiam explicar as alterações morfológicas descritas anteriormente, bem como a presença de grupamentos celulares atípicos, destacados do epitélio do tubo neural em seu lúmen. Sugerem-se que muitas vias possam ser afetadas pela exposição aos contaminantes e resultem nas alterações descritas. Esses dados são inéditos na literatura e ressaltam a preocupação com a exposição aos contaminantes, principalmente porque são concentrações realistas.

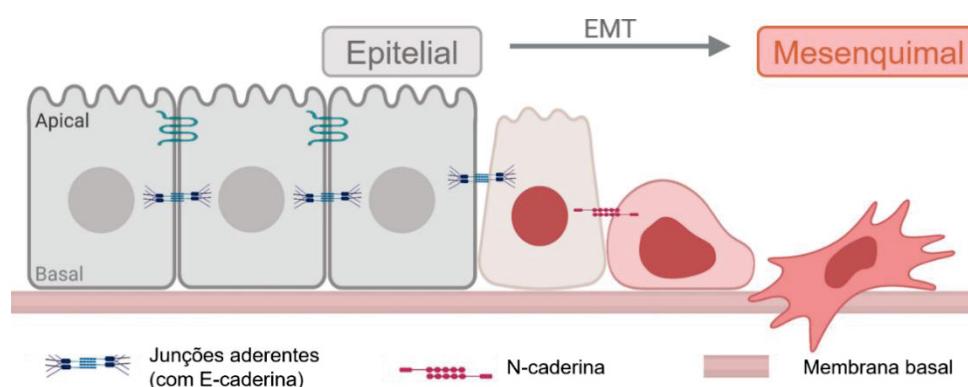
Palavras-chave: Adesão celular; Crista neural cefálica; Contaminantes persistentes; Concentrações realistas.

1 INTRODUÇÃO

A crista neural (CN), muitas vezes referida como a quarta camada germinativa, é uma população embrionária exclusiva dos vertebrados, que dá origem a uma grande variedade de tipos celulares durante o desenvolvimento (GANS; NORTHCUTT, 1983; ERICKSON; KAMENEVA; ADAMEYCO, 2022), incluindo melanócitos, miócitos, células do sistema nervoso periférico, condroblastos e osteoblastos (FISH; SCHINEIDER, 2014). Essa população celular mostra-se interessante para estudo devido a sua característica multipotente e capacidade migratória (LE DOUARIN; CALCHEIN, 1999; BELLAIRS; OSMOND, 2014).

A indução da CN ocorre simultaneamente ao fechamento do tubo neural (TN) durante a gastrulação, entre o ectoderma neural e não neural. Depois passam pela transição epitélio-mesenquimal (EMT) (FIGURA 1), durante a neurulação, para deixar o neuroepitélio e migrar extensivamente através do embrião (SITTEWELLE; MONSORO-BURQ, 2018; PIACENTINO; BRONNER, 2020). A formação e migração dessa população celular segue uma organização metamérica anteroposterior (SLACK, 2013). Em aves, pode ser dividida em 5 segmentos: cefálica, cardíaca, vagal, do tronco e sacral (LE DOUARIN; CALCHEIN, 1999). A migração na região cefálica ocorre em fluxos migratórios pela via dorsolateral, principalmente saindo do epitélio, permeando o mesênquima até regiões adjacentes ao tubo neural (TN) (LE DOUARIN, 2004).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL (EMT)



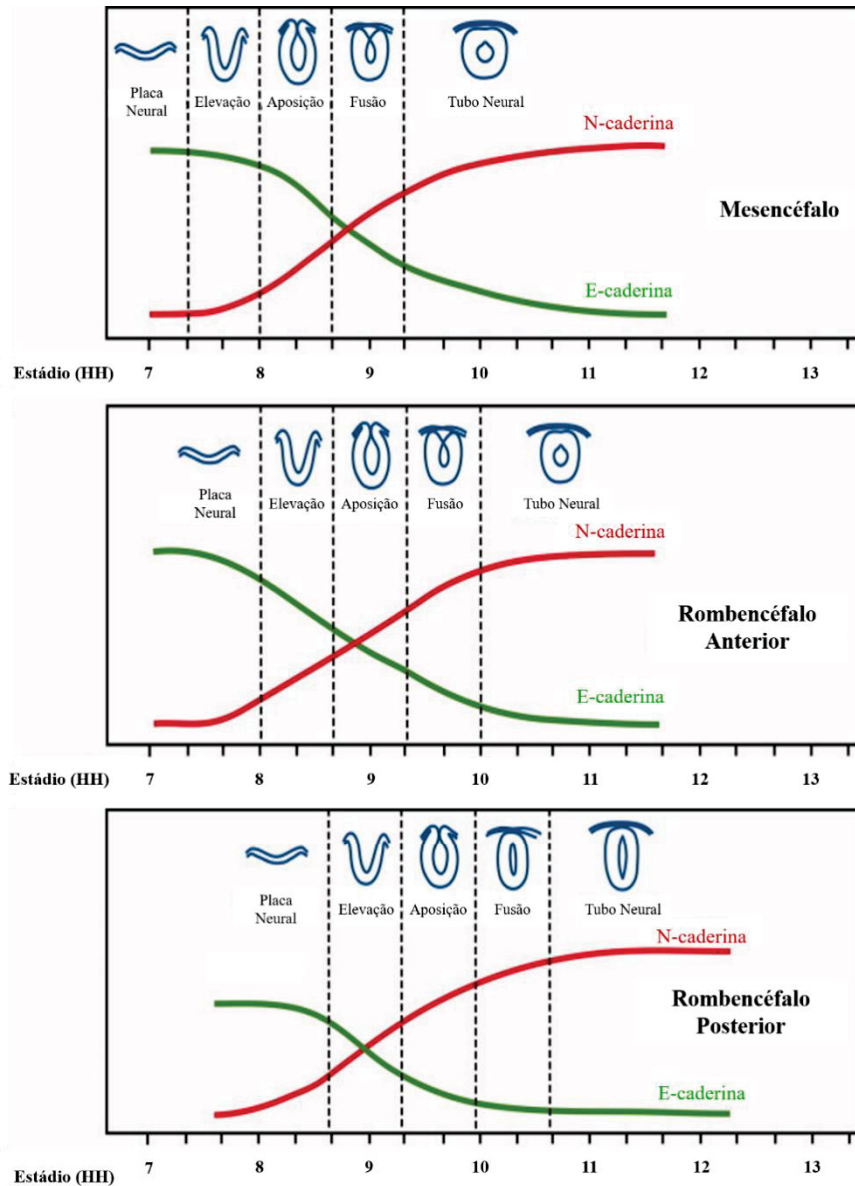
Visão geral da transição epitélio-mesenquimal (EMT). A EMT é um processo dinâmico no qual as células ativam fatores de transcrição promotores de EMT, desmontam as junções célula-célula, perdem a polaridade apical-basal e regulam positivamente novas caderinas. As células também sofrem rearranjos extensos do citoesqueleto de actina que medeiam mudanças de forma, polaridade, comportamento invasivo e migração. Em muitos casos *in vivo*, a EMT é parcial e as células têm propriedades epiteliais e mesenquimais. FONTE: Adaptado de AMACK (2021).

As células migratórias utilizam diversos mecanismos para atravessar seu ambiente, seguindo gradientes químicos (quimiotaxia), gradientes adesivos (haptotaxia) e rigidez da

matriz extracelular (durotaxia) (GENUTH *et al.*, 2018; PIACENTINO; BRONNER, 2020; COUTIÑO; MAYOR, 2022). Durante a EMT, as junções celulares são desmontadas e desconstruídas para que as células epiteliais reduzam progressivamente o contato célula-célula à medida que começam a adquirir características mesenquimais (ZHAO; TRAINOR, 2022). Acompanhando essa quebra nas junções celulares, ocorre a perda na polaridade ápico-basal e o rearranjo dos filamentos de actina, para permitir mudanças dinâmicas na forma e motilidade celular (KEROSUO; BRONNER-FRASER, 2012). Adicionalmente, a degradação e remodelação da matriz extracelular são necessárias, ocorrendo para isso a quebra da membrana basal, com alteração das integrinas e ativação de metaloproteases (MMPs), entre outras moléculas (MORACHO *et al.*, 2022).

Durante a EMT a localização e organização de moléculas de adesão, como as caderinas e cateninas, são altamente reguladas. Sabe-se que as proteínas caderinas são moléculas de adesão célula-célula importantes para a integridade epitelial (ROGERS; SORRELS; BRONNER, 2018). No desenvolvimento normal, ocorre uma “troca de caderinas” para reduzir caderinas epiteliais (como a E-caderina) e aumentar a expressão de caderinas mesenquimais (N-caderina), permitindo que as células delaminem do neuroepitélio e migrem para diversos locais no organismo embrionário (PIACENTINO; BRONNER, 2020). Além disso, proteínas cateninas, como a β -catenina, participam dos complexos de adesão nas junções aderentes, conectando-se as caderinas ao citoesqueleto de actina e/ou citoesqueleto de microtúbulos (KEROSUO; BRONNER-FRASER, 2012). A β -catenina pode atuar também como fator de co-transcrição para várias moléculas envolvidas na progressão do ciclo celular, desenvolvimento embrionário, reparo tecidual, entre outros (NUSSE, 2015).

No embrião de *G. gallus* há uma cinética temporal da substituição de caderinas, no estágio 10HH, no nível mesencéfalo e rombencéfalo anterior. A substituição de E- para N-caderina ocorre apenas gradualmente, com um período de tempo relativamente longo em que ambas as proteínas são co-expressas. O desaparecimento completo de E-caderina do epitélio neural ocorre somente após o fechamento do TN e migração das células da CN. Na região imediatamente posterior, do rombencéfalo posterior até a região anterior do tronco, a troca também ocorre gradualmente, porém durante o fechamento do TN no estágio 12HH (DADY; BLAVET; DUBAND, 2012) (FIGURA 2).

FIGURA 2 – SUBSTITUIÇÃO TEMPORAL DE E- PARA N-CADERINA NO EMBRIÃO DE *G. GALLUS*

Representação esquemática do tempo e cinética da mudança de E- para N-caderina em células epiteliais neurais na zona intermediária da placa neural durante movimentos de neurulação em diferentes estádios de desenvolvimento ao longo da região cefálica do embrião de *G. gallus*. FONTE: Adaptado de DADY, BLAVET e DUBAND (2012).

Devido a importância da migração das células CN e das proteínas envolvidas na EMT que viabilizam esse processo, especialmente durante o desenvolvimento cefálico, defeitos na formação, migração ou diferenciação levam a anormalidades craniofaciais e várias outras doenças do desenvolvimento (COUTIÑO; MAYOR, 2022). Moléculas de adesão são descritas como alvos moleculares de compostos tóxicos. As caderinas, por exemplo, devido a sua estrutura molecular, dependências de cálcio e seu envolvimento nas vias de sinalização celular (GRUNWALD, 2018).

Metais pesados, como chumbo (Pb) e cádmio (Cd), podem interferir em moléculas de adesão, uma vez que têm a capacidade de mimetizar ou substituir íons essenciais (MATOVIC *et al.*, 2015; FANG *et al.*, 2021). O ácido perfluorooctanóico (PFOA), poluente orgânico, mesmo sem ter seu mecanismo de toxicidade bem elucidado, apresenta a capacidade de remodelar os filamentos de actina e comprometer as junções aderentes (LIU *et al.*, 2018). De maneira isolada esses contaminantes podem promover alterações em membranas celulares, a expressão das moléculas de adesão e, assim, comprometer a adesão célula-célula (HU *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2013; CHOONG; LIU; TEMPLETON, 2014; CAROCCI *et al.*, 2016). No entanto, a literatura não descreve os efeitos desses contaminantes sobre as células da CN e moléculas envolvidas na EMT, nos diferentes níveis axiais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos realizados no presente capítulo seguem a metodologia descrita no capítulo II. Resumidamente, os ovos fertilizados de *G. gallus* foram injetados com as mesmas concentrações, selados e incubados randomicamente. Os embriões foram incubados até atingirem os estádios 10HH (33-38 horas) e 14HH (50-53 horas). Posteriormente, foram coletados e estadiados, fixados em paraformaldeído 2% (PFA) e armazenados em geladeira (4°C).

Após a fixação, os embriões foram embebidos em sacarose e emblocados em solução de gelatina e sacarose, em moldes plásticos e submersos em nitrogênio líquido. Cortes de 5 µm foram coletados em intervalos de 90 µm e 130 µm, para os estádios 10HH e 14HH, respectivamente, de forma que cada corte representasse o prosencéfalo, mesencéfalo e cada um dos sete rombômeros. Em cada experimento, durante a microtomia, cortes alternados foram retirados e colocados sobre lâminas correspondentes aos controles (branco e secundário). Os cortes foram colocados sobre lâminas previamente gelatinizadas e armazenadas em freezer - 20°C até o momento da imunomarcção.

Foram utilizados 3 embriões de cada estágio (10 e 14HH), por grupo experimental. As lâminas foram retiradas do freezer e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, foram colocadas em câmara úmida e lavadas em PBS pH 7,4 e os cortes refixados em PFA 2%, bloqueados com soro albumina bovina (BSA) 1% e glicina 0,1M e permeabilizados com Triton X-100 0,03%. Em seguida, os cortes foram incubados, separadamente, com os anticorpos primários (Tabela 1), em câmara úmida, *overnight* à 4°C, lavados e incubados com os respectivos anticorpos secundários, diluídos em PBS pH 7,4, por

2 horas à temperatura ambiente, no escuro. Vinte minutos antes de retirar o anticorpo secundário foi adicionado o marcador nuclear DAPI. Os cortes foram lavados em PBS e água Mili-Q e montados com lamínula e Gel/Mount®.

TABELA 1 – ANTICORPOS

Finalidade	Anticorpo	Fonte	Conjugado	Diluição	Marca
Células da Crista Neural	Anti-HNK-1 (IgM) Monoclonal ¹	Coelho	-	Não diluído	Chemicon Biotechnology
	Anti-IgM de coelho ²	Cabra	Fluoresceína	1:300	Agilent Technologies
Moléculas de Adesão	Anti- β -catenina (IgG) Policlonal ¹	Camundongo	-	1:200	Sigma-Aldrich
	Anti-IgG de Camundongo ²	Coelho	Alexa-Fluor® 594	1:100	Sigma-Aldrich
	Anti-N-caderina (IgG) Policlonal	Camundongo	-	1:200	Invitrogen
	Anti-IgG de Camundongo	Coelho	Alexa-Fluor® 488	1:200	Sigma-Aldrich
	Anti-E-caderina (IgG) Policlonal	Camundongo	-	1:200	Cell Marque
	Anti-IgG de Camundongo	Coelho	Alexa-Fluor® 488		Sigma-Aldrich

1: Anticorpo primário. 2: Anticorpo secundário. FONTE: A autora (2018).

As lâminas foram fotografadas e as imagens analisadas utilizando-se o *software* ImageJ Fiji.

A intensidade relativa de fluorescência, que determina a relação entre intensidade de fluorescência e a área do corte analisado foi utilizada para análise quantitativa do número de células da CN, expressão de β -catenina, E- e N-caderina. Este parâmetro foi adaptado a partir de trabalhos anteriores (LI *et al.*, 2016; WHANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017). Para analisar a migração das células da crista neural foi medida a distância linear projetada do ápice do tubo neural dorsal até as células da crista neural laterais mais distantes, sendo o procedimento adaptado de Rovasio e Battiato (2002).

Os dados obtidos foram submetidos ao teste D'agostino-Pearson ou Kolmogorov-Smirnov, dependendo do número de amostra obtida. Após os testes de normalidade foi aplicada a análise de variância de uma via (*Two-way* ANOVA), com pós-teste de Tukey para dados com

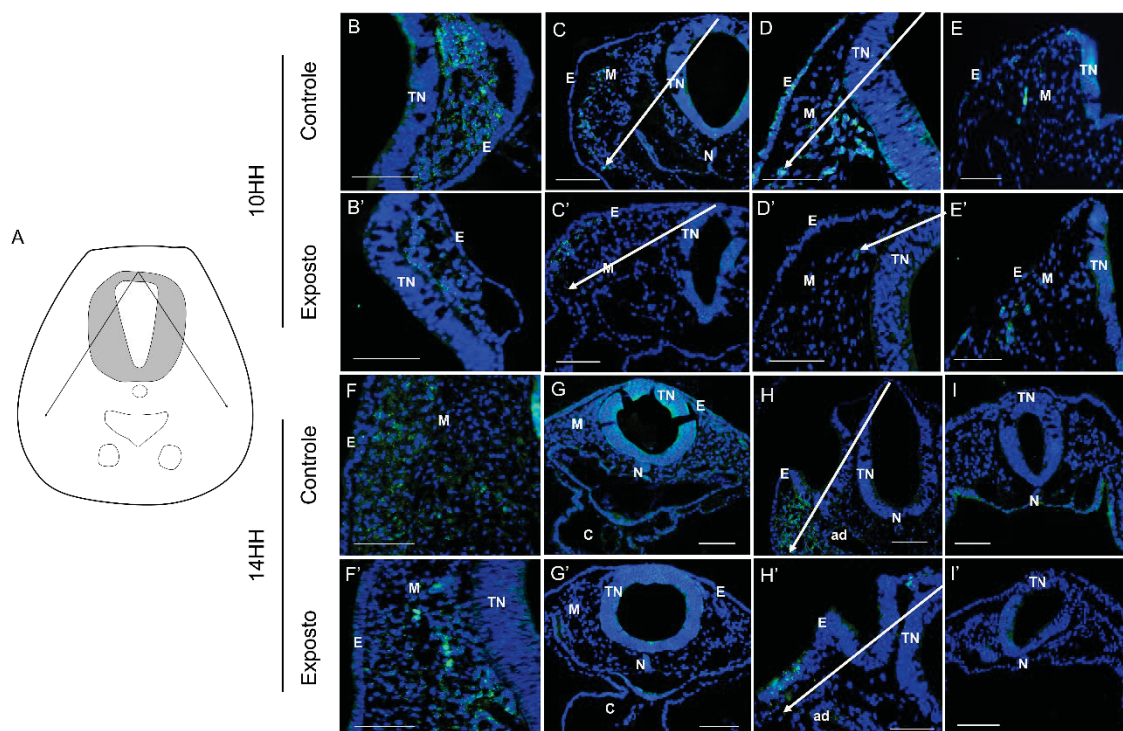
distribuição normal, onde o fator analisado foi o grupo tratamento. Os grupos expostos ao Pb, Cd e PFOA foram comparados entre si para identificar o efeito dependente da concentração. Os dados de cada grupo exposto foram comparados com o grupo controle. Os grupos expostos às misturas foram comparados com o controle e com os grupos de exposição isolada (Pb 0,015 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Cd 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e PFOA 5 ng.ml^{-1}). Foi considerado $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 CÉLULAS DA CRISTA NEURAL

Foi observado o número das células da crista neural (CN) e a distância linear de migração. As células encontram-se distribuídas principalmente no mesênquima, sendo possível visualizar que no grupo controle há um número maior de células por todo o tecido (FIGURA 3B-E e F-I), enquanto nos grupos expostos essa incidência é menor nos dois estádios avaliados (FIGURA 3B'-E' e F'-I'). Foi observado que a distância linear nos expostos (setas nas FIGURAS 3C', D' e H') foi inferior quando comparação a seus respectivos controles.

FIGURA 3 – CÉLULAS DA CRISTA NEURAL NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH



Cortes histológicos de embriões de *G. gallus* nos estádios 10HH e 14HH. A: Desenho esquemático exemplificando a análise da distância linear de migração. Embriões controle: B-I. Embriões expostos ao Pb $0,015 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: D' e H'. Embriões expostos ao Cd $0,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: E' e I'. Embriões expostos ao PFOA $5 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$: C' e G'. Embriões expostos ao Pb+Cd+PFOA: B' e F'. TN: Tubo neural; N: Notocorda; E: Ectoderme; M: Mesênquima; C: Coração; ad: Aorta dorsal; Seta: Distância linear de migração. Imunofluorescência com anticorpo Anti-HNK-1 (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul). Barras de escala: 100 μm . Fonte: A autora (2022).

3.1.1 Número de células migratórias da crista neural

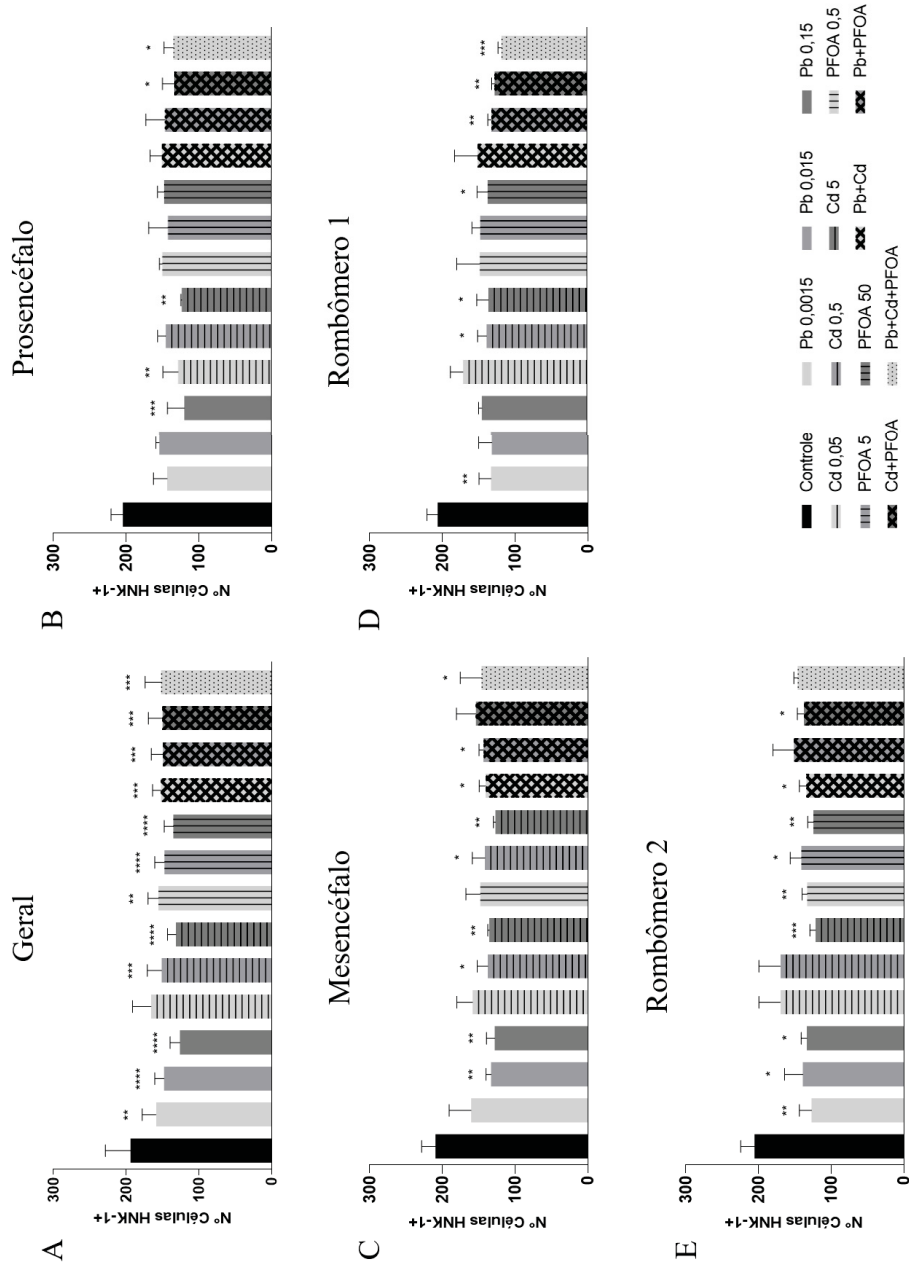
No estágio 10HH, todos os grupos de contaminantes em diferentes níveis axiais reduziram significativamente o número de células HNK-1+ (células da CN em migração). Ao avaliar toda a região cefálica, foi observada redução progressiva com o aumento da concentração de Cd. Porém, ao avaliar separadamente os níveis axiais, foi observado que no mesencéfalo houve redução progressiva frente a exposição de Cd e PFOA e em r6 e r7 o Pb apresentou redução progressiva no número de células. Nesse estágio, os níveis de r3 e r5 foram menos afetados pelo contaminantes. Nas misturas não foi observada contribuição significativa dos contaminantes isolados que as compõe (FIGURA 4).

No estágio 14HH, as menores concentrações de Pb e PFOA não apresentaram redução no número de células em nenhum nível axial. Em r5 nenhum contaminante reduziu significativamente o número de células da CN e em r3 houve redução frente a exposição da maior concentração de Pb. Dentre os contaminantes, o PFOA na maior concentração e o grupo

de mistura Pb+Cd+PFOA afetaram uma maior extensão ao longo da região cefálica. Não foi observada relação progressiva dentre os grupos de contaminantes ou das misturas e os contaminantes isolados (FIGURA 5).

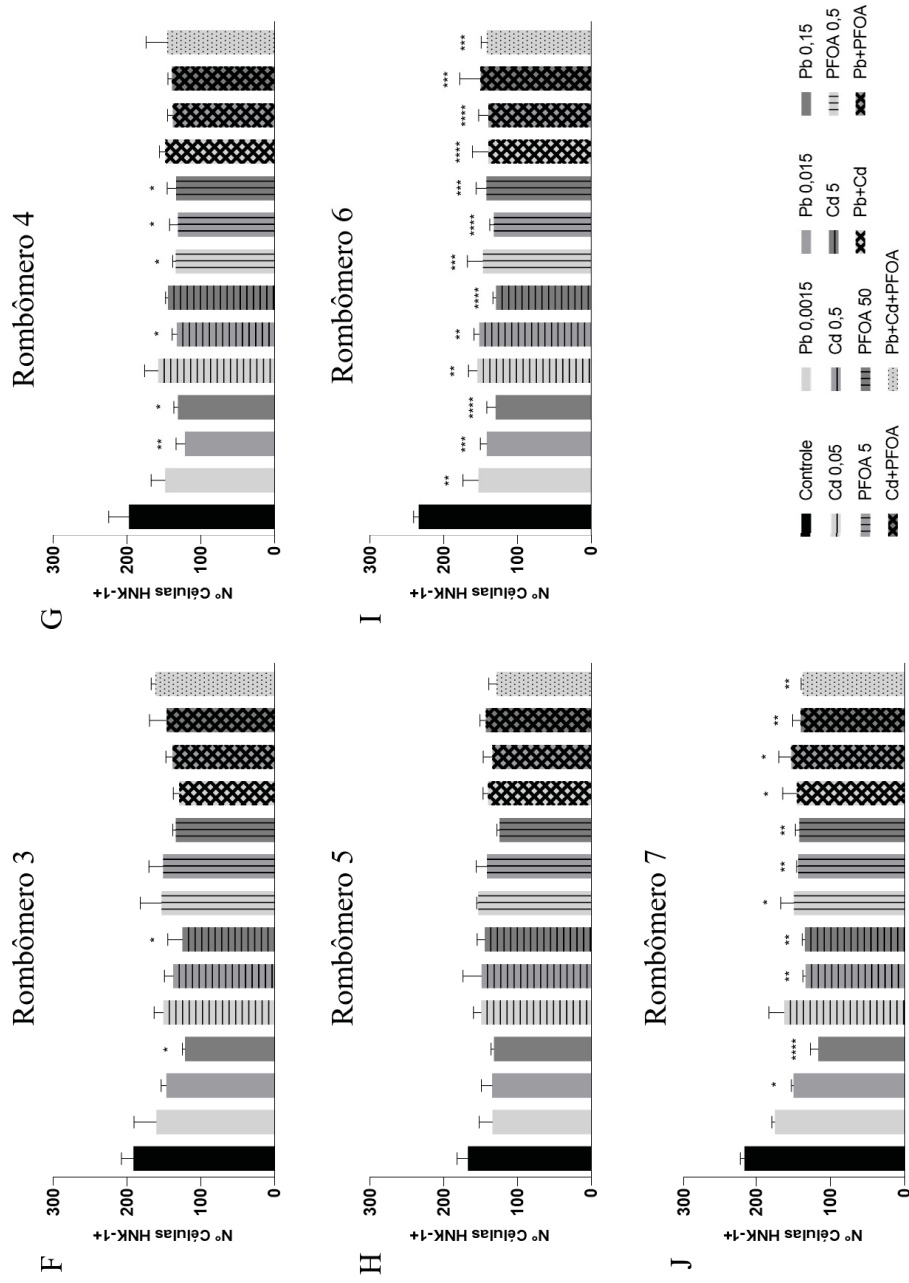
Os resultados do número de células da CN estão compilados no quadro 1.

FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS HNK-1+ NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10 HH



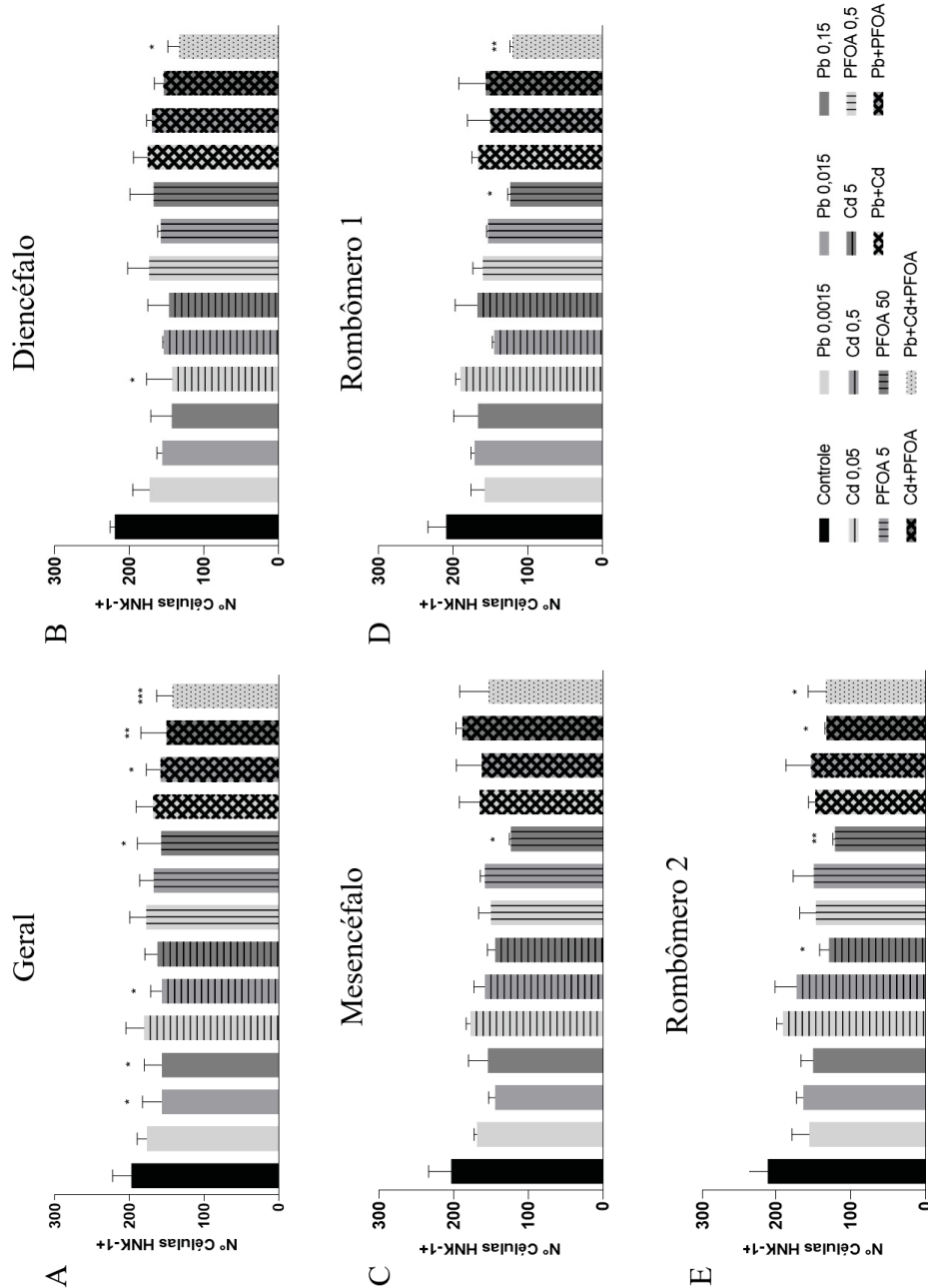
A: Número de células HNK-1+ na região cefálica geral. B: Prosencéfalo. C: Mesencéfalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001. Valores = Média ± Erro padrão. ANOVA de duas vias (Two-way ANOVA) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2021).

FIGURA 4 (CONTINUAÇÃO) - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS HNK-1 + NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10 HH



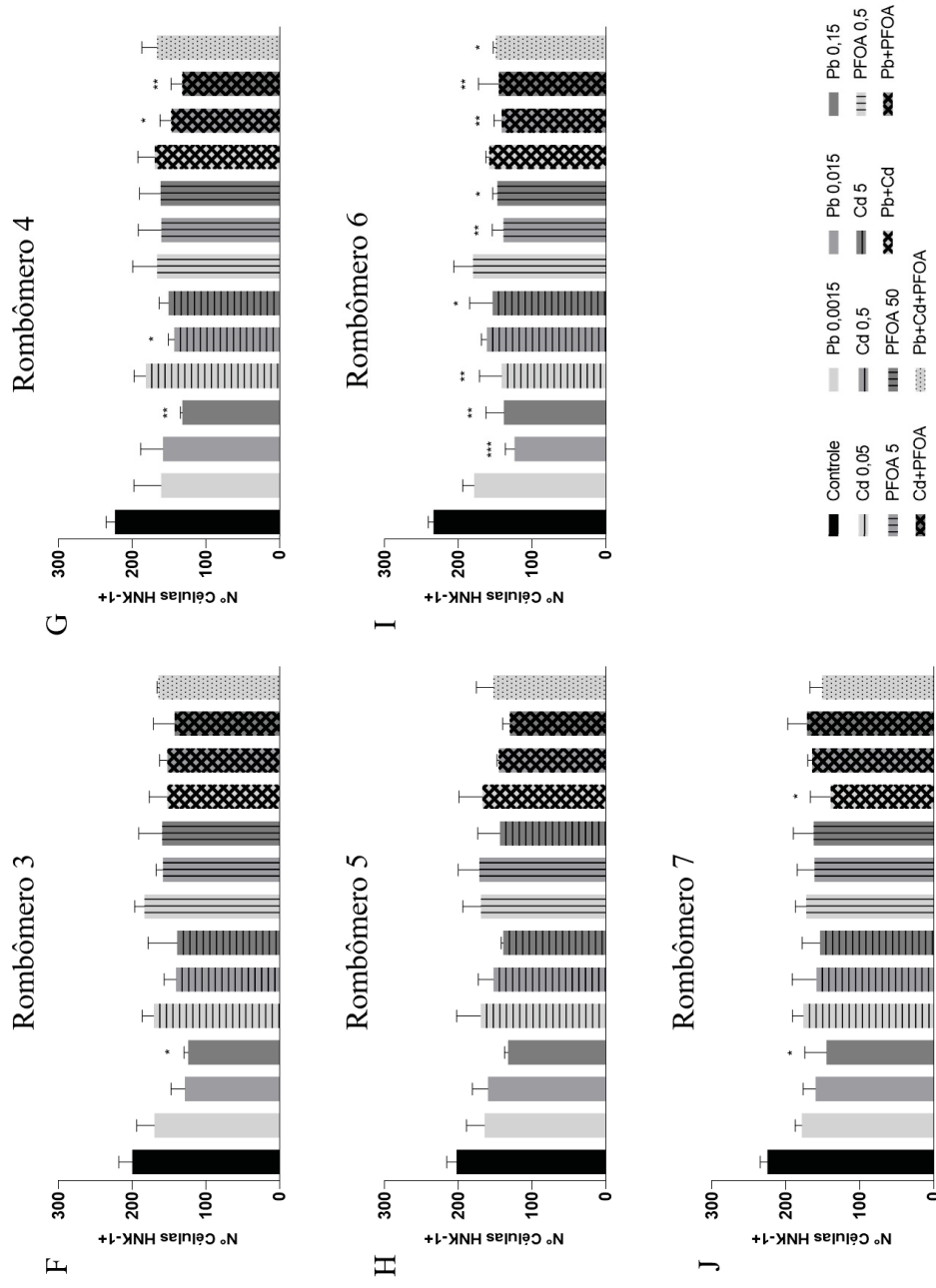
F: Rombômero 3, G: Rombômero 4, H: Rombômero 5, I: Rombômero 6, J: Rombômero 7. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2021).

FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS HNK-1 + NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14 HH



A: Número de células HNK-1+ na região cefálica geral. B: Diencéfalo. C: Mesencéfalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2021).

FIGURA 5 (CONTINUAÇÃO) - DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS HNK-1 + NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14 HH



F: Rombômero 3. G: Rombômero 4. H: Rombômero 5. I: Rombômero 6. J: Rombômero 7. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way* ANOVA) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2021).

QUADRO 1 – NÚMERO DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA

		Pb 0,0015	Pb 0,015	Pb 0,15	Cd 0,05	Cd 0,5	Cd 5	PFOA 0,5	PFOA 5	PFOA 50	Pb+Cd	Pb+PFOA	Cd+PFOA	Pb+Cd+PFOA
10HH	Geral													
	Prosencéfalo													
	Mesencéfalo													
	R1													
	R2													
	R3													
	R4													
	R5													
14HH	R6													
	R7													
	Geral													
	Diencefalo													
	Mesencéfalo													
	R1													
	R2													
	R3													
	R4													
	R5													
	R6													
	R7													

Avaliação do número de células da crista neural na região cefálica geral e por nível axial. Sombreado em vermelho: redução significativa em relação ao controle. Seta: Redução progressiva dentro do grupo do contaminante. FONTE: A autora (2022).

3.1.2 Distância linear de migração das células da crista neural

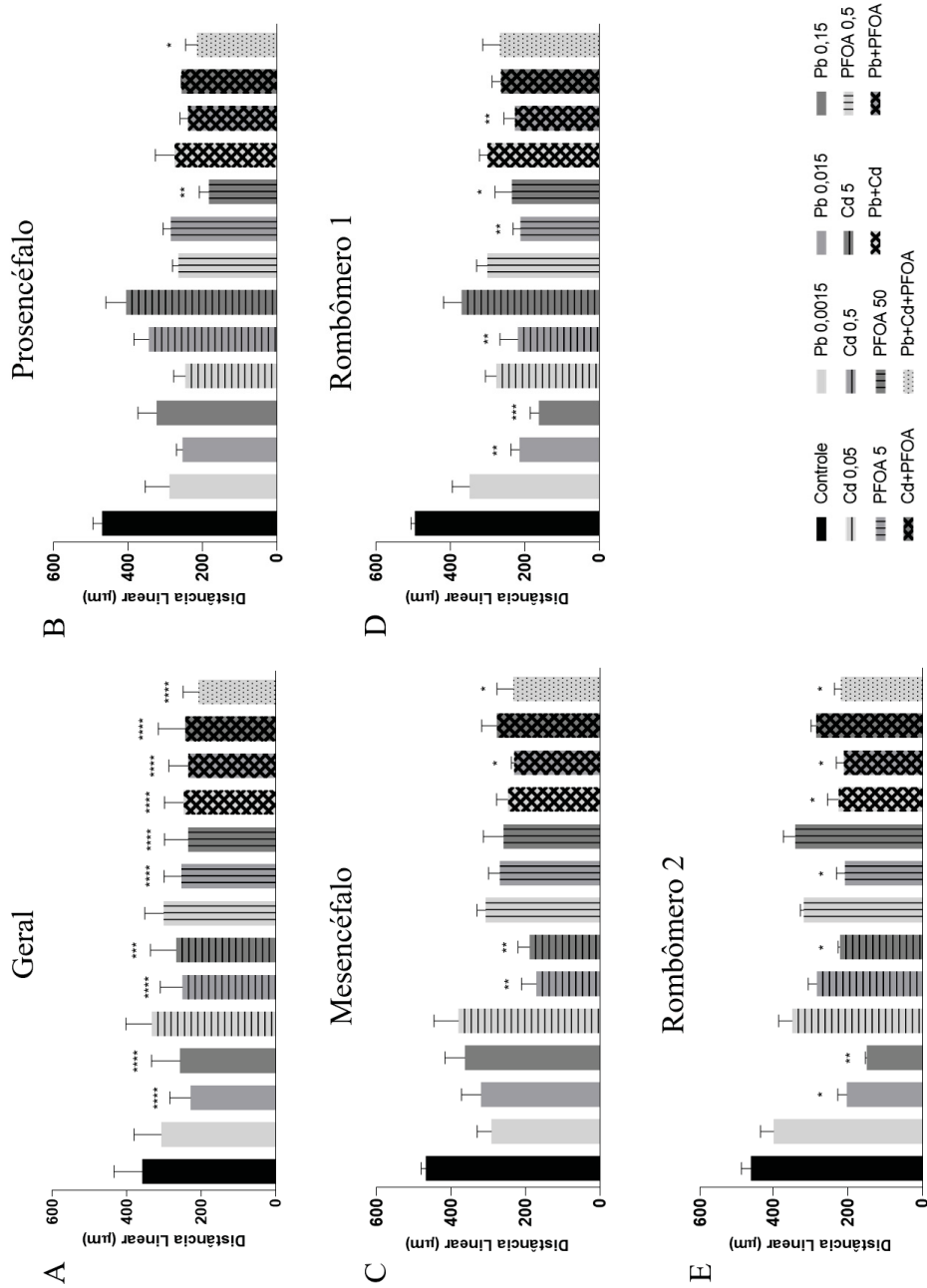
No estágio 10HH houve redução significativa na distância linear de migração em todos os níveis axiais frente a exposição de quase todos os contaminantes. A exceção ocorreu com o Cd e com o PFOA na menor concentração, que apresentou redução apenas no nível de r6 e r7. O Pb na concentração intermediária, o PFOA na maior concentração e a mistura Pb+Cd+PFOA afetaram significativamente uma maior extensão da região cefálica. O Pb ao nível de r2 e r3 demonstrou redução significativamente progressiva com o aumento da concentração. Adicionalmente, as regiões de r5 e r6 foram significativamente afetadas por todas as misturas, no entanto, não foi identificada contribuição na redução das misturas de nenhum contaminante isolado que as compõem, em nenhum nível axial avaliado (FIGURA 6).

No estágio 14HH, ocorreu redução significativa na distância que as células da CN estão migrando após exposição a todos os contaminantes. É menos intensa no grupo exposto ao PFOA na concentração intermediária, visto que só foi encontrada redução significativa ao nível de r6. Em r1, independente do grupo de exposição, não houve redução significativa na migração. Na avaliação geral da região cefálica, o Pb e o Cd demonstraram redução

significativamente progressiva com o aumento da concentração, mas ao diferenciar as regiões cefálicas, apenas o Pb demonstrou esse efeito. O grupo de mistura Pb+Cd+PFOA está afetando uma porção mais extensa de tecido e o diencéfalo, mesencéfalo e r7 foram significativamente afetados por todas as misturas, mas os compostos isolados não apresentaram efeito significativo na redução observada nas misturas (FIGURA 7).

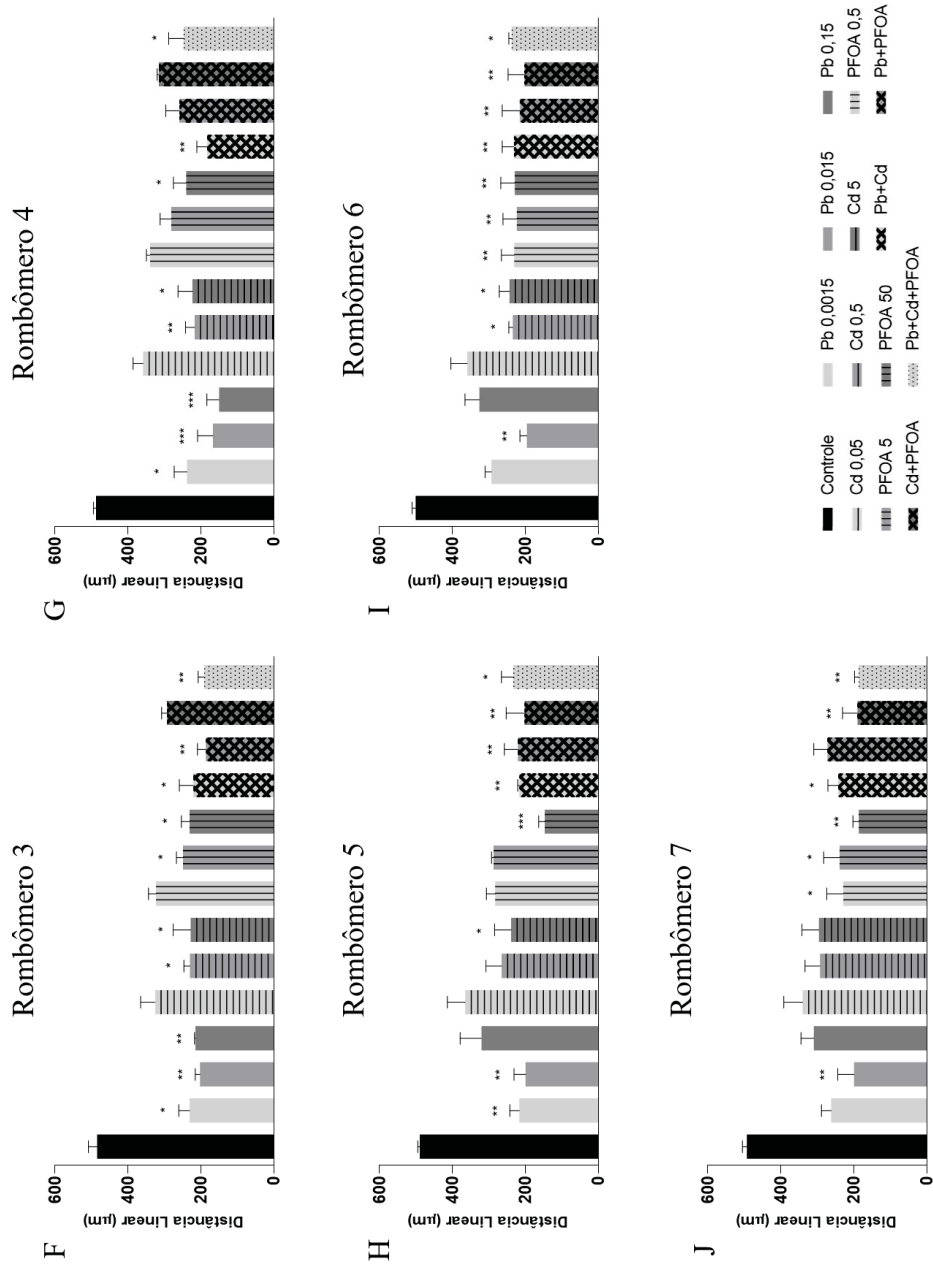
Os resultados obtidos sobre a distância linear de migração das células da crista neural estão resumidos no quadro 2.

FIGURA 6 - DISTÂNCIA LINEAR DE MIGRAÇÃO DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10 HH



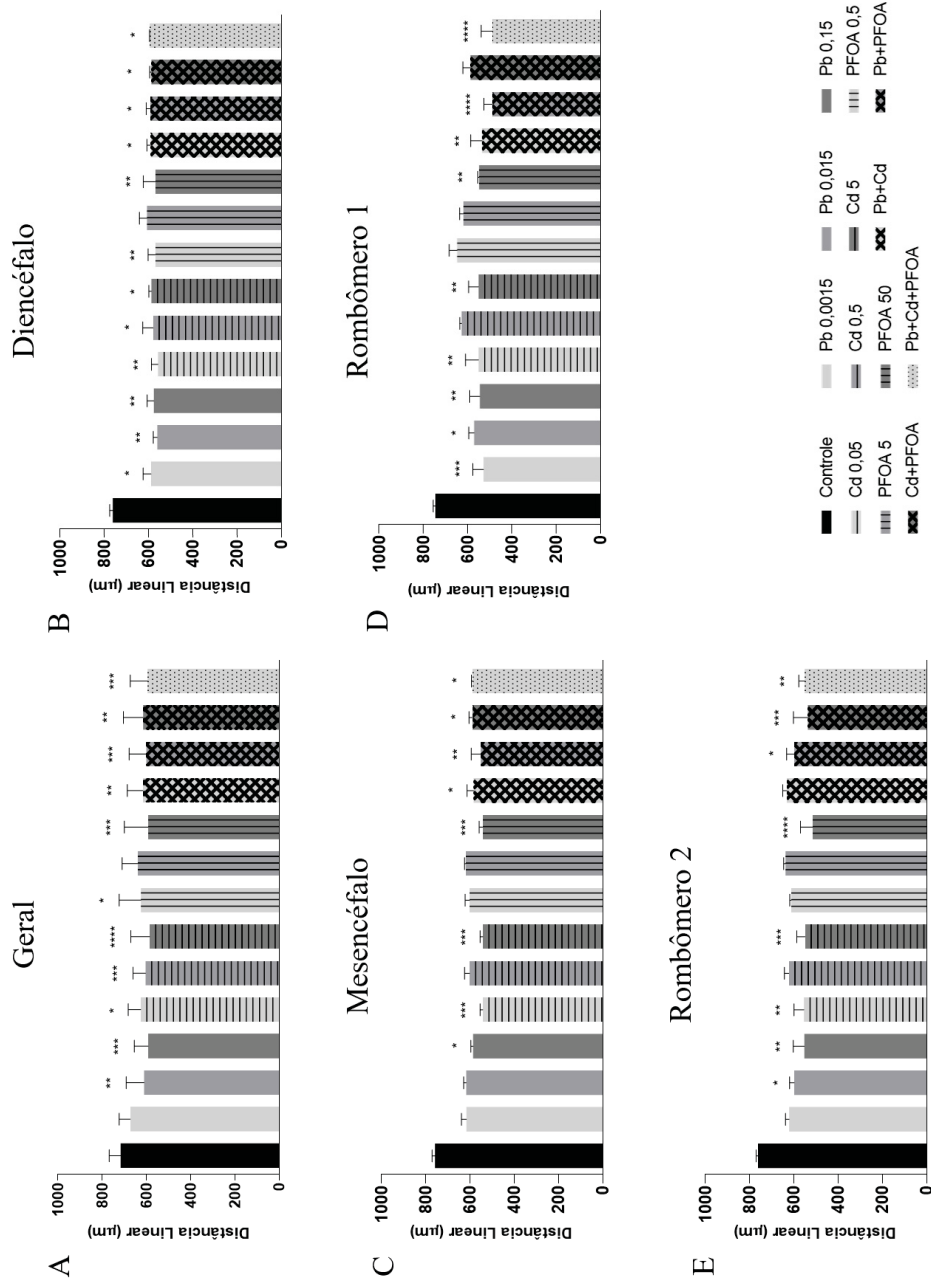
A: Distância linear de migração das células da crista neural na região céfálica geral. B: Prosencéfalo. C: Mesencéfalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

FIGURA 6 (CONTINUAÇÃO) - DISTÂNCIA LINEAR DE MIGRAÇÃO DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10 HH



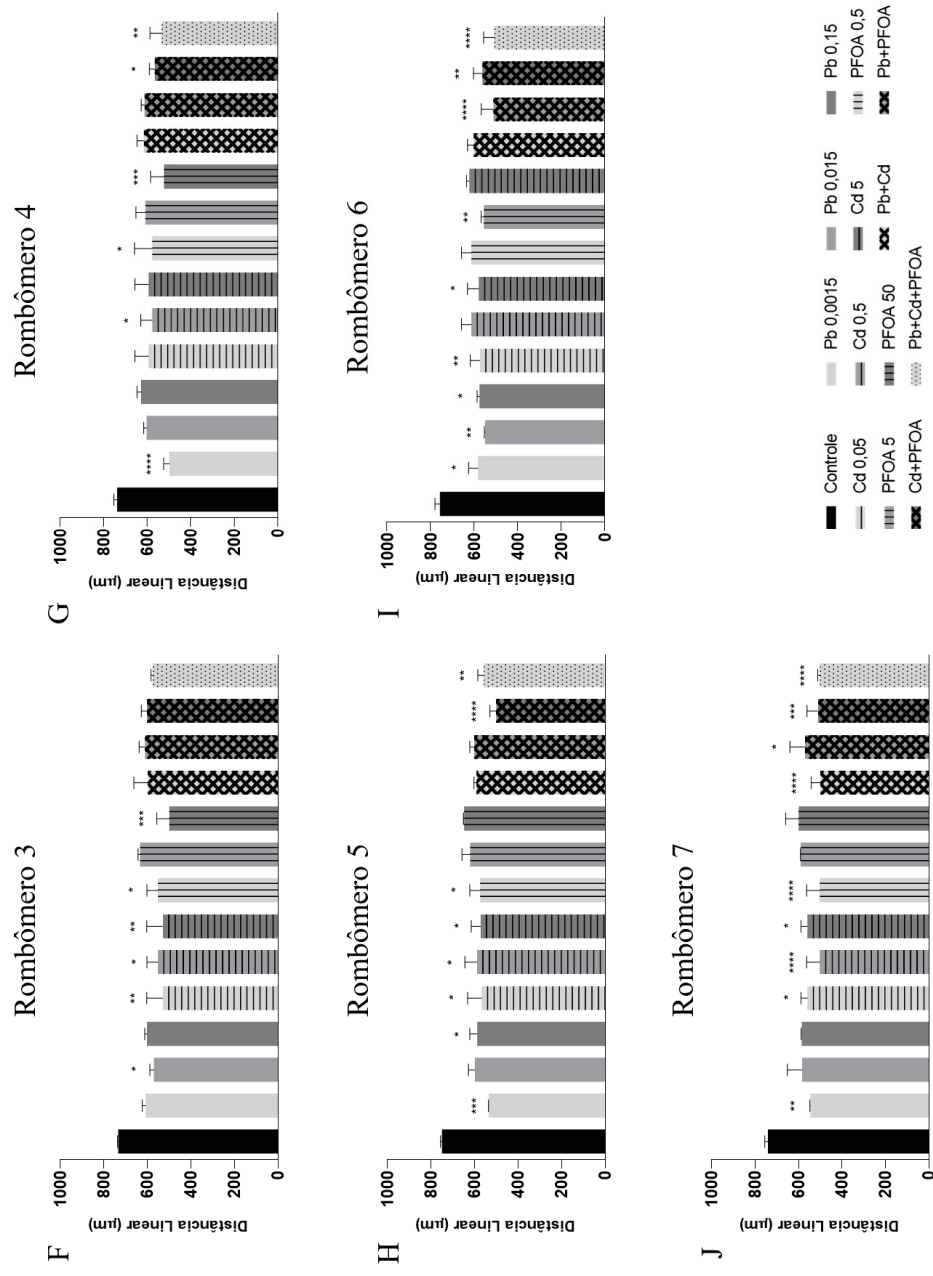
F: Rombômero 3. G: Rombômero 4. H: Rombômero 5. I: Rombômero 6. J: Rombômero 7. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

FIGURA 7 - DISTÂNCIA LINEAR DE MIGRAÇÃO DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14 HH



A: Distância linear de migração das células da crista neural na região cefálica geral. B: Diencephalo. C: Mesencephalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way* ANOVA) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

FIGURA 7 (CONTINUAÇÃO) - DISTÂNCIA LINEAR DE MIGRAÇÃO DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14 HH



F: Rombômero 3. G: Rombômero 4. H: Rombômero 5. I: Rombômero 6. J: Rombômero 7. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

QUADRO 2 – DISTÂNCIA LINEAR DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA

		Pb 0,0015	Pb 0,015	Pb 0,15	Cd 0,05	Cd 0,5	Cd 5	PFOA 0,5	PFOA 5	PFOA 50	Pb+Cd	Pb+PFOA	Cd+PFOA	Pb+Cd+PFOA
10HH	Geral													
	Prosencéfalo													
	Mesencéfalo													
	R1													
	R2													
	R3													
	R4													
	R5													
	R6													
	R7													
14HH	Geral													
	Diencefalo													
	Mesencéfalo													
	R1													
	R2													
	R3													
	R4													
	R5													
	R6													
	R7													

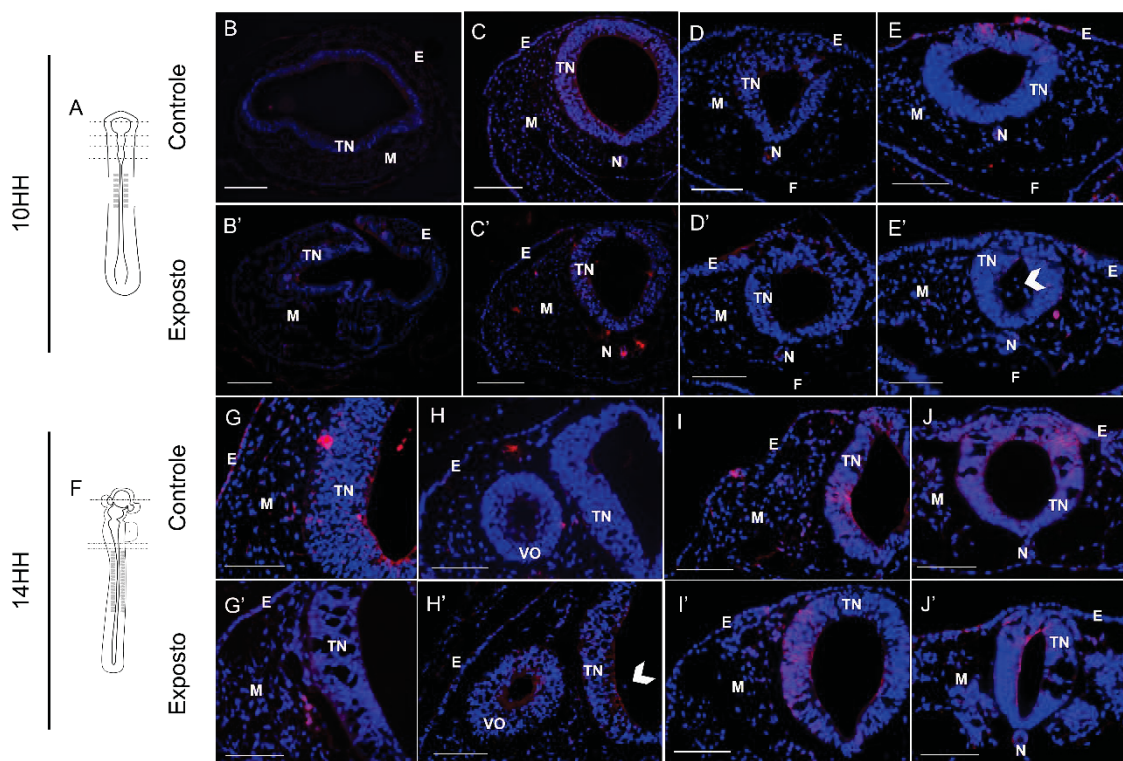
Avaliação da distância linear de migração das células da crista neural na região cefálica geral e por nível axial. Sombreado em vermelho: redução significativa em relação ao controle. Seta: Redução progressiva dentro do grupo do contaminante. FONTE: A autora (2022).

3.2 MOLÉCULAS DE ADESÃO

3.2.1 β -catenina

Ao avaliar a expressão de β -catenina, foi observado que no estágio 10HH houve aumento nos grupos expostos (FIGURA 8B'-E') quando comparados ao controle (FIGURA 8B-E). Já no estágio 14HH foi observado o inverso, ou seja, os embriões expostos aos contaminantes apresentaram redução de β -catenina (FIGURA 8G'-J') em relação ao controle (FIGURA 8G-J). A β -catenina foi localizada principalmente no TN, mas também pôde ser visualizada na ectoderme. Nessa análise, foram visualizadas células destacadas na luz do TN (cabeça de seta) em alguns embriões expostos (FIGURA 8E' e H'), porém negativas para β -catenina.

FIGURA 8 – EXPRESSÃO DE β -CATENINA NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH



Cortes histológicos de embriões de *G. gallus*. A (10HH) e F (14HH): Desenho esquemático mostrando os diferentes níveis axiais representados nas colunas da prancha. Embriões controle: B-E e G-J. Embriões expostos ao Pb 0,015 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: E' e G'. Embriões expostos ao Cd 0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: B' e J'. Embriões expostos ao PFOA 5 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$: D' e H'. Embriões expostos ao Pb+Cd+PFOA: C' e I'. TN: Tubo neural; N: Notocorda; E: Ectoderme; M: Mesênquima; F: Faringe; VO: Vesícula ótica; Cabeça de seta: Células destacadas na luz do TN. Imunofluorescência com anticorpo Anti- β -catenina (vermelho) e marcação nuclear com DAPI (azul). Barras de escala: 100 μm . Fonte: A autora (2022).

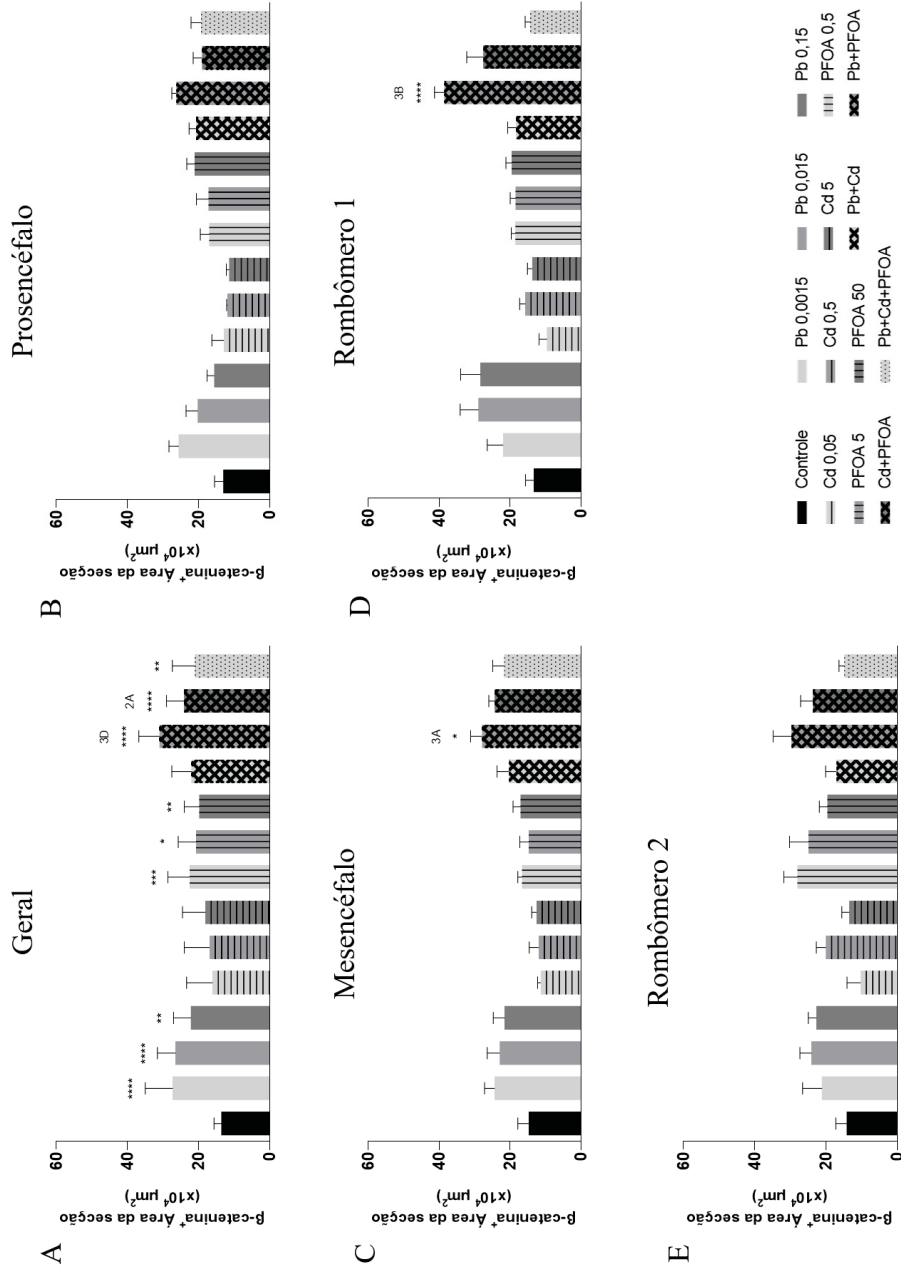
Na avaliação da região cefálica de maneira geral, no estágio 10HH, houve aumento na expressão de β -catenina frente a exposição ao Pb, PFOA e misturas. Porém, ao separar por níveis axiais esses resultados são diluídos, sendo que apenas o Pb na menor concentração apresentou aumento significativo em r4 e r5 e na concentração intermediária em r5. Nesse nível, o Pb demonstrou aumento progressivo com a redução da concentração. O grupo de mistura Pb+PFOA afetou significativamente uma extensão maior de tecido em comparação com o controle, sendo que apenas o PFOA contribuiu com o aumento observado (FIGURA 9).

No estágio 14HH foi observada redução significativa na expressão de β -catenina em quase todos os grupos expostos quando comparados ao controle. O Pb na concentração intermediária não apresentou redução significativa em nenhum nível axial. O nível de r7 é menos afetado pelos contaminantes, uma vez que somente a maior concentração de Cd e PFOA demonstraram redução. O Cd apresentou redução progressiva ao nível de r3 com o aumento da concentração, mas isso não foi observado em nenhum outro nível axial. As misturas afetaram

significativamente a expressão de β -catenina, exceto ao nível de r3 e r7, na exposição com Pb+Cd+PFOA. O Pb contribuiu para essa redução observada nas misturas, especialmente nos grupos Pb+Cd e Pb+PFOA (FIGURA 10).

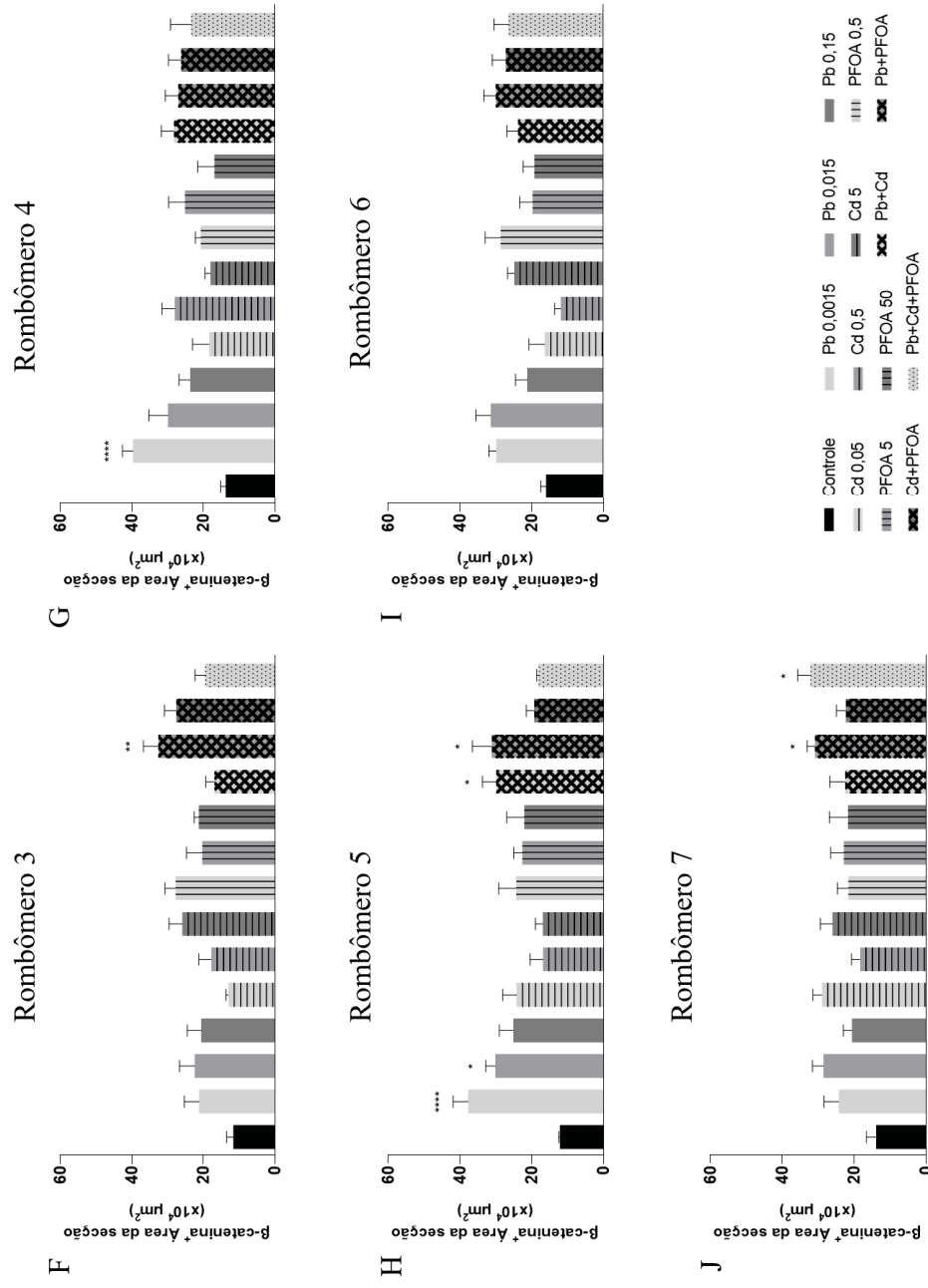
Os resultados obtidos na avaliação da expressão de β -catenina estão resumidos no quadro 3.

FIGURA 9 – β -CATENINA EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10 HH



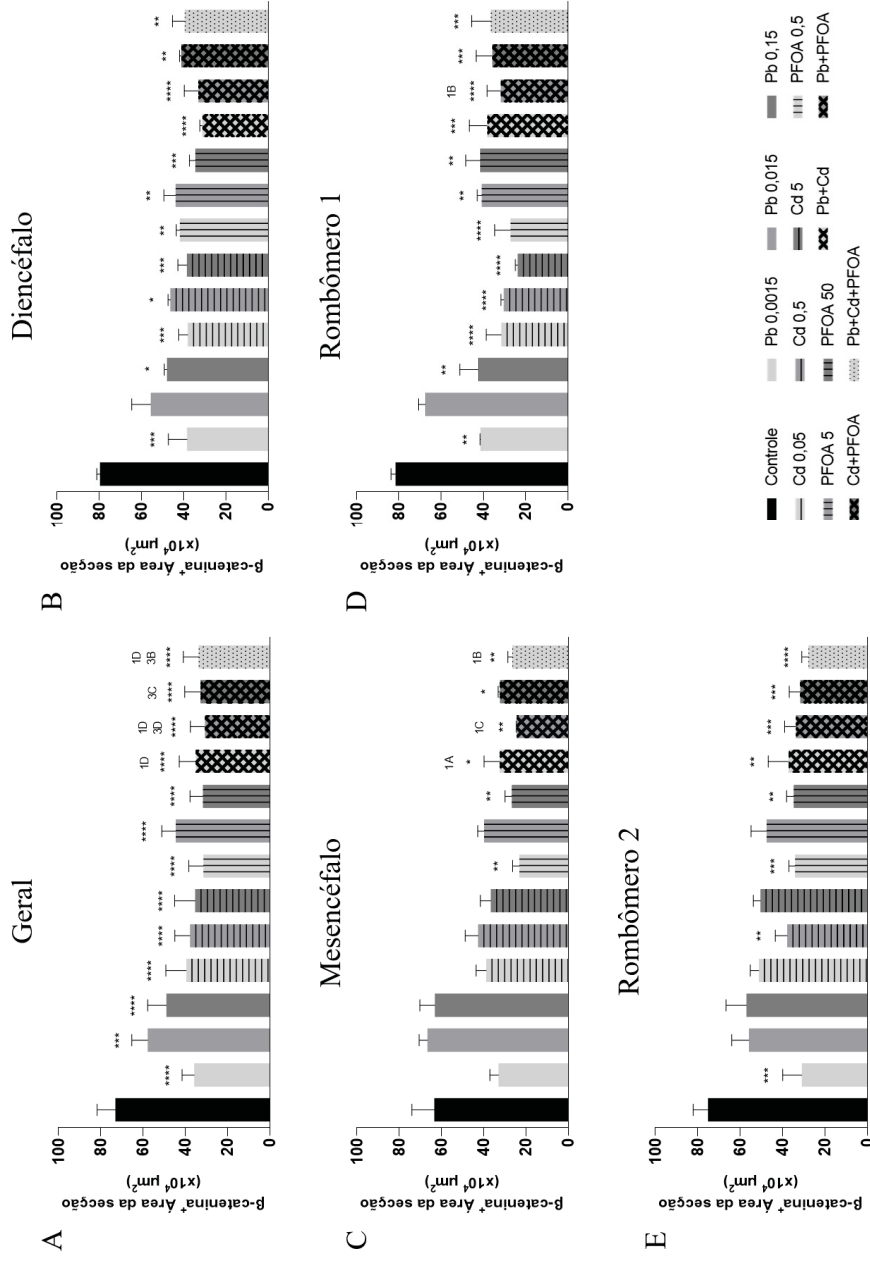
A: β -catenina na região cefálica geral. B: Prosencéfalo. C: Mesencéfalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Os números 2 e 3 representam os grupos de Cd $0,5 \mu g.ml^{-1}$ e PFOA $5 ng.ml^{-1}$, respectivamente e as letras A, B e D indicam significância estatística de $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,0001$, respectivamente. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

FIGURA 9 (CONTINUAÇÃO) – β -CATENINA EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10 HH



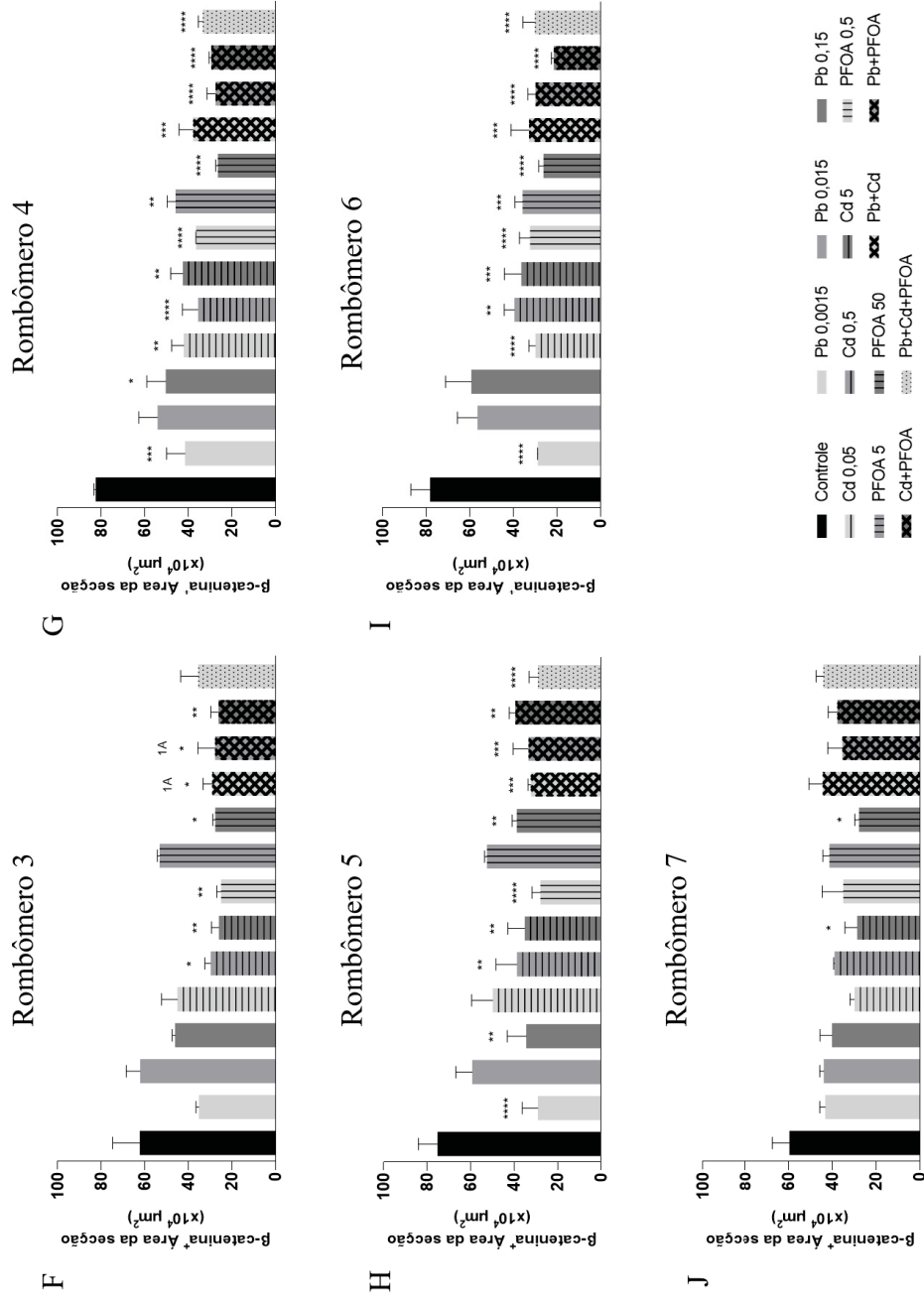
F: Rombômero 3. G: Rombômero 4. H: Rombômero 5. I: Rombômero 6. J: Rombômero 7. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way* ANOVA) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

FIGURA 10 – β -CATENINA EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14 HH



A: β -catenina na região céfálica geral. B: Diencefalo. C: Mesencefalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Os números 1 e 3 representam os grupos de Pb 0,015 $\mu g \cdot ml^{-1}$ e PFOA 5 $ng \cdot ml^{-1}$, respectivamente e as letras A, B, C e D indicam significância estatística de $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.0001$, respectivamente. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way* ANOVA) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

FIGURA 10 (CONTINUAÇÃO) – β -CATENINA EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14 HH



F: Rombômero 3, G: Rombômero 4, H: Rombômero 5, I: Rombômero 6, J: Rombômero 7. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. O número 1 representa o grupo de Pb 0,015 $\mu g \cdot ml^{-1}$ e a letra A indica significância estatística de $p < 0.05$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way* ANOVA) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

QUADRO 3 – EXPRESSÃO DE β -CATENINA NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA

		Pb 0,0015	Pb 0,015	Pb 0,15	Cd 0,05	Cd 0,5	Cd 5	PFOA 0,5	PFOA 5	PFOA 50	Pb+Cd	Pb+PFOA	Cd+PFOA	Pb+Cd+PFOA
10HH	Geral											↑PFOA	↑Cd	
	Prosencéfalo													
	Mesencéfalo											↑PFOA		
	R1											↑PFOA		
	R2													
	R3													
	R4													
	R5													
	R6													
	R7													
14HH	Geral										↓Pb	↓Pb; PFOA	↓Cd	↓Pb; PFOA
	Diencefalo													
	Mesencéfalo										↓Pb	↓Pb		↓Pb
	R1											↓Pb		
	R2													
	R3										↓Pb	↓Pb		
	R4													
	R5													
	R6													
	R7													

Avaliação da expressão de β -catenina na região cefálica geral e por nível axial. Sombreado em vermelho: redução significativa em relação ao controle. Sombreado em verde: aumento significativo em relação ao controle. Seta horizontal: Efeito progressivo dentro do grupo do contaminante. Seta vertical seguida do nome do contaminante: Efeito significativo em relação ao contaminante indicado. FONTE: A autora (2022).

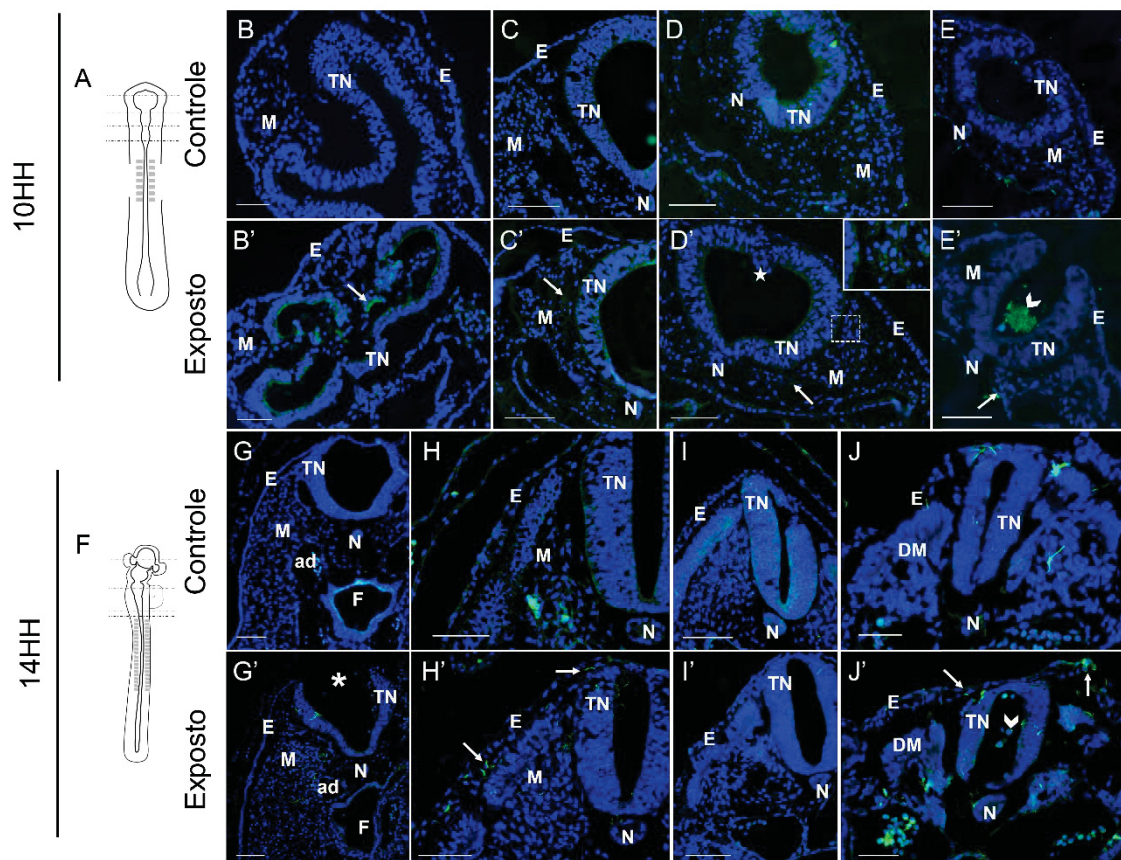
3.2.2 N-caderina

No estágio 10HH foi observado aumento na expressão de N-caderina nos grupos expostos (FIGURA 11B'-E') quando comparados aos seus respectivos controles (FIGURA 11B-E). Nesse estágio não foi identificado TN anormalmente aberto, porém nos expostos observou-se a expressão de N-caderina nas células do TN (FIGURA 11B'-D') e também nas células do mesênquima que circunda o tubo (setas) (FIGURA 11C' e D'). Além disso, em alguns cortes, as células do ápice do TN estavam adentrando o TN (estrela) (FIGURA 11D') e formaram grandes grupamentos de células N-caderina + na luz do TN (cabeça de seta) (FIGURA 11E').

No estágio 14HH, diferente do observado no estágio anterior, houve redução de N-caderina nos grupos expostos (FIGURA 11G'-J') quando comparados ao controle (FIGURA 11G-J). Alguns embriões, independente do contaminante, apresentaram TN aberto (asterisco) (FIGURA 11G'). Houve marcação positiva para N-caderina no TN e no mesênquima (seta) (FIGURA 11G' e H') e também nas células destacadas na luz do TN (cabeça de seta) (FIGURA 11J').

Em ambos os estádios não foi observada relação qualitativa entre a intensidade de fluorescência da N-caderina com os diferentes níveis axiais no eixo cefálico dos embriões.

FIGURA 11 – EXPRESSÃO DE N-CADERINA NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH



Cortes histológicos de embriões de *G. gallus*. A (10HH) e F (14HH): Desenho esquemático mostrando os diferentes níveis axiais representados nas colunas da prancha. Embriões controle: B-E e G-J. Embriões expostos ao Pb 0,015 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: B' e G'. Embriões expostos ao Cd 0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: D' e H'. Embriões expostos ao PFOA 5 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$: C' e I'. Embriões expostos ao Pb+Cd+PFOA: E' e J'. TN: Tubo neural; N: Notocorda; E: Ectoderme; M: Mesênquima; F: Faringe; DM: Dermatomiótomo; ad: Aorta dorsal; Cabeça de seta: Células destacadas na luz do TN; *: TN anormalmente aberto; Seta: Marcação no ectoderma. Em D' quadro pontilhado indica localização da imagem em maior aumento. Imunofluorescência com anticorpo Anti-N-caderina (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul). Barras de escala: 100 μm . Fonte: A autora (2022).

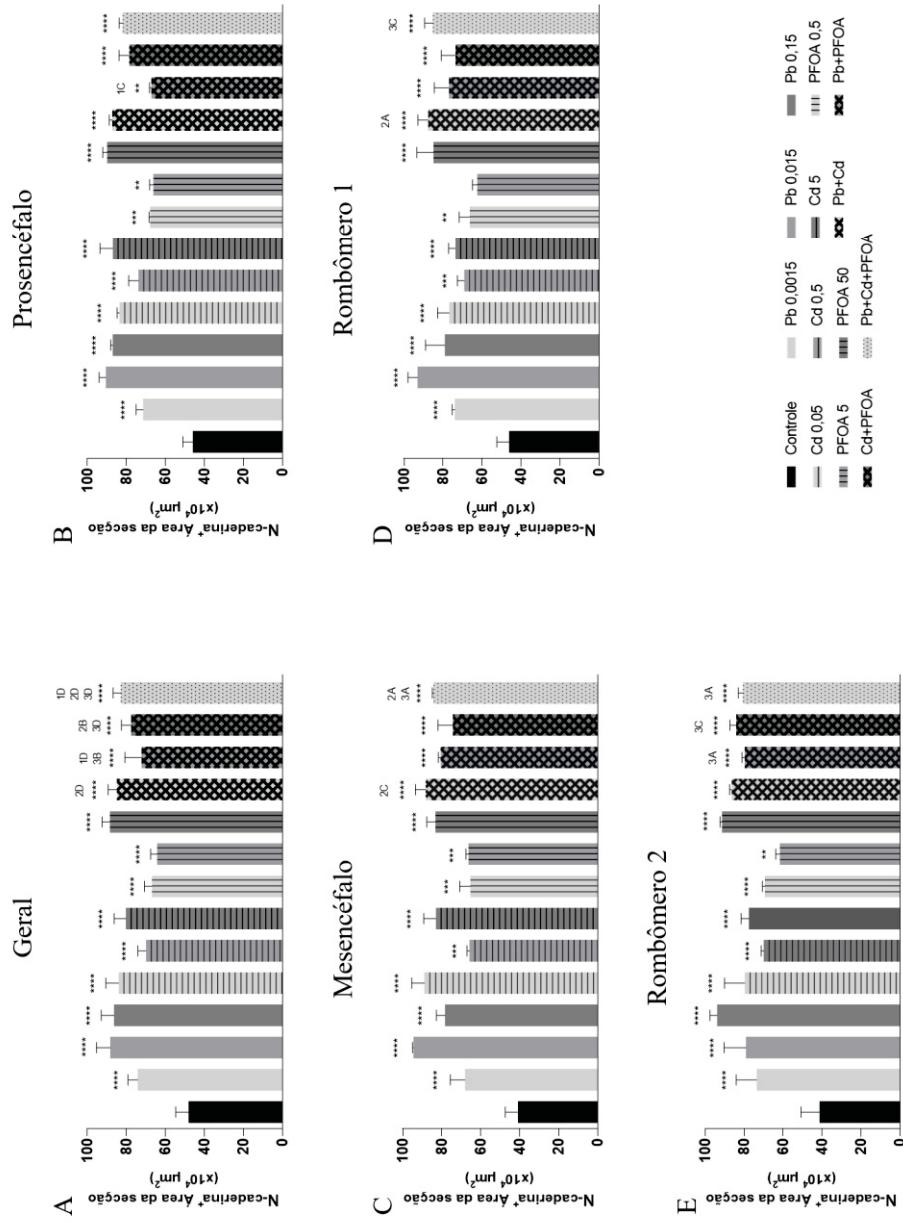
Ao avaliar o estágio 10HH foi possível verificar o aumento na expressão de N-caderina em todos os grupos expostos quando comparados ao controle. O rombômero 6 foi o nível axial menos afetado pelos contaminantes. Além disso, o PFOA nas concentrações de 0,5 e 5 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$ perturbaram a expressão da N-caderina em apenas 5 dos 9 níveis axiais avaliados, sendo que as regiões mais anteriores foram mais afetadas pelo contaminante. Todas as misturas apresentaram aumento em relação ao controle. Na mistura Pb+Cd foi observada contribuição significativa do Cd para o aumento na expressão de N-caderina, enquanto a mistura Pb+PFOA foi afetada tanto

pelo Pb quanto pelo PFOA. Porém, o Pb contribuiu para o aumento em um maior número de níveis axiais, de modo similar o grupo Cd+PFOA recebeu a contribuição dos dois contaminantes, sendo que isso foi mais evidente em relação ao PFOA. A mistura Pb+Cd+PFOA foi significativamente afetada por todos os contaminantes, sendo que o PFOA também afetou mais níveis axiais (FIGURA 12).

No estágio 14HH houve redução significativa na expressão de N-caderina em todos os grupos expostos quando comparados ao controle. Porém, as menores concentrações de Pb, Cd e PFOA afetaram uma menor extensão da região cefálica. O mesencéfalo apresentou redução significativa frente à exposição a quase todos os grupos de exposição, exceto ao Cd na menor concentração. As misturas Cd+PFOA e Pb+Cd+PFOA demonstraram maior impacto nos diferentes níveis axiais, sendo que na primeira o Cd contribuiu significativamente na redução, enquanto na segunda, tanto Pb quanto Cd demonstraram a mesma participação (FIGURA 13).

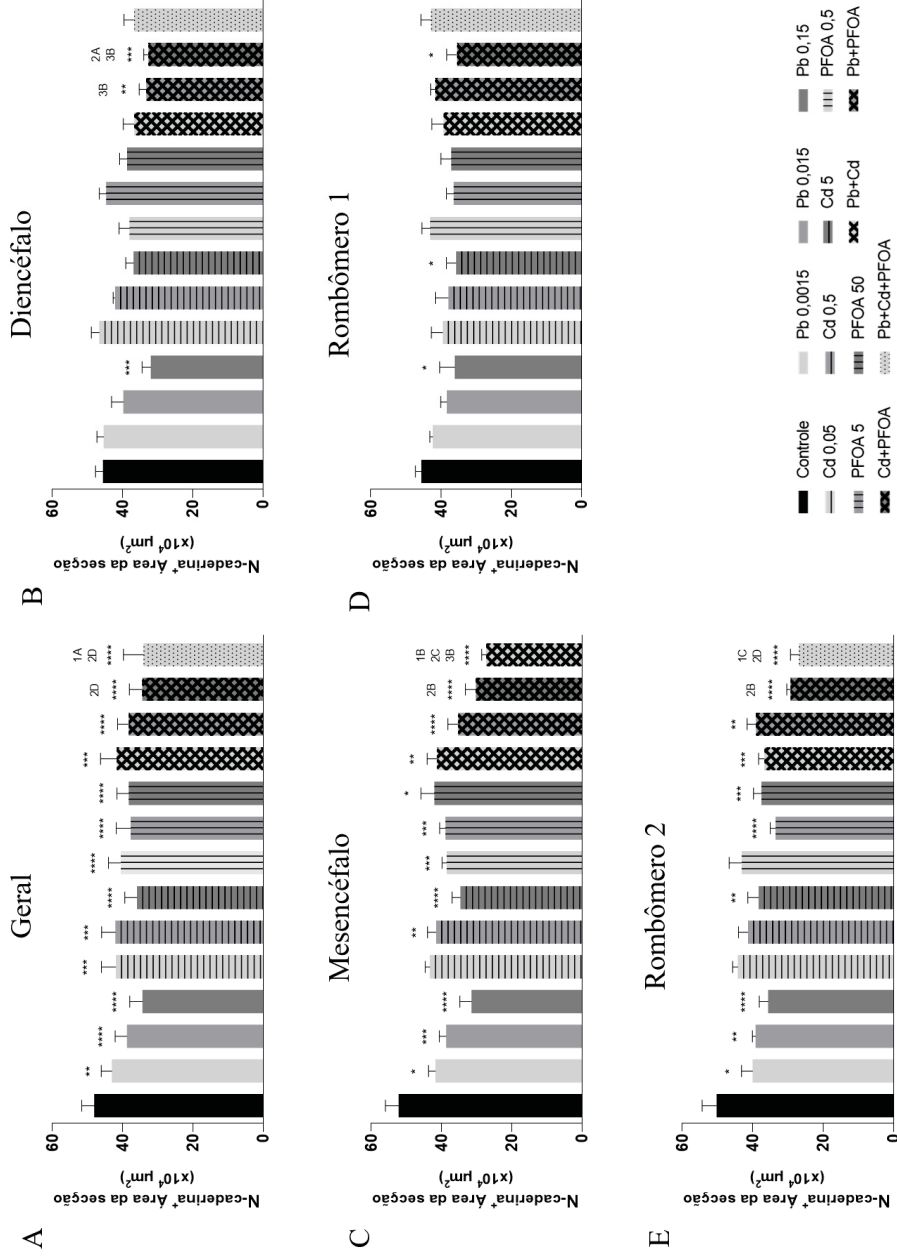
Os resultados obtidos na avaliação quantitativa da expressão de N-caderina estão resumidos no quadro 4.

FIGURA 12 – N-CADERINA EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10 HH



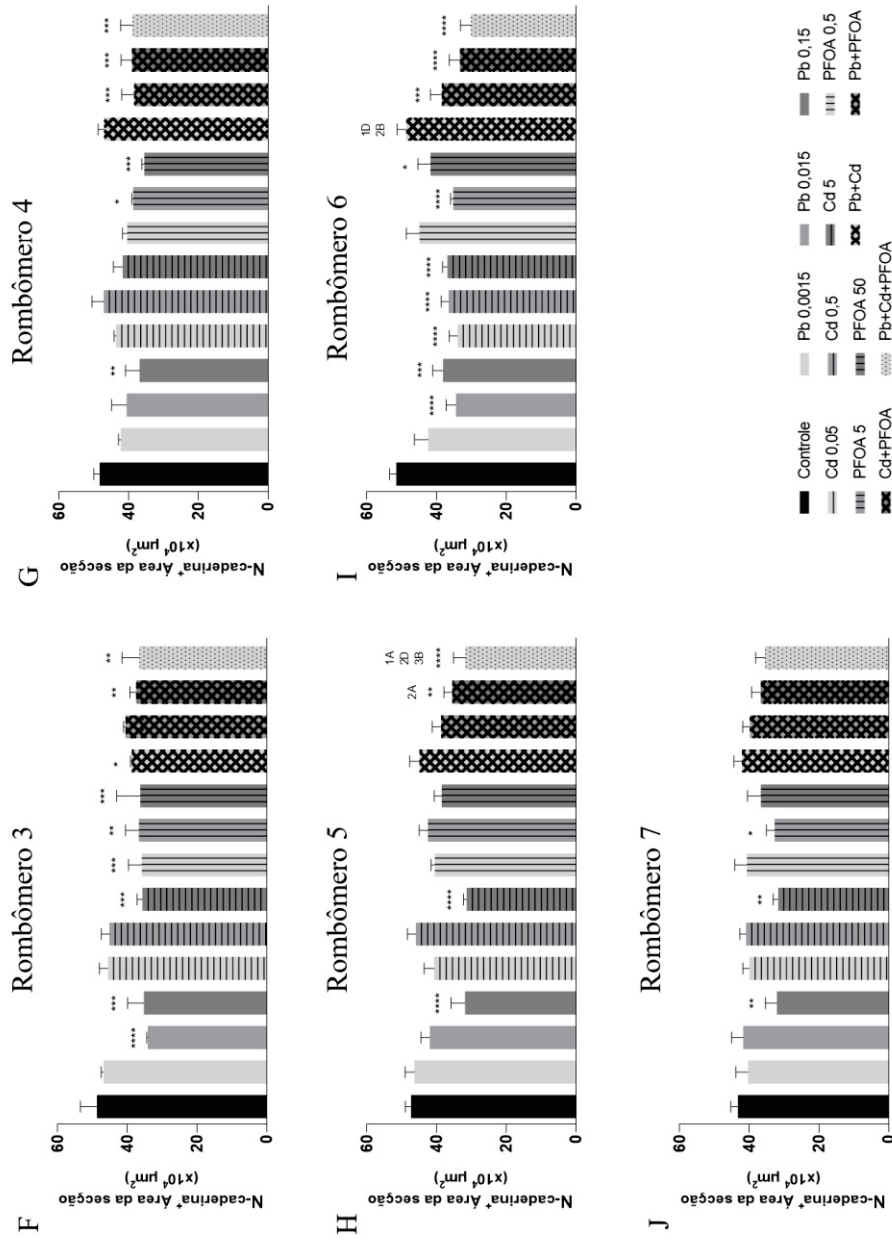
A: N-caderina na região céflica geral. B: Diencéfalo. C: Mesencéfalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Os números 1, 2 e 3 representam os grupos de Pb 0,015 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Cd0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e PFOA 5 ng.ml^{-1} , respectivamente e as letras A, B, C e D indicam significância estatística de $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.0001$, respectivamente. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

FIGURA 13 – N-CADERINA EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14 HH



A: N-caderina na região céflica geral. B: Diencéfalo. C: Mesencéfalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Os números 1, 2 e 3 representam os grupos de Pb 0,015 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Cd0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e PFOA 5 ng.ml^{-1} , respectivamente e as letras A, B e D indicam significância estatística de $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.0001$, respectivamente. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way* ANOVA) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

FIGURA 13 (CONTINUAÇÃO) – N-CADERINA EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14 HH



F: Rombômero 3. G: Rombômero 4. H: Rombômero 5. I: Rombômero 6. J: Rombômero 7. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Os números 1 e 2 representam os grupos de Pb 0,015 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e Cd 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e as letras B e C indicam significância estatística de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way* ANOVA) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

QUADRO 4 – EXPRESSÃO DE N-CADERINA NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA

		Pb 0,0015	Pb 0,015	Pb 0,15	Cd 0,05	Cd 0,5	Cd 5	PFOA 0,5	PFOA 5	PFOA 50	Pb+Cd	Pb+PFOA	Cd+PFOA	Pb+Cd+PFOA
10HH	Geral										↑Cd	↑Pb; PFOA	↑Cd; PFOA	↑Pb; Cd; PFOA
	Prosencéfalo											↑Pb		
	Mesencéfalo										↑Cd			↑Cd; PFOA
	R1										↑Cd			↑PFOA
	R2											↑PFOA	↑PFOA	↑PFOA
	R3										↑Cd		↑PFOA	↑PFOA
	R4													↑PFOA
	R5											↑Pb		↑Cd; PFOA
	R6											↑Pb		
	R7											↑Pb		
14HH	Geral												↓Cd	↓Pb; Cd
	Diencefalo											↓PFOA	↓Cd; PFOA	
	Mesencéfalo												↓Cd	↓Pb; Cd; PFOA
	R1													
	R2												↓Cd	↓Pb; Cd
	R3													
	R4													
	R5												↓Cd	↓Pb; Cd; PFOA
	R6										↓Pb; Cd			
	R7													

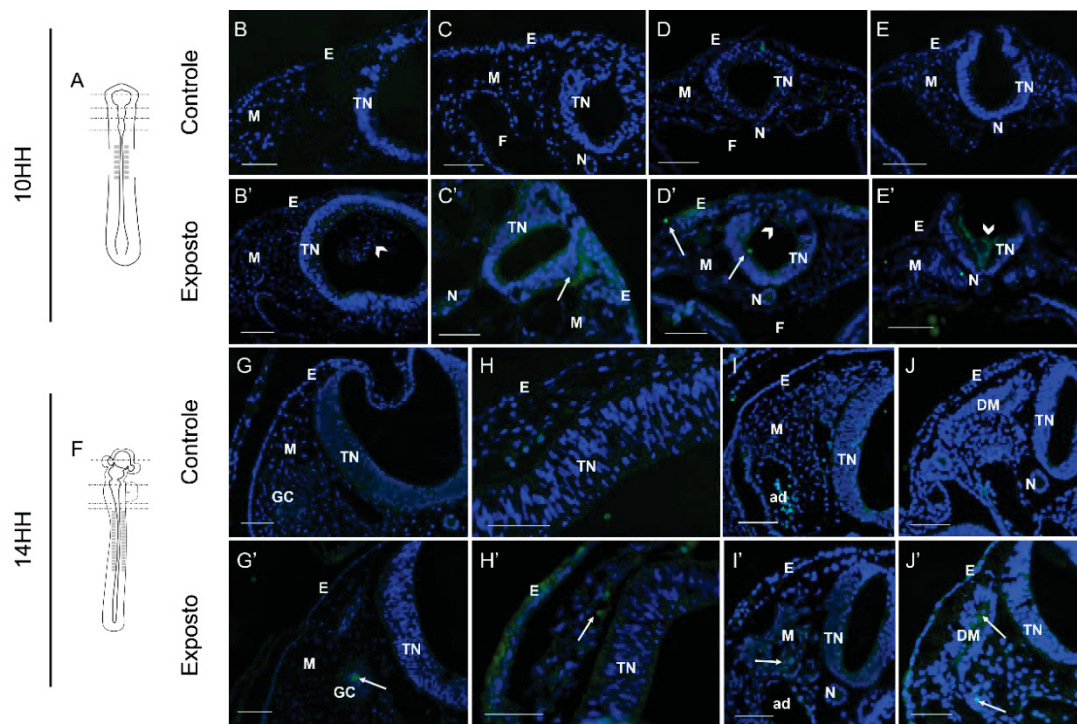
Avaliação da expressão de N-caderina na região cefálica geral e por nível axial. Sombreado em vermelho: Redução significativa em relação ao controle. Sombreado em verde: Aumento significativo em relação ao controle. Seta horizontal: Efeito progressivo dentro do grupo do contaminante. Seta vertical seguida do nome do contaminante: Efeito significativo em relação ao contaminante indicado. FONTE: A autora (2022).

3.2.3 E-caderina

Foi observada redução na expressão de E-caderina, no estágio 10HH, após a exposição aos contaminantes (FIGURA 14B'-E') quando comparadas ao controle (FIGURA 14B-E). Em quase todos os níveis axiais foram observadas células na luz do TN (FIGURA 14B', D' e E'), porém apenas nos níveis do 5° ao 7° rombômero essas células eram positivas para E-caderina (FIGURA 14B', D'-E'). A marcação para E-caderina foi identificada principalmente no TN e ectoderme, sendo que algumas células estavam presentes no mesoderme.

No estágio 14HH, foi observada que a marcação estava mais acentuada quando comparada ao estágio 10HH. Além disso, houve redução na expressão da E-caderina nos expostos (FIGURA 14G'-J') em relação aos embriões controle (FIGURA 14G-J). Não foram identificadas células na luz do TN, mas como observado no estágio anterior, as células E-caderina + estavam concentradas tanto no TN quanto no ectoderme (FIGURA 14G'-J'). Porém, também foram observadas células positivas nos primórdios dos gânglios cranianos (FIGURA 14G') e dermatomiótomo (FIGURA 14 J'), quando esses eram visíveis.

FIGURA 14 – EXPRESSÃO DE E-CADERINA NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NOS ESTÁDIOS 10HH E 14HH



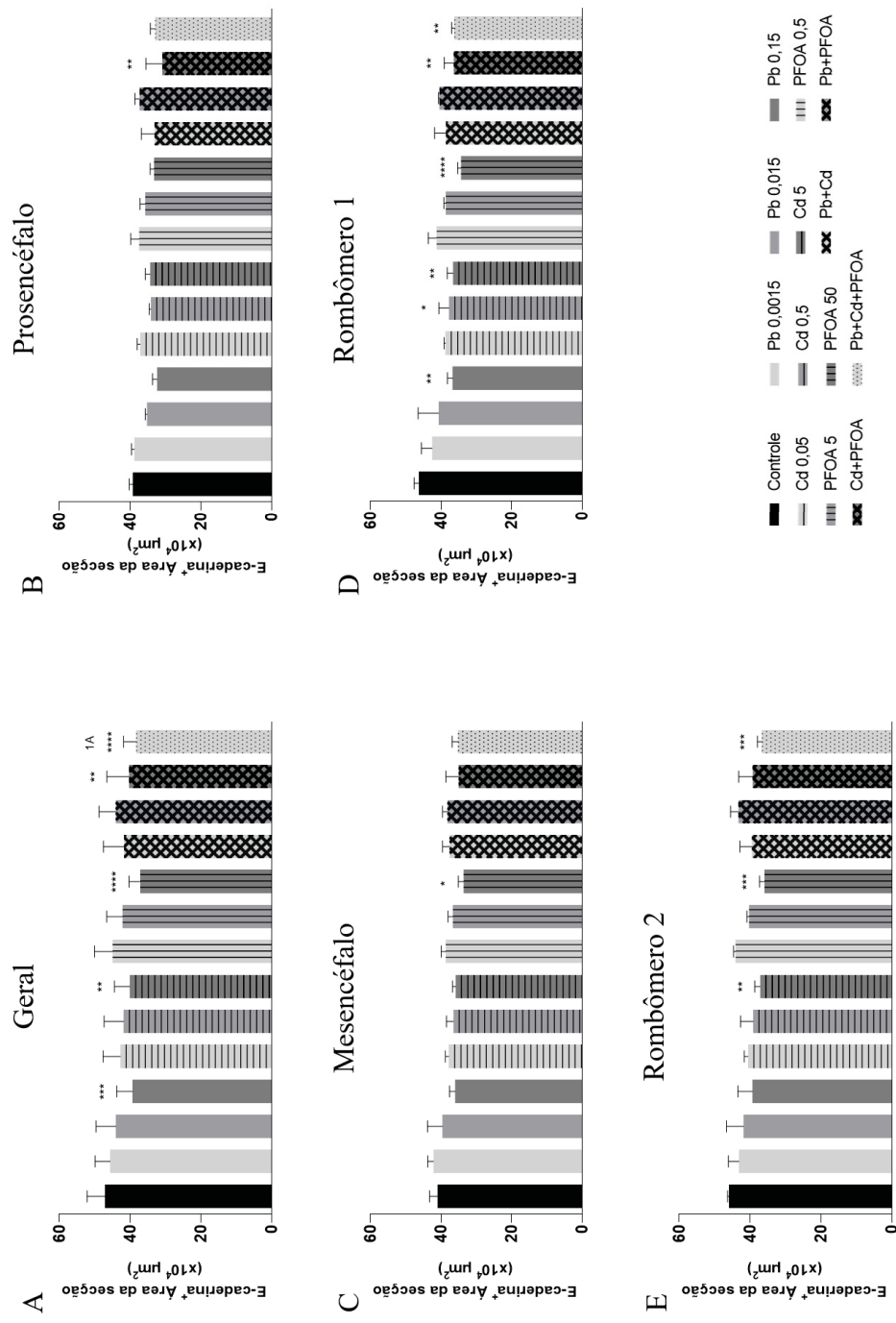
Cortes histológicos de embriões de *G. gallus*. A (10HH) e F (14HH): Desenho esquemático mostrando os diferentes níveis axiais representados nas colunas da prancha. Embriões controle: B-E e G-J. Embriões expostos ao Pb 0,015 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: B' e G'. Embriões expostos ao Cd 0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$: D' e H'. Embriões expostos ao PFOA 5 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$: C' e I'. Embriões expostos ao Pb+Cd+PFOA: E' e J'. TN: Tubo neural; N: Notocorda; E: Ectoderme; M: Mesênquima; ad: Aorta dorsal; DM: Dermatomiótomo; GC: Primórdio do gânglio craniano; Cabeça de seta: Células destacadas na luz do TN; Seta: Marcação positiva. Imunofluorescência com anticorpo Anti-E-caderina (verde) e marcação nuclear com DAPI (azul). Barras de escala: 100 μm . Fonte: A autora (2022).

No estágio 10HH, a maior concentração de Pb, Cd e PFOA demonstrou reduzir significativamente a expressão de E-caderina, principalmente em r1, r6 e r7. Ao nível do 1º rombômero, o Cd demonstrou efeito dependente da concentração. Além disso, apenas as misturas Cd+PFOA e Pb+Cd+PFOA foram significativamente reduzidas em quase todos os níveis axiais. Porém, apenas o grupo Pb+Cd+PFOA foi significativamente afetado por Pb e Cd, mas o Pb interferiu nos r4 ao 7 e o Cd apenas no r7.

No estágio 14HH, todos os contaminantes afetaram os diferentes níveis axiais, porém essa incidência foi menor para o PFOA nas concentrações de 0,5 e 5 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$, sendo o 6º rombômero o menos afetado. O Pb teve efeito dependente da concentração no diencéfalo, 1º e 4º rombômeros e o Cd em r1. Todos os grupos de mistura mostraram redução significativa em comparação ao controle, sendo que as misturas Pb+Cd e Pb+PFOA tiveram a contribuição dos dois contaminantes isolados que as compunham e as misturas Cd+PFOA e Pb+Cd+PFOA tiveram contribuição significativa especialmente do PFOA.

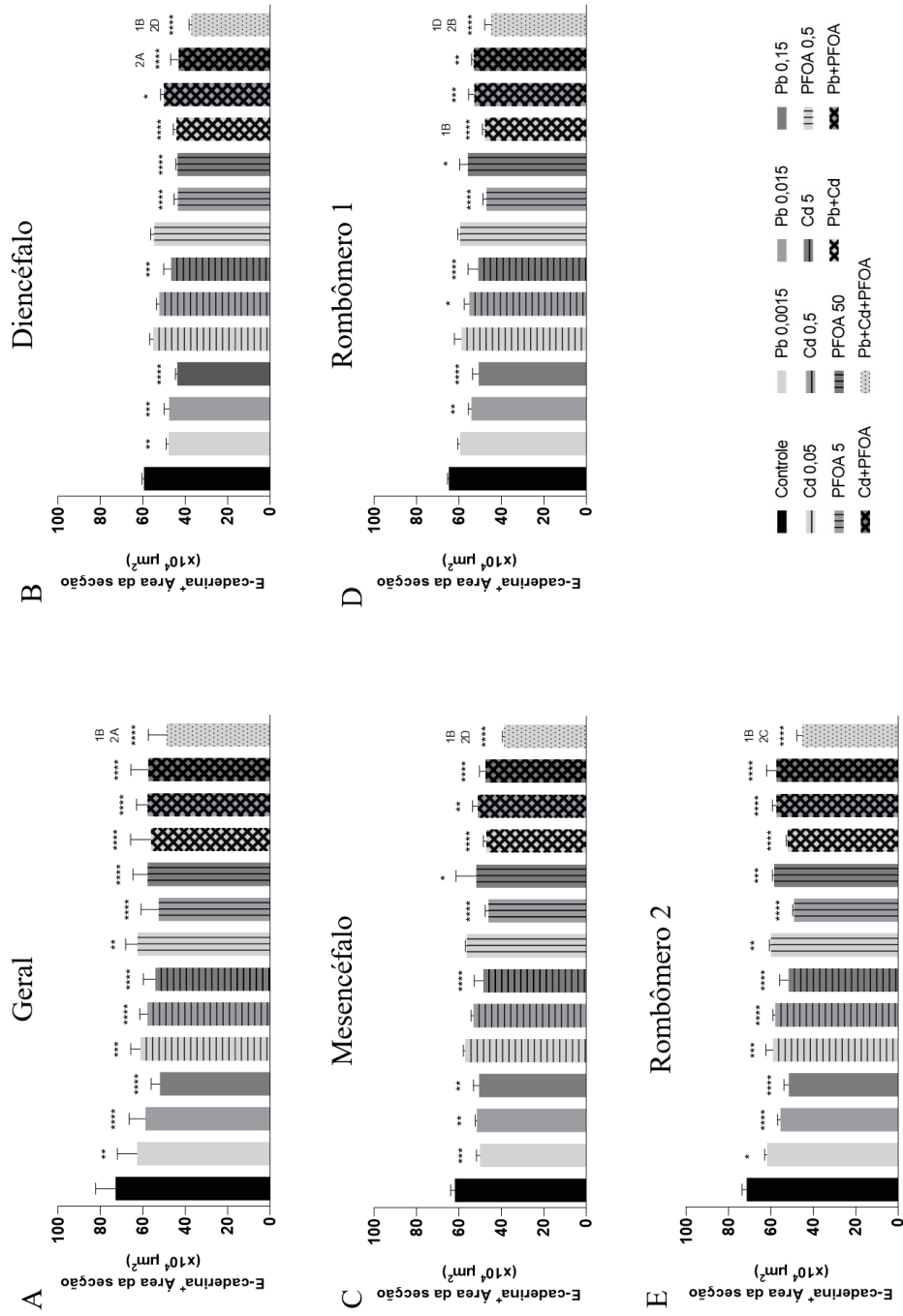
Os resultados quantitativos da expressão de E-caderina estão resumidos no quadro 5.

FIGURA 15 – E-CADERINA EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10 HH



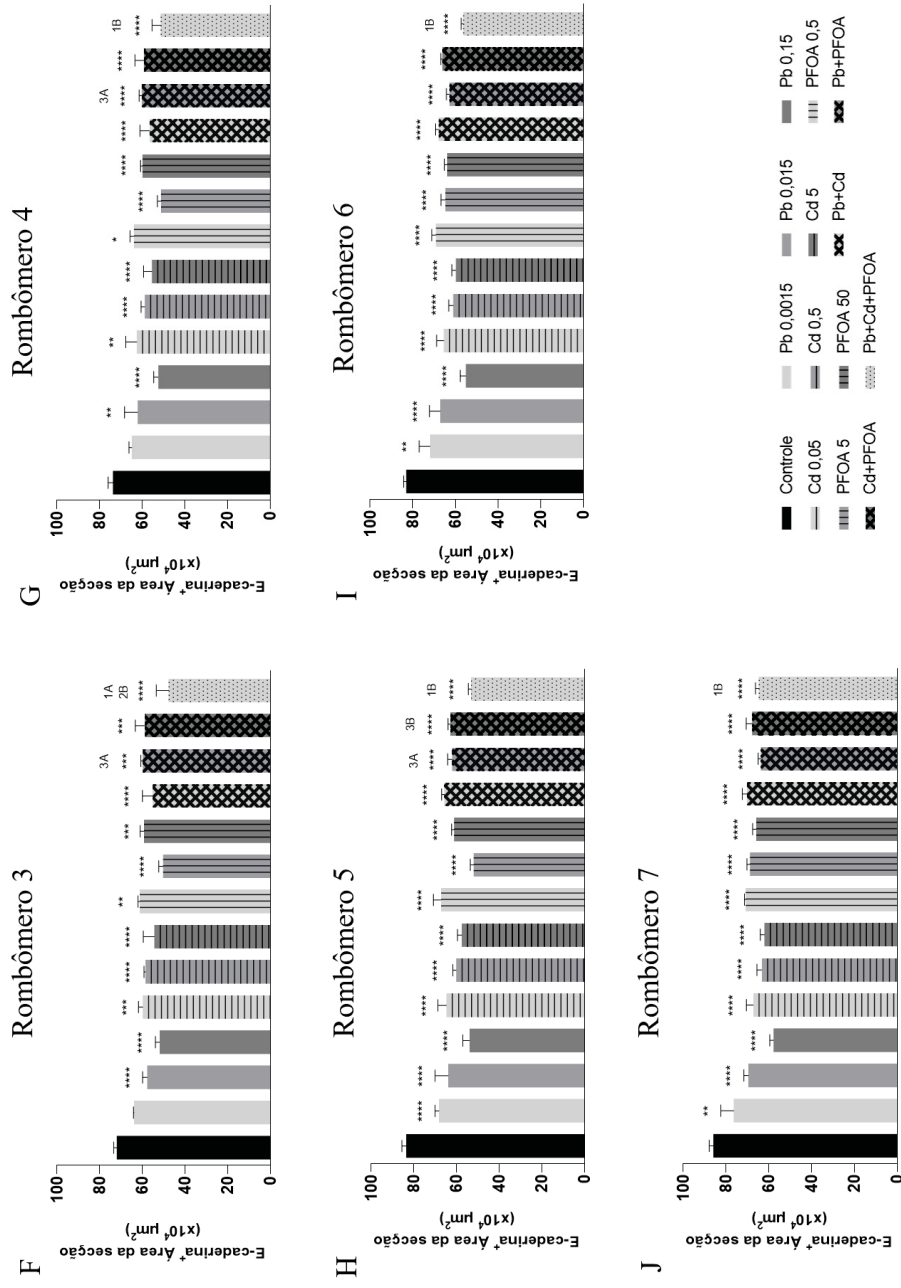
A: E-caderina na região cefálica geral. B: Diencéfalo. C: Mesencéfalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. O número 1 representa o grupo de Pb 0,015 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ e a letra A indica significância estatística de $p < 0.05$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

FIGURA 16 – E-CADERINA EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14 HH



A: E-caderina na região céflica geral. B: Diencefalo. C: Mesencefalo. D: Rombômero 1. E: Rombômero 2. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Os números 1 e 2 representam os grupos de Pb 0,015 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e Cd 0,5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, as letras A, B, C e D indicam significância estatística de $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

FIGURA 16 (CONTINUAÇÃO) – E-CADERINA EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 14 HH



F: Rombômero 3. G: Rombômero 4. H: Rombômero 5. I: Rombômero 6. J: Rombômero 7. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Os números 1 e 3 representam os grupos de Pb 0,015 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e PFOA 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e as letras A e B indicam significância estatística de $p < 0.05$ e $p < 0.01$, respectivamente. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. ANOVA de duas vias (*Two-way ANOVA*) com pós teste de Tukey. Fonte: A autora (2022).

QUADRO 5 – EXPRESSÃO DE E-CADERINA NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS* NO ESTÁDIO 10HH E 14HH, FRENTE A EXPOSIÇÃO AO Pb, Cd E PFOA, ISOLADOS E EM MISTURA

		Pb 0,0015	Pb 0,015	Pb 0,15	Cd 0,05	Cd 0,5	Cd 5	PFOA 0,5	PFOA 5	PFOA 50	Pb+Cd	Pb+PFOA	Cd+PFOA	Pb+Cd+PFOA
10HH	Geral													↓Pb
	Prosencéfalo													
	Mesencéfalo													
	R1													
	R2													
	R3													
	R4													↓Pb
	R5													↓Pb
	R6													↓Pb
	R7													↓Pb; Cd
14HH	Geral										↓Pb; Cd	↓Pb; PFOA	↓Cd; PFOA	↓Pb; Cd; PFOA
	Diencefalo											↓Pb		
	Mesencéfalo										↓Cd			↓Cd; PFOA
	R1										↓Cd			↓PFOA
	R2											↓PFOA	↓PFOA	↓PFOA
	R3										↓Cd		↓PFOA	↓PFOA
	R4													
	R5										↓Pb			↓PFOA
	R6										↓Pb			↓Cd; PFOA
	R7											↓Pb		

Avaliação da expressão de E-caderina na região cefálica geral e por nível axial. Sombreado em vermelho: redução significativa em relação ao controle. Seta horizontal: Efeito progressivo dentro do grupo do contaminante. Seta vertical seguida do nome do contaminante: Efeito significativo em relação ao contaminante indicado. FONTE: A autora (2022).

4 DISCUSSÃO

O desenvolvimento embrionário normal pode ser perturbado por vários estressores, como contaminantes, em um estágio crítico da embriogênese, resultando em anomalias do desenvolvimento (SHARMA *et al.*, 2019). No presente capítulo foi sugerido que múltiplas facetas do desenvolvimento estariam sujeitas aos efeitos negativos dos contaminantes e, portanto, tentou-se elucidar alguns dos mecanismos celulares que poderiam explicar as alterações craniofaciais observadas em embriões de *G. gallus* descritas no capítulo II. Como as células da CN cefálicas refletem a configuração metamérica da cabeça dos vertebrados (KURATANI; KUSAKABE; HIRASAWA, 2018; YORK; MCCAULEY, 2020) qualquer distúrbio nessa população pode ser responsável por essas alterações.

No estágio 10HH, na região cefálica, as células da CN já iniciaram sua migração, enquanto no estágio 14HH elas cessaram sua migração ventral e começaram a agregação para formar os futuros gânglios cranianos (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; MCKEOWNN; WALLACE; ANDERSON., 2003). Foi observado, neste trabalho, uma diminuição no número de células da CN cefálica após a exposição aos contaminantes, principalmente no estágio 10HH.

Sharma e colaboradores (2019) relacionam a redução no número de células da CN com o aumento na apoptose. Porém, os dados observados no capítulo anterior contradizem essa afirmação, pois houve redução na taxa de morte celular por apoptose. Entretanto, nossos dados não discriminam especificamente as células da CN e por isso podem não representar a real taxa de apoptose exclusivamente para essa população celular. Além da apoptose, a proliferação celular também pode interferir no número das células da CN cefálica (JIAO *et al.*, 2019; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2019).

A migração correta das células da CN depende de uma série de fatores, como a interação célula-célula e/ou célula-matriz (KOONTZ; URRITA; BRONNER, 2022). Nossos resultados indicaram uma redução na distância linear de migração das células da CN, especialmente no estágio 14HH, e que pode ter sido ocasionada pela falta ou excesso de adesão celular e que resultará em defeitos na migração, como sugerido por McKeown, Wallace e Anderson (2013).

Com o objetivo de entender se a adesividade celular e, consequentemente, a transição epitélio-mesenquimal foram afetadas pela exposição aos contaminantes, moléculas de adesão, como β -catenina, N- e E-caderina, foram investigadas. A β -catenina desempenha papel crucial durante o desenvolvimento embrionário e nas células da CN, já que atua como ligante entre a caderina e o citoesqueleto e como mediador chave da sinalização da via Wnt canônica (ou via Wnt/ β -catenina) (LUO *et al.*, 2006). No estágio 10HH foi observado que os embriões expostos aos contaminantes tiveram aumento na expressão da β -catenina e que a mistura Pb+PFOA afetou um maior número de níveis axiais, apresentando aumento relacionado ao PFOA. Já no estágio 14HH, houve redução da β -catenina, sendo que as concentrações mais altas apresentaram reduções mais extensas pela região cefálica e as misturas demonstraram relação especialmente com o Pb. Trabalhos anteriores relataram que a exposição ao Pb (BEIER *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2021), Cd (THÉVENOD, 2009; WEI; SHAIKH, 2017) e PFOA (SMIRNOVA *et al.*, 2021), em diferentes sistemas, podem interromper a sinalização na via Wnt canônica. Assim, o desequilíbrio da taxa de β -catenina encontrada possa estar relacionado com a redução da distância linear de migração, uma vez que participa da ligação entre outras moléculas de adesão. Além disso, a β -catenina atua como um fator de transcrição para várias moléculas importantes, como a ciclina D1, uma molécula de progressão do ciclo celular. Como a inibição da via Wnt resulta em proliferação e diferenciação reduzidas (SCHILHAM *et al.*, 1998; HANSON *et al.*, 2010), a redução da β -catenina poderia corroborar nossos resultados em relação a redução da proliferação frente a exposição aos contaminantes.

A N-caderina é outra proteína de adesão célula-célula importante para a integridade epitelial (ROGERS; SORRELS; BRONNER, 2018). Requerem uma associação com β -catenina para exercer sua função, pois com o aumento de N-caderina na membrana celular a expressão de β -catenina também aumenta (CHEN; STEWART; NELSON, 1999; KURTH *et al.*, 1999). Alterações na expressão de N-caderina afetam a população de células da CN (ROGERS, 2018) e também a arquitetura do TN. Estudos anteriores evidenciaram a migração ectópica das células da CN para o lúmen do TN (BRONNER-FRASER; WOLF; MURRAY, 1992; WATT; TRAINOR, 2014; DA COSTA *et al.*, 2021) corroborando os resultados encontrados nesse trabalho. Em relação aos estádios de desenvolvimento, houve aumento na expressão de N-caderina no estágio 10HH e redução no estágio 14HH, onde a maior concentração de Pb e Cd afetaram mais níveis axiais. A literatura corrobora com os dados para este estágio, pois o Pb e Cd podem perturbar as caderinas (GRUNWALD, 2018) que dependem de Ca^{2+} para sua função ideal, já que ambos podem mimetizar esse íon e promover seu deslocamento direto (GARZA; VEJA; SOTO, 2006). Além disso, podem interferir na concentração de zinco e alterar a clivagem das caderinas, catalisada por metaloproteinases (MMP) dependentes de zinco (HEILIGER *et al.*, 2015). Já foi descrito que o Pb e Cd reduzem a expressão de N-caderina em embriões de *G. gallus* (FIORINI *et al.*, 2004), o que explicaria, em parte, a redução observada na migração das células da CN em nosso trabalho. Não há dados na literatura sobre o mecanismo e efeito do PFOA na expressão de N-caderina na região cefálica de embriões. De modo geral, o PFOA parece reduzir a expressão de moléculas de adesão, pois há redução da expressão de N-caderina e β -catenina na barreira hematotesticular (LU *et al.*, 2016) e redução de outras caderinas e também de ocludina e integrinas em células tumorais (YEUNG *et al.*, 2007).

Durante a formação do TN a expressão de E-caderina é gradualmente reduzida e comutada para N-caderina (KEROSUO; BRONNER-FRASER, 2012). De modo geral, os contaminantes utilizados neste trabalho afetaram a E-caderina, uma vez que houve diminuição de sua marcação em todos os estádios. As caderinas podem ser moduladas na superfície celular pela clivagem por MMPs dependentes de zinco (Zn). No entanto, a ligação de Zn pode ser diretamente perturbada pela ligação por competição e deslocamento de metais pesados, como o Pb e Cd (PARR-STURGESS *et al.*, 2012; HEILIGER *et al.*, 2015). Além disso, os metais pesados podem afetar a expressão das caderinas através da modulação de fatores de transcrição dependentes de Zn (PRATT *et al.*, 2008; VAN ROY; BERX, 2008). Já foi demonstrado que a intoxicação pelo Pb (GRUNWALD, 2018), Cd (PROZIALECK; NIEWENHUIS, 1991; JO; KOH, 2013) e PFOA (CHOI *et al.*, 2013) reduziu a adesão celular confirmando nossos dados.

De maneira geral, a alteração na homeostase do Ca^{2+} poderia promover os resultados adversos observados no número e migração de células da CN, bem como na expressão de β -catenina, N-caderina e E-caderina encontradas no presente trabalho. O cálcio regula um grande número de sistemas de sinalização intracelular e atividades celulares, incluindo mitose e apoptose (ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2011). A disfunção do Ca^{2+} já foi associada à apoptose no neuroepitélio embrionário, o que resultaria na formação de defeitos no TN (ZHAO *et al.*, 2019). Além disso, a alteração homeostática desse cátion altera a proliferação e migração celular (PIEROZAN; JERNEREN; KARLSSON, 2018; LI *et al.*, 2018), interfere na adesão celular (CHOI *et al.*, 2013) e perturba a dinâmica do citoesqueleto de actina (TEMPLETON, LIU, 2013). Além disso, no início da transição epitélio-mesenquimal das células da CN, a expressão alterada de moléculas de adesão celular dependentes de Ca^{2+} , como caderinas e β -catenina, interrompe as adesões célula-célula (ODA; TAKEICHI, 2011) e poderia explicar, parcialmente, as alterações morfológicas encontradas na literatura e nesse trabalho.

A segregação correta das células da CN cefálica é fundamental para o desenvolvimento normal. Dependendo da fase do desenvolvimento e nível axial que as células da CN são afetadas, distúrbios e malformações distintos podem ocorrer (WATT; TRAINOR, 2014). Com a avaliação individual dos níveis axiais após exposição aos contaminantes feito no presente trabalho, buscou-se identificar quais níveis seriam mais afetados por eles e, assim, estabelecer uma relação com os gânglios cranianos e estruturas que serão posteriormente formadas. Verificou-se que o prosencéfalo/diencéfalo, mesencéfalo, r1 e r6 foram os níveis que apresentaram maior redução em todos os parâmetros avaliados. As células das regiões do diencéfalo e mesencéfalo movem-se anteriormente sobre os primórdios ópticos para formar estruturas fronto-nasais, enquanto que no rombencéfalo migram lateral e ventralmente para preencher os arcos branquiais (COULY *et al.*, 1998; LUMSDEN; SPRAWSON; GRAHAN, 1991; KUO; ERICKSON, 2010). Cada um dos arcos branquiais está associado a um gânglio craniano, que participará da inervação de muitas das estruturas derivadas do arco (SUDIWALA; KNOX, 2019), como maxilares e ossos do martelo e da bigorna do ouvido médio, originados do primeiro arco branquial (preenchido por células originadas de r1 e r2) e as glândulas tireoide e paratireoide, originadas do terceiro e quarto arco (preenchido por células originadas de r6 e r7) (LUMSDEN; SPRAWSON; GRAHAN, 1991; KUO; ERICKSON, 2010). O Pb já foi associado a problemas na formação de conceitos verbais e domínio da linguagem (MASON *et al.*, 2014), a alterações no equilíbrio postural, maturação visual, discriminação e memória olfativa (GULSON; YUI; HOWARTH, 1998; MAMELI *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2017) e a alterações no tronco encefálico auditivo em aves (LURIE *et al.*, 2006),

sendo que o diencéfalo, mesencéfalo e r1 contribuem para a formação das estruturas envolvidas nos processos descritos acima (BELLAIR; OSMOND, 2014; KURATANI; KUSAKABE; HIRASAWA, 2018). Além disso, em zebrafish, o Cd reduz drasticamente a formação de gânglios cranianos, neurônios sensoriais e suas comissuras no prosencéfalo e mesencéfalo (CHOW *et al.*, 2008). O PFOA pode induzir o aumento de alterações morfológicas na região cefálica (KMECICK *et al.*, 2019) e afetar características craniofaciais como a distância interocular (JANTZEN *et al.*, 2016). As alterações craniofaciais estão entre as anomalias congênitas mais comuns do ser humano (PILON, 2021). Sua patogênese frequentemente inclui defeitos na migração, proliferação e destino das células da crista neural envolvidas na formação do esqueleto craniofacial (SIISMETS; ESCOTILHA, 2020), o que está em concordância com os dados obtidos nesse trabalho. Essas alterações podem levar a uma variedade de síndromes de defeitos de desenvolvimento, geralmente chamadas de neurocristopatias (PARADA *et al.*, 2015; DURHAN *et al.*, 2019; LI, J. *et al.*, 2019). O presente estudo reforça a preocupação em relação a exposições ao Pb, Cd e PFOA e às suas misturas, pois esses contaminantes podem interferir em diferentes processos celulares, afetar níveis axiais importantes na formação de diferentes estruturas e, até mesmo, contribuir para o surgimento de alterações como as neurocristopatias.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Pb, Cd e PFOA são poluentes onipresentes e resistentes à degradação. Isso explica sua ampla disseminação ambiental e a preocupação com sua contínua exposição aos seres vivos, especialmente nos organismos em desenvolvimento, visto que são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos.

O presente trabalho mostrou que a exposição aos contaminantes, isolados e em mistura, em concentrações realistas, não afetou a mortalidade embrionária em estádios iniciais do desenvolvimento, porém interferiu significativamente na morfologia da região cefálica dos embriões nos estádios 10HH e 14HH, em diferentes níveis axiais. As anormalidades morfológicas estão relacionadas a alterações em processos celulares, como proliferação, apoptose, migração e adesão celular, como confirmado ao se realizar a análise de redes. Essa metodologia identificou 18 vias principais, ordenadas em quatro grupos.

Após a avaliação *in silico*, foi comprovado, experimentalmente, que os contaminantes afetam esses processos celulares nos embriões em desenvolvimento. Essa confirmação se deu pelos achados com: 1) a redução na proliferação e apoptose das células da região cefálica e consequente redução significativa no número de células da crista neural; e 2) as alterações encontradas em moléculas de adesão celular (β -catenina, N- e E-caderina), que contribuíram para reduzir a distância linear de migração das células da crista neural.

Os tópicos avaliados nesse trabalho estão resumidos na figura 1.

Apesar dos efeitos observados, no momento não é possível comprovar o comportamento das misturas, uma vez que a correta interpretação da sua exposição depende da aplicação de um modelo específico de aditividade que permita prever a resposta a várias doses e contaminantes.

Alguns dos experimentos podem ser aprimorados e complementados futuramente, como a quantificação dos contaminantes especificamente na região cefálica do embrião, e a avaliação dos marcadores para matriz extracelular (fibronectina) e para Wnt.

CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados, concluiu-se que:

- O Pb, Cd e PFOA, isolados e em mistura, podem gerar alterações nas vias de sinalização MAPK, ErbB, p53, Notch, TGF- β , Wnt, PPAR, FoxO, sinalização por cálcio, metabolismo do retinol, bem como nas interações com receptores de matriz extracelular, moléculas de adesão e junções celulares.
- Apenas o Pb na concentração intermediária aumentou a taxa de mortalidade. Os contaminantes, isolados e em mistura, aumentaram a ocorrência de malformações cefálicas.
- A exposição aos contaminantes reduziu significativamente a proliferação e apoptose nos diferentes níveis axiais na região cefálica.
- O número e a migração das células da crista neural cefálica foram significativamente reduzidos, nos estádios 10HH e 14 HH, nos diferentes níveis ao longo dos eixos axiais.
- Foram observadas alterações nas moléculas de adesão celular, β -catenina, N- e E-caderina, sendo que no estágio 14HH todas foram significativamente reduzidas. No estágio 10HH houve aumento na expressão de β -catenina e N-caderina, indicando que modificações também podem estar relacionadas com o tempo de exposição.
- O padrão morfológico, associado às alterações celulares, é condizente com anormalidades morfofuncionais relatadas na literatura.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-BAKI, A. S.; DKHIL, M. A.; AL-QURAISHY, 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.
- ABUDAYYAK, M.; ÖZTAŞ, E.; ÖZHAN, G. Assessment of perfluorooctanoic acid toxicity in pancreatic cells. **Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA**, v. 72, p. 105077, 2021.
- ALEKSANDROWICZ, E.; HERR, I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. **ALTEX**, v. 32, n. 2, p. 143-147, 2015.
- ALWAN, S.; CHAMBERS, C.D. Identifying human teratogens: an update. **Journal of Pediatric Genetics**, n. 4, v. 2, p. 39-41, 2015.
- AMACK, J. D. Cellular dynamics of EMT: lessons from live *in vivo* imaging of embryonic development. **Cell Communication and Signaling: CCS**, v. 19, n. 1, p. 79, 2021.
- ANDERSEN, M. E.; BUTENHOFF, J. L.; CHANG, S. C.; FARRAR, D. G.; KENNEDY, G. L. JR.; LAU, C.; OLSEN, G. W.; SEED, J.; WALLACE, K. B. Perfluoroalkyl acids and related chemistries-toxicokinetics and modes of action. **Toxicological Sciences: An official journal of the Society of Toxicology**, v. 102, n. 1, p. 3-14, 2008.
- ANGIONE, C. Human Systems Biology and Metabolic Modelling: A Review-From Disease Metabolism to Precision Medicine. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 8304260, 2019.
- APPEL, M.; FORSTHUBER, M.; RAMOS, R.; WIDHALM, R.; GRANITZER, S.; UHL, M.; HENGSTSCHLÄGER, M.; STAMM, T.; GUNDAKER, C. The transplacental transfer efficiency of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): a first meta-analysis. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 25, n. 1, p. 23-42, 2022.
- ARVANITI, O. S.; STASINAKIS, T. S. Review on the occurrence, fate and removal of perfluorinated compounds during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 524-525, p. 881-92, 2015.
- ATKINS, P. W.; JONES, L. L. **Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2001.
- ATSDR - Agency for toxic substances & disease registry. **ATSDR's Substance Priority List 2019**. Disponível em <<https://www.https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2019spl>>. Acesso em 18 mar 2021.
- AYYALASOMAYAJULA, N.; BANDARU, M.; DIXIT, P. K.; AJUMEERA, R.; CHETTY, C. S.; CHALLA, S. Inactivation of GAP-43 due to the depletion of cellular calcium by the Pb and amyloid peptide induced toxicity: An *in vitro* approach. **Chemico-Biological Interactions**, v. 316, p. 108927, 2020.
- BAEYENS, W.; VRIJENS, J.; GAO, Y.; CROES, K.; SCHOETERS, G.; HOND, E. D.; SIOEN, I.; BRUCKERS, L.; NAWROT, T.; NELEN, V.; MIEROOP, E. V. D.; MORRENS,

B.; LOOTS, I.; VAN LAREBEKE, N.; LEERMAKERS, M. Trace metals in blood and urine of newborn/mother pairs, adolescents and adults of the Flemish population (2007-2011). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 217, n. 8, p. 878-890, 2014.

BAO, J.; SHAO, L-X.; LIU, Y.; CUI, S-H.; WANG, X.; LU, G-L.; WANG, X.; JIN, Y-H. Target analysis and suspect screening of per- and polyfluoroalkyl substances in paired samples of maternal serum, umbilical cord serum, and placenta near fluorochemical plants in Fuxin, China. **Chemosphere**, v. 307, n. 1, p. 135731, 2022.

BARTHELERY, N. J.; MANFREDI, J. J. Cerebellum Development and Tumorigenesis: a p53-centric Perspective. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 5, p. 404-413, 2016.

BEDNARCZYK, M.; DUNISLAWSKA, A.; STADNICKA, K.; GROCHOWSKA, E. Chicken embryo as a model in epigenetic research. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, p. 101164, 2021.

BEESEON, S.; WEBSTER, G. M.; SHOEIB, M.; HARNER, T.; BENSKIN, J. P.; MARTIN, J. W. Isomer profiles of perfluorochemicals in matched maternal, cord, and house dust samples: manufacturing sources and transplacental transfer. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 11, p. 1659-1664, 2011.

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.

BEIER, E. E.; SHEU, T-J.; DANG, D.; HOLZ, J. D.; UBAYAWARDENA, R.; BABIJ, P.; PUZAS, J. E. Heavy Metal Ion Regulation of Gene Expression: mechanisms by which lead inhibits osteoblastic bone-forming activity through modulation of the wnt/ β -catenin signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 29, p. 18216-18226, 2015.

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

BERK, M.; WILLIAMS, L. J.; ANDREAZZA A.C.; PASCO, J. A.; DODD, S.; JACKA, F. N.; MOYLAN, S.; REINER, E. J.; MAGALHAES, P. V. S. Pop, heavy metal and the blues: secondary analysis of persistent organic pollutants (POP), heavy metals and depressive symptoms in the NHANES National Epidemiological Survey. **BMJ Open**, v. 4, n. 7, p. e005142, 2014.

BERNASCONI, S.; STREET, M. E.; IUGHETTI, L.; PREDIERI, B. Chemical contaminants in breast milk: a brief critical overview. **Global Pediatrics**, v. 2, p. 100017, 2022.

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

BERTOCCHINI, F.; ALEV, C.; NAKAYA, Y.; SHENG, G. A little winning streak: the reptilian-eye view of gastrulation in birds. **Development, Growth and Differentiation**, v. 55, n. 1, p. 52-59, 2013.

BIEGEL, L. B.; HURTT, M. E.; FRAME, S. R.; O'CONNOR, J. C.; COOK, J. C. Mechanisms of extrahepatic tumor induction by peroxisome proliferators in male CD rats. **Toxicological Sciences**, v. 60, p. 44-55, 2001.

BJØRNSTAD, S.; AUSTDAL, L. P.; 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.

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.

BOCCHI, N.; FERRACIN, L. C.; BIAGGIO, S. R. Pilhas e baterias: Funcionamento e impacto ambiental. **Química Nova na Escola**, v. 11, p. 3-9, 2000.

BORGES, M. E. **Uso do embrião de ave (*Gallus gallus*) como organismo modelo para embriotoxicidade do Pb e As**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

BRESSLER, J. P.; OLIVI, L.; CHEONG, J. H.; KIM, Y.; MAERTEN, A.; BANNON, D. Metal transporters in intestine and brain: their involvement in metal-associated neurotoxicities. **Human & Experimental Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 221-229, 2007.

BRITO, R. R.; CANEDO, A.; FARIAS, D.; ROCHA, T. R. Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends. **The Science of the Total Environment**, v. 848, p. 157665, 2022.

BRONNER-FRASER, M.; WOLF, J. J.; MURRAY, B. A. Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube. **Developmental Biology**, v. 153, n. 2, p. 291-301, 1992.

BRYAN, C. D.; CASEY, M. A.; PFEIFFER, R. L.; JONES, B. W.; KWAN, K. M. Optic cup morphogenesis requires neural crest-mediated basement membrane assembly. **Development**, v. 147, n. 4, p. dev181420, 2020.

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.

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.

CAI, D.; LI, Q-Q.; CHU, C.; WANG, S-Z.; TANG, Y-T.; APPLETON, A. A.; QIU, R-L.; YANG, B-Y.; HU, L-W.; DONG, G-H.; ZENG, X-W. High trans-placental transfer of

perfluoroalkyl substances alternatives in the matched maternal-cord blood serum: Evidence from a birth cohort study. **The Science of the Total Environment**, v. 705, p. 135885, 2020.

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.

CAROCCI, A.; CATALANO, A.; LAURIA, G.; SINICROPI, M. S.; GENCHI, G. Lead Toxicity, Antioxidant Defense and Environment. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 238, p.45-67, 2016.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Blood Lead Levels in Children. 2022. Disponível em < <https://www.cdc.gov/nceh/lead/docs/lead-levels-in-children-fact-sheet-508.pdf> > Acesso em 19 ago 2022.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Cadmium, 2019. Disponível em < <https://www.cdc.gov/niosh/topics/Cadmium/> > Acesso em 19 ago. 2022.

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.

CHANG, Y. F.; WEN, J. F.; CAI, J. F.; XIAO-YING, W.; YANG, L.; GUO, Y. D. An investigation and pathological analysis of two fatal cases of cadmium poisoning. **Forensic Science International**, v. 220, p. e5-e8, 2012.

CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; BEN-ARI, Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. **Neuroreport**, v. 7, n. 1, p. 61-64, 1995.

CHEN, Y. T.; STEWART, D. B.; NELSON, W. J. Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 144, n. 4, p. 687-699, 1999.

CHEN, Z.; MYERS, R.; WEI, T.; BIND, E.; KASSIM, P.; WANG, G.; JI, Y.; HONG, X.; CARUSO, D.; BARTELL, T.; GONG, Y.; STRICKLAND, P.; NAVAS-ACIEN, A.; GUALLAR, E.; WANG, X. Placental transfer and concentrations of cadmium, mercury, lead, and selenium in mothers, newborns, and young children. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 24, n. 5, p. 537-544, 2014.

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: An international Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, 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.

CHOW, E. S.; HUI, M. N.; LIN, C. C.; CHENG, S. H. Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development. **Aquatic Toxicology**, v. 87, n. 3, p. 157-169, 2008.

CLARKE, D. N.; MARTIN, A. C. Actin-based force generation and cell adhesion in tissue morphogenesis. **Current Biology**, v. 31, n. 10, p. R667-R680, 2021.

CLEMENTS, P. J. M.; BOLON B.; MCINNES, E.; MUKARATIRWA, S.; SCUDAMORE, C. Animal Models in Toxicologic Research: Rodents. **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**. 4.ed. Academic Press, p. 653-694, 2022.

COBBINA, S. J.; XU, H.; ZHAO, T.; MAO, G.; ZHOU, Z.; WU, X.; LIU, H.; ZOU, Y.; WU, X.; YANG, L. A multivariate assessment of innate immune-related gene expressions due to exposure to low concentration individual and mixtures of four kinds of heavy metals on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 47, n. 2, p. 1032-1042, 2015.

COLLIN, M. S.; BASKAR, A.; GEEVARGHESE, D. M.; ALI, M. N. V. S.; BAHUBALI, P.; CHOUDHARY, R.; LVOV, V.; TOVAR, G. I.; SENATOV, F.; KOPPALA, S.; SWAMIAPPAN, S. Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects in plants: A review. **Journal of Hazardous Materials Letters**, v. 3, p. 100064, 2022.

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.

COULY, G.; GRAPIN-BOTTON, A.; COLTEY, P.; RUHIN, B.; LE DOUARIN, N. M. Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between Hox gene expression and lower jaw development. **Development**, v. 125, n. 17, p.3445-3459, 1998.

COUTIÑO, B.C.; MAYOR, R. Neural crest mechanosensors: Seeing old proteins in a new light. **Developmental Cell**, v. 57, n. 15, p. 1792-1801, 2022.

CRINNION, J. W. Maternal Levels of Xenobiotics that Affect Fetal Development and Childhood Health. **Alternative Medicine Review**, v. 14, n. 3, p. 212-222, 2009.

CULLINANE, J.; BANNIGAN, J.; THOMPSON, J. Cadmium teratogenesis in the chick: period of vulnerability using the early chick culture method, and prevention by divalent cations. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 335-341, 2009.

CUMMINGS, A.; KAVLOCK, R. A systems biology approach to developmental toxicology. **Reproductive Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 281-290, 2005.

DA COSTA, M. C. V.; KMECICK, M.; 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, p. 106948, 2021.

DA SILVA, C. P.; DE ALMEIDA, T. E.; ZITTEL, R.; STREMEL, T. R. O.; DOMINGUES, C. E.; KORDIAK, J.; DE CAMPOS, S. X. Translocation of metal ions from soil to tobacco

roots and their concentration in the plant parts. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 663, 2016.

DADY, A.; BLAVET, C.; DUBAND, J-L. Timing and kinetics of E- to N-cadherin switch during neurulation in the avian embryo. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 241, n. 8, p. 1333-13449, 2012.

DARTEY, E.; BERLINGER, B.; WEINBRUCH, S.; THOMASSEN, Y.; ODLAND, J. O.; BROX, J.; NARTEY, V. K.; YEBOAH, F. A.; ELLINGSEN, D. G. Essential and non-essential trace elements among working populations in Ghana. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 44, p. 279-287, 2017.

DAVA FOODS. **The Structure of the Egg**. Disponível em < <http://www.davafoods.com/the-egg/structure-of-the-egg.aspx> > Acesso em: 24 mai 2017.

DAVIS, A.P.; MURPHY, C. G.; JOHNSON, R.; LAY, J. M.; LENNON-HOPKINS, K.; SARACENI-RICHARDS, C.; SCIAKY, D.; KING, B. L.; ROSENSTEIN, M. C.; WIEGERS, T. C.; MATTINGLY, C. J. The Comparative Toxicogenomics Database: update 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D1104-1114, 2013.

DEFO, M. A.; SPEAR, P. A.; COUTURE, P. Consequences of metal exposure on retinoid metabolism in vertebrates: a review. **Toxicology Letters**, v. 225, n. 1, p. 1-11, 2014.

DENG, P.; MA, Q.; XI, Y.; YANG, L.; LIN, M.; YU, Z.; CHEN, C.; ZHOU, Z. Transcriptomic insight into cadmium-induced neurotoxicity in embryonic neural stem/progenitor cells. **Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA**, v. 62, p. 104686, 2020.

DESESSO, J. M.; WILLIAMS, A. L. **Periods of Susceptibility: Interspecies Comparison of Developmental Milestones During Ontogenesis of the Central Nervous System**. In Handbook of Developmental Neurotoxicology, 2 ed. Academic Press, p. 113-125, 2018.

DOU, C.; ZHANG, J. Effects of lead on neurogenesis during zebrafish embryonic brain development. **Journal of Hazardous Materials**, v. 194, p. 277-282, 2011.

DOUGHERTY, B. V.; PAPIN, J. A. Systems biology approaches help to facilitate interpretation of cross-species comparisons. **Current Opinion in Toxicology**, v. 23-24, p. 74-79, 2020.

DU, Y.; CAI, Z.; ZHOU, G.; LIANG, W.; MAN, W.; 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, p. 113508, 2022.

DURHAM, M.; HOWIE, R. N.; LARSON, N.; LARUE, A.; CRAY, J. Pharmacological exposures may precipitate craniosynostosis through targeted stem cell depletion. **Stem Cell Research**, v. 40, p. 101528, 2019.

DURSKA, G. Levels of lead and cadmium in pregnant women and newborns and evaluation of their impact on child development. **Annales Academiae Medicae Stetinensis**, v. 47, p. 49-60, 2001.

EFSA. European Food Safety Authority. Lead dietary exposure in the European population. **EFSA Journal**, v. 10, n. 7: 2831, 2012.

EGENDORF, S. P.; GAILEY, A. D.; SCHACHTER, A. E.; MIELKE, H. W. Soil toxicants that potentially affect children's health. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 50, n. 1, p. 100741, 2020.

EPA - U.S. EPA **Environmental Protection Agency**. Learn about Lead. 2022. Disponível em < <https://www.epa.gov/lead/learn-about-lead> > Acesso em 19 ago 2022.

ERICKSON, A. G.; KAMENEVA, P.; ADAMEYKO, I. The transcriptional portraits of the neural crest at the individual cell level. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [preprint], 2022.

ESPART, A.; ARTIME, S.; TORT-NASARRE, G.; YARA-VARÓN, E. Cadmium exposure during pregnancy and lactation: materno-fetal and newborn repercussions of Cd (II), and Cd-metallothionein complexes. **The Royal Society of Chemistry's**, v. 10, p. 1359-1367, 2018.

ESPARTERO, L. J. L.; YAMADA, M.; FORD, J.; OWENS, G.; PROW, T.; JUHASZ, A. Health-related toxicity of emerging per- and polyfluoroalkyl substances: Comparison to legacy PFOS and PFOA. **Environmental Research**, v. 212, Part C, p. 113431, 2022.

ESTEBAN-VASALLO, M. D.; ARAGONÉS, N.; POLLAN, M.; LÓPEZ-ABENTE, G.; PEREZ-GOMEZ, B. Mercury, Cadmium, and Lead Levels in Human Placenta: A Systematic Review. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 10, p. 1369-1377, 2012.

EUROPEAN COMMISSION. 2020. **Commission delegated regulation (EU) 2020/784 of 8 April 2020 amending annex I to regulation (EU) 2019/1021 of the European parliament and of the council as regards the listing of perfluorooctanoic acid (PFOA), its salts and PFOA-related compounds**. L 188 I/1.

FANG, Y.; LU, L.; LIANG, Y.; PENG, D.; ASCHNER, M. JIANG, Y. Signal transduction associated with lead-induced neurological disorders: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 150, p. 112063, 2021.

FENG, Y.; SHI, Z.; FANG, X.; XU, M.; DAI, J. Perfluorononanoic acid induces apoptosis involving the Fas death receptor signaling pathway in rat testis. **Toxicology Letters**, v. 190, n. 2, p. 224-230, 2009.

FIORINI, C.; TILLOY-ELLUL, A.; CHEVALIER, S.; CHARUEL, C.; POINTIS, G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. **Reproductive Toxicology**, v. 18, n. 3, p. 413-421, 2004.

FISH, J. L.; SCHNEIDER, R. A. Neural Crest-Mediated Tissue Interactions During Craniofacial Development: The Origins of Species-Specific Pattern. In Trainor, P. A. **Neural Crest Cells Evolution, Development and Disease**. Elsevier, San Diego, p. 101-124, 2014.

FLANNERY, B. M.; SCHAEFER, H. R.; MIDDLETON, K. B. A scoping review of infant and children health effects associated with cadmium exposure. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 131, p. 105155, 2022.

FLENTKE, G. R.; SMITH, S. M. The avian embryo as a model for fetal alcohol spectrum disorder. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 96, n. 2, p. 98-106, 2018.

FLORA, S. J. S; AGRAWAL, S. Arsenic, Cadmium, and Lead. *In*: Gupta, R. C. **Reproductive and Developmental Toxicology**. 2 ed. Academic Press. 2017. p. 551-557.

FLORA, S. J.; FLORA, G.; SAXENA, G. MISHRA, M. Arsenic and lead induced free radical generation and their reversibility following chelation. **Cellular and Molecular Biology**, v. 53, n. 1, p. 26-47, 2007.

FLOREA, A.M., TABAN, J., VARGHESE, E., ALOST, B.T., MORENO, S., BÜSSELBERG, D. Lead (Pb²⁺) neurotoxicity: ion-mimicry with calcium (Ca²⁺) impairs synaptic transmission. A review with animated illustrations of the pre- and post-synaptic effects of lead. **Journal of Local and Global Health Science**, v. 4, p. 01-38, 2013.

FRANK, J. J.; POULAKOS, A. G.; TORNERO-VELEZ, R.; XUE, J. Systematic review and meta-analyses of lead (Pb) concentrations in environmental media (soil, dust, water, food, and air) reported in the United States from 1996 to 2016. **The Science of the Total Environment**, v. 694, p. 133489, 2019.

FRAZZOLI, C.; RUGGIERI, F.; BATTISTINI, B.; ORISAKWE, O. E.; IGBO, J. K.; BOCCA, B. E-WASTE threatens health: The scientific solution adopts the one health strategy. **Environmental Research**, v. 212, Part A, p. 113227, 2022.

FRY, K. L.; WHEELER, C. A.; GILLINGS, M. M.; FLEGAL, A. R.; TAYLOR, M. P. Anthropogenic contamination of residential environments from smelter As, Cu and Pb emissions: Implications for human health. **Environmental Pollution**, v. 262, p. 114235, 2020.

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

GAN, J.; BOLON, B.; VAN VLEET, T.; WOOD, C. Alternative Models in Biomedical Research: *In Silico*, *In Vitro*, *Ex Vivo*, and Nontraditional *In Vivo* Approaches. **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**. 4.ed. Academic Press, p. 925-966, 2022.

GANS, C.; NORTHCUTT, R. G. Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. **Science**, v. 220, n. 4594, p. 268-273, 1983.

GARCÍA, C. A. A. Formation of Neural Tube. **Reference Module in Biomedical Sciences**, Elsevier, 2017.

GARCIA-ESQUINAS, E.; PEREZ-GOMEZ, B.; FERNANDEZ-NAVARRO, P.; FERNANDEZ, M. A.; PAZ, C.; PEREZ-MEIXEIRA, A. M.; GIL, E.; IRISO, A.; SANZ, J. C.; ASTRAY, J.; CISNEROS, M.; SANTOS, A.; ASENSIO, A.; GARCIA-SAGREDO, J. M.; GARCIA, J. F.; VIOQUE, J.; LOPEZ-ABENTE, G.; POLLAN, M., GONZALEZ, M. J.; MARTINEZ, M.; ARAGONES, N. Lead, mercury and cadmium in umbilical cord blood and its association with parental epidemiological variables and birth factors. **BMC Public Health**, v. 13, n. 841, 2013.

- GARZA, A.; VEJA, R.; SOTO, E. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 12, n. 3, p. RA57-RA65, 2006.
- GENCHI, G.; SINICROPI, M. S.; LAURIA, G.; CAROCCI, A.; CATALANO, A. The Effects of Cadmium Toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 11, p. 3782, 2020.
- GENG, H. X.; WANG, L. Cadmium: Toxic effects on placental and embryonic development. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 67, p. 102-107, 2019.
- GENUTH, M. A.; ALLEN, C. D. C.; MIKAWA, T.; WEINER, O. D. Chick cranial neural crest cells use progressive polarity refinement, not contact inhibition of locomotion, to guide their migration. **Developmental Biology**, v. 444, n. Suppl 1, p. S252-S261, 2018.
- GIANNACCINI, M.; CUSCHIERI, A.; DENTE, D.; RAFFA, V. Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 4, p. 703-719, 2014.
- GILBERT, S. F. **Developmental Biology**, 11 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2019.
- GIORDANO, G.; COSTA, L. G. Developmental neurotoxicity: some old and new issues. **ISRN Toxicology**, v. 24, p. 814795, 2012.
- GIULIANI, R.; BETTONI, F.; LEALI, D.; MORANDINI, F.; APOSTOLI, P.; GRIGOLATO, P.; CESANA, B. M.; ALEO, M. F. Focal adhesion molecules as potential target of lead toxicity in NRK-52E cell line. **FEBS Letters**, v. 579, n. 27, p. 6251-6258, 2005.
- GRANT, K.; GOLDIZEN, F. C.; SLY, P. D.; BRUNE, M. N.; NEIRA, M.; VAN DEN BERG, M.; NORMAN, R. E. Health consequences of exposure to e-waste: a systematic review. **The Lancet. Global Health**, v. 1, n. 6, p. e350-361, 2013.
- GRUNWALD, G. B. Cell Adhesion Molecules as Targets of Developmental Toxicants. *In* **Comprehensive Toxicology**, 3 ed. Elsevier, 2018, p. 202-215.
- GULSON, B. L.; YUI, L. A.; HOWARTH, D. Delayed visual maturation and lead pollution. **The Science of the Total Environment**, v. 224, n. 1-3, p. 215-219, 1998.
- GUNDAKER, C.; FORSTHUBER, M.; SZIGETI, T.; KAKUCS, R.; MUSTIELES, V.; FERNANDEZ, M. F.; BENGTSSEN, E.; VOGEL, U.; HOUGAARD, K. S.; SABER, A. T. Lead (Pb) and neurodevelopment: A review on exposure and biomarkers of effect (BDNF, HDL) and susceptibility. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 238, p. 113855, 2021.
- GUO, H.; ZHANG, H.; SHENG, N.; WANG, J.; CHEN, J.; DAI, J. Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure induces splenic atrophy via overactivation of macrophages in male mice. **Journal of Hazardous Materials**, v. 407, 124862, 2021.
- GUO, Y.; YUAN, J.; NI, H.; JI, J.; ZHONG, S.; ZHENG, Y.; JIANG, Q. Perfluorooctanoic acid-induced developmental cardiotoxicity in chicken embryo: Roles of miR-490-5p. **Environmental Pollution**, v. 312, p. 120022, 2022.

HABIB, S. J.; ACEBRÓN, S. P. Wnt signalling in cell division: from mechanisms to tissue engineering. **Trends in Cell Biology**, v. 32, n. 12, p. 1035-1048, 2022.

HALL, S. M.; ZHANG, S.; HOFFMAN, K.; MIRANDA, M. L.; STAPLETON, H. M. Concentrations of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in human placental tissues and associations with birth outcomes. **Chemosphere**, v. 295, p. 133873, 2022.

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.

HANSON, M. L.; BRUNDAGE, K. M.; SCHAFER, R.; TOU, J. C.; BARNETT, J. B. Prenatal cadmium exposure dysregulates sonic hedgehog and Wnt/beta-catenin signaling in the thymus resulting in altered thymocyte development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 242, n. 2, p. 136-145, 2010.

HAYRE, C. M.; BLACKMAN, S.; CARLTON, K.; EYDEN, A. Attitudes and perceptions of radiographers applying lead (Pb) protection in general radiography: An ethnographic study. **Radiography**, v. 24, n. 1, p. e13-e18, 2017.

HEILIGER, E.; OSMANAGIC, A.; HAASE, H.; GOLENHOFEN, N.; GRABRUCKER, A. M.; WETH, A.; BAUMGARTNER, W. N-Cadherin-mediated cell adhesion is regulated by extracellular Zn (²⁺). **Metallomics**, v. 7, n. 2, p. 355-362, 2015.

HEO, J.-J.; LEE, J.-W.; KIM, S.-K.; OH, J.-E. Foodstuff analyses show that seafood and water are major perfluoroalkyl acids (PFAAs) sources to humans in Korea. **Journal of Hazardous Materials**, v. 279, p. 402–409, 2014.

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**, v. 6, n. 53, p. 47844–47857, 2016.

HILL, M. A. **Embryology Carnegie Stage Comparison**. Disponível em <https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_Stage_Comparison>. Acesso em 22 dez 2021.

HIS, W. Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbeltierleibes: die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei. **F.C.W. Vogel**, Leipzig, 1868.

HOJJATI-NAJAFABADI, A.; MANSOORIANFAR, M.; LIANG, T.; SHAHIN, K.; KARIMI-MALEH, H. A review on magnetic sensors for monitoring of hazardous pollutants in water resources. **The Science of the Total Environment**, v. 824, p. 153844, 2022.

HOLBRO, T.; HYNES, N. E. ERBB RECEPTORS: Directing Key Signaling Networks Throughout Life. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 195-217, 2004.

HONG, Y. C.; KULKARNI, S. S.; LIM, Y. H.; KIM, E.; PARK, H.; KIM, Y.; KIM, B. N.; CHANG, N.; OH, S. Y.; KIM, Y. J.; PARK, C.; HA, E. Postnatal Growth Following Prenatal Lead Exposure and Calcium Intake. **Pediatrics**, v. 134, n. 6, p. 1151-1159, 2014.

- HOOD, L.; ROWEN, L.; GALAS, D. J.; AITCHISON, J. D. Systems biology at the Institute for Systems Biology. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 7, n. 4, p. 239-248, 2008.
- HU, Q.; FU, H.; SONG, H.; REN, T.; LI, L.; YE, L.; LIU, T.; DONG S. Low-level lead exposure attenuates the expression of three major isoforms of neural cell adhesion molecule. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 2, p. 255-260, 2011.
- HU, W.; XIA, M.; ZHANG, C.; SONG, B.; XIA, Z.; GUO, C.; CUI, Y.; JIANG, W.; ZHANG, S.; XU, D.; FANG, J. Chronic cadmium exposure induces epithelial mesenchymal transition in prostate cancer cells through a TGF- β -independent, endoplasmic reticulum stress induced pathway. **Toxicology Letters**, v. 353, p. 107-117, 2021,
- HUANG, C.; KRATZER, M. C.; WEDLICH, D.; KASHEF, J. E-cadherin is required for cranial neural crest migration in *Xenopus laevis*. **Developmental Biology**, v. 414, n. 2, p. 159-171, 2016.
- HUANG, H.; JIN, Y.; CHEN, C.; FENG, M.; WANG, Q.; LI, D.; CHEN, W.; XING, X.; YU, D.; XIAO, Y. A toxicity pathway-based approach for modeling the mode of action framework of lead-induced neurotoxicity. **Environmental Research**, v. 199, p. 111328, 2021.
- HUANG, W.; WU, T.; WU, K. Zebrafish (*Danio rerio*): A potential model to assess developmental toxicity of ketamine. **Chemosphere**, v. 291, n. 3, 133033, 2022.
- 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.
- HUMPHRIES, J. D.; BYRON, A.; HUMPHRIES, M. J. Integrin ligands at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. Pt 19, p. 3901-3903, 2006.
- HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673-687, 2002.
- IRIE, N.; KURATANI, S. Comparative transcriptome analysis reveals vertebrate phylotypic period during organogenesis. **Nature Communications**, v. 2, n. 248, 2011.
- IROEGBU, J. D.; IJOMONE, O. K.; FEMI-AKINLOSOTU, O. M.; IJOMONE, O. M. ERK/MAPK signaling in the developing brain: Perturbations and consequences. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 131, p. 792-805, 2021.
- IRVINE, A. R.; BERLO, D. V.; SHEKHANI, R.; MASEREEUW, R. A systematic review of *in vitro* models of drug-induced kidney injury. **Current Opinion in Toxicology**, v. 27, p. 18-26, 2021.
- JAISHANKAR, M.; TSETEN, T.; ANBALAGAN, N.; MATHEW, B. B.; BEEREGOWDA, K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 7 n. 2, p. 60-72, 2014.
- JANTZEN, C. E.; ANNUNZIATO, K. A.; BUGEL, S. M.; COOPER, K. R. PFOS, PFNA, and PFOA sub-lethal exposure to embryonic zebrafish have different toxicity profiles in terms

of morphometrics, behavior and gene expression. **Aquatic Toxicology**, v. 175, p. 160-170, 2016.

JEDRYCHOWSKI, W.; PERERAB, F.; JANKOWSKIC, J.; RAUHB, V.; FLAKA, E.; CALDWELLD, K. L.; JONESD, R. L.; PACA, A.; LISOWSKA-MISZCZYK, I. Prenatal low-level lead exposure and developmental delay of infants at age 6 months (Krakow inner city study). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 211, n. 3-4, p. 345-351, 2008.

Jl, Z.; YAN, K.; LI, W.; HU, H.; ZHU, X. Mathematical and Computational Modeling in Complex Biological Systems. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 5958321, 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.

JIANG, Q.; WANG, C.; XUE, C.; XUE, L.; WANG, M.; LI, C.; DENG, Z.; WANG, Q. Changes in the levels of l-carnitine, acetyl-l-carnitine and propionyl-l-carnitine are involved in perfluorooctanoic acid induced developmental cardiotoxicity in chicken embryo. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 116-124, 2016.

JIAO, Y-H.; LIU, M.; WANG, G.; LI, H-Y.; LIU, J-S.; YANG, X.; YANG, D-Y. EMT is the major target for okadaic acid-suppressed the development of neural crest cells in chick embryo. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, p. 192-201, 2019.

JO, C.; KOH, Y. H. Cadmium induces N-cadherin cleavage via ERK-mediated γ -secretase activation in C6 astroglia cells. **Toxicology Letters**, v. 222, n. 2, p. 117-121, 2013.

JOHN, A.; RAUZI, M. Composite morphogenesis during embryo development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 120, p. 119-132, 2021.

JONES, P. D.; HU, W. Y.; DE COEN, W.; NEWSTED, J. L.; GIESY, J. P. Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 22, p. 2639-2649, 2003.

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.

KAIN, K. H.; MILLER, J. W. I.; JONES-PARIS, C. R.; THOMASON, R. T.; LEWIS, J. D.; BADER, D. M.; BARNETT, J. V.; ZIJLSTRA, A. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. **Developmental Dynamics**, v. 243, n. 2. P. 216-228, 2014.

KASTEN-JOLLY, J.; LAWRENCE, D. A. Sex-specific effects of developmental lead exposure on the immune-neuroendocrine network. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 334, p. 142-157, 2017.

KASTEN-JOLLY, J.; PABELLO, N.; BOLIVAR, V. J.; LAWRENCE, D. A. Developmental lead effects on behavior and brain gene expression in male and female BALB/cAnNTac mice. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 5, p. 1005-1020, 2012.

KEROSUO, L.; BRONNER-FRASER, M. What is bad in cancer is good in the embryo: importance of EMT in neural crest development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 3, p. 320-332, 2012.

KHAN, E. A.; ZHANG, X.; HANNA, E. M.; YADETIE, F.; JONASSEN, I.; GOKSØYR, A.; ARUKWE, A. Application of quantitative transcriptomics in evaluating the *ex vivo* effects of per- and polyfluoroalkyl substances on Atlantic cod (*Gadus morhua*) ovarian physiology. **The Science of the Total Environment**, v. 755, n. Pt 1, p. 142904, 2021.

KHOSRAVI, A.; SHARIFI, I.; TAVAKKOLI, H.; KEYHANI, A. R.; AFGAR, A.; SALARI, Z.; MOSALLANEJAD, S. S.; BAMOROVAT, M.; SHARIFI, F.; HASSANZADEH, S.; SADEGHI, B.; DABIRI, S.; MORTAZAEIZDEH, A.; SHEIKHSHOAIE, Z.; SALARKIA, E. Vascular apoptosis associated with meglumine antimoniate: *In vivo* investigation of a chick embryo model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 505, n. 3, p. 794-800, 2018.

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, n. 6, p. 1153-1160, 2013.

KIM, S.; CHOI, K.; JI, K.; SEO, J.; KHO, Y.; PARK, J.; KIM, S.; PARK, S.; HWANG, I.; JEON, J.; YANG, H.; GIESY, J. P. Trans-placental transfer of thirteen perfluorinated compounds and relations with fetal thyroid hormones. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 17, p. 7465-7472, 2011.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KLESZCZYŃSKI, K.; SKŁADANOWSKI, A. C. Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids. III. Disturbance in Ca^{2+} homeostasis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 251, n. 2, p. 163-168, 2011.

KMECICK, M.; COSTA, M.C.V.; 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, p. 152286, 2019.

KNUDSEN, T. B.; SPENCER, R. M.; PIERRO, J. D.; BAKER, N. C. Computational biology and *in silico* toxicodynamics. **Current Opinion in Toxicology**, v. 23-24, p. 119-126, 2020.

KÖHLER, A.; SCHAMBONY, A.; WEDLICH, D. Cell migration under control of Wnt-signaling in the vertebrate embryo. *In* SOKOL, S. Y. **Advances in Developmental Biology**, Elsevier, p. 159-201, 2007.

KOONTZ, A.; URRUTIA, H. A.; BRONNER, M. E. Making a head: Neural crest and ectodermal placodes in cranial sensory development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [preprint], 2022.

KORN, M. J.; CRAMER, K. S. Windowing chicken eggs for developmental studies. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 8, p. e306, 2007.

KOTHAPALLI, C. R. Differential impact of heavy metals on neurotoxicity during development and in aging central nervous system. **Current Opinion in Toxicology**, v. 26, p. 33-38, 2021.

KOWALSKI, T. W.; DUPONT, A. V.; RENGEL, B. D.; SGARIONI, E.; GOMES, J. A.; FRAGA, L. R.; SCHULER-FACCINI, L.; VIANNA, F. S. L. Assembling systems biology, embryo development and teratogenesis: What do we know so far and where to go next? **Reproductive Toxicology**, v. 88, p. 67-75, 2019.

KRUSE, J-P.; GU, W. Modes of p53 Regulation. **Cell**, v. 137, n. 4, p. 609-622, 2009.

KUMAR, A.; GOTTESFELD, P. Lead content in household paints in India. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 1, p. 333-337, 2008.

KUO, B. R.; ERICKSON, C.A. Regional differences in neural crest morphogenesis. **Cell Adhesion and Migration**, v. 4, n. 4, p. 567-585, 2010.

KURATANI, S. C.; KIRBY, M.L. Initial migration and distribution of cardiac neural crest in the avian embryo: an introduction to the concept of the circumpharyngeal crest. **American Journal of Anatomy**, v.191, n. 3, p. 215-227, 1991.

KURATANI, S.; KUSAKABE, R.; HIRASAWA, T. The neural crest and evolution of the head/trunk interface in vertebrates. **Developmental Biology**, v. 44, p. S60-S66, 2018.

KURTH, T.; FESENKO, I. V.; SCHNEIDER, S.; MÜNCHBERG, F. E.; JOOS, T. O.; SPIEKER, T. P.; HAUSEN, P. Immunocytochemical studies of the interactions of cadherins and catenins in the early *Xenopus* embryo. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 215, n. 2, p. 155-169, 1999.

KUWABARA, S.; YAMAKI, M.; YU, H.; ITOH, M. Notch signaling regulates the expression of glycolysis-related genes in a context-dependent manner during embryonic development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 2, p. 803-808, 2018.

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.

LAU, C.; BUTENHOFF, J. L.; ROGERS, J. M. The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 198, n. 2, p. 231-341, 2004.

LAU, C.; THIBODEAUX, J. R.; HANSON, R. G.; NAROTSKY, M. G.; ROGERS, J. M.; LINDSTROM, A. B.; STRYNAR, M. J. Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse. **Toxicological Sciences: An official Journal of the Society of Toxicology**, v. 90, n. 2, p. 510-518, 2006.

LE DOUARIN, N. M. DUPIN, E. The "beginnings" of the neural crest. **Developmental Biology**, v. 444 Suppl 1, p. S3-S13, 2018.

LE DOUARIN, N. M. The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. **Mechanisms of Development**, v. 121, n. 9, p. 1089-1102, 2004.

LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. The Neural Crest, a Fourth Germ Layer of the Vertebrate Embryo: Significance in Chordate Evolution. *In*: TRAINOR, P. A. **NEURAL CREST CELLS: Evolution, Development and Disease**. 1 Ed. San Diego: Elsevier Inc, 2014, 3-26.

LE DOUARIN, N. M.; KALCHEIM, C. **The Neural Crest**. 2^a ed. Cambridge University Press, 1999, p. 1 – 58.

LE NOVÈRE, N. Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. **Nature Reviews. Genetics**, v. 16, n. 3, p. 146-158, 2015.

LEE, J-W.; CHOI, H.; HWANG, U-K.; KANG, J-C.; KANG, Y. J.; KIM, K. I.; KIM, J-H. Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 68, p. 101-108, 2019.

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.

LEONARD, C. E.; TANEYHILL, L. A. The road best travelled: Neural crest migration upon the extracellular matrix. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 100, p. 1987-185, 2020.

LEONARD, S. S.; BOWER, J. J.; SHI, X. Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 255, n. 1-2, p. 3-10, 2004.

LEONARD, S. S.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 12, p. 1921-1942, 2004.

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**, v. 80, p. 99-106, 2019.

LI, J.; RODRIGUEZ, G.; HAN, X.; JANEČKOVÁ, E.; KAHNG, S.; SONG, B.; CHAI, Y. Regulatory Mechanisms of Soft Palate Development and Malformations. **Journal of Dental Research**, v. 98, n. 9, p. 959-967, 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.; ZHANG, X. Perfluorooctanoic acid stimulates ovarian cancer cell migration, invasion via ERK/NF- κ B/MMP-2/-9 pathway. **Toxicology Letters**, v. 249, 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, Z. Y.; MA, Z. L.; LU, W. H.; CHENG, X.; CHEN, J. L.; SONG, X. Y.; CHUAI, M.; LEE, K. K.; YANG, X. Ethanol exposure represses osteogenesis in the developing chick embryo. **Reproductive Toxicology**, v. 62, p. 53-61, 2016.
- LI, Z.; YU, Z.; GAO, P.; YIN, D. Multigenerational effects of perfluorooctanoic acid on lipid metabolism of *Caenorhabditis elegans* and its potential mechanism. **The Science of the Total Environment**, v. 703, p. 134762, 2020.
- LIANG, L.; PAN, Y.; BIN, L.; LIU, Y.; HUANG, W.; LI, R.; LAI, K. P. Immunotoxicity mechanisms of perfluorinated compounds PFOA and PFOS. **Chemosphere**, v.291, Part 2, p. 132892, 2022.
- LIAO, C-H.; LI, X-Y.; WU, B.; DUAN, S.; JIANG, G-B. Acute enhancement of synaptic transmission and chronic inhibition of synaptogenesis induced by perfluorooctane sulfonate through mediation of voltage-dependent calcium channel. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 14, p. 5335-5341, 2008.
- LIAO, G.; WANG, P.; ZHU, J.; WENG, X.; LIN, S.; HUANG, J.; XU, Y.; ZHOU, F.; ZHANG, H.; TSE, L. A.; ZOU, F.; MENG, X. Joint toxicity of lead and cadmium on the behavior of zebrafish larvae: An antagonism. **Aquatic Toxicology**, v. 238, p. 105912, 2021.
- LIAO, J.; CAI, X.; YANG, Y.; CHEN, Q.; GAO, S.; LIU, G.; SUN, L.; LUO, Z.; LEI, T.; JIANG, M. Dynamic study of the lead (Pb) tolerance and accumulation characteristics of new dwarf bamboo in Pb-contaminated soil. **Chemosphere**, v. 282, p. 131089, 2021.
- LIU, H.; SHENG, N.; ZHANG, W.; DAI, J. Toxic effects of perfluorononanoic acid on the development of Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 32, p. 26-34, 2015.
- LIU, J.; LI, J.; LIU, Y.; CHAN, H. M.; ZHAO, Y.; CAI, Z.; WU, Y. Comparison on gestation and lactation exposure of perfluorinated compounds for newborns. **Environment International**, v. 37, n. 7, p. 1206-1212, 2011.
- LIU, J.; LIAO, G.; TU, H.; HUANG, Y.; PENG, T.; XU, Y.; CHEN, X.; HUANG, Z.; ZHANG, Y.; MENG, X.; ZOU, F. A protective role of autophagy in Pb-induced developmental neurotoxicity in zebrafish. **Chemosphere**, v. 235, p. 1050-1058, 2019.
- LIU, Q. S.; HAO, F.; SUN, Z.; LONG, Y.; ZHOU, Q.; JIANG, G. Perfluorohexadecanoic acid increases paracellular permeability in endothelial cells through the activation of plasma kallikrein-kinin system. **Chemosphere**, v. 190, p. 191-200, 2018.
- LIU, W.; IRUDAYARAJ, J. Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure inhibits DNA methyltransferase activities and alters constitutive heterochromatin organization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 141, p. 111358, 2020.

- 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: An International Journal Published in Association with BIBRA**, v. 25, n. 7. p. 1294-1301, 2011.
- LONG, M.; GHISARI, M.; KJELDSEN, 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.
- LU, Y.; LUO, B.; LI, J.; DAI J. Perfluorooctanoic acid disrupts the blood-testis barrier and activates the TNF α /p38 MAPK signaling pathway *in vivo* and *in vitro*. **Archives of Toxicology**, v.90, n. 4, p. 971-983, 2016.
- LUMSDEN, A.; SPRAWSON, N.; GRAHAM, A. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. **Development**, v. 113, n. 4, p. 1281-1291, 1991.
- LUO, Y.; HIGH, F. A.; EPSTEIN, J. A.; RADICE, G. L. N-cadherin is required for neural crest remodeling of the cardiac outflow tract. **Developmental Biology**, v. 299, n. 2, p. 517-528, 2006.
- LURIE, D. I.; BROOKS, D. M.; GRAY, L. C. The effect of lead on the avian auditory brainstem. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 1, p. 108-117, 2006.
- 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 α and Wnt5a/Frizzled2. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 381, p. 114716, 2019.
- MA, Y.; HUANG, P.; CAO, J.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; CHEN, B. Analysis of a more sustainable method for recycling waste lead batteries: Surface renewal promotes desulfurization agent regeneration. **Waste Management**, v. 137, p. 319-328, 2022.
- MAHONEY, H.; XIE, Y.; BRINKMANN, M.; GIESY, J. P. Next Generation Per- and Poly-Fluoroalkyl Substances: Status and Trends, Aquatic Toxicity, and Risk Assessment. **Eco-Environment and Health**, [preprint], 2022.
- MAMELI, O.; CARIA, M. A.; MELIS, F.; SOLINAS, A.; TAVERA, C.; IBBA, A.; TOCCO, M.; FLORE, C.; RANDACCIO, F. S. Neurotoxic effect of lead at low concentrations. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 269-275, 2001.
- MANSEL, C.; FROSS, S.; ROSE, J.; DEMA, E.; MANN, A.; HART, H.; KLAWINSKI, P.; VOHRA, B. P. S. Lead exposure reduces survival, neuronal determination, and differentiation of P19 stem cells. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 72, p. 58-70, 2019.
- MARCEAU G.; GALLOT, D.; LEMERY, D.; SAPIN, V. Metabolism of retinol during mammalian placental and embryonic development. **Vitamins and Hormones**, v. 75, p. 97-115, 2007.
- MAS, A.; AROLA, L. L. Cadmium and lead toxicity effects on zinc, copper, nickel and iron distribution in the developing chick embryo. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 80, n. 1, p. 185– 188, 1985.

MASON, L. H.; HARP, J. P.; HAN, D. Y. Pb neurotoxicity: neuropsychological effects of lead toxicity. **BioMed Research International**, p. 840547, 2014.

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.

MCCAULEY, N.; LAWLESS, L.; BASRA, M.; DEPADOVA, N.; LOYOLA, X. A.; ZHOU, H.; KO, G.; ZHANG, K.; XIE, L. *In ovo* exposure to cadmium causes right ventricle hyperplasia due to cell proliferation of cardiomyocytes. **Toxicology Letters**, v. 366, p. 1-6, 2022.

MCKEOWNN, S. J.; WALLACE, A. S.; ANDERSON, R. B. Expression and function of cell adhesion molecules during neural crest migration. **Developmental Biology**, v. 373, p. 244-257, 2003.

MCKINNEY, M.C.; MCLENNAN, R.; GINIUNAITE, R.; BAKER, R.E.; MAINI, P.K.; OTHMER, H.G.; KULESA P. M. Visualizing mesoderm and neural crest cell dynamics during chick head morphogenesis. **Developmental Biology**, v. 461, n. 2, p. 184-196, 2020.

MEDINA-CUADRA, L.; MONSORO-BURQ, A. H. *Xenopus*, an emerging model for studying pathologies of the neural crest. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 145, p.313-348, 2021.

MELLOTT, D. O.; BURKE, R. D. Divergent roles for Eph and Ephrin in Avian Cranial Neural Crest. **BMC Developmental Biology**, v. 8: 56, 2008.

MIYAGAWA-TOMITA, S.; WALDO, K.; TOMITA, H.; KIRBY, M. L. Temporospacial study of the migration and distribution of cardiac neural crest in quail-chick chimera. **American Journal of Anatomy**, v. 192, n. 1, p. 79-88, 1991.

MIYAKE, A.; NAKAYAMA, Y.; KONISHI, M.; ITOH, N. Fgf19 regulated by Hh signaling is required for zebrafish forebrain development. **Developmental Biology**, v. 288, n. 1, p. 259-275, 2005.

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

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, n. 3, p. 321-334, 2020.

MONROY, B. Y.; ADAMSON, C. J.; CAMACHO-AVILA, A.; GUERZON, C. N.; ECHEVERRIA JR, C. V.; ROGERS, C. D. Expression atlas of avian neural crest proteins: Neurulation to migration. **Developmental Biology**, v. 483, p. 39-57, 2022.

MONROY, R.; MORRISON, K.; TER, K.; ATKINSON, S.; KUBWABO, C.; STEWART, B.; FOSTER, W. G. Serum levels of perfluoroalkyl compounds in human maternal and umbilical cord blood samples. **Environmental Research**, v. 108, p. 56– 62, 2008.

- MORACHO, N.; LEARTE, A. I. R.; MUÑOZ-SÁEZ, E.; MARCHENA, M. A.; CID, M. A.; ARROYO, A. G.; SÁNCHEZ-CAMACHO, C. Emerging roles of MT-MMPs in embryonic development. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 251, n. 2, 240-275, 2022.
- MOTAS, M.; JIMÉNEZ, S.; OLIVA, J.; CÁMARA, M. A. PÉREZ-CÁRCELES, M. D. Heavy Metals and Trace Elements in Human Breast Milk from Industrial/Mining and Agricultural Zones of Southeastern Spain. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 17, p. 9289, 2021.
- MOUSA, S. A. Expression of adhesion molecules during cadmium hepatotoxicity. **Life Sciences**, v. 75, n. 1, p. 93-105, 2004.
- MUKHOPADHYAY, P.; SEELAN, R. S.; GREENE, R. M.; PISANO, M. M. Impact of prenatal arsenate exposure on gene expression in a pure population of migratory cranial neural crest cells. **Reproductive Toxicology**, v. 86, p. 76-85, 2019.
- MÜLLER, Y. M.; KOBUS, K.; SCHATZ, J. C.; AMMAR, D.; NAZARI, E. M. Prenatal lead acetate exposure induces apoptosis and changes GFAP expression during spinal cord development. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, n. 1, p. 223-229, 2012.
- MURRAY, K.E.; THOMAS, S.M.; BODOUR, A.A. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 3462–3471, 2010.
- NÁJERA, G. S.; WEIJER, C. J. Cellular processes driving gastrulation in the avian embryo. **Mechanisms of Development**, v. 163, p. 103624, 2020.
- NAKAMURA, Y.; OHBA, K.; OHTA, H. Participation of metal transporters in cadmium transport from mother rat to fetus. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 37, n. 5, p. 1035-1044, 2012.
- NARAYANASAMY, M.; DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N. Bioremediation of noxious metals from e-waste printed circuit boards by Frankia. **Microbiological Research**, v. 245, p. 126707, 2021.
- NARBAITZ, R.; MARINO, I.; SARKAR, K. Lead-induced early lesions in the brain of the chick embryo. **Teratology**, v. 32, p. 389-396, 1985.
- NASPOLINI, N. F.; MEYER, A.; MOREIRA, J. C.; SUN, H.; FROES-ASMUS, C. I. R.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G. Environmental pollutant exposure associated with altered early-life gut microbiome: Results from a birth cohort study. **Environmental Research**, v. 205. P. 112545, 2022.
- National Research Council (US) Committee on Developmental Toxicology. Scientific Frontiers in **Developmental Toxicology and Risk Assessment**. Washington (DC): National Academies Press (US), 2000.
- 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, n. 3, p. 1121-1126, 2011.

NGANGA, C.; CLARK, S.; WEINBERG, J. Lead in Kenyan Household Paint. **University of Cincinnati, Nairobi, Kenya, IPEN (2012)**. Disponível em <https://ipen.org/sites/default/files/documents/Lead%20in%20Kenyan%20Household%20Paint%20Sept.%202012.pdf>> Acesso em 22 dez 2021.

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.

NJATI, S. Y.; MAGUTA, M. M. Lead-based paints and children's PVC toys are potential sources of domestic lead poisoning - A review. **Environmental Pollution**, v. 249, p. 1091-1105, 2019.

NUSSE, R. Cell signaling: Disarming Wnt. **Nature**, v. 519, n. 7542, p. 163-164, 2015.

ODA, H.; TAKEICHI, M. Evolution: structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. **The Journal of Cell Biology**, v. 193, n. 7, p. 1137-1146, 2011.

OLATUNDE, O. C.; T KUVAREGA, A. T.; ONWUDIWE, D. C. Photo enhanced degradation of polyfluoroalkyl and perfluoroalkyl substances. **Heliyon**, v. 6, n. 12, p. e05614, 2020.

OLLSON, C. J.; SMITH, E.; HERDE, P.; JUHASZ, A.L. Influence of co-contaminant exposure on the absorption of arsenic, cadmium and lead. **Chemosphere**, v. 168, p. 658-666, 2017.

OLSON, R. K. **Manual de Toxicologia Clínica**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PAN, Y.; ZHU, Y.; ZHENG, T. CUI, Q.; BUKA, S. L.; ZHANG, B.; GUO, Y.; XIA, W.; YEUNG, L. W.; LI, Y.; ZHOU, A.; QIU, L.; LIU, H.; JIANG, M.; WU, C.; XU, S.; DAI, J. Novel Chlorinated Polyfluorinated Ether Sulfonates and Legacy Per-/Polyfluoroalkyl Substances: Placental Transfer and Relationship with Serum Albumin and Glomerular Filtration Rate. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 1, p. 634-644, 2017.

PARADA, C.; HAN, D.; GRIMALDI, A.; SARRIÓN, P.; PARK, S. S.; PELIKAN, R.; SANCHEZ-LARA, P. A.; CHAI, Y. Disruption of the ERK/MAPK pathway in neural crest cells as a potential cause of Pierre Robin sequence. **Development**, v. 142, n. 21, p. 3734-3745, 2015.

PARK, K.; HAN, E. J.; AHN, G.; KWAK, I-S. Effects of thermal stress-induced lead (Pb) toxicity on apoptotic cell death, inflammatory response, oxidative defense, and DNA methylation in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 224, p. 105479, 2020.

PARLIAMENT, EUROPEAN AND COUNCIL, EUROPEAN. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes in **Official Journal of the European Union**, 2010.

PARR-STURGESS, C. A.; TINKER, C. L.; HART, C. A.; BROWN, M. D.; CLARKE, N. W.; PARKIN, E. T. Copper modulates zinc metalloproteinase-dependent ectodomain shedding of key signaling and adhesion proteins and promotes the invasion of prostate cancer epithelial cells. **Molecular Cancer Research: MCR**, v. 10, n. 10, p. 1282-1293, 2012.

PASCALE, A.; SOSA, A.; BARES, C.; BATTOCLETI, A.; MOLL, M. J.; POSE, D.; LABORDE, A.; GONZÁLEZ, H.; FEOLA, G. E-Waste Informal Recycling: An Emerging Source of Lead Exposure in South America. **Annals of Global Health**, v. 82, n. 1, p. 197-201, 2016.

PIACENTINO, M. L.; LI, Y.; BRONNER M. E. Epithelial-to-mesenchymal transition and different migration strategies as viewed from the neural crest. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 66, p. 43-50, 2020.

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.

PILON, N. Treatment and Prevention of Neurocristopathies. **Trends in Molecular Medicine**, v. 27, n. 5, p. 451-468, 2021.

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.

PLANT, N. J. An introduction to systems toxicology. **Toxicology Research**, v. 4, n. 1, p. 9-22, 2015.

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.

POTESER M.; HUTTER, H-P.; MOSHAMMER, H.; WEITENSFELDER, L. Perfluorooctanoic acid (PFOA) enhances NOTCH-signaling in an angiogenesis model of placental trophoblast cells. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 229, p. 113566, 2020.

PRATT, C. H.; VADIGEPALLI, R.; CHAKRAVARTHULA, P.; GONYE, G. E.; PHILP, N. J.; GRUNWALD, G. B. Transcriptional regulatory network analysis during epithelial-mesenchymal transformation of retinal pigment epithelium. **Molecular Vision**, v. 14, p. 1414-1428, 2008.

PROZIALECK, W. C.; NIEWENHUIS, R. J. Cadmium (Cd^{2+}) disrupts Ca^{2+} -dependent cell-cell junctions and alters the pattern of E-cadherin immunofluorescence in LLC-PK₁ cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 181, n. 3, p. 1118-1124, 1991.

RAMÍREZ-MALULE, H.; QUIÑONES-MURILLO, D. H.; MANOTAS-DUQUE, D. Emerging contaminants as global environmental hazards. A bibliometric analysis. **Emerging Contaminants**, v. 6, p. 179-193, 2020.

RANA, S. V. S. Metals and apoptosis: recent developments. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 22, n. 4, p. 262-284, 2008.

RASHIDI, H.; SOTTILE, V. The chick embryo: hatching a model for contemporary biomedical research. **BioEssays**, v. 31, n. 4, p. 459-465, 2009.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as an experimental model to study *in vivo* angiogenesis in glioblastoma multiforme. **Brain Research Bulletin**, v. 182, p. 26-29, 2022.

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.

RIVERA, E. D.; MEAKIN, J. R.; HOLSGROVE, T. P. *In-vitro* models of disc degeneration – A review of methods and clinical relevance. **Journal of Biomechanics**, v. 142, 111260, 2022.

RIVERO, L. B. D.; SCHATZ, J.C.; CARVALHO, M. C.; MÜLLER, Y. M. R. Ação do acetato de chumbo sobre o padrão de desenvolvimento de embriões de *gallus domesticus*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n.1, p 83-87, 2006.

ROGERS, C. D. Data on the effects of N-cadherin perturbation on the expression of type II cadherin proteins and major signaling pathways. **Data in Brief**, v. 20, p. 419-425, 2018.

ROGERS, C. D.; SORRELLS, L. K.; BRONNER, M. E. A catenin-dependent balance between N-cadherin and E-cadherin controls neuroectodermal cell fate choices. **Mechanisms of Development**, v. 152, p. 44-56, 2018.

RONCO, A. M.; ARGUELLO, G.M.; GRAS, N. L. Metals content in placentas from moderate cigarette consumers: correlation with newborn birth weight. **Biometals**, v. 18, p. 233-241, 2005.

ROSENBRUCH, M. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. **ALTEX**, v. 14, p. 111-113, 1997.

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

ROVASIO, R. A.; BATTIATO, N. L. Ethanol Induces Morphological and Dynamic Changes on *In Vivo* and *In Vitro* Neural Crest Cells. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.26, n. 8, p. 1286-1298, 2002.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 126-140, 2010.

RUDGE, C. V.; RÖLLIN, H. B.; NOGUEIRA, C. M.; THOMASSEN, Y.; RUDGE, M. C.; ODLAND, J. O. The placenta as a barrier for toxic and essential in paired maternal and cord blood samples of South African Delivering women. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 11, n. 7. 2009.

SAKAMOTO, M; CHAM, H. M.; DOMINGO, J. L.; KUBOTA, M.; MURATA, K. Changes in body burden of mercury, lead, arsenic, cadmium and selenium in infants during early lactation in comparison with placental transfer. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 179–84, 2012.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B; SANTANA, I. C. H. **Histologia e Embriologia Animal comparada**, 2 ed. Fortaleza – Ceará: EdUECE, 2015.

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.

SAND, K. M. K.; GRUBER, M. M.; SANDLIE, I.; MATHIESEN, L.; ANDERSEN, J. T.; WADSACK, C. Contribution of the *ex vivo* placental perfusion model in understanding transplacental immunoglobulin G transfer. **Placenta**, v. 127, p. 77-87, 2022.

SCHATZ, J.C. **Caracterização morfológica de embriões de *gallus domesticus*, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula.** Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SCHILHAM, M. WW.; WILSON, A.; MOERER, P.; BENAÏSSA-TROUW, B. J.; CUMANO, A.; CLEVERS, H. C. Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 8, p. 3984-3991, 1998.

SCHMIDT, C. W. Unfair trade: e-waste in Africa. **Environmental Health Perspectives**, v.114, n. 4, p. 232-235, 2006.

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.

SCHWANZ, T. G.; LLORCA, M.; FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Perfluoroalkyl substances assessment in drinking waters from Brazil, France and Spain. **Science of the Total Environment**, v. 539, p. 143–152, 2016.

SECHRIST, J.; SCHERSON, T.; BRONNER-FRASER, M. Rhombomere rotation reveals that multiple mechanisms contribute to the segmental pattern of hindbrain neural crest migration. **Development**, v. 120, n. 7, p. 1777-1790, 1994.

SFAKIANAKIS, D. G.; RENIERI, E.; KENTOURI, M.; TSATSAKIS, A. M. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. **Environmental Research**, v. 137, p. 246-255, 2015.

SHAH, A.; TANEYHILL, L. A. Differential expression pattern of Annexin A6 in chick neural crest and placode cells during cranial gangliogenesis. **Gene Expression Patterns**, v. 18, p. 21-28, 2015.

SHAPIRO, L.; WEIS, W. I. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 3, p. a003053, 2009.

SHARMA, S.; UGGINI, G. K.; DESAI, I.; BALAKRISHNAN, S. A combination insecticide at sub-lethal dose debilitated the expression pattern of crucial signaling molecules that facilitate craniofacial patterning in domestic chick *Gallus domesticus*. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 76, p. 106386, 2019.

SHEFA, S. T.; HÉROUX, P. Both physiology and epidemiology support zero tolerable blood lead levels. **Toxicology Letters**, v. 280, p. 232-237, 2017.

SHENG, G. Day-1 chick development. **Developmental Dynamics**, v. 243, n. 3, p. 357-367, 2014.

SHI, D.; MI, G.; WANG, M.; WEBSTER, T. J. *In vitro* and *ex vivo* systems at the forefront of infection modeling and drug discovery. **Biomaterials**, v. 198, p. 228-249, 2019.

SIISMETS, E. M.; ESCOTILHA, N. E. Cranial Neural Crest Cells and Their Role in the Pathogenesis of Craniofacial Anomalies and Coronal Craniosynostosis. **Journal of Developmental Biology**, v. 8, n. 3, p.18, 2020.

SINGH, P.; CHAUHAN, K. Chapter 2 - Persistent Organic Pollutants (POPs) in Environment and its Health Impact. Editor(s): Pardeep Singh, Chaudhery Mustansar Hussain, Sanchayita Rajkhowa, Management of Contaminants of Emerging Concern (CEC). *In Environment*, Elsevier, p. 71-91, 2021.

SITTEWELLE, M.; MONSORO-BURQ, A. H. AKT signaling displays multifaceted functions in neural crest development. **Developmental Biology**, v. 444, n. Suppl 1, p. S144-S155, 2018.

SLACK J.M.W. **Evolution and Development**. *In: Essential Developmental Biology*. (Ed.). John Wiley & Sons, Chichester, p. 419-439, 2013.

SLACK, J. M. W. **Essential Developmental Biology**. 3 ed. Wiley-Blackwell, 2012

SLACK, J. M.; HOLLAND, P. W.; GRAHAM, C. F. The zootype and the phylotypic stage. **Nature**, v. 361, n. 6412, p. 490-492, 1993.

SLUSARSKI, D. C.; PELEGRI, F. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. **Developmental Biology**, v. 307, n. 1, p. 1-13, 2007.

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, A.; GRAHAM, A. Restricting Bmp-4 Mediated Apoptosis in Hindbrain Neural Crest. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 220, n. 3, p.276-283, 2001.

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.

SNIDER, N.T.; MISHINA, Y. Cranial Neural Crest Cell Contribution to craniofacial Formation, Pathology, and Future Directions in Tissue Engineering. **Birth Defects Research. Part C, Embryo Today**, v. 102, n. 3, p. 324-332, 2014.

SØFTELAND, L.; KIRWAN, J. A.; HORI, T. S. F.; STORSETH, T. R.; SOMMER, U.; BERNTSEN, M. H. G.; VIAN, 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.

- SONNACK, L.; KLAWONN, T.; KRIEHBUBER, R.; HOLLERT, H.; SCHÄFERS, C.; FENSKE, M. Concentration dependent transcriptome responses of zebrafish embryos after exposure to cadmium, cobalt and copper. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics**, v. 24, p. 29-40, 2017.
- SPREITZER, E.; ALDERSON, T. R.; BOURGEOIS, B.; EGGENREICH, L.; HABACHER, H.; BRAHMERSDORFER, G.; PRITIŠANAC, I.; SÁNCHEZ-MURCIA, P. A.; MADL, T. FOXO transcription factors differ in their dynamics and intra/intermolecular interactions. **Current Research in Structural Biology**, v. 4, p. 118-133, 2022.
- 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.
- STONE, J.; SUTRAVE, P.; GASCOIGNE, E.; GIVENS, M.B.; FRY, R. C.; MANUCK, T. A. Exposure to toxic metals and per- and polyfluoroalkyl substances and the risk of preeclampsia and preterm birth in the United States: a review. **American Journal of Obstetrics and Gynecology MFM**, v. 3, n. 3, p. 100308, 2021.
- STROBL-MAZZULLA, P. H.; BRONNER, M. E. Epithelial to mesenchymal transition: new and old insights from the classical neural crest model. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 5-6, p. 441-416, 2012.
- SUDIWALA, S.; KNOX, S. M. The emerging role of cranial nerves in shaping craniofacial development. **Genesis: The Journal of Genetics and Development**, v. 57, n. 1, p. e23282, 2019.
- SZABO-ROGERS, H. L.; SMITHERS, L. E.; YAKOB, W. LIU, K. J. New directions in craniofacial morphogenesis. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 84-94, 2010.
- TABOUREAU, O.; EL M'SELMI, W.; AUDOUZE, K. Integrative systems toxicology to predict human biological systems affected by exposure to environmental chemicals. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 405, p. 115210, 2020.
- TALLEY, M. J.; NARDINI, D.; QIN, S.; PRADA, C. E.; EHRMAN, L. A.; WACLAW, R. R. A role for sustained MAPK activity in the mouse ventral telencephalon. **Developmental Biology**, v. 476, p. 137-147, 2021.
- TAMM, C.; CECCATELLI, S. Mechanistic insight into neurotoxicity induced by developmental insults. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 408-418, 2017.
- 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. A.; KORDAS, K.; GOLDING, J.; EMOND, A. M. Effects of low-level prenatal lead exposure on child IQ at 4 and 8 years in a UK birth cohort study. **Neurotoxicology**, v. 62, p. 162-169, 2017.

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.

TEN DIJKE, P.; ARTHUR, H. M. Extracellular control of TGF- β signaling in vascular development and disease. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 11, p. 857-869, 2007.

TÊTE, N.; DURFORT, M.; RIEFFEL, D.; SCHEIFLER, R.; SÁNCHEZ-CHARDI, A. Histopathology related to cadmium and lead bioaccumulation in chronically exposed wood mice, *Apodemus sylvaticus*, around a former smelter. **Science of the Total Environment**, v. 481, p. 167-177, 2014.

THEVENEAU, E.; MAYOR, R. Neural crest cell migration: guidance, pathways, and cell-cell interactions. In: TRAINOR, P. A. **Neural Crest Cell: Evolution, Development and Disease**. Academic Press is an imprint of Elsevier, 2014. p. 73-88.

THÉVENOD, F. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 221-239, 2009.

THOMPSON, J. M.; BANNIGAN, J. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. **Reproductive Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 304-315, 2008.

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, S.; VON SCHIRNDING, Y. E.; PRAPAMONTOL, T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. **Bull World Health Organ**, v.78, n.9, p.1068-1077, 2000.

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.

UNEP. The Global Alliance to Eliminate Lead Paint (Lead Paint Alliance). **United Nations Environment Programme**, 2021. Disponível em < <https://www.unep.org/explore-topics/chemicals-waste/what-we-do/emerging-issues/global-alliance-eliminate-lead-paint>> Acesso em 22 dez 2021.

VALENT, F.; LITTLE, D.; BERTOLLINI, R.; NEMER, L. E.; BARBONE, F.; TAMBURLINI, G. Burden of disease attributable to selected environmental factors and injury among children and adolescents in Europe. **Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2032-2039, 2004.

VALLVERDÚ-COLL, N.; LÓPEZ-ANTIA, A.; MARTINEZ-HARO, M.; ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E.; MATEO, R. Altered immune response in mallard ducklings exposed to lead through maternal transfer in the wild. **Environmental Pollution**, v. 205, p. 350-356, 2015.

VAN ROY, F.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 65, n. 23, p. 3756-3788, 2008.

VEGA-LOPEZ, G. A.; CERRIZUELA, S.; TRIBULO, C.; AYBAR, M. J. Neurocristopathies: New insights 150 years after the neural crest discovery. **Developmental Biology**, v. 444, p. S110-S143, 2018.

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.

VIGNES, H.; VAGENA-PANTOULA, V.; VERMOT, J. Mechanical control of tissue shape: Cell-extrinsic and -intrinsic mechanisms join forces to regulate morphogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 130, p. 45-55, 2022.

VILCHES-MOURE, J. G. Embryonic Chicken (*Gallus gallus domesticus*) as a Model of Cardiac Biology and Development. **Comparative Medicine**, v. 69, n. 3, p. 184-203, 2019.

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

WANG, L.; ZHENG, Y.; ZHANG, G.; HAN, X.; LI, S.; ZHAO, H. Lead exposure induced inflammation in bursa of Fabricius of Japanese quail (*C. japonica*) via NF- κ B pathway activation and Wnt/ β -catenin signaling inhibition. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 224, p. 111587, 2021.

WANG, Y.; CHANG, W.; WANG, L. ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, M.; WANG, Y. LI, P. A review of sources, multimedia distribution and health risks of novel fluorinated alternatives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 109402, 2019.

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, Z.; ZHAO, H.; XU, Y.; ZHAO, J.; SONG, Z.; BI, Y. LI, Y.; LAN, X.; PAN, C.; FOULKES, N. S.; ZHANG, S. Early-life lead exposure induces long-term toxicity in the central nervous system: From zebrafish larvae to juveniles and adults. **The Science of the Total Environment**, v. 804, p. 150185, 2022.

WANNINAYAKE, D. M. Comparison of currently available PFAS remediation technologies in water: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 283, 111977, 2021.

WATT, K. E. N.; TRAINOR, P. A. Neurocristopathies: The Etiology and Pathogenesis of Disorders Arising from Defects in Neural Crest Cell Development. **Neural Crest Cells Evolution, Development and Disease. Neural Crest Cells Evolution, Development and Disease**. 1.ed. Elsevier Inc, p. 361-394, 2014.

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.

WEISZ, P. B. The normal stages in the development of the South African clawed toad, *Xenopus laevis*. **The Anatomical Record**, v. 93, p. 161-169, 1945.

WHITE, S. S.; FENTON, S. E.; HINES, E. P. Endocrine disrupting properties of perfluorooctanoic acid. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, p. 16-26, 2011.

WHO. Children and digital dumpsites: e-waste exposure and child health. **Geneva: World Health Organization**, 2021.

WHO. Enviromental Health Criteria 237 - Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals. **World Health Organization**, 2006.

WHO. Exposure do cadmium: a major public health concern. **World Health Organization**, 2019b. Disponível em < <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CED-PHE-EPE-19-4-3> >. Acesso em 20 out 2020.

WHO. Lead poisoning and health. **World Health Organization**, 2019a.

WILLIAMS, R. M.; SAUKA-SPENGLER, T. *Ex ovo* electroporation of early chicken embryos. **Structured, Transparent, Accessible, Reproducible Protocols**, v. 2, n. 2, p. 100424, 2021.

WILSON, J. G. Experimental studies on congenital malformations. **Journal of Chronic Diseases**, v. 10, n. 2, p. 111-130, 1959.

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.; VESTERGREN, R.; BERGER, U.; COUSINS, I. T. Early life exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs): A critical review. **Emerging Contaminants**, v. 3, n. 2, p. 55-68, 2017.

WU, D-L.; CHENG, L.; RAO, Q-X.; WANG, X-L.; ZHANG, Q-C.; YAO, C-X.; CHEN, S. S.; LIU, X.; SONG, W.; ZHOU, J-X.; SONG, W-G. Toxic effects and transcriptional responses in zebrafish liver cells following perfluorooctanoic acid exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 253, p. 106328, 2022.

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.

WU, M. Y.; HILL, C. S. TGF- β superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. **Developmental Cell**, v. 16, n. 3, p. 329-343, 2009.

WU, Q.; ACHEBOUCHE, R.; AUDOUZE, K. Computational systems biology as an animal-free approach to characterize toxicological effects of persistent organic pollutants. **ALTEX**, v. 37, n. 2, p. 287-299, 2020.

XIE, S.; JIANG, L.; WANG, M.; SUN, W.; YU, S.; TURNER, J. R.; YU, Q. Cadmium ingestion exacerbates *Salmonella* infection, with a loss of goblet cells through activation of Notch signaling pathways by ROS in the intestine. **Journal of Hazardous Materials**, v. 391, p. 122262, 2020.

XU, Y.; ZHAO, H.; WANG, Z.; GAO, H.; LIU, J.; LI, K. SONG, Z.; YUAN, C.; LAN, X.; PAN, C.; ZHANG, S. Developmental exposure to environmental levels of cadmium induces neurotoxicity and activates microglia in zebrafish larvae: From the perspectives of neurobehavior and neuroimaging. **Chemosphere**, v. 291, n. Pt 1, p. 132802, 2022.

YADAV, A.; VERHAEGEN, S.; FILIS, P.; DOMANSKA, D.; LYLE, R.; SUNDARAM, A. Y. M.; LEITHAUG, M.; ØSTBY, G. C.; ALEKSANDERSEN, M.; BERNTSEN, H. F.; ZIMMER, K. E.; FOWLER, P. A.; PAULSEN, R. E.; ROPSTAD, E. Exposure to a human relevant mixture of persistent organic pollutants or to perfluorooctane sulfonic acid alone dysregulates the developing cerebellum of chicken embryo. **Environment International**, v. 166, p. 107379, 2022.

YADAV, A.; VERHAEGEN, S.; VERBRUGGEN, E.; KERHOAS, M.; HUIBERTS, E. H. W.; HADERA, M. G.; BERNTSEN, H. F. ZIMMER, K. E.; ROPSTAD, E.; PAULSEN, R. E. A human relevant mixture of persistent organic pollutants (POPs) and perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) differentially affect glutamate induced excitotoxic responses in chicken cerebellum granule neurons (CGNs) *in vitro*. **Reproductive Toxicology**, v. 100, p. 100-119, 2021.

YAHYA, F. A.; HASHIM, N. F. M.; ALI, D. A. I.; LING, T. C.; CHEEMA, M. S. A brief overview to systems biology in toxicology: The journey from *in vivo*, *in-vitro* and -omics. **Journal of King Saud University – Science**, v. 33, n. 1, p. 101254, 2021.

YAMAGUCHI, Y.; MIURA, M. Programmed cell death in neurodevelopment. **Developmental Cell**, v. 32, n.4, p. 478-490, 2015.

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 chicken embryogenesis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 194, p. 110415, 2020.

YAN, Y.; WANG, G.; LUO, X.; ZHANG, P. PENG, S.; CHENG, X.; WANG, M. YANG, X. Endoplasmic reticulum stress-related calcium imbalance plays an important role on Zinc oxide nanoparticles-induced failure of neural tube closure during embryogenesis. **Environment International**, v. 152, p. 106495, 2021.

YANG, J.; WEINBERG, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. **Developmental Cell**, v. 14, n. 6, p. 818-829, 2008.

YEUNG, L. W. Y.; GURUGE, K. S.; YAMANAKA, N.; MIYAZAKI, S.; LAM, P. K. S. Differential expression of chicken hepatic genes responsive to PFOA and PFOS. **Toxicology**, v. 237, n 1-3, p. 111-125, 2007.

YIN, J.; WANG, A-P.; LI, W-F.; SHI, R.; JIN, H-T.; WEI, J-F. Sensitive biomarkers identification for differentiating Cd and Pb induced toxicity on zebrafish embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 56, p. 340-349, 2017.

YORK, J. R.; MCCAULEY, D. W. The origin and evolution of vertebrate neural crest cells. **Open Biology**, v. 10, n. 1, p. 190285, 2020.

YU, X-D.; YAN, C-H.; SHEN, X-M.; CAO, L-L.; YU, X-G.; JUN, L. Z.; LIU, J-X. Prenatal exposure to multiple toxic heavy metals and neonatal neurobehavioral development in Shanghai, China. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, p. 437-443, 2011.

ZAYDMAN, A. M. STROKOVA, A. L. PAHOMOVA, N. Y.; GUSEV, A. F.; MIKHAYLOVSKIY, M. V.; SHEVCHENKO, A. I.; ZAIDMAN, M. N.; SHILO, A. R.; SUBBOTIN, V. M. Etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis: Review of the literature and new epigenetic hypothesis on altered neural crest cells migration in early embryogenesis as the key event. **Medical Hypotheses**, v. 151, p. 110585, 2021.

ZAYNAB, M.; AL-YAHYAI, R.; AMEEN, A.; SHARIF, S.; ALI, L.; FATIMA, M.; KHAN, K. A.; LI, S. Health and environmental effects of heavy metals. **Journal of King Saud University – Science**, v. 34, n. 1, p. 101653, 2022.

ZHANG T.; ZHANG, C; ZHANG, J.; LIN, J.; SONG, D.; ZHANG, P.; LIU, Y.; CHEN, L.; ZHANG, L. Cadmium impairs zebrafish swim bladder development via ROS mediated inhibition of the Wnt/Hedgehog pathway. **Aquatic Toxicology**, v. 247, p. 106180, 2022.

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, P.; WANG, G.; LIN, Z.; WU, Y.; ZHANG, J.; LIU, M.; LEE, K. K. H.; CHUAI, M.; YANG, X. Alcohol exposure induces chick craniofacial bone defects by negatively affecting cranial neural crest development. **Toxicology Letters**, v. 281, p. 53-64, 2017.

ZHANG, Y-H.; WANG, T.; LI, Y-F.; DENG, Y-N.; SHEN, F-G. Roles of the Notch signaling pathway and microglia in autism. **Behavioral Brain Research**, v. 437, p. 114131, 2023.

ZHAO, R.; TRAINOR, P. A. Epithelial to mesenchymal transition during mammalian neural crest cell delamination. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [preprint], 2022.

ZHAO, X.; DUESTER, G. Effect of retinoic acid signaling on Wnt/ β -catenin and FGF signaling during body axis extension. **Gene Expression Patterns**, v. 9, n. 6, p. 430-435, 2009.

ZHAO, Z.; CAO, L.; HERNÁNDEZ-OCHOA, E.; SCHNEIDER, M. F.; REECE, E. A. Disturbed intracellular calcium homeostasis in neural tube defects in diabetic embryopathy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 514, n. 3, p. 960-966, 2019.

ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. **Cell Calcium**, v. 50, n. 3, p. 211-221, 2011.

ZHONG, Y.; SHEN, L.; YE, X. ZHOU, D.; HE, Y.; ZHANG, H. Mechanism of immunosuppression in zebrafish (*Danio rerio*) spleen induced by environmentally relevant concentrations of perfluorooctanoic acid. **Chemosphere**, v. 249, p. 126200, 2020.

ZHONG, Z.; ZHANG, C.; RIZAK, J. D.; CUI, Y.; XU, S.; CHE, Y. Chronic prenatal lead exposure impairs long-term memory in day old chicks. **Neuroscience Letters**, v. 476, n. 1, p. 23-6, 2010.

ZHOU, G.; LI, Z.; SUN, S.; FANG, Y.; WEI, Z. TGF- β 1 alleviates HgCl₂ induced apoptosis via P38 MAPK signaling pathway in human trophoblast cells. **Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA**, v. 61, p. 104626, 2019.

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.

ZHOU, Y-T.; LI, R.; LI, S-H.; MA, X.; LIU, L.; NIU, D.; DUAN, X. Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure affects early embryonic development and offspring oocyte quality via inducing mitochondrial dysfunction. **Environment International**, v. 167, p. 107413, 2022.

ZHU, B.; LIU, L.; LI, D-L.; 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, 2011.

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, p. 107105, 2021.