

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SANDRA CHRISTINA KOLODZIEJSKI

**EXPOSIÇÃO AO ÁCIDO PERFLUOROOCETANOICO (PFOA)
PREJUDICA A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL
DO TRONCO EM EMBRIÕES DE GALLUS GALLUS.**

CURITIBA
2024

Sandra Christina Kolodziejski

EXPOSIÇÃO AO ÁCIDO PERFLUOROOCTANOICO (PFOA)
PREJUDICA A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL
DO TRONCO EM EMBRIÕES DE *GALLUS GALLUS*.

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

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Feijó
Ortolani- Machado.

Coorientadora: Dra. Mariliza Cristine
Vieira da Costa

CURITIBA

2024

Dedico esse trabalho aos meus pais: João e Izabel, que sacrificaram
seus sonhos para que o meu se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dr^a. Claudia Feijó Ortolani-Machado por toda paciência e incentivo nas iniciações científicas e durante a realização desse trabalho. Obrigada por me acolher no Laboratório de Embriotoxicologia e pelas lições profissionais concedidas nesse período.

À minha coorientadora, Mariliza Cristine Vieira da Costa, que esteve ao meu lado nos momentos mais turbulentos desse trabalho, sempre auxiliando e me instruindo da melhor forma possível. Obrigada pelo companheirismo e pela amizade que foram tão importantes nesse período.

Aos meus pais João e Izabel, minhas irmãs Ângela, Rosângela e Ana e aos meus sobrinhos André, João e Heloíse. O amor de vocês foi meu maior incentivo durante a graduação.

Aos amigos Melyssa, Paula, Daniele, Eduardo e Danilo, por estarem ao meu lado em todos os momentos desse trabalho. Obrigada por acreditarem em mim e me incentivarem durante os diferentes momentos da graduação. Essa experiência jamais teria sido a mesma sem as brincadeiras, risadas e comidas compartilhadas.

Aos professores do grupo de Toxicologia Celular, por todos os ensinamentos por serem, para mim, uma referência profissional.

Aos meus amigos Ana, Mateus e Nicolas. Obrigada por serem minha família do coração e por nunca terem desistido de mim, mesmo nos momentos em que eu já havia.

Ao CTAF e a todos os técnicos do centro, muito obrigada por sempre serem tão solícitos nos atendimentos e esclarecimento de dúvidas. O trabalho de vocês foi essencial na realização desse estudo.

À Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis da UFPR e aos auxílios disponibilizados por ela, sem os quais eu nunca teria condições de permanecer em uma universidade.

À Casa da Estudante Universitária de Curitiba (CEUC) por ser um lar e por ter me oferecido a oportunidade de ter contato com realidades e culturas tão diferentes da minha. Além de possibilitar a minha permanência

na universidade, esse local trouxe pessoas muito queridas em minha vida.

Enfim, obrigada a todos e todas que estiveram ao meu lado durante a graduação.

"O ser humano é parte da natureza, e sua guerra contra a natureza é inevitavelmente uma guerra contra si mesmo."

Rachel Carso

RESUMO

A crista neural (CN) é uma população celular exclusiva dos vertebrados, caracterizada por sua pluripotência, grande capacidade migratória e proliferativa. Essas características permitem que a CN origine várias estruturas no organismo embrionário. Sabe-se que muitos poluentes podem influenciar negativamente os processos celulares durante o desenvolvimento, porém, estudos sobre os efeitos de contaminantes na migração das células da crista neural (CCN) são escassos. Um poluente ambiental que se destaca é o ácido perfluorooctanoico (PFOA), uma substância antropogênica que apresenta persistência no meio ambiente e potencial de bioacumulação como agravantes a sua exposição. Seus efeitos tóxicos são vastos, podendo ocasionar toxicidade do desenvolvimento, além de possuir potencial teratogênico. Contudo, até o momento, a literatura não descreve o efeito desse contaminante sobre as CCN do tronco. Sendo assim, o presente estudo avaliou os efeitos do PFOA sobre as CCN do tronco migratórias em embriões de *Gallus gallus*. Para isso, foi injetada na câmara de ar de ovos embrionados de galinha uma solução salina (controle) ou PFOA na concentração de 5 ng.ml^{-1} , a qual mimetiza uma exposição pré-natal real. Os ovos foram incubados por cerca de 48-52h, para obtenção de embriões no estágio 15HH. Os embriões foram emblocados em solução de gelatina e sacarose e, então, a região do tronco foi cortada em $100 \mu\text{m}$ em vibrátomo. Os cortes foram submetidos à técnica de *Free Floating* para imunofluorescência, utilizando o anticorpo (IgM) anti-HNK-1 para observação das CCN. As lâminas foram montadas, a captura das imagens foi realizada em microscópio de varredura a laser confocal e analisadas com o auxílio do *software* ImageJ Fiji. Com os dados obtidos, o *software* GraphPad Prism 9 foi utilizado a fim de avaliar diferenças estatisticamente significativas entre embriões controle e expostos ao PFOA, sendo realizado teste t de *Student* para a intensidade de fluorescência. Observou-se que os embriões expostos ao PFOA apresentaram redução na migração de CCN em comparação aos embriões controle, indicando citotoxicidade desse composto sobre essa população celular. Desse modo, podemos concluir que a exposição ao PFOA altera o processo de migração das CCN do tronco em embriões de *Gallus gallus* no estágio 15HH.

Palavras-chave: Migração celular; Poluente emergente; HNK-1.

ABSTRACT

The neural crest (NC) is a cell population exclusive to vertebrates, characterized by its pluripotency, high migratory capacity, and proliferative potential. These characteristics enable the NC to give rise to various structures in the embryonic organism. It is known that many pollutants can negatively influence cellular processes during development; however, studies on the effects of contaminants on the migration of neural crest cells (NCCs) are scarce. One notable environmental pollutant is perfluorooctanoic acid (PFOA), an anthropogenic substance that exhibits environmental persistence and bioaccumulation potential, exacerbating its exposure risks. Its toxic effects are extensive, capable of causing developmental toxicity and possessing teratogenic potential. However, to date, the literature does not describe the effects of this contaminant on trunk NCCs. Therefore, the present study evaluated the effects of PFOA on the number of migratory trunk CCN in *Gallus gallus* embryos. For this, a saline solution (control) or PFOA at a concentration of 5 ng/ml⁻¹, which reproduces a real prenatal exhibition, was injected into the air chamber of chicken embryos. The eggs were incubated for approximately 48-52 hours to obtain embryos at stage 15HH. The embryos were embedded in a gelatin and sucrose solution, and then the trunk region was sectioned at 100 µm using a vibratome. Free-floating The sections were subjected to the Free Floating technique for immunofluorescence, using the anti-HNK-1 antibody (IgM). The slides were mounted, images were captured using a confocal laser scanning microscope, and analyzed with the software ImageJ Fiji. With the obtained data, GraphPad Prism 9 software was used to evaluate statistically significant differences between control and PFOA-exposed embryos, using the Student's t-test for fluorescence intensity. It was observed that embryos exposed to PFOA showed reduced NCC migration compared to control embryos, indicating the cytotoxic of this compound on this cellular population. Thus, we can be concluded that PFOA exposure alters the trunk NCC migration process in *Gallus gallus* embryos at stage 15HH.

Keywords: Cell migration; Emerging pollutant; HNK-1.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.2 OBJETIVO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4 RESULTADOS	31
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÕES	41
7 REFERÊNCIAS	42
1.1 DESENVOLVIMENTO INICIAL EM <i>GALLUS GALLUS</i>	17
1.2 CÉLULAS DA CRISTA NEURAL.....	21
1.3 ÁCIDO PERFLUOROOCETANÓICO (PFOA)	24
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES.....	27
2.2 DOSES DE EXPOSIÇÃO E GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
2.3 MÉTODO DE EXPOSIÇÃO	28
2.4 COLETA DE EMBRIÕES.....	28
2.5 EMBLOCAGEM DOS EMBRIÕES	30
2.6 MICROTOMIA	31
2.7 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	31
2.8 CAPTURA E ANÁLISE DE IMAGENS.....	32
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
3 RESULTADOS	34
4 DISCUSSÃO	39
5 CONCLUSÕES	41
6 REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A crista neural (CN) é uma população de células-tronco multipotentes, transitória e exclusiva de vertebrados, sendo identificada na região dorsal do tubo neural (Carlson, 2014; Rothstein *et al.*, 2018; Gilbert; Barresi, 2019). Essa população celular possui alta capacidade migratória, permitindo a formação de estruturas tanto neuronais quanto não neuronais (Theveneau *et al.*, 2007; Shakhova; Sommer, 2010; Theveneau; Mayor, 2012; Gilbert; Barresi, 2019). A adequada migração das células da CN (CCN) depende da interação entre si, com as células do meio circundante e com sinais ambientais, configurando um processo altamente coordenado (Theveneau; Mayor, 2012; Szabó, Mayor, 2018).

Substâncias per e polifluoroalquil (PFAS) constituem uma classe de compostos antropogênicos amplamente usados em aplicações industriais, possuindo características físico-químicas únicas, que lhes proporcionam resistência à degradação química, térmica e biológica, tornando-os compostos persistentes no ambiente (Renner, 2001; Alexander *et al.*, 2008; Corsini *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2022). Substâncias ambientalmente persistentes atingem concentrações mais altas no ambiente em comparação com aquelas que não são persistentes, demandando, maior atenção no contexto dos estudos toxicológicos (Cousins *et al.*, 2019). Entre os PFAS, o ácido perfluorooctanóico (PFOA) destaca-se por sua vasta e antiga aplicação industrial, além de ser apontado como prevalente no ambiente, em animais e humanos em relação a outros PFAS (Holmström *et al.*, 2005; Florentin *et al.*, 2011).

Sabendo que o processo de migração das CCN é altamente coordenado e que fatores ambientais influenciam significativamente os processos celulares das CCN (Cerrizuela *et al.*, 2020), torna-se relevante avaliar os efeitos do PFOA sobre essa população celular.

1.2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi investigar se o PFOA interfere no

número de células migratórias da crista neural do tronco em embriões de *Gallus gallus* no estágio 15 HH.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EMBRIÃO DE *GALLUS GALLUS* COMO MODELO ANIMAL

A utilização do *Gallus gallus* (*G. gallus*), popularmente conhecido como galinha, como modelo animal possui uma história que remonta a mais de 2000 anos. Foi o primeiro modelo animal utilizado nas áreas de Biologia do Desenvolvimento e Embriologia, permitindo a elucidação de fenômenos fundamentais do desenvolvimento, como indução e plasticidade celular (Stern, 2005; Vergara; Canto-Soler, 2012). Estudos recentes têm enfatizado o emprego de embriões de galinha em estudos de teratologia, proporcionando maior entendimento sobre a ação dos teratógenos (Wachholz, 2021).

O embrião de *G. gallus* apresenta vantagens significativas em relação a outros modelos animais, como a grande semelhança com humanos em nível molecular, celular, anatômico e nos processos iniciais do desenvolvimento que ocorrem durante a organogênese (Stern, 2005; Psychoyos, 2008; Vergara; Canto-Soler, 2012; Kain *et al.*, 2014; Kantarcioglu *et al.*, 2018; Bednarczyk *et al.*, 2021). O desenvolvimento de órgãos complexos como cérebro, coração e rim envolve interações teciduais controladas em nível espaço-temporal, tornando essencial o uso de modelos que compartilhem essas semelhanças com o desenvolvimento humano (Kiecker, 2015). O embrião de *G. gallus* preenche este requisito, sendo um modelo experimental valioso para aplicações biomédicas (Rashidi; Sottile, 2009; Ghimire *et al.*, 2022).

Além disso, seu desenvolvimento é rápido (21 dias) e seus estádios de desenvolvimento são bem descritos morfológicamente (Hamburger; Hamilton, 1951). Comparado a outros modelos experimentais, o embrião de galinha possui tamanho maior no início do desenvolvimento, o que permite maior quantidade de material disponível para análise, facilitando a visualização e manipulação do embrião (Zosen *et al.*, 2021).

Sua manutenção em laboratório é simples e de baixo custo, necessitando apenas o controle do sistema de incubação (Kiecker, 2015; Wachholz *et al.*, 2021; Zosen *et al.*, 2021; Butler; Brinker; Leong, 2022,

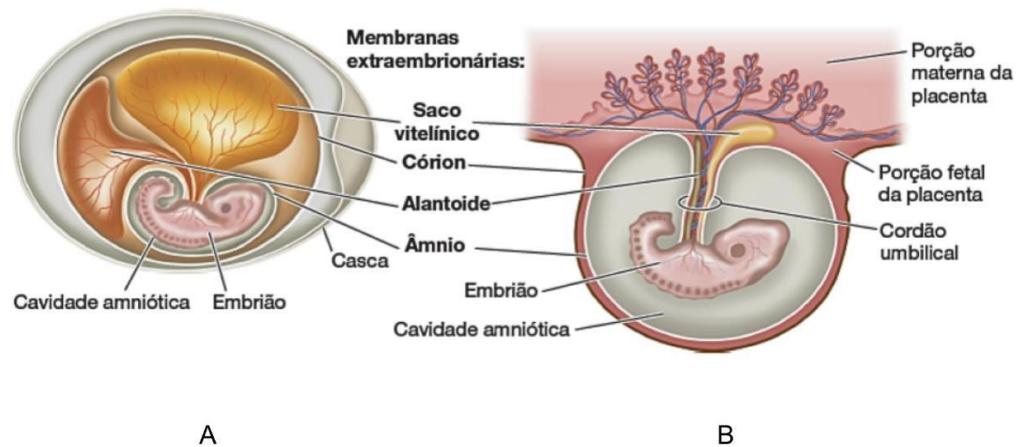
Ribatti; Annese, 2023). Outra vantagem significativa desses embriões é o cumprimento dos princípios dos 3R's (substituição, redução e refinamento) no uso de animais, permitindo acesso ao embrião sem sacrificar a mãe, realização de injeções de drogas não invasivas para o animal e controle do número de indivíduos usados nas experimentações (Zosen *et al.*, 2021; Butler; Brinker; Leong, 2022; Ribatti; Annese, 2023). A independência de influências maternas se apresenta como uma grande vantagem para os estudos de embriotoxicologia, permitindo avaliar seletivamente o efeito do contaminante no embrião. Além disso, o ovo de galinha é um sistema autossustentável e fechado, que impede a excreção do contaminante, possibilitando uma exposição prolongada com apenas uma injeção da substância (Psychoyos, 2008; Rashidi; Sottile, 2009; Bjørnstad *et al.*, 2015; Ghimire *et al.*, 2022).

Apesar de suas grandes vantagens, é importante considerar algumas desvantagens associadas aos embriões de *Gallus gallus*, como a dificuldade em extrapolar os resultados para organismos mamíferos, uma vez que o embrião de *Gallus gallus* se desenvolve externamente ao organismo materno (Bjørnstad *et al.*, 2015; Psychoyos, 2008). Assim, o metabolismo materno e a proteção seletiva da barreira placentária contra a exposição do feto a substâncias devem ser considerados, a depender da proposta do estudo, de modo que a dose usada nos embriões de *Gallus gallus* deve levar em conta a que os embriões são exclusivamente expostos (Da Costa *et al.*, 2021).

2.2 DESENVOLVIMENTO INICIAL EM *GALLUS GALLUS*

As aves, assim como os répteis e mamíferos, são vertebrados pertencentes ao grupo dos amniotas. Seus ovos apresentam um conjunto de membranas extraembrionárias: âmnio, saco vitelínico, córion e alantóide, que, juntamente com um envoltório rígido (a casca), circundam o embrião, permitindo seu desenvolvimento externo ao organismo materno (Yahav; Brake, 2014; Gilbert; Barresi, 2020). Na figura 1, observa-se uma comparação entre embriões de ave e mamífero.

FIGURA 1 - COMPARAÇÃO ENTRE EMBRIÃO DE AVE E MAMÍFERO

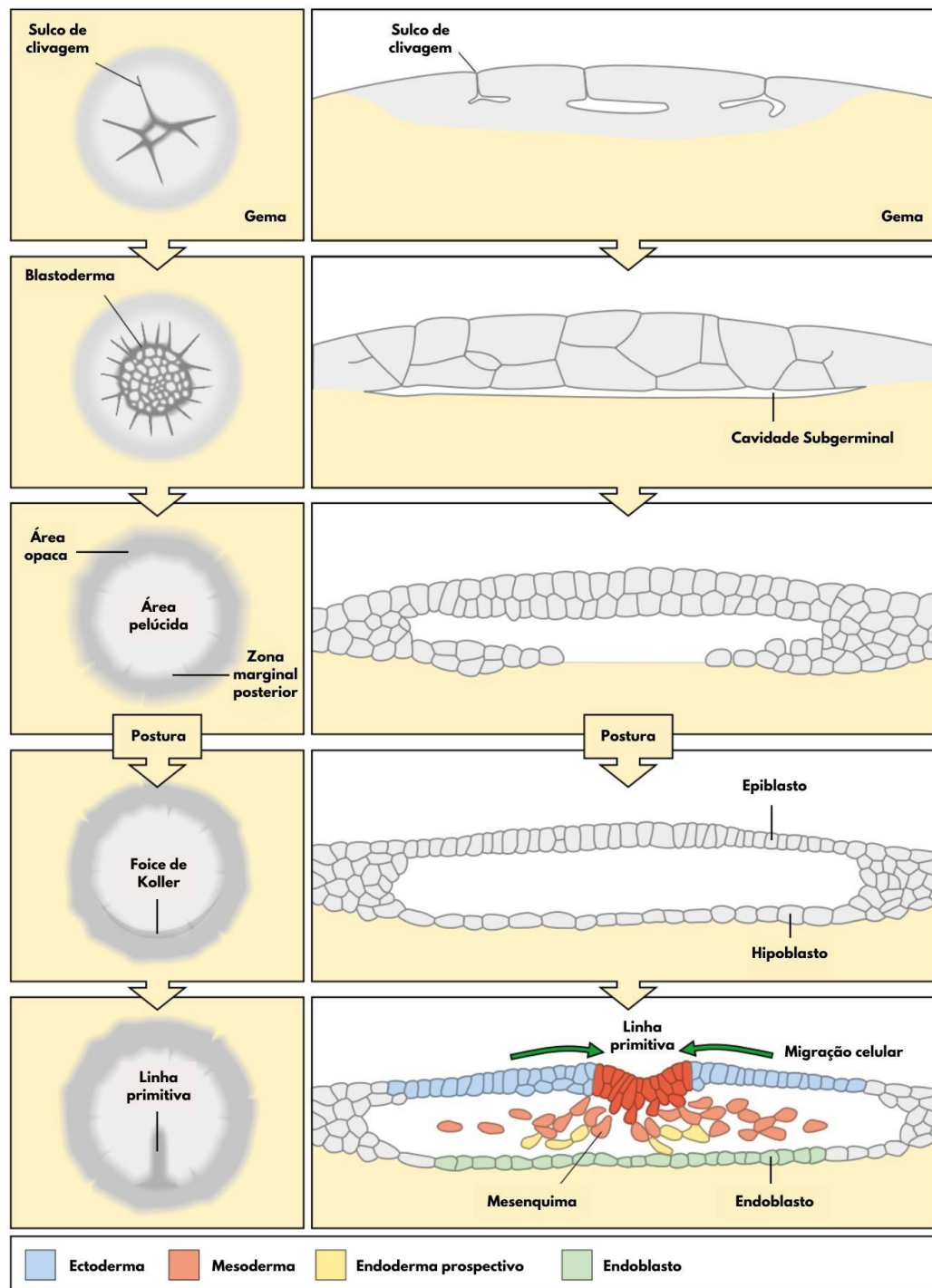


A: Modelo de embrião de ave. B: Modelo de embrião de mamífero. Em negrito estão indicadas as membranas extraembrionárias comuns aos dois vertebrados. Fonte: Adaptada de Gilbert; Barresi, 2020.

Após a ovulação, uma série de eventos cruciais ocorre no oviduto da galinha, incluindo fertilização, secreção de albumina e formação da casca, e duram em torno de 25 horas (Sheng, 2014). Ainda no oviduto, tem início a segmentação, um processo que dará origem ao disco germinativo ou blastoderme (Salmito-Vanderley; Santana, 2015). Com a ocorrência da oviposição, é necessário que os ovos sejam incubados a uma temperatura adequada para que o desenvolvimento prossiga adequadamente, sendo que para *Gallus gallus* é de $37,5^{\circ}\text{C} (\pm 0,5^{\circ}\text{C})$ (Garcia; Fernández, 2012).

No momento da postura, a blastoderme está dividida em duas camadas celulares: o epiblasto, responsável pela formação do embrião, e o hipoblasto, que originará porções das membranas extraembrionárias (Gilbert, Barresi, 2020). A seguir, já nas primeiras horas de incubação do ovo, o desenvolvimento embrionário de *G. gallus* prossegue por meio do processo morfogênético da gastrulação. Nesse momento, as células do epiblasto, uma camada unicelular, dão origem aos três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma. Isso ocorre graças à formação da linha primitiva, estrutura que se forma a partir da foice de Koller e que permite a migração das células do epiblasto para o espaço subgerminal (figura 2) (Garcia; Fernandez, 2012; Nájera; Weijer, 2020).

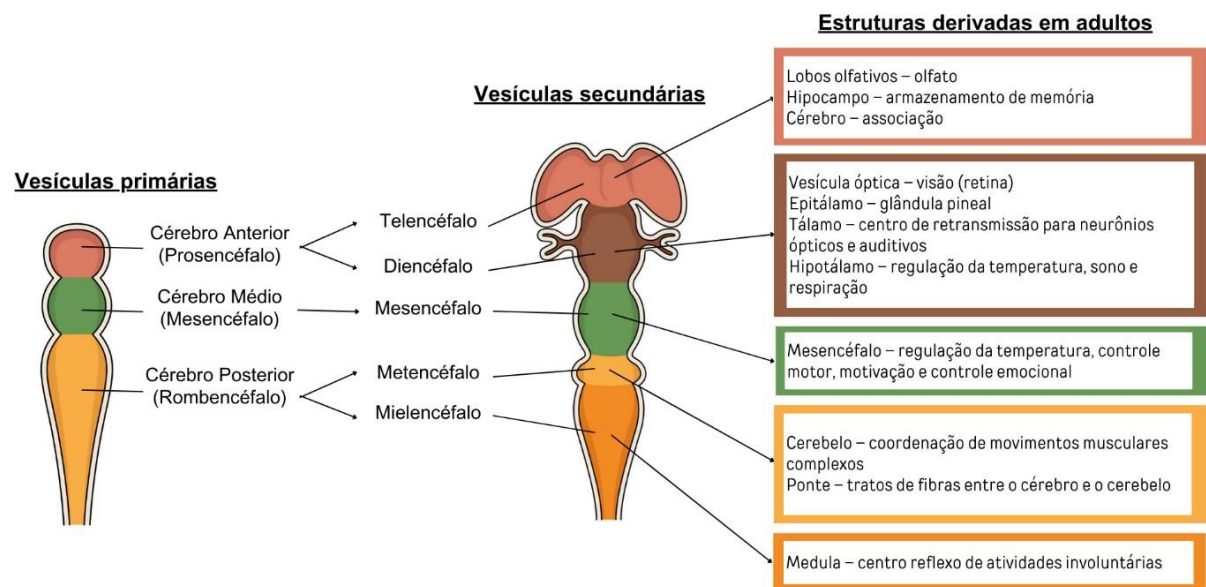
FIGURA 2 - PROCESSOS DE CLIVAGEM E GASTRULAÇÃO EM EMBRIÃO DE GALINHA



Os quadros à esquerda mostram uma visão superior do embrião e apresentam as transformações que o embrião passa com a formação da área pelúcida, da foice de Koller e da linha primitiva. Já os quadros à direita representam cortes transversais dos embriões de *Gallus gallus* e demonstram a formação da cavidade subgerminal, do hipoblasto e epiblasto. No último quadro à direita é possível observar os movimentos celulares do epiblasto sobre a linha primitiva que permitem a formação das três camadas germinativas do embrião. FONTE: Adaptado de Wolpert; Tickle; Arias, 2019.

Enquanto a gastrulação acontece na parte posterior do embrião, a neurulação, processo pelo qual se inicia a formação do sistema nervoso, começa a ocorrer na parte anterior. Sob indução da notocorda, ocorre um espessamento do ectoderma na extremidade anterior do embrião, formando a placa neural. As laterais da placa neural se elevam para formar as pregas neurais, estruturas que se fundem para gerar o tubo neural (TN), responsável pela formação do sistema nervoso central (SNC) (Garcia; Fernández, 2012). Inicialmente, o TN é um tubo simples, mas posteriormente é dividido em três vesículas encefálicas primárias na região rostral: o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo. O prosencéfalo se subdivide, originando as vesículas encefálicas secundárias telencéfalo e diencéfalo, enquanto o rombencéfalo dá origem ao metencéfalo e ao mielencéfalo, cada uma dessas estruturas dando origem a diferentes estruturas do SNC (figura 3) (Harada; Sato; Nakamura, 2016; Darnell; Gilbert, 2017).

FIGURA 3 - FORMAÇÃO DAS VESÍCULAS ENCEFÁLICAS



Esquema da formação das vesículas encefálicas primárias e secundárias e as estruturas do SNC que derivam delas. Fonte: Adaptado de Darnell, Gilbert, 2017.

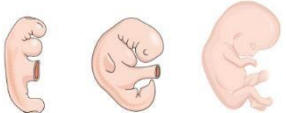
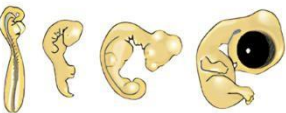
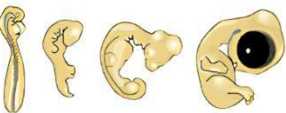
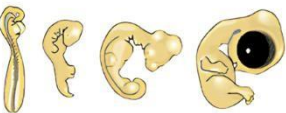
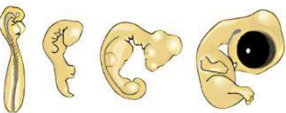
Enquanto o SNC é formado a partir do tubo neural, a formação do sistema nervoso periférico (SNP), responsável pela comunicação do SNC

com o restante do corpo, ocorre a partir de diferentes origens, como as células neurogênicas placodais e as células da crista neural (Murtazina; Adameyko, 2023).

Todo o desenvolvimento do *Gallus gallus* foi classificado por Viktor Hamburgere Howard Hamilton (1951) em 46 estágios, que se iniciam com a postura do ovo e se encerram com a eclosão, resultando no pintinho completamente formado. O desenvolvimento de seu sistema nervoso começa no estágio 8HH, com a fusão das pregas neurais, marcando o início da formação do tubo neural. No estágio 10HH, já é possível observar as três vesículas cerebrais primárias: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (Hamburger; Hamilton, 1951).

Nesse estudo, foram utilizados embriões no estágio 15HH, período que corresponde ao primeiro trimestre do desenvolvimento humano (figura 4) (Bjørnstad *et al.*, 2015).

FIGURA 4 - COMPARAÇÃO ENTRE O DESENVOLVIMENTO HUMANO E DA GALINHA

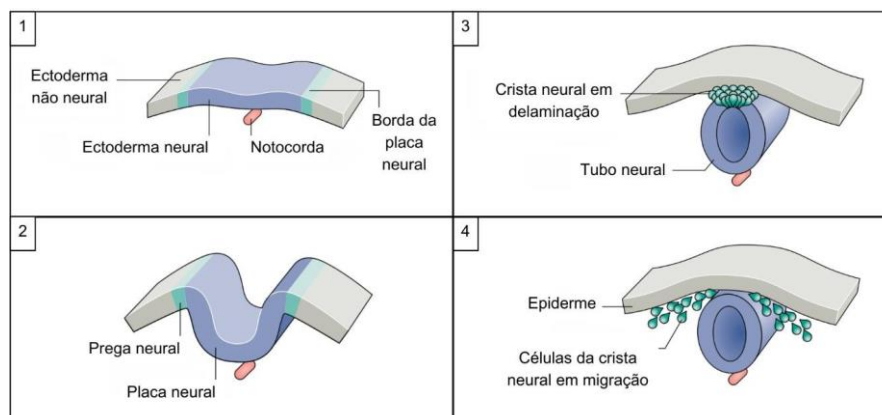
Trimestres		I												II												III																	
Período	Tempo de desenvolvimento humano (semanas)	Embrionário								Fetal																																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		
																																											
		1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12	13	14																											
	Tempo de desenvolvimento da galinha (dias)																																										
		1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12	13	14																											
																																											
		1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12	13	14																											
																																											
		1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12	13	14																											
																																											

multipotência, habilidade de migração em longas extensões e capacidade de diferenciação, a CN contribui para a formação não apenas de tecidos neurais, mas também de uma grande diversidade de tecidos diferenciados, razão pela qual muitos embriologistas a descrevem como a “quarta camada germinativa” (Martik, Bronner; 2021; Ji *et al.*, 2019; Dupin *et al.*, 2018).

A formação da CN (figura 5) tem início durante a gastrulação e ocorre na região dorsal do futuro sistema nervoso central anterior (que será composto pelo prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo) a partir do ectoderma neural e do ectoderma não neural em uma região denominada borda da placa neural (Leathers; Rogers, 2022; Martik, Bronner; 2021; Ji *et al.*, 2019).

A seguir, durante a neurulação, processo em que as pregas neurais se unem para formar o tubo neural, a CN se separa do neuroepitélio que a circunda por meio da delaminação, processo que divide um único tecido em duas populações celulares distintas (Gilbert; Barresi, 2020; Theveneau; Mayor, 2012). A delaminação só ocorre graças à transição epitélio-mesenchimal, caracterizada por mudanças na expressão de moléculas de adesão e na polaridade celular que agregam um perfil invasivo a essas células, permitindo que elas migrem para locais distantes no embrião em desenvolvimento e se diferenciem em uma variedade de tipos celulares (Leathers; Rogers, 2022; Theveneau; Mayor, 2012).

FIGURA 5 - FORMAÇÃO DA CRISTA NEURAL



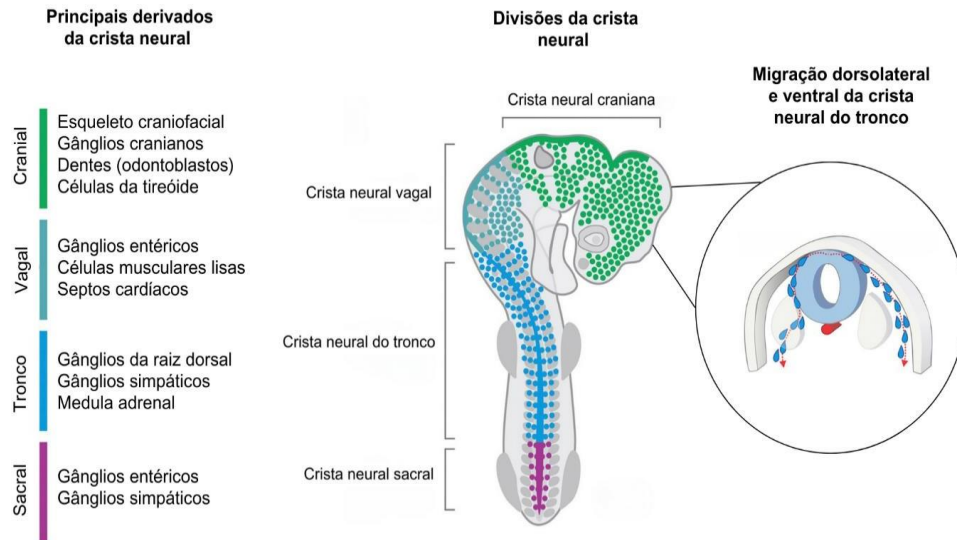
Formação e início da migração das células da CN durante o processo de neurulação. FONTE: Adaptado de Martik; Bronner (2021).

O desenvolvimento e a funcionalidade das células da CN perpassam uma série de eventos celulares que devem ser meticulosamente regulados, como migração, diferenciação e apoptose, por exemplo (Wang *et al.*, 2019). Possíveis defeitos nesses eventos podem culminar em prejuízo à formação das células da CN, gerando anormalidades denominadas de neurocristopatias, uma das causas mais comuns de defeitos congênitos (Ji *et al.*, 2019).

A crista neural se forma ao longo do eixo ântero-posterior do embrião e pode ser dividida em quatro subpopulações celulares de acordo com a posição em que são especificadas, sendo elas: craniana, vagal, do tronco e sacral (figura 6). A classificação da CN nessas quatro subpopulações distintas não tem apenas embasamento anatômico, visto que as células da CN que surgem em diferentes níveis axiais diferem em seus padrões migratórios, potencial de diferenciação e de expressão gênica (Rothstein; Bhattacharya; Simões-Costa, 2018).

Para que o processo de migração das diferentes subpopulações da CN ocorra, do seu local de origem até a região alvo, inúmeros sinais positivos e negativos são necessários, tal como as interações dessas células entre si, interações dessas células com outras populações em seu entorno, com a matriz extracelular e sinais quimiotáticos (Theveneau; Mayor, 2014).

FIGURA 6 - SUBPOPULAÇÕES DA CRISTA NEURAL



Esquema demonstrando as subpopulações da crista neural ao longo do eixo ântero-posterior de um embrião de galinha, as principais estruturas derivadas de cada uma e o padrão de migração dorsolateral e ventral que ocorre na crista neural do tronco. Fonte: Adaptado de Rothstein; Bhattacharya; Simões-Costa, 2018.

As células da CN do tronco incluem a população de células da CN que migrando 8° ao 27° somito em embriões de ave (Da Silva *et al.*, 2022). Sua migração, como demonstrado na figura 6, ocorre de dois modos: pela via ventral (através do somito) e pela via dorsolateral (entre o somito e a ectoderme) (Rothstein; Bhattacharya; Simões-Costa, 2018; Gilbert; Barresi, 2020). As células que migram pela via ventral dão origem aos gânglios da raiz dorsal, gânglios simpáticos e à medula adrenal, enquanto as células que migram pela via dorsolateral formam células pigmentares, os melanócitos (Vega-Lopez; Cerrizuela; Aybar, 2017).

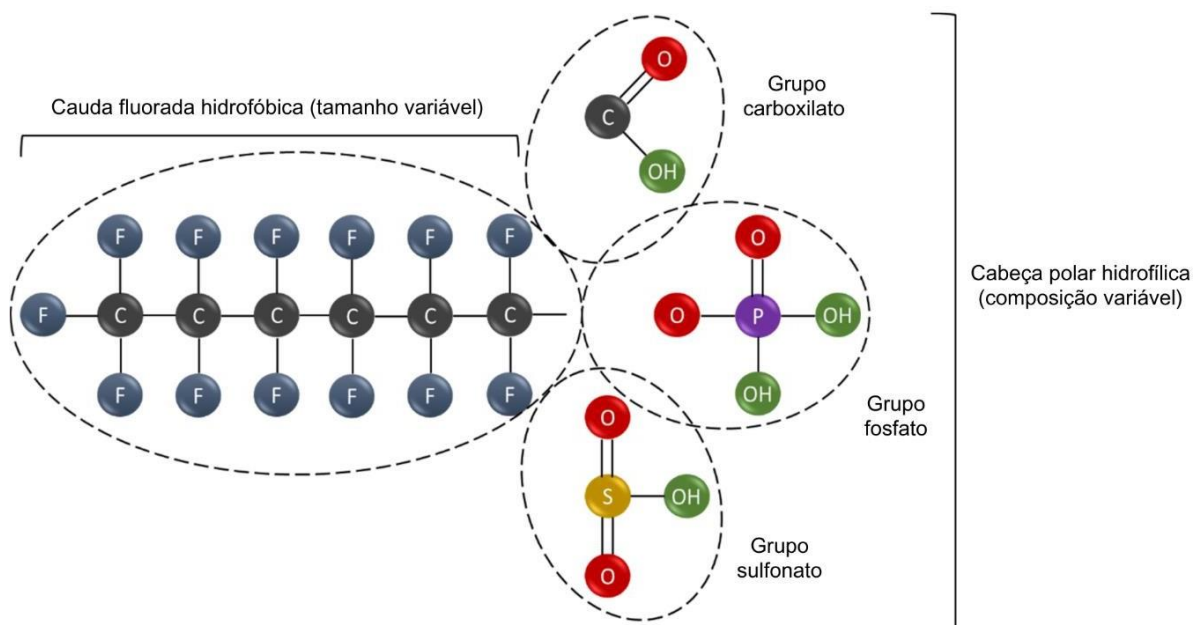
Sabe-se que fatores ambientais, como poluentes, possuem significativa influência sobre os processos celulares que participam da formação das células da CN e que por elas são desempenhadas no desenvolvimento embrionário, podendo ser a gênese de inúmeras patologias congênitas (Cerrizuela *et al.*, 2020).

2.4 ÁCIDO PERFLUOROOCTANÓICO (PFOA)

Substâncias per e polifluoroalquil (PFAs), anteriormente denominadas compostos perfluorados (PFCs), são uma classe de compostos

antropogênicos emergentes em que as ligações de hidrogênio da cadeia carbônica são substituídas por ligações com flúor (Klingelhöfer *et al.*, 2024; Manojkumar *et al.*, 2023; Liang *et al.*, 2022). Essas substâncias são classificadas conforme o comprimento desua cadeia de carbono: PFAS com seis ou mais carbonos são denominados de cadeia longa, enquanto aqueles com menos de seis carbonos são considerados de cadeia curta (Barlow *et al.*, 2019). Além da variação no tamanho da cadeia carbônica, diferentes PFAs possuem diferentes grupos funcionais, como carboxilato, fosfato, sulfonato e amina, entre outros (figura 7) (Gaines, 2022; Panieri, 2022). A região da cadeia fluorada apresenta perfil lipofílico e hidrofóbico e é estável contra variações de temperatura e pH, enquanto os grupos funcionais são polares (Gaines, 2022; Manojkumar *et al.*, 2023). Essas características moleculares são únicas aos PFAS e agregam grande valor em sua aplicação industrial, a qual ocorre desde a década de 1950 (Gaines, 2022).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA GERAL DE UMA MOLÉCULA DE PFA



Esquema da estrutura geral de uma molécula de PFA demonstrando a cauda fluorada hidrofóbica e exemplos de grupos funcionais que podem ocorrer em diferentes moléculas desse grupo. Fonte: Adaptado de Panieri *et al.*, 2022.

Essas substâncias são utilizadas em 25 ramos industriais diferentes, sendo encontradas em uma grande variedade de produtos de consumo,

como tecidos impermeabilizados, embalagens de alimentos, espuma de combate a incêndio, inseticidas, painéis antiaderentes, cosméticos e produtos de limpeza, eletrônicos no geral, tintas, entre muitos outros (Glüge *et al.*, 2020; Gaines, 2022).

No entanto, essas mesmas características químicas que os tornam interessantes para aplicações industriais fazem dos PFAS compostos resistentes à degradação química, térmica e biológica, tornando-os, assim, compostos persistentes no ambiente (Cousins *et al.*, 2020). A alta persistência influencia o comportamento dessas substâncias no ambiente, onde são amplamente distribuídas e atingem concentrações mais altas do que produtos químicos não persistentes, demandando atenção especial no contexto da toxicologia (Cousins *et al.*, 2019).

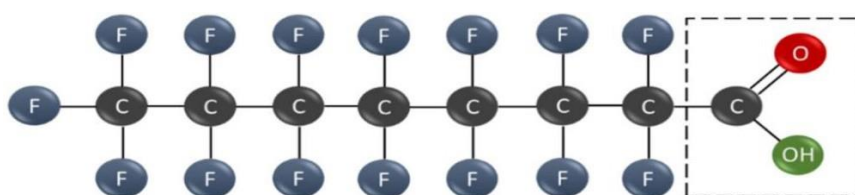
As principais formas de exposição aos PFAS são por ingestão e inalação, através de alimentos, água potável, fontes transportadas pelo ar e poeira doméstica (Jian *et al.*, 2017; De La Torre *et al.*, 2019).

Entre os PFAS, o ácido perfluorooctanóico (PFOA) (figura 8) é um dos compostos que recebe mais atenção em estudos toxicológicos devido à sua ampla e antiga aplicação industrial, além de ser apontado como prevalente no ambiente, em animais e humanos em relação a outros PFAS (Holmström *et al.*, 2005; Florentin *et al.*, 2011; Gaines, 2022).

O PFOA não é metabolizado e apresenta diversas consequências negativas para a saúde, sendo carcinogênico e causador de infertilidade masculina, alterações metabólicas, aumento do fígado, perda de peso, toxicidade no desenvolvimento, imunotoxicidade, desregulação endócrina, entre outros efeitos (Barlow *et al.*, 2019; Eggert *et al.*, 2019). Estudos em ratos mostraram que ele se concentra no fígado, rins e sangue (Steenland *et al.*, 2010). Em humanos, já foi detectado em amostras de sangue em várias regiões do mundo (Kannan *et al.*, 2004). Além disso, o PFOA pode atravessar a barreira placentária, atingindo embriões e fetos, além de ser identificado em recém-nascidos e no leite materno, evidenciando a exposição pré e pós-natal a esse composto (Kannan *et al.*, 2004; Steenland *et al.*, 2010; Eggert *et al.*, 2019). Estudos anteriores do grupo demonstraram que o PFOA gera embriotoxicidade em *Gallus gallus* ao

promover mortalidade e alterações morfológicas, principalmente na região cefálica e no tubo neural, além de gerar alterações em processos celulares, como apoptose e proliferação, expressão de moléculas de adesão celular e na migração de células da crista neural craniana (Da Costa, 2022; Kmecick *et al.*, 2019).

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO PERFLUOROOCETANÓICO



Estrutura química do PFOA, composta por uma cadeia perfluorada de oito carbonos e um grupo carboxila. Fonte: Adaptado de Panieri *et al.*, 2022.

A crescente preocupação com esses compostos levou à redução e eliminação da produção e utilização de alguns PFAS (ITRC, 2020). Essas restrições foram implementadas a partir dos anos 2000, quando foram relatados a onipresença e os riscos à saúde associados a dois PFAS: o PFOA e o PFOS (Giesy; Kannan, 2001). Esses dois compostos, amplamente utilizados, foram incluídos na Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) em 2009 (PFOS) e 2019 (PFOA) para eliminação ou restrição global (UNEP, 2019). No Brasil, o Projeto de Lei 2726/2023, apresentado em 22 de maio de 2023, que institui a política nacional de controle dos PFAS, ainda está em tramitação na câmara dos deputados (BRASIL, 2023). Apesar das restrições impostas, o PFOA e o PFOS continuam sendo os PFAS mais detectados e estudados no ambiente global (EPA, 2022; OECD, 2022).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho é parte de um estudo mais abrangente intitulado: “Ação do chumbo, cádmio e ácido perfluorooctanóico, de maneira isolada e

em mistura, sobre o desenvolvimento da região cefálica de *Gallus gallus*". Todos os procedimentos realizados nesse estudo 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.

3.1 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES

Os ovos fertilizados de *Gallus gallus* utilizados para a obtenção de embriões foram doados por uma empresa, localizada no município da Lapa (PR). No laboratório, os ovos foram higienizados com papel toalha umedecido em álcool 70%, pesados e identificados de acordo com os grupos experimentais.

3.2 DOSES DE EXPOSIÇÃO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O desenho experimental foi constituído de dois grupos distintos: o grupo controle, composto por embriões que receberam solução fisiológica (0,9% de NaCl) *in ovo* e o grupo exposto, tratado com 5 ng.mL⁻¹ de PFOA *in ovo*.

A concentração de PFOA utilizada foi determinada com base na extrapolação alométrica interespecie, empregando a taxa metabólica basal para diferentes matrizes biológicas (aves não passeriformes e mamíferos placentários), conforme descrito por Da Costa e colaboradores (2021) (Cálculo 1). Esta concentração foi baseada nos níveis de PFOA encontrados no sangue do cordão umbilical humano, na placenta e no recém-nascido, sendo, assim, capaz de mimetizar os efeitos que o PFOA pode ter sobre o embrião em desenvolvimento (Cariou *et al.*, 2015).

CÁLCULO 1 - EXTRAPOLAÇÃO ALOMÉTRICAS INTERESPÉCIES

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

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

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

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

TMB – Taxa metabólica basal.

k – Constante de grandes grupos taxonômicos, 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.

3.3 MÉTODO DE EXPOSIÇÃO

A câmara de ar do ovo é o local onde ocorre melhor dispersão de contaminantes no embrião (Yamamoto *et al.*, 2012), sendo, por isso, o local de escolha para a injeção das soluções. No fluxo laminar, foi feito um orifício na casca com agulha de grande calibre (1,00 X 30 mm), pelo qual o NaCl e PFOA foram injetados. Logo após, os ovos foram selados com fita adesiva, posicionados com a câmara de ar voltada para cima e incubados em incubadora BOD (SL-224, SOLAB Científica), em temperatura controlada a 38°C (± 0,5°C), com umidade e ventilação constantes (Da Costa *et al.*, 2021).

3.4 COLETA DE EMBRIÕES

Os embriões foram incubados por 48-52 horas aproximadamente, até atingirem o estágio 15HH (figura 9).

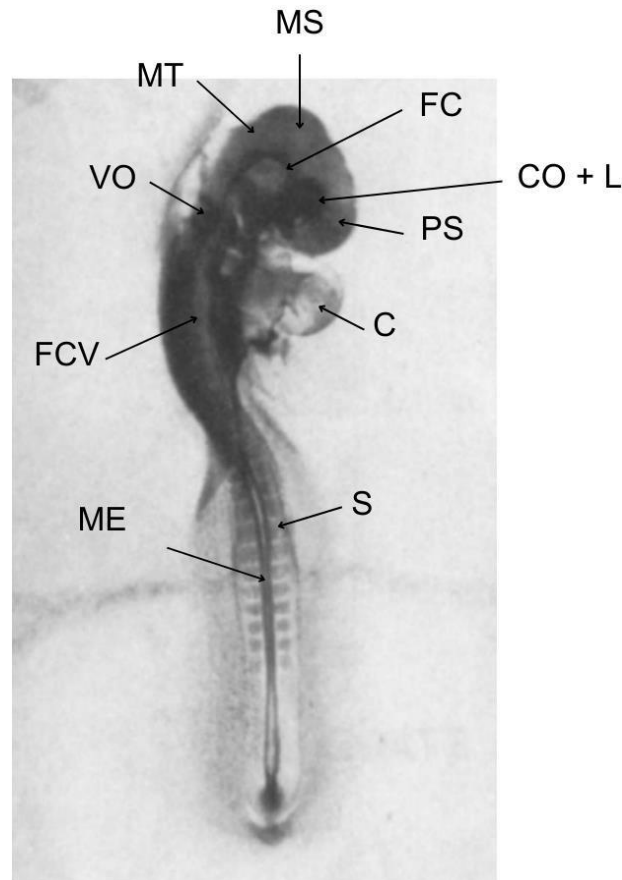
FIGURA 9 - EMBRIÃO DE *GALLUS GALLUS* EM ESTÁDIO 15HH

Imagem de um embrião de *Gallus gallus* no estágio 15HH, destacando as estruturas anatômicas principais. MS = mesencéfalo; MT = metencéfalo; PS = prosencefalo; FCV = flexura cervical; FC = flexura craniana; VO = vesícula ótica; C = coração; S = somitos; ME = medula espinhal; CO+L = cálice óptico + lentes. Fonte: Adaptado de Hamburger e Hamilton (1951).

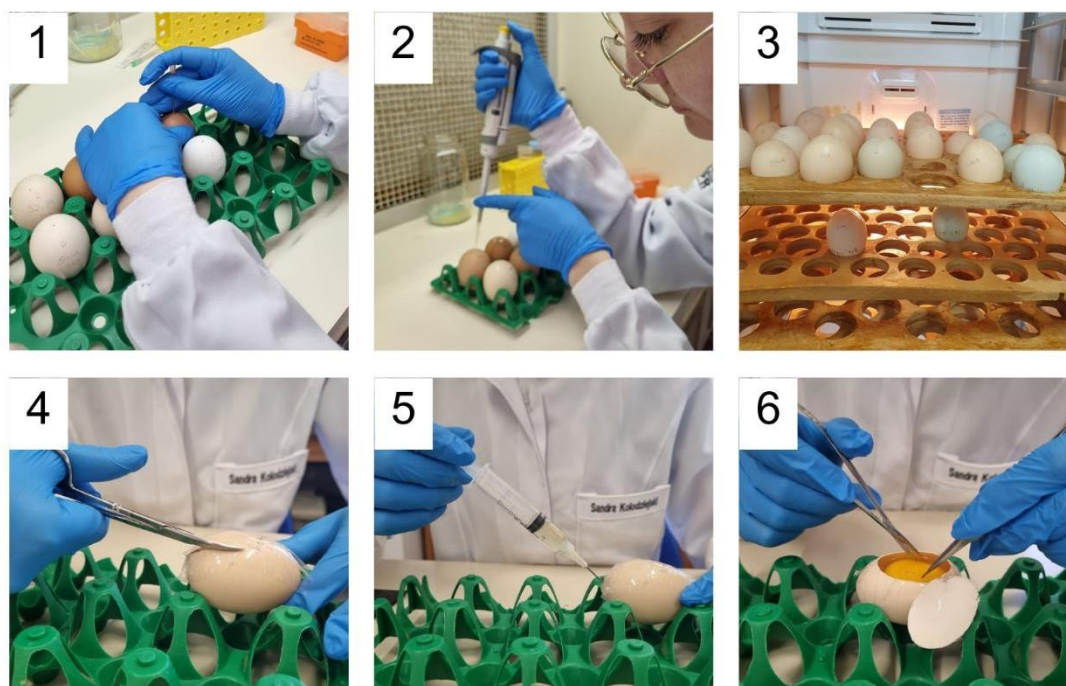
Vinte minutos antes da abertura, os ovos foram colocados na posição horizontal, na incubadora, para que o embrião se posicionasse na parte superior do ovo, possibilitando sua visualização pela janela da casca. Após a remoção dos ovos da incubadora foram retirados 3 ml de albúmen para reduzir o volume 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. Em seguida, foram retirados e colocados em placas 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) e fixados em paraformaldeído (PFA) 2% (Da Costa *et al.*, 2021).

Foram selecionados apenas embriões no estágio 15HH. Aqueles que não se encontravam no estágio de interesse foram armazenados e serão utilizados em outro trabalho do Laboratório de Embriotoxicologia – UFPR.

Os processos de exposição, abertura dos ovos e coleta dos embriões são demonstrados na figura 10.

FIGURA 10 - EXPOSIÇÃO E COLETA DOS EMBRIÕES



Procedimentos realizados: 1 - abertura de um orifício na casca do ovo; 2 - exposição ao PFOA ou NaCl; 3 - disposição dos ovos na incubadora; 4 - abertura de uma janela na casca do ovo; 5 - retirada de albúmen; 6 - coleta do embrião. Fonte: A autora (2024).

3.5 EMBLOCAGEM DOS EMBRIÕES

Foram utilizados 3 embriões no estágio 15HH, por grupo experimental. Os embriões foram retirados do fixador e lavados três vezes com PBS 1X, por 5 minutos cada. Em seguida, foram embebidos em solução de gelatina 30% e sacarose 15% em banho-maria à 37°C, sendo

realizadas trocas das soluções a cada 1 hora, por 4 horas. Após, os embriões foram retirados do banho-maria e emblocados em moldes plásticos devidamente identificados. Posteriormente, foram mantidos sob refrigeração a 4°C, por 12h, de modo a possibilitar completa polimerização da gelatina. Os blocos foram retirados do molde somente no momento do corte.

3.6 MICROTOMIA

Para a microtomia, foi utilizado o micrótomo de navalha vibratória - vibratomo (Leica VT1000 S), onde foram realizados cortes transversais seriados da região do tronco em espessura de 100 µm e armazenados em PBS em placas de 24 poços refrigerados a 4°C, para posterior imunomarcação.

3.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

A técnica *Free Floating* foi utilizada para imunomarcação, com protocolo baseado em Da Costa e colaboradores (2021). Essa técnica apresenta algumas vantagens, em relação à imunomarcação em lâmina, como realizar o ensaio com cortes mais espessos, lavagem mais eficiente dos reagentes, possibilidade de reutilização de anticorpos e otimização de tempo dos experimentos, por exemplo (Potts; Coppotelli; Ross, 2021)

Os cortes foram retirados da refrigeração, lavados com PBS pH 7,4, refixados em PFA 2% por 10 min, lavados novamente em PBS, incubados em glicina 0,1 M por 2 minutos para bloquear os radicais aldeídicos livres e deixados em solução de PBS, BSA 1% e triton X-100 0,3%, por 4 horas, no agitador magnético (Scienware) para bloqueio dos sítios inespecíficos e permeabilização do tecido, respectivamente.

A seguir, realizou-se incubação com o anticorpo primário (IgM) anti-HNK-1 (Chemicon Biotechnology) (produzido em camundongo e específico para células da crista neural de galinha) não diluído, *overnight*, a 4°C.

No dia seguinte, os cortes foram lavados com PBS, BSA 1% e triton

X-100 0,3% e incubados com anticorpo secundário anti-IgM (EMD Millipore Corporation) (de camundongo produzido em cabra, conjugado com rodamina) diluído em PBS, BSA 1% e triton X-100 0,3% na concentração 1:100, por uma hora e meia. Trinta minutos antes do término da incubação com o anticorpo secundário, foram adicionados 25 µL de solução de DAPI (Santa Cruz Biotechnology), na concentração 100ng.mL⁻¹. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS.

Três poços, com cortes de regiões imediatamente anteriores aos cortes de interesse, foram destinados aos controles: 1) branco (não recebeu os anticorpos primário e secundário); 2) primário (não recebeu anticorpo secundário); e 3) secundário (não recebeu o anticorpo primário).

Os cortes foram dispostos em lâminas previamente gelatinizadas (0,1%) em meio de montagem *Gel Mount* (Biomedica Corporation) e as lamínulas foram seladas com esmalte livre de formol.

3.8 CAPTURA E ANÁLISE DE IMAGENS

A captura de imagens foi realizada em microscópio de varredura a laser confocal, modelo A1SiR+MP (Nikon Corporation, Tokio, Japão), com distância de 1µm entre uma secção e outra, utilizando o *software* NisElements.

A análise focou na intensidade relativa de fluorescência (IRF) das células da crista neural, marcadas com o anticorpo anti-HNK-1, para avaliar o número de células dessa população em migração. As imagens capturadas foram analisadas utilizando o *software* ImageJ Fiji (National Institutes of Health - NIH).

Para a medição da IRF, foi analisado, para cada embrião, um corte apenas no canal vermelho de fluorescência, representando células marcadas com rodamina (conforme ilustrado na figura 11). Foram registradas a área e a densidade integrada bruta (*RawIntDen*) de cada corte, sendo realizadas três medições por corte. A seguir, o valor de *RawIntDen*, que representa a quantidade total de pixels em uma imagem (Gunder et al., 2022), foi dividido pelo valor da área do corte para obter a

IRF para cada medição.

A média das três medições foi calculada e posteriormente a média da IRF do controle secundário foi subtraída da IRF das amostras para obter o valor final da IRF.

FIGURA 11 - ANÁLISE DAS IMAGENS NO SOFTWARE IMAGEJ FIJI

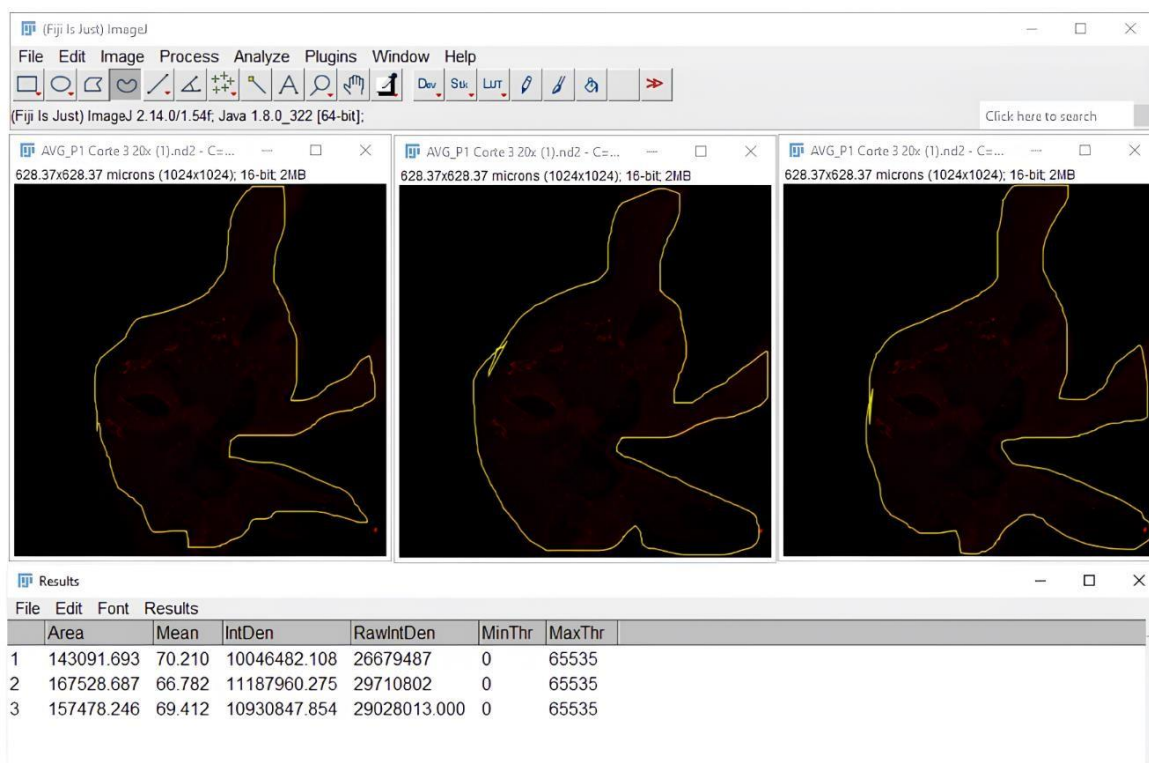


Ilustração do processo de contorno e análise de células marcadas com rodamina no software ImageJ Fiji, mostrando como a área e a densidade integrada bruta (*RawIntDen*) são medidas e utilizadas para calcular a intensidade relativa de fluorescência (IRF).

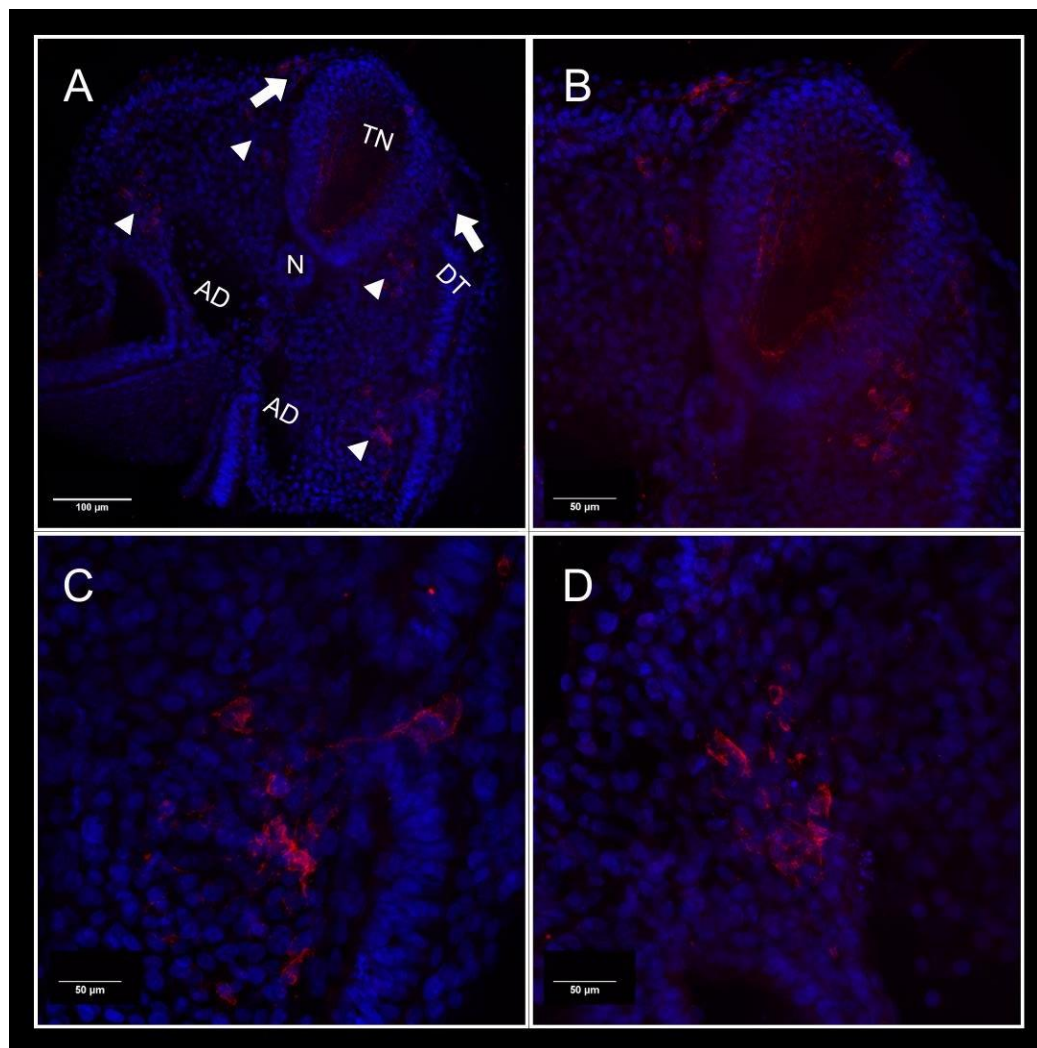
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes foram realizados por meio do *software GraphPad Prism 9*, a fim de avaliar se as diferenças observadas são estaticamente significativas quando comparadas aos controles, sendo considerado $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Os dados foram submetidos a testes de normalidade e seguiram a distribuição normal, segundo o teste de *Shapiro-Wilk*. A seguir foram submetidos ao teste *t* de *Student*.

4 RESULTADOS

Nos embriões controle (FIGURAS 11 e 12), foram observados grupamentos celulares evidentes, marcados com anti-HNK-1 (em vermelho), com células migrando pela via ventral (através do somito) e pela via dorsolateral (entre o somito e a ectoderme). Porém, nos embriões expostos ao PFOA (FIGURAS 13 e 14), nota-se a diminuição na quantidade e tamanho dos grupamentos celulares em relação ao grupo controle. Além disso, nos cortes expostos, as células migram predominantemente pela via ventral.

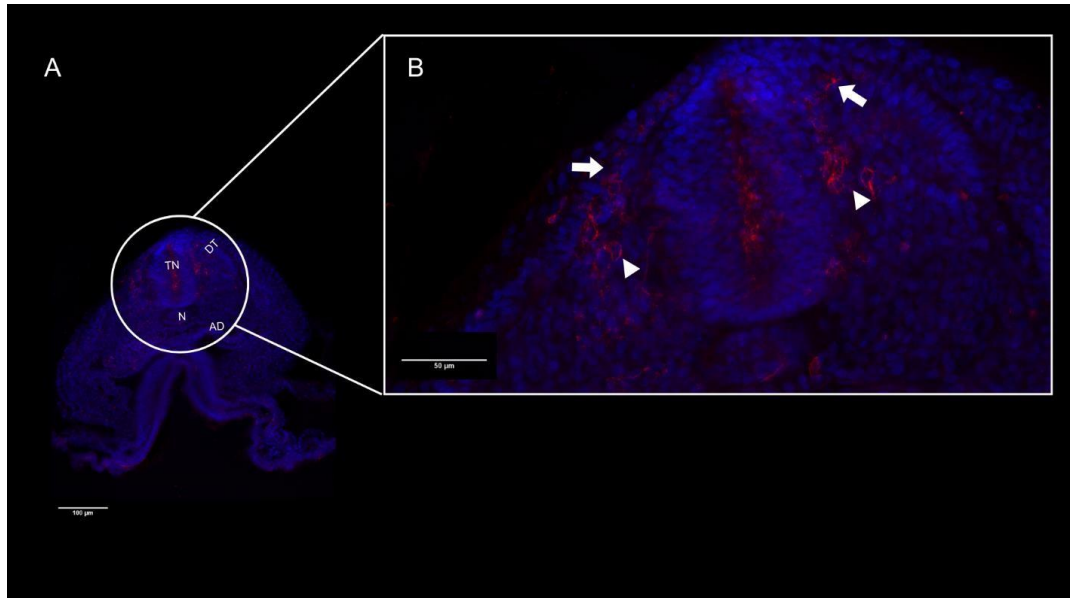
FIGURA 11 - GRUPAMENTOS DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM MIGRAÇÃO EM EMBRIÃO CONTROLE NO ESTÁDIO 15HH



Cortes histológicos imunomarcados para identificação das células da crista neural (CCN) do tronco em migração. A: aumento de 20X; B, C e D: aumento de 60X, evidenciando os grupamentos de CCN em migração. Cabeças de seta: CCN migrando pela via ventral; Setas: CCN migrando pela via dorsolateral. TN: tubo neural; N: notocorda; AD: aorta

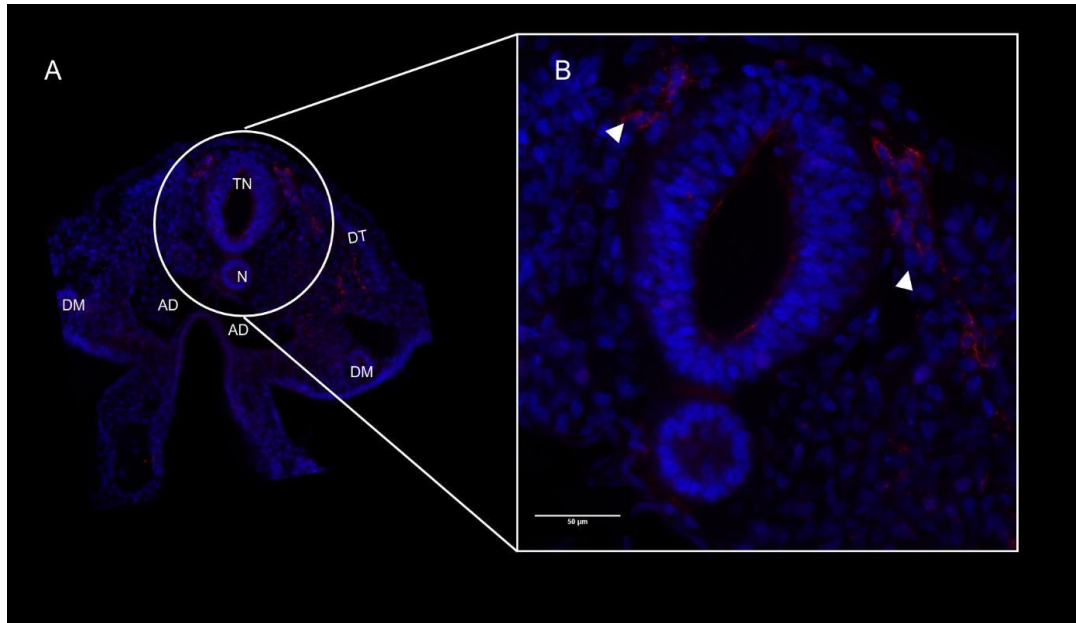
dorsal; DT: dermomiótomo. Imunofluorescência com anticorpo anti-HNK-1 (vermelho) e marcação nuclear com DAPI (azul). FONTE: A autora (2024).

FIGURA 12 - GRUPAMENTOS DE CÉLULAS DE CRISTA NEURAL EM MIGRAÇÃO EM EMBRIÃO CONTROLE NO ESTÁDIO 15HH



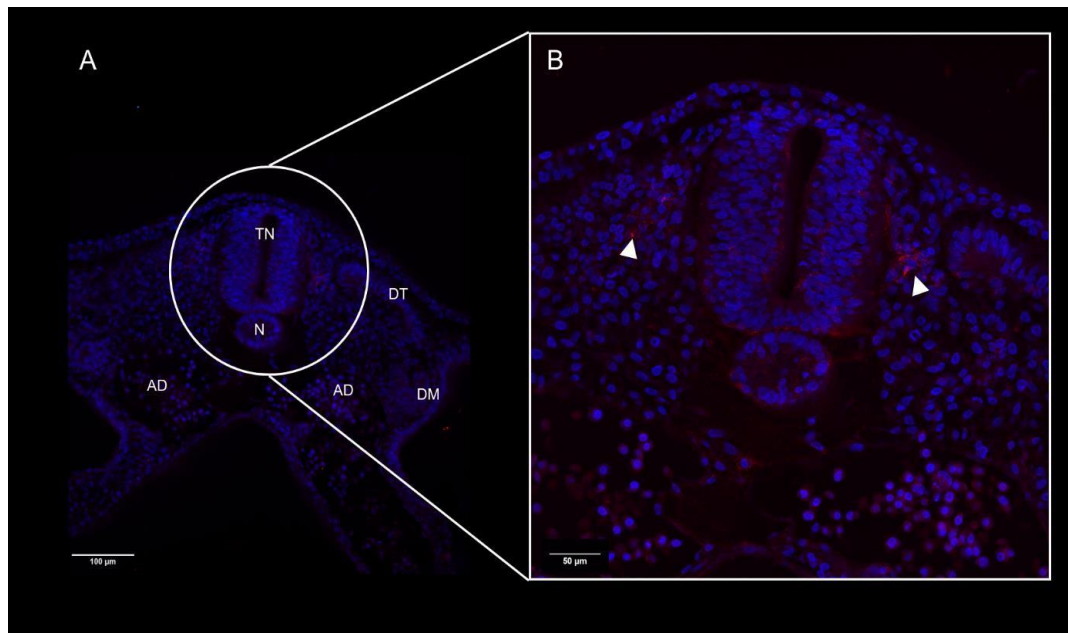
Cortes histológicos imunomarcados para identificação das células da crista neural (CCN) do tronco em migração. A: aumento de 20X; B: aumento de 60X, destacando os grupamentos de CCN em migração. Cabeças de seta: CCN migrando pela via ventral; Setas: CCN migrando pela via dorsolateral. TN: tuboneural; N: notocorda; AD: aorta dorsal; DT: dermomiótomo. Imunofluorescência com anticorpo anti- HNK-1 (vermelho) e marcação nuclear com DAPI (azul). FONTE: A autora (2024).

FIGURA 13 - GRUPAMENTOS DE CÉLULAS DE CRISTA NEURAL EM MIGRAÇÃO EM EMBRIÃO EXPOSTO AO PFOA



Cortes histológicos imunomarcados para identificação das células da crista neural (CCN) do tronco em migração. A: aumento de 20X; B: aumento de 60X evidenciando os grupamentos de células da CN em migração. Cabeças de seta: CCN migrando pela via ventral. TN: tubo neural; N: notocorda; AD: aorta dorsal; DT: dermomiótomo; DM: ducto mesonéfrico. Imunofluorescência com anticorpo anti-HNK-1 (vermelho) e marcação nuclear com DAPI (azul). FONTE: A autora (2024).

FIGURA 14 - GRUPAMENTOS DE CÉLULAS DE CRISTA NEURAL EM MIGRAÇÃO EM EMBRIÃO EXPOSTO



Cortes histológicos imunomarcados para identificação das CCN do tronco em migração. A: aumento de 20X; B: aumento de 60X, evidenciando os grupamentos de células da CN em migração. Cabeças de seta: CCN migrando pela via ventral. TN: tubo neural; N: notocorda; AD: aorta dorsal; DT: dermomiótomo; DM: ducto mesonéfrico. Imunofluorescência com anticorpo anti-HNK-1 (vermelho) e marcação nuclear com DAPI (azul). FONTE: A autora (2024).

Os dados obtidos na análise das imagens no *software* ImageJ Fiji estão indicados nas tabelas 1 e 2 (embriões controle e expostos ao PFOA, respectivamente).

TABELA 1 - DADOS DE ÁREA, DENSIDADE INTEGRADA BRUTA E DA MÉDIA FINAL DOS EMBRIÕES CONTROLE

Embriões controle					
	Área	RawIntDen	IRF	Média IRF	
Controle secundário	336.725.544	13.061.411	0,03878949	0,04	IRF final
	306.857.019	12.263.639	0,03996532		
	325.057.392	12.740.582	0,03919487		
C2	183.920.809	62.042.377	0,33733201	0,33	0,29
	182.333.224	60.926.883	0,33415130		
	211.139.090	65.871.479	0,31198145		
C3	172.404.036	75.927.624	0,44040514	0,44	0,40
	181.549.975	78.133.718	0,43037030		
	172.313.284	76.458.076	0,44371551		
C7	267.988.285	157.903.447	0,58921772	0,58	0,54
	281.775.351	162.398.201	0,57633927		
	277.818.437	161.686.487	0,58198617		

Fonte: A autora (2024).

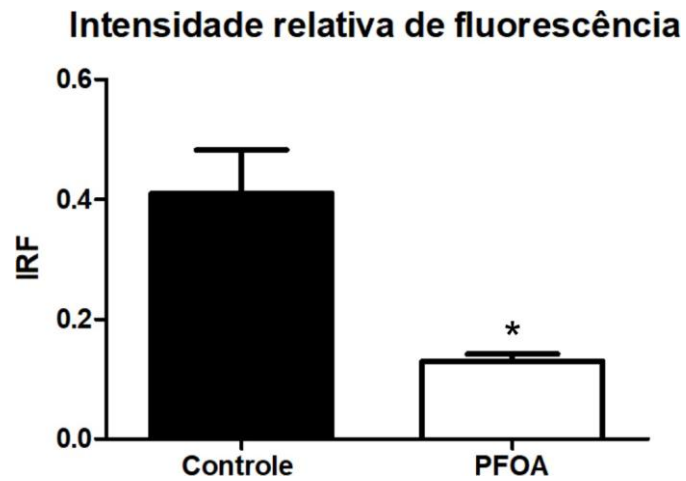
TABELA 2 - DADOS DE ÁREA, DENSIDADE INTEGRADA BRUTA E DA MÉDIA FINAL DOS EMBRIÕES EXPOSTOS AO PFOA

Embriões tratados - PFOA					
	Área	RawIntDen	IRF	Média IRF	
Controle secundário	286,500,828	8,967,985	0.03130178	0.03	IRF final
	260,685,241	10,834,092	0.04156005		
	259,494,552	7,459,071	0.02874462		
P1	278,102,365	39,629,606	0.14250007	0.14	0.11
	271,791,938	38,830,708	0.14286924		
	305,832,394	42,251,500	0.13815247		
P56	152,043,326	28,126,299	0.18498871	0.19	0.15
	103,502,596	19,933,509	0.19258946		
	158,417,015	29,183,606	0.18422015		
P35	217,330,523	36,198,295	0.16655873	0.17	0.13
	220,035,745	36,389,058	0.16537794		
	221,736,299	36,706,657	0.16554194		

Fonte: A autora (2024).

Foi quantificada a diminuição na intensidade relativa de fluorescência das células da crista neural do tronco marcadas com anti-HNK-1 em embriões no estágio 15HH expostos ao PFOA em relação aos embriões controle, evidenciando assim, uma redução significativa no número de células da crista neural do tronco em migração, como demonstrado na figura 14.

FIGURA 14 - GRÁFICO DA INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS DACRISTA NEURAL DO TRONCO



PFOA: n = 3; Controle: n = 3. Asterisco indica a diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle: * $p < 0,0497$. Valores = Média $\pm$ Erro padrão. FONTE: A autora (2024).

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o PFOA é prejudicial às células da crista neural (CCN) do tronco de embriões de *Gallus gallus* no estágio 15HH, por meio da interferência no número de células migratórias. Sabendo que esse processo é indispensável para a funcionalidade adequada dessa população (Brandelli; Lopes; Boelter, 2017; Szabó; Mayor, 2018), podemos afirmar que o PFOA é citotóxico às células da crista neural do tronco.

O desenvolvimento e migração anormal dessa população de células podem culminar no surgimento de neurocristopatias, um grupo heterogêneo de doenças congênitas raras (Pilon, 2021). Como as células da crista neural do tronco dão origem aos gânglios da raiz dorsal, aos gânglios simpáticos, à medula adrenal e aos melanócitos, a perturbação das funções dessa população durante o desenvolvimento embrionário pode acarretar o surgimento de neurocristopatias relacionadas a essas estruturas (Vega-Lopez; Cerrizuela; Aybar, 2017). Kam e colaboradores (2014) demonstraram que o aumento da apoptose e consequente perturbação da migração das CCN do tronco em camundongos gerou fenótipo semelhante à doença de Hirschsprung, uma neurocristopatia caracterizada por defeitos no sistema nervoso entérico e hipopigmentação, por exemplo. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho geram preocupação, visto que sugerem que a exposição ao PFOA pode gerar perturbação dessa população celular, e consequentemente, das estruturas que dela derivam.

Até o momento, existe uma lacuna na literatura acerca dos efeitos do PFOA sobre as CCN. Nenhum estudo traz como objetivo específico analisar os mecanismos pelos quais esse poluente pode induzir toxicidade sobre essa população celular, bem como o efeito desse poluente sobre a migração das CCN do tronco. Contudo, há algumas pesquisas que buscam observar os efeitos que o PFOA e o Ácido perfluorooctanessulfônico (PFOS), um PFA com estrutura e toxicidade semelhantes (Ghisi; Vamerali; Manzetti, 2019), têm sobre células-tronco neurais (CTN), as quais são geradas a partir de células do neuroectoderma embrionário, mesmo tecido

que origina as CCN (Galli; Gritti; Bonfanti; Vescovi, 2003). Entre os efeitos deletérios que esses contaminantes geram sobre as CTN estão a alteração da morfologia (Pierozan; Karlsson, 2021), diminuição da proliferação celular (Wan Ibrahim *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2016), diminuição da viabilidade celular (Dong *et al.*, 2016) e aumento da apoptose (Wan Ibrahim *et al.*, 2013). Desse modo, sabendo que as CTN possuem a mesma origem tecidual que as CCN, podemos sugerir que os efeitos negativos que esses compostos têm sobre as células-tronco neurais também poderiam ser observados nas CCN, sendo esse um motivo para a realização de estudos que busquem investigar os efeitos do PFOA sobre esses processos celulares nas CCN, os quais podem estar relacionados com a diminuição da migração dessas células.

Além disso, já foi demonstrado que o PFOA altera a distância linear de migração e o número de células migratórias da CN, mas em células da crista neural craniana de embriões de *Gallus gallus* nos estádios 10HH e 14HH (Da Costa, 2022). Os principais resultados desse trabalho indicam que o PFOA modifica a expressão de β -catenina, N- e E-caderina. Essas moléculas de adesão celular são essenciais para a interação célula-célula e célula-matriz, além de desempenharem papel crucial na transição epitélio-mesenquimal. Quando esses processos são perturbados, a migração das CCN é afetada em qualquer uma das suas subpopulações (McKeown; Wallace; Anderson, 2013). Desse modo, sabendo que alterações nas moléculas de adesão podem afetar a migração das CCN do tronco, os dados obtidos por Da Costa (2022) fornecem uma possível explicação para os resultados obtidos no presente estudo.

A grande maioria dos estudos que buscam analisar a citotoxicidade de PFAs sobre células eucarióticas são realizados *in vitro* e apontam dois mecanismos principais de citotoxicidade: desequilíbrio da homeostase de cálcio e estresse oxidativo. Ambos mecanismos culminam na disfunção mitocondrial, com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, aumento da atividade das caspases, liberação do citocromo c, depleção dos níveis intracelulares de ATP e alteração da atividade de enzimas antioxidantes, resultando em morte celular programada, ou apoptose

(Freire *et al.*, 2008; Kleszczyński; Stepnowski; Składanowski, 2009; Zhao *et al.*, 2010; Kleszczyński; Składanowski, 2011; Liu *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Esses mecanismos de citotoxicidade podem explicar a diminuição da migração das CCN por meio do aumento da apoptose, como já demonstrado por Sharma e colaboradores (2019), que observaram diminuição da migração das células da crista neural craniana em embriões de *Gallus gallus* após a exposição a uma combinação de inseticidas.

Para obter dados mais robustos e contribuir para uma conclusão mais fundamentada, é necessário aprimorar os experimentos. O principal limitante deste trabalho foi o número reduzido de embriões utilizados e a observação em apenas um estágio de desenvolvimento, devido à dificuldade em adquirir ovos embrionados de fontes especializadas. Um estudo com um número maior de amostras proporcionaria maior confiabilidade estatística. Além disso, observar os efeitos do PFOA sobre a migração das CCN dos estádios 15HH ao 19HH daria uma visão mais abrangente do impacto desse poluente, já que é nesse intervalo que ocorre a migração das células da crista neural do tronco em *Gallus gallus* (Giovannone *et al.*, 2015).

6 CONCLUSÕES

O presente estudo buscou analisar os efeitos do PFOA na migração das células da crista neural (CCN) do tronco em embriões de *Gallus gallus* no estágio 15HH. Os resultados indicam que a exposição ao PFOA, em concentração ambientalmente relevante, prejudica a migração das CCN do tronco, um efeito até então não descrito na literatura

Este achado ressalta a importância de considerar os impactos potenciais dos compostos perfluorados no desenvolvimento embrionário das aves e sugere a necessidade de investigações adicionais para elucidar os mecanismos moleculares associados a essa toxicidade específica.

7 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.; AUÐUNSSON, G. A.; BENFORD, D.; COCKBURN, A.; CRAVEDI, J. P.; DOGLIOTTI, E.; DOMENICO, A. DI; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; FINK- GREMMELS, J.; FÜRST, P.; GALLI, C.; GRANDJEAN, P.; GZYL, J.; HEINEMEYER, G.; JOHANSSON, N.; MUTTI, A.; SCHLATTER, J.; LEEUWEN, R. VAN.; PETEGHEM, C. VAN.; VERGER, P. Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. **EFSA Journal**, v. 6, p. 1-131, 2008.

BARLOW, C. A.; BOYD, C. A.; KEMP, M. J.; PARR, K. A. H. PFAS Toxicology – What is Driving the Variation in Drinking Water Standards? **GZA GeoEnvironmental, Inc**, não p., 2019.

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

BJØRNSTAD, S.; AUSTDAL, L.P.E.; ROALD, B.; GLOVER, J.C.; PAULSEN, R.E. Cracking the Egg: Potencial of the developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.355, p. 386-396, 2015.

BRANDELLI, A.; LOPES, N. A.; BOELTER, J. F. Food applications of nanostructured antimicrobials. **Food Preservation**, p. 35-74, 2017.

BRASIL. Câmara dos Deputados. Projeto de lei nº 2726, de 22 de maio de 2023. Autor: Juninho do Pneu. **Câmara dos Deputados**, Brasília, DF, 26 nov. 2023. Disponível em: <<https://www.camara.leg.br/propostas-legislativas/2364117>>. Acesso em: 10 jun.2024.

BUTLER, K. S.; BRINKER, C. J.; LEONG, H. S. Bridging the In Vitro to In Vivo gap: Using the Chick Embryo Model to Accelerate Nanoparticle Validation and Qualification for In Vivo studies. **ACS Nano**, v. 12, p. 19626–19650, 2022.

CARLSON, B.M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. 5ª ed. Riode Janeiro, Elsevier, 2014.

CERRIZUELA, S.; VEGA-LOPEZ, G. A.; AYBAR, M. J. The role of teratogens in neural crest development. **Birth Defects Research**, v. 112, p. 584-632, 2020.

CORSINI, E.; LUEBKE, R. W.; GERMOLÉC, D. R.; DEWITT, J. C. Perfluorinated compounds: emerging pops with potential immunotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 230,p. 263-270, 2014.

COUSINS, I. T.; NG, C. A.; WANG, Z.; SCHERINGER, M. Why is high persistence alone a major cause of concern? **Environmental Science: Processes & Impacts**, v.21, p. 781-792, 2019.

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

DA COSTA, Mariliza Cristine Vieira. Ação do chumbo, cádmio e ácido perfluorooctanóico, de maneira isolada e em mistura, sobre o desenvolvimento inicial da região cefálica de *Gallus gallus*. 2022. Tese (doutorado) — Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Disponível em <https://acervodigital.ufpr.br/xmlui/handle/1884/284>. Acesso em: 23 abr. 2024.

DARNELL, D.; GILBERT, S. F. Neuroembryology. **WIREs Developmental Biology**, v. 6. e215, 2017.

DE LA TORRE, A.; NAVARRO, I.; SANZ, P.; MÁRTINEZ, M. D. L. Á. Occurrence and human exposure assessment of perfluorinated substances in house dust from three European countries. **Science of The Total Environment**, v. 685, p. 208-314, 2019.

DUPIN, E.; CALLONI, G.W.; COELHO-AGUIAR, J. M.; LE DOUARIN, N. M. The issue of the multipotency of the neural crest cells. **Developmental Biology**, v. 444, p. 47- 59, 2018.

EGGERT, A.; CISNEROS-MONTALVO, S.; ANANDAN, S.; MUSILLI, S.; STUKENBORG, J. B.; ADAMSSON, A.; NURMIO, M.; TOPPARI, J. The effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) on fetal and adult rat testis. **Reproductive Toxicology**, v. 90, p. 68-76, 2019.

EPA (2022). **Our Current Understanding of the Human Health and Environmental Risks of PFAS**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pfas/our-current-understanding-human-health-and-environmental-risks-pfas>>. Acesso em: 02 jun. 2024.

FLORENTIN, A.; DEBLONDE, T.; DIGUIO, N.; HAUTEMANIERE, A.; HARTEMANN, P. Impacts of two perfluorinated compounds (PFOS and PFOA) on human hepatoma cells: Cytotoxicity but no genotoxicity? **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, p.493-499, 2011.

GAINES, L. G. T. Historical and current usage of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A literature review. **American Journal of Industrial**

Medicine, v. 66, p. 353-378, 2022.

GARCIA, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G. **Embriologia**. 3^a ed. Porto Alegre, Artmed, 2012.

GIESY, J. P.; KANNAN, K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. **Environmental science & technology**, v. 35, n. 7, p. 1339-1342, 2001.

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

GILBERT., S. F.; BARRESI, M. J. F. **Biologia do desenvolvimento**. 8^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2020.

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

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

HARADA, H.; SATO, T.; NAKAMURA, H. Fgf8 signaling for development of the midbrain and hindbrain. **Development, Growth & Differentiation**, v. 58, p. 437-445, 2016.

HOLMSTRÖM, K. E.; JÄRNBERG, U.; BIGNERT, A. Temporal Trends of PFOS and PFOA in Guillemot Eggs from the Baltic Sea, 1968–2003. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 80-84, 2005.

ITRC (2020). The Interstate Technology & Regulatory Council. **Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs) Team. Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)**. September, 2020.

JI, Y.; HAO, H.; REYNOLDS, K.; MCMAHON, M.; ZHOU C. J. Wnt Signaling in Neural Crest Ontogenesis and Oncogenesis. **Cells**, v. 8, 1173, 2019.

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

LEATHERS, T. A.; ROGERS, C. D. Time to go: neural crest cell epithelial-to-mesenchymal transition. **Development**, v. 149, 200712, 2022.

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, não p., 2022.

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, p. 216-218, 2014.

KANNAN, K.; CORSOLINI, S.; FALANDYSZ, J.; FILLMANN, G.; KUMAR, K. S.; LOGANATHAN, B. G.; MOHD, M. A.; OLIVERO, J.; WOUWE, N. V.; YANG, J. H.; ALDOUS, K. M. Perfluorooctanesulfonate and Related Fluorochemicals in Human Blood from Several Countries. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 4489-4495, 2004.

KANTARCIOGLU, E.; KAHIOGULLARI, G.; ZAIMOGLU, M.; ATMIS, E. O.; PEKER, E.; YIGMAN, Z.; BILLUR, D.; AYDIN, S.; ERDEN, I. M.; UNLÜ, A. The effect of magnetic resonance imaging on neural tube development in an early chicken embryo model. **Child's Nervous System**, v. 34, p. 933-938, 2018.

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

KLINGELHÖFER, D.; BRAUN, M.; GRONENBERG, D. A.; BRÜGGMANN, D. The “forever” per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A critical accounting of global research on a major threat under changing regulations. **Chemosphere**, v. 354, 141694, 2024.

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, 152286, 2019.

NÁJERA, G. S.; WEIJER, C. J. Cellular processes driving gastrulation in the avian embryo. **Mechanisms of Development**, v. 163, não p., 2020.

MANOJKUMAR, Y.; PILLI, S.; RAO, P. V.; TYAGI, R. D. Sources, occurrence and toxic effects of emerging per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). **Neurotoxicology and Teratology**, v. 97, 107174, 2023.

MARTIK, M. L.; BRONNER, M. E. Riding the crest to get a head: neural crest evolution in vertebrates. **Nature Reviews**, v. 22, p. 616-626, 2021.

MAYOR, R.; THEVENEAU, E. The role of the non-canonical Wnt–planar cell polarity pathway in neural crest migration. **Biochemical Journal**, v. 457, p. 19-26, 2013.

MURTAZINA, A.; ADAMEYKO, I. The peripheral nervous system. **Development**, v.150, 2023.

OECD (2022). **Portal on Per and Poly Fluorinated Chemicals**. Disponível em: <<https://www.oecd.org/chemicalsafety/portal-perfluorinated-chemicals/countryinformation/european-union.htm>> Acesso em: 01 jul. 2023.

PANIERI, E.; BARALIC, K.; DJUKIC-COSIC, D.; DJORDJEVIC, A. B.; SASO, L. PFAS Molecules: A Major Concern for the Human Health and the Environment. **Toxics**, v.10, não p., 2022.

POTTS, E. M. COPPOTELLI, G., ROSS, J. J. M. Histological-Based Stainings using Free-Floating Tissue Sections. **Journal of Visualized Experiments**, 162, não p., 2021.

PSYCHOYOS, D.; FINNELL, R. Double whole mount in situ hybridization of early chickembryos. **Journal of Visualized Experiments**, v. 20, 904, 2008.

RIBATTI, D.; ANNESE, T. Chick embryo in experimental embryology and more. *Pathology - Research and Practice*, v. 245, 154478, 2023.

RENNER, R. Concern over Perfluorinated Chemicals. **Environmental Science and Technology**, não p., 2001.

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

ROTHSTEIN, M.; BHATTACHARYA, D.; SIMOES-COSTA, M. The molecular basis of neural crest axial identity. **Developmental Biology**, v. 444, p. 170-180, 2018.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; SANTANA, I. C. H. **Histologia e EmbriologiaAnimal comparada**. 2ª ed. Fortaleza, EdUECE, 2015.

SHAKHOVA, O.; SOMMER L. **Neural crest-derived stem cells**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27044/>. Acesso em 11 março 2024.

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

STERN, C. D. The Chick: A Great Model System Becomes Even Greater. **Developmental Cell**, v. 8, p. 9-17, 2005.

STEENLAND, K.; FLETCHER, T.; SAVITZ, D. A. Epidemiologic Evidence on the Health Effects of Perfluorooctanoic Acid (PFOA). **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 1100-1108, 2010.

SZABÓ, A. MAYOR, R. Mechanisms of Neural Crest Migration. **Annual Review of Genetics**, v. 52, p.43-63, 2018.

THÉVENEAU, E.; DUBAND, J.L.; ALTABEF, M. Ets-1 Confers Cranial Features on Neural Crest Delamination. **PLoS ONE**, não p., 2007.

THÉVENEAU, E.; MAYOR, R. Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. **Developmental Biology**, v. 366, p. 34-54, 2012.

UNEP (2019). **Decision SC-9/12: Listing of Perfluorooctanoic Acid (PFOA), its Salts and PFOA-Related Compounds in Annex A of the Stockholm Convention.** (UNEP/POPS/COP.9/SC-9/12). Geneva, Switzerland.

UNEP (2009). **Decision SC-4/17: Listing of Perfluorooctane Sulfonic Acid, its Salts and Perfluorooctane Sulfonyl Fluoride in Annex B of the Stockholm Convention.** (UNEP/POPS/COP.4/SC-4/17), Geneva, Switzerland.

VEJA-LOPEZ, G. A.; CERRIZUELA, S.; AYBAR, M. J. Trunk neural crest cells: formation, migration and beyond. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 61, p. 5-15, 2017.

VERGARA, M. N.; CANTO-SOLER, M. V.; Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. **Neural Development**, v. 7, não p., 2012.

YAHAV, S.; BRAKE, J. Chick embryogenesis: a unique platform to study the effects of environmental factors on embryo development. **Journal of Stem Cells**, v. 9, p. 17-37, 2014.

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, p. 548-555, 2012.

WACHHOLZ, G. E.; RENGEL, B. D.; VARGESSON, N.; FRAGA, L. R. From the Farm to the Lab: How Chicken Embryos Contribute to the Field of Teratology. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 666726, 2021.

WANG, Q.; KUROSAKA, H.; KIKUCHI, M.; NAKAYA, A.; TRAINOR, P. A.; YAMASHIRO, T. Perturbed development of cranial neural crest cells in association with reduced sonic hedgehog signaling underlies the pathogenesis of retinoic-acid- induced cleft palate. **Disease Models & Mechanisms**, v. 12, 040279, 2019.

WOLPERT, L.; TICKLE, C.; ARIAS, A. M. **Principles of Development**. 6^a ed.

OxfordUniversity Press, 2019.

ZOSEN, D.; HADERA, M. G.; LUMOR, J. S.; ANDERSEN, J. M.; PAULSEN, R. E. Chicken embryo as animal model to study drug distribution to the developing brain. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 112, não p., 2021.