

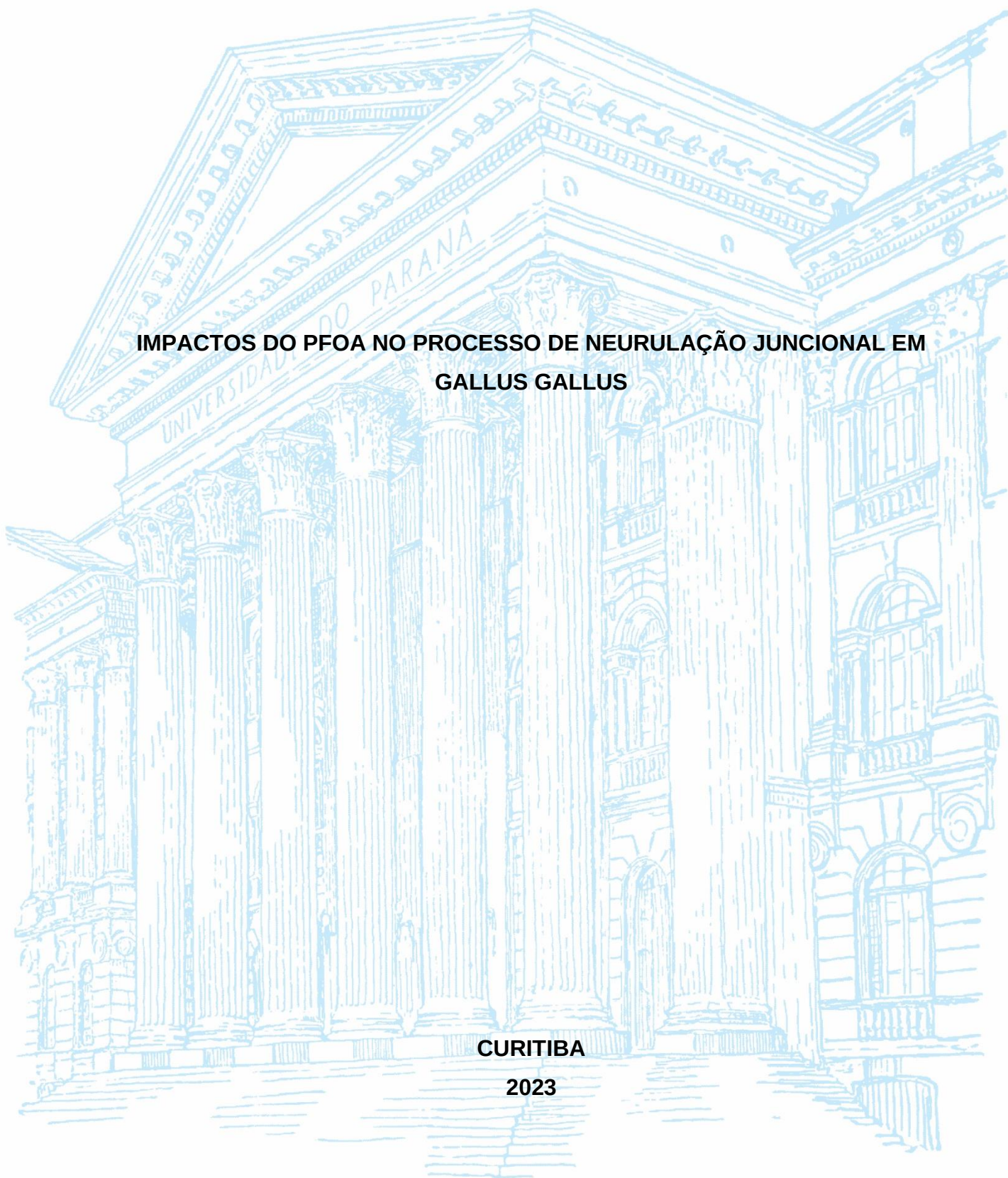
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDO DA COSTA FERREIRA

**IMPACTOS DO PFOA NO PROCESSO DE NEURULAÇÃO JUNCIONAL EM
GALLUS GALLUS**

CURITIBA

2023



EDUARDO DA COSTA FERREIRA

**IMPACTOS DO PFOA NO PROCESSO DE NEURULAÇÃO JUNCIONAL EM
*Gallus gallus***

Monografia referente a disciplina BIO027 – Estágio Supervisionado em Biologia, apresentado na Universidade Federal do Paraná como requisito básico para a conclusão do bacharelado do Curso de Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Feijó Ortolani-Machado

Coorientadora: Dra. Melyssa Kmecick

Curitiba

2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força e determinação para seguir em frente.

À professora Claudia Feijó Ortolani-Machado, minha orientadora nos últimos 5 anos. Sou grato pela sua confiança, paciência e apoio. Também agradeço pelos ensinamentos e inspirações que me motivaram a seguir o caminho da pesquisa.

À minha coorientadora Melyssa Kmecick, pela imensa ajuda e apoio. Sou grato pela amizade, conversas, risadas, ensinamentos e pelo grande impacto positivo na minha formação acadêmica. Agradeço por me ajudar a superar os desafios e a me tornar uma pessoa perseverante.

Aos meus pais, Evaldo e Elisangela, e ao meu irmão, Wesley, pelo incondicional apoio, carinho, compreensão e amor. Sou grato pelo suporte que me ajudou a ser quem eu sou hoje. Agradeço pelos conselhos e conversas que me auxiliaram a superar os momentos difíceis.

Aos meus familiares, em especial meus avós, pelo contínuo suporte durante toda essa jornada.

À minha colega de laboratório, Mariliza. Sou grato pela sua amizade e as conversas sempre acompanhadas de uma bela xícara de café. Obrigado pelos seus conselhos e por ter me ajudado a ser uma pessoa mais atenciosa. Também agradeço às colegas Paula, Sandra e Daniele pela amizade, brincadeiras e apoio nos trabalhos do laboratório.

À minha colega, Beatriz, pela amizade, discussões descontraídas e por me ajudar a conciliar os trabalhos do laboratório com as demandas da graduação.

À professora Maritana Mela, por disponibilizar o micrótomo usado na obtenção dos cortes histológicos.

Ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência da UFPR, por ceder o fotomicroscópio usado na captura das imagens.

À Universidade Federal do Paraná, por me proporcionar uma formação de qualidade.

À Pro-reitoria de Assuntos Estudantis, por todo o apoio necessário para a conclusão desse trabalho e a minha manutenção na graduação.

RESUMO

O ácido perfluorooctanóico (PFOA) é um produto sintético empregado na fabricação de utensílios industriais e domésticos. Apesar da relevância econômica, esse composto é persistente e tende a se acumular nos órgãos e tecidos humanos, resultando em distúrbios diversos. Entre as alterações observadas, o PFOA interfere nos processos de neurulação primária (NP) e secundária (NS), que são mecanismos responsáveis pela formação do tubo neural (TN), precursor do sistema nervoso central. A NP constitui o TN da região anterior pela dobra da placa neural, enquanto a NS é responsável pela formação dessa estrutura pela condensação das células mesenquimais na porção caudal. Em estudos recentes, foram descritos movimentos morfogenéticos distintos na região de transição entre a NP e NS, conhecidos como neurulação juncional (NJ), que conecta a porção anterior e posterior do TN. Embora a contaminação por PFOA já tenha sido associada a malformações durante a NP e NS, até o momento não foram encontradas evidências de sua relação com a NJ. Sendo assim, com o intuito de incrementar o estudo da neurotoxicidade do PFOA durante a neurulação, o presente trabalho investigou os impactos desse contaminante na integridade e estruturação tecidual durante a NJ em embriões de *Gallus gallus*. Para isso, 10 ovos foram injetados com NaCl 0,9% (grupo controle) e 10 com PFOA 5 ng.mL⁻¹ (grupo exposto) e, em seguida, incubados por 40-45 horas para a obtenção de embriões no estágio HH11. Após a incubação, os embriões foram fixados, emblocados em Historesina®, cortados transversalmente na espessura de 5 µm e, então, submetidos a coloração. Parte dos cortes de 6 embriões (3 controles + 3 expostos) foram corados em hematoxilina e eosina (H&E) para a análise morfológica qualitativa e semiquantitativa via *score* morfológico. A outra parte foi submetida a marcação histoquímica com ácido periódico Schiff (PAS) para a análise semiquantitativa da integridade tecidual. A análise morfológica revelou desestruturação da placa neural, falha na transição epitelial mesenquimal, invasão celular e apoptose. O *score* morfológico atribuiu valores de alterações maiores no grupo exposto. A análise da integridade tecidual mostrou que embriões expostos ao PFOA apresentaram instabilidade estrutural em comparação com o controle, com redução significativa de 30% na intensidade de marcação. Com base nos resultados obtidos, juntamente com a revisão de literatura existente, pode-se concluir que o PFOA atua como um agente degenerativo durante a neurulação, promovendo algum tipo de disfunção em todas as etapas desse processo descritas até o momento.

Palavras-chave: Embriotoxicologia; Ácido Perfluorooctanóico; Malformações.

ABSTRACT

Perfluorooctanoic acid (PFOA) is a synthetic compound used in the manufacturing of industrial and household products. Despite its economic relevance, this compound is persistent and tends to accumulate in human organs and tissues, causing a variety of disorders. Among the observed alterations, PFOA interferes with the processes of primary neurulation (PN) and secondary neurulation (SN), which are mechanisms responsible for the formation of the neural tube (NT), the precursor of the central nervous system. PN forms the anterior region of the neural tube (NT) through the folding of the neural plate (NP), while SN is responsible for the formation of this structure through condensation of mesenchymal cells in the caudal portion. Recent studies have described distinct morphogenetic movements in the transition region between PN and SN, known as junctional neurulation (JN), which connects the anterior and posterior portions of the NT. Although contamination with PFOA has been associated with malformations during PN and SN, there is currently no evidence of its relationship with JN. Therefore, aiming to enhance the study of PFOA neurotoxicity during neurulation, this study investigated the impacts of this contaminant on tissue integrity and organization during JN in *Gallus gallus* embryos. To achieve this, eggs were injected with 0.9% NaCl (control group) or 5 ng/ml⁻¹ PFOA (exposed group), and then incubated for 40-45 hours to obtain embryos at HH11 stage. After incubation, the embryos were fixed, embedded in Historesin®, transversely sectioned at a thickness of 5 µm, and subsequently subjected to staining. Some sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for qualitative and semi-quantitative morphological analysis using a morphological scoring system. The other part was subjected to histochemical staining with periodic acid-Schiff (PAS) for semi-quantitative analysis of tissue integrity. Morphological analysis revealed malformations in the PN, failure in the epithelial-mesenchymal transition, cell invasion, and apoptosis. The morphological scoring assigned higher alteration values to the exposed group; however, the differences were not significant due to the sample size. Analysis of tissue integrity showed that embryos exposed to PFOA exhibited structural instability compared to the control group, with a significant reduction of 30% in staining intensity. Based on the obtained results, along with the review of existing literature, it can be concluded that PFOA acts as a degenerative agent during neurulation, causing some form of dysfunction in all described stages of this process so far.

Keywords: Embryotoxicology; Perfluorooctanoic Acid; Neurulation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Configuração Molecular do PFOA.....	2
FIGURA 2 - Fluxo de Disseminação e Contaminação por PFOA.....	3
FIGURA 3 - Possíveis Efeitos do PFOA em Humanos.....	5
FIGURA 4 - Possíveis Efeitos Neurotóxicos do PFOA Durante o Desenvolvimento.....	7
FIGURA 5 - Neurulação em Amnietos.....	10
FIGURA 6 - Embrião no Estádio de Interesse.....	13
FIGURA 7 - Região de Interesse.....	15
FIGURA 8 - Observação e Mensuração do Embrião.....	16
FIGURA 9 - Desestruturação da PN.....	19
FIGURA 10 - Desorganização Neuroepitelial.....	21
FIGURA 11- Apoptose Durante a NJ.....	23
FIGURA 12 - Marcação com PAS durante a NJ.....	28

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Integridade Tecidual Média.....	25
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Grupos Experimentais.....	12
TABELA 2 - Volume de injeção.....	13
TABELA 3 - <i>Score</i> morfológico dos Embriões.....	24

LISTA DE SIGLAS

CF	- Ligação Carbono-Flúor
DTNJ	- Defeitos do Tubo Neural Juncional
H&E	- Hematoxilina e Eosina
HH	- Estádio Hamburger e Hamilton
NJ	- Neurulação Juncional
NP	- Neurulação Primária
NS	- Neurulação Secundária
PAS	- Ácido Periódico de Schiff
PFAS	- Substâncias Perfluoroalquil
PFOA	- Ácido Perfluorooctanóico
PN	- Placa Neural
S	- <i>Score</i> Morfológico
TN	- Tubo Neural

SUMÁRIO

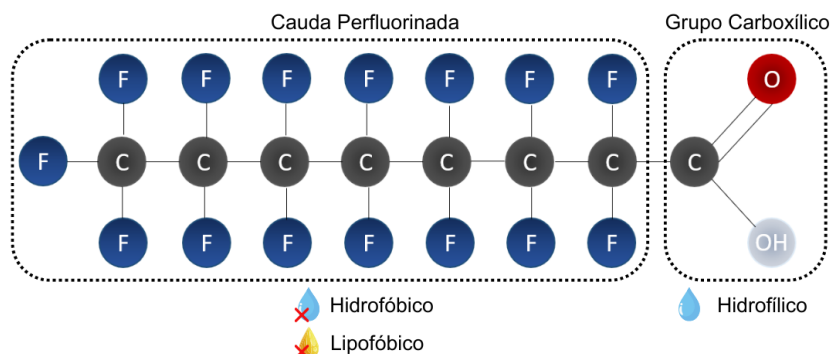
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Ácido Perfluorooctanóico	1
1.1.1	Toxicidade e Contaminação Ambiental.....	2
1.1.2	Contaminação Humana e Efeitos Gerais.....	4
1.1.3	Neurotoxicidade em Humanos.....	5
1.1.4	Neurotoxicidade em Modelos Animais.....	7
1.2	Neurulação.....	8
1.3	O Embrião de <i>Gallus gallus</i> como modelo Teratológico.....	10
2	JUSTIFICATIVA.....	11
3	OBJETIVOS.....	11
3.1	Objetivo Geral.....	11
3.2	Objetivos Específicos.....	11
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1	Desenho Experimental.....	12
4.2	Exposição e Incubação.....	12
4.3	Coleta dos Embriões.....	13
4.4	Processamento Histológico.....	14
4.5	Análise Morfológica dos Embriões.....	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5.1	Distúrbios Estruturais.....	17
5.2	Comportamento Neuroepitelial Anômalo.....	19
5.3	Degeneração Tecidual.....	22
5.4	Score Morfológico.....	24
5.5	Análise de Integridade Tecidual.....	24
6	CONCLUSÕES.....	27
	REFERÊNCIAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDO PERFLUOROOCTANÓICO (PFOA)

O ácido perfluorooctanóico (PFOA, $C_nF_{2n+1}COOH$) é um composto organofluorado de origem artificial pertencente ao grupo de substâncias perfluoroalquil (PFAS) (BUCK *et al.*, 2012). Sua síntese é baseada na substituição dos hidrogênios de um hidrocarboneto por átomos de flúor via fluorinação eletroquímica (BENSKIN; DE SILVA; MARTIN, 2010). Nesse processo, um precursor orgânico é diluído em fluoreto de hidrogênio e, com a inserção de corrente elétrica, ocorre a dissociação do hidrogênio da cadeia carbônica e a incorporação de flúor (AUDENAERT *et al.*, 1999). A molécula resultante apresenta propriedades físico-químicas relevantes para atividades industriais e comerciais, incluindo comportamento anfipático, estabilidade térmica e resistência química (KISSA, 2001). O comportamento anfipático do PFOA é estabelecido devido à sua configuração bipartida, compreendendo uma região hidrofóbica/perfluorinada; e outra hidrofílica com grupamento carboxílico (Figura 1) (PANIERI *et al.*, 2022). A estabilidade térmica é resultado das fortes ligações carbono-flúor (CF) (O'HAGAN, 2008), conferindo ao composto a capacidade de persistir em temperaturas de até 200°C, com decomposição próxima aos 500°C (KISSA, 2001; XIAO *et al.*, 2020). Além disso, o PFOA possui uma resistência química inerente, protegendo-o contra processos de fotólise, hidrólise, entre outros (CALVO-FLORES; ISAC-GARCÍA; DOBADO, 2018). Essa competência advém da capacidade do flúor em blindar todos os átomos de carbono da cadeia, garantindo a integridade da molécula frente aos ataques químicos (SIEGEMUND *et al.*, 2016). Essas propriedades do PFOA proporcionam otimizações para produtos e serviços humanos, justificando sua produção e aplicação em larga escala em vários setores industriais (BUCK; MURPHY; PABON, 2012; TOSKOS; PANAGIOTAKIS; DERMATAS, 2019).

FIGURA 1 – CONFIGURAÇÃO MOLECULAR DO PFOA



Molécula de PFOA e suas propriedades básicas. FONTE: modificado de PANIERI *et al.* (2022).

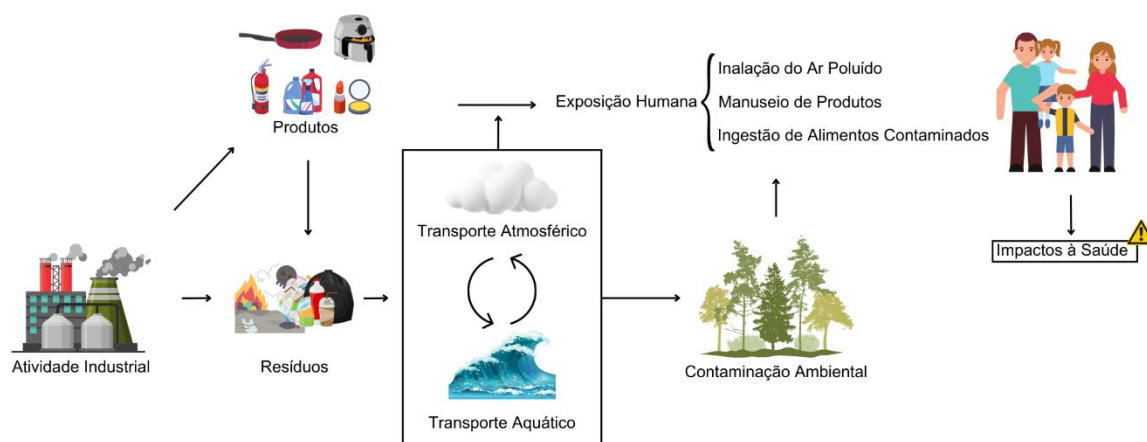
Entre os atributos do PFOA que fundamentam suas aplicações, destacam-se o comportamento anfipático, a estabilidade físico-química e a presença da cadeia perfluorinada (PANIERI *et al.*, 2022). O caráter anfipático confere à molécula a capacidade de repelir água e gordura (GARDINER, 2014), o que é essencial na produção de revestimentos antiaderentes em estofados, tapetes, vidrarias, papéis, utensílios domésticos e produtos têxteis e de higiene pessoal (BUCK *et al.*, 2012; GLÜGE *et al.*, 2020). Por sua vez, a estabilidade molecular do PFOA garante resistência térmica, química e baixa reatividade, tornando-o um componente significativo na produção de invólucros anticorrosivos, na composição de cabos, turbinas, placas fotovoltaicas e em processamentos metalúrgicos (GLÜGE *et al.*, 2020). Outro atributo importante é a natureza surfactante do PFOA, que se baseia na redução da tensão superficial em meios aquosos (KISSA, 2001). Isso ocorre por meio da intercalação do PFOA com as moléculas de água, diminuindo as forças moleculares e as resistências regentes, permitindo uma maior fluidez do líquido (SCHULTZ.; BAROFSKY; FIELD, 2003; SCHMIERMUND, 2022). Tal qualidade é pertinente para a produção de tintas, produtos de limpeza, espumas de combate ao incêndio e como emulsificante em cremes e shampoos (WANG *et al.*, 2013; HILL; EASTOE, 2017; GLÜGE *et al.*, 2020).

1.1.1 Toxicidade e contaminação ambiental

As propriedades que tornam o PFOA adequado para várias aplicações também o tornam um poluente ambiental tóxico e persistente (GRANDJEAN; CLAPP, 2015).

Sua periculosidade decorre da capacidade de interferir nos processos biológicos, provocando diversas patologias, e de sua resistência à degradação em condições normais, resultando em acúmulo no organismo e no ambiente (VAALGAMAA *et al.*, 2011; STEENLAND *et al.*, 2020). Também possui ágil disseminação pelo transporte de longa distância, o que leva à dispersão de partículas a partir de seu ponto de origem para outras áreas (PREVEDOUROS *et al.*, 2006). Esse processo de disseminação faz com que o PFOA presente no solo e nos rios seja transportado para os oceanos, onde é redistribuído para várias regiões por meio das correntes marinhas (WANIA, 2007; ARMITAGE *et al.*, 2009). Além disso, pode ser transportado pela atmosfera e depositado em outras regiões por correntes de ar (KUNACHEVA *et al.*, 2012). Como resultado dessas dinâmicas, combinadas com as atividades antropogênicas, o PFOA se tornou ubíquo e estabeleceu uma contaminação ambiental em escala global (Figura 2) (DE SILVA *et al.*, 2021). Isso é evidenciado pela detecção do composto tanto em áreas industrializadas, incluindo potências mundiais e países em desenvolvimento, quanto em locais remotos, como o Ártico, cadeias de montanhas e oceanos (ARMITAGE *et al.*, 2009; MUIR *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2020). Além disso, o PFOA está presente em recursos naturais, alimentos, e é encontrado em organismos como animais, plantas e seres humanos (GHISI; VAMERALI; MANZETTI, 2019; INGELIDO *et al.*, 2020; SCIANCALEPORE *et al.*, 2021).

FIGURA 2 – FLUXO DE DISSEMINAÇÃO E CONTAMINAÇÃO POR PFOA



Disseminação e contaminação global mediada por transportes de longa distância. Seta preta: fluxo do PFOA. FONTE: O Autor, usando recursos do Canva® (2023).

Devido ao seu potencial tóxico e disseminativo, alguns países restringiram o uso de PFOA na confecção de materiais (BOCK; LAIRD, 2022). Nos Estados Unidos, a produção de PFOA foi encerrada em 2015, entretanto, produtos perfluorinados importados ainda circulam no país (EPA, 2019). Nesse contexto, empresas nacionais optaram por compostos organofluorinados substitutivos, porém esses compostos também são tóxicos e persistentes no ambiente (BRANDSMA *et al.*, 2019; SATBHAI; VOGS; CRAGO, 2022). Apesar dessas tentativas, os EUA ainda apresentam elevada contaminação por PFOA em água potável, solo e em grupos populacionais (ANDREWS; NAIDENKO, 2020; GALLOWAY *et al.*, 2020). Nos países da União Europeia, o uso do PFOA foi restrito a uma concentração máxima por produto fabricado, e sua emissão é controlada semanalmente entre as indústrias (SZNAJDER-KATARZYŃSKA *et al.*, 2019; BRENNAN *et al.*, 2021). Tais medidas ajudaram a remediar a contaminação desde 2011, mas não foram suficientes para lidar com a crescente exposição humana e a contaminação dos recursos naturais (EAST *et al.*, 2021; RICHTEROVÁ *et al.* 2023). No Brasil, não existem regulamentações que controlem o uso e a emissão de PFOA, o que agrava a situação, considerando a presença desse composto em regiões urbanas e nos recursos naturais (NASCIMENTO *et al.*, 2018; TORRES *et al.*, 2022).

Em um contexto global, a regulação do PFOA enfrenta incertezas, uma vez que as legislações criadas não são efetivamente aplicadas para restringir seu uso, ou não estabelecem limitações de forma legal (BRENNAN *et al.*, 2021). Diante desse cenário,

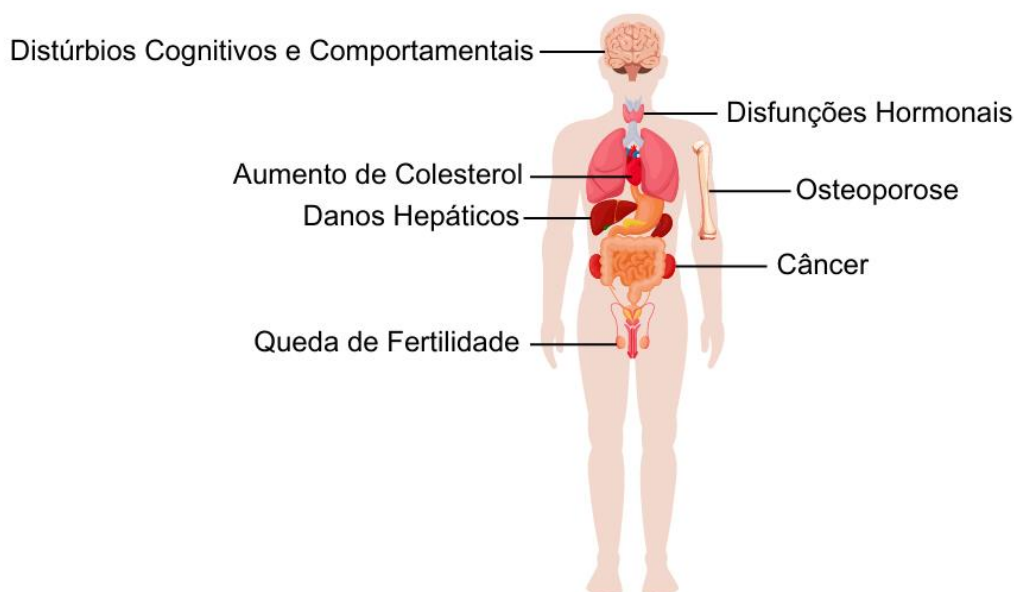
torna-se essencial investigar a toxicidade do PFOA a fim de fortalecer os regimentos de controle dos perfluoroalquilos (PFAS).

1.1.2 Contaminação humana e efeitos gerais

A emissão do PFOA pelas atividades industriais e sua disseminação global têm levado à contaminação das populações humanas (DE SILVA *et al.*, 2021). A exposição ao PFOA ocorre por meio da inalação do ar poluído, bem como pelo consumo e manuseio de água, alimentos e produtos contaminados (SUNDERLAND *et al.*, 2019). Após ser internalizado, o PFOA tende a se acumular principalmente no sangue, leite materno, fígado, pulmões, cérebro, rins e ossos (PÉREZ *et al.*, 2013; GEBBINK; VAN LEEUWEN, 2020; LAKIND *et al.*, 2022). A presença desse poluente no organismo pode desencadear alterações em vários mecanismos biológicos, resultando em disfunções sistêmicas (FIGURA 3) (ESPARTERO *et al.*, 2022).

No sistema reprodutor, evidências apontam que o PFOA pode causar queda na motilidade e integridade dos espermatozoides, além de redução da qualidade do sêmen e alterações genitais (LOUIS *et al.* 2015; DI NISIO *et al.*, 2019). Alguns estudos sugerem a possível associação do PFOA em casos de pré-eclâmpsia, gestação prolongada e redução do peso do recém-nascido, embora os dados ainda sejam inconsistentes (STEENLAND *et al.*, 2020). Além disso, foram observados possíveis efeitos endócrinos, evidenciados pela interferência nos mecanismos metabólicos da glicose, resultando no aumento da glicemia e contribuindo para o desenvolvimento de obesidade e diabetes do tipo 2 (ALDERETE *et al.*, 2019; MITRO *et al.*, 2021). Disfunções da tireoide também foram relatadas devido à capacidade desse poluente de interferir no feedback entre os hormônios tireoidianos e as células alvo, culminando no hiper e hipotireoidismo (COPERCHINI *et al.*, 2017). Já no sistema renal, o PFOA parece estar associado à maior retenção de ácido úrico no organismo, promovendo hiperuricemia e gota em grande parte das populações expostas (SCINICARIELLO *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2023). Foram registrados também potenciais efeitos adversos, como danos hepáticos, aumento do risco de osteoporose e câncer em vários tecidos (GALLOWAY *et al.*, 2015; DARROW *et al.*, 2016; BARTELL; VIEIRA, 2021).

FIGURA 3 – POSSÍVEIS EFEITOS DO PFOA EM HUMANOS



Riscos do PFOA sobre a saúde humana descritos na literatura. FONTE: O Autor, usando recursos do Canva ® (2023).

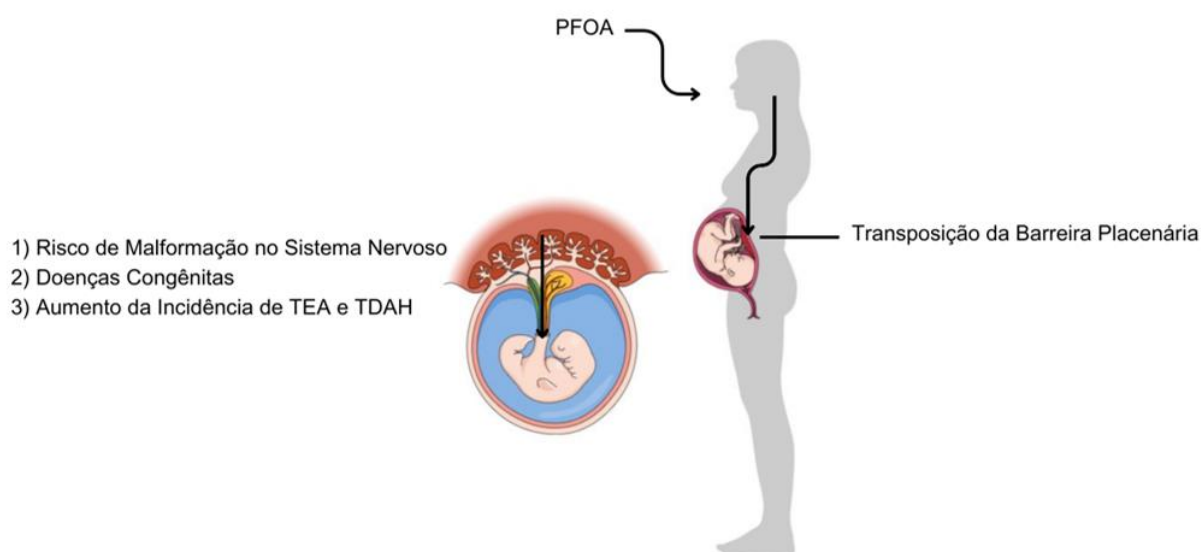
1.1.3 Neurotoxicidade em humanos

Outros estudos têm abordado a toxicidade do PFOA no sistema nervoso central humano (STEENLAND *et al.*, 2020). A neurotoxicidade desse poluente pode ocorrer em dois momentos: durante o período pós-natal e pré-natal. Os efeitos durante o desenvolvimento infantojuvenil e em adultos são atribuídos à capacidade do PFOA de ultrapassar a barreira hematoencefálica (PIEKARSKI; DIAZ; MCNERNEY, 2020). Embora o mecanismo exato de transposição ainda não esteja completamente elucidado, acredita-se que o PFOA seja capaz de produzir radicais livres que desregulam a permeabilidade da barreira, possibilitando sua passagem (CAO; NG, 2021). Uma vez no cérebro, o PFOA se acumula em várias regiões e pode desencadear diferentes distúrbios (PÉREZ *et al.*, 2013; DI NISIO *et al.*, 2022). Devido a esses riscos, estudos epidemiológicos foram conduzidos para tentar estabelecer os riscos desse poluente nas populações humanas expostas (ESPARTERO *et al.*, 2022). As pesquisas apontam uma possível correlação positiva da contaminação por PFOA com aumento de casos de distúrbios motores, comportamentais e comprometimento da memória de curto prazo (GALLO *et al.*, 2013; VAN LAREBEKE *et al.*, 2022; WENG *et al.*, 2022; KIM *et al.* 2023). Contudo, essas investigações são realizadas em

amostras populacionais restritas, portanto, seus resultados são sugestivos e não conclusivos (STEENLAND *et al.*, 2020). Para fortalecer essas evidências, é necessário realizar investigações em outras comunidades e com maior número de participantes.

Os malefícios causados pelo PFOA durante o período pré-natal estão relacionados à sua capacidade de atravessar a barreira placentária (FIGURA 4) (MIDASCH *et al.*, 2007). Esse fenômeno representa um risco para os mecanismos de neurulação e outros processos envolvidos na formação do sistema nervoso central (ESPARTERO *et al.*, 2022). Investigações dessa problemática em grupos humanos têm explorado a correlação entre o aparecimento de distúrbios cognitivos na infância e o grau de contaminação dos parentais (SKOGHEIM *et al.*, 2021). Esses estudos apontam para um aumento de transtorno do espectro autista (TEA) e transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) em crianças concebidas por mães expostas ao PFOA (LUO *et al.*, 2020; OH *et al.*, 2021; SKOGHEIM *et al.*, 2021). Já no contexto do desenvolvimento, a contaminação dos parentais tem sido associada ao aumento de malformações no sistema nervoso central em recém-nascidos (STEIN *et al.*, 2014). Essas evidências sugerem que o PFOA pode interferir nos mecanismos de neurulação, porém tal problemática ainda não foi totalmente explorada no contexto humano.

FIGURA 4 – POSSÍVEIS EFEITOS NEUROTÓXICOS DO PFOA DURANTE O DESENVOLVIMENTO



Síntese da neurotoxicidade do PFOA durante o período pré-natal em humanos. FONTE: O Autor, usando recursos do BioRender® (2023).

1.1.4 Neurotoxicidade em modelos experimentais

A neurotoxicidade do PFOA tem sido extensivamente investigada em modelos experimentais, revelando diversos efeitos prejudiciais (ESPARTERO *et al.*, 2022). Esses efeitos abrangem a perturbação bioquímica do tecido nervoso, distúrbios comportamentais e cognitivos, bem como alterações durante o desenvolvimento embrionário (PIEKARSKI; DIAZ; MCNERNEY, 2020). A perturbação bioquímica ocorre devido à capacidade do PFOA de desregular a homeostase do cálcio (Ca), levando ao aumento da concentração desse íon no meio intracelular dos neurônios (LIU *et al.*, 2011). O excesso de Ca nessas células desencadeia mecanismos degenerativos, como apoptose, neuroinflamação e estresse oxidativo (IQUBAL *et al.*, 2020; SOUDERS II *et al.*, 2021). Além disso, pode alterar os níveis de neurotransmissores e de receptores essenciais, resultando em uma redução na plasticidade sináptica (JOHANSSON; ERIKSSON; VIBERG, 2009; FOGUTHI *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2021). Essas disfunções neuronais podem levar ao aparecimento de distúrbios cognitivos e doenças neurodegenerativas, observadas em modelos animais (WANG *et al.*, 2019; AGHAEI *et al.*, 2022). Em camundongos, o PFOA causou defeitos motores, comprometimento geral da locomoção e hiperatividade (JOHANSSON; FREDRIKSSON; ERIKSSON, 2008; ONISHCHENKO *et al.*, 2011). Também foi observada diminuição da memória de curto prazo e ocorrência de comportamentos relacionados à ansiedade, como aumento da frequência cardíaca, maior vigilância e redução da ingestão de alimentos (MERRILL *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2022). De maneira semelhante, essas disfunções também podem afetar o funcionamento do cérebro humano, conforme evidenciado pelos problemas cognitivos em populações expostas. No entanto, futuras investigações são necessárias para estabelecer uma relação conclusiva nesse contexto.

A neurotoxicidade do PFOA também foi observada durante o desenvolvimento embrionário de aves e ratos. Essas investigações mostraram que o PFOA e seus precursores interferem nos mecanismos de neurulação, resultando em malformações (MOUSSA *et al.*, 2011; KMECICK *et al.*, 2019). Essas alterações podem se manifestar como malformações congênitas em neonatos, incluindo cranioraquisquise, espinha bífida, encefalocele e até inviabilidade do organismo (AVAGLIANO *et al.*, 2019). No entanto, pouco é explorado sobre os impactos do PFOA nos mecanismos de neurulação. Dado o potencial neurotóxico desse composto (STEIN *et al.*, 2014;

KMECICK *et al.*, 2019; SKOGHEIM *et al.*, 2021) é crucial estudar sua interação com os processos de formação do sistema nervoso central para um melhor entendimento dos efeitos causados.

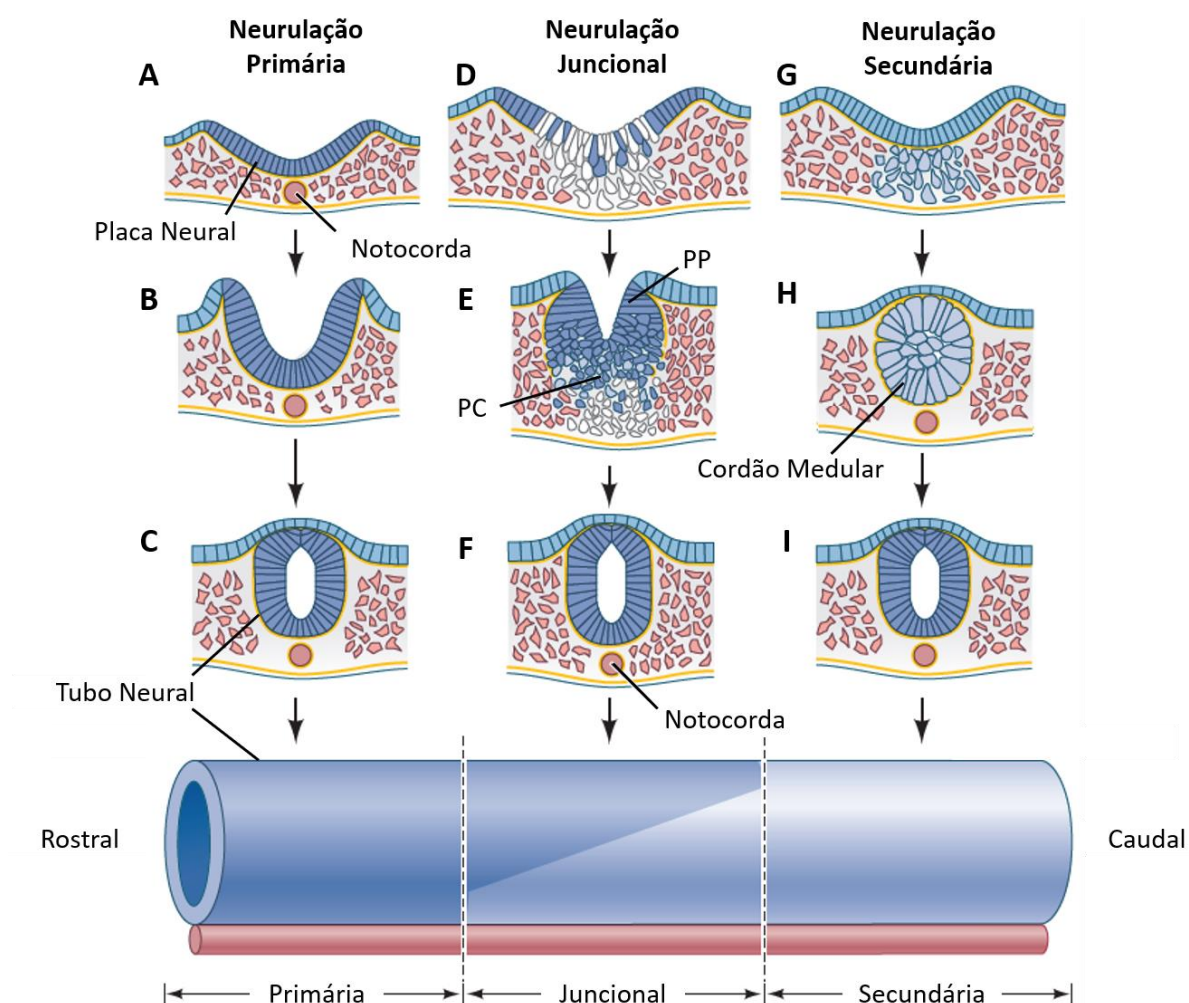
1.2 NEURULAÇÃO

Durante a embriogênese, a neurulação desempenha um papel crucial na formação do tubo neural (TN), que serve como precursor da medula espinhal e do encéfalo (COPP; GREENE; MURDOCH, 2003). Esse processo ocorre de forma ordenada e espacialmente dividida em neurulação primária (NP) e neurulação secundária (NS) (SCHOENWOLF; SMITH, 1990). A NP tem início na região céfalo-torácica, onde ocorre a diferenciação da ectoderme em uma estrutura chamada placa neural (PN) (Figura 5A), seguida pelo crescimento por extensão convergente (LOWERY; SIVE, 2004). Após o crescimento, as pregas neurais ascendem e tensionam os pontos de dobra da PN, causando uma torção tecidual (Figura 5B) (DE GOEDEREN *et al.*, 2022). Essa dobra causa a aproximação das pregas neurais opostas, que se fundem na linha medial dorsal do embrião, originando o TN anterior (Figura 5C) (COLAS; SCHOENWOLF, 2001). A NP é concluída simultaneamente ao início da NS, que ocorre na porção lombo-caudal (LOWERY; SIVE, 2004). Durante a NS, as células mesenquimais se agregam para formar um cordão medular (Figura 5G) (SCHOENWOLF; SMITH, 2000), que posteriormente sofre uma transição mesenquimal-epitelial (Figura 5H), gerando lúmens que se coalescem na luz do TN posterior (Figura 5I) (CATALA, 2021).

Sob a perspectiva clássica, a NP e NS são os mecanismos geradores do sistema nervoso central e periférico (SCHOENWOLF; SMITH, 1990). Entretanto, Dady e colaboradores (2014) descreveram um tipo de neurulação distinto que ocorre na região toracolombar de embriões de aves e humanos, conhecido como neurulação juncional (NJ). Esse processo resulta no TN juncional, estrutura que estabelece a comunicação entre a medula espinhal proveniente da NP e NS. A NJ é caracterizada por 4 etapas distintas: 1) diferenciação da placa neural; 2) dissociação tecidual; 3) reconfiguração neuroepitelial; e 4) fusão das pregas neurais. Inicialmente, a PN se diferencia em 2 populações: a periférica e a central. A população periférica é composta por células neuroepiteliais positivas para o marcador Sox-2, delimitadas por uma membrana basal, enquanto as centrais são Sox-2 negativas, não delimitadas por

membrana basal e apresentam uma perda gradual do comportamento epitelial (Figura 5D). Conforme as pregas neurais ascendem, as células da população central passam por uma transição para um estado mesenquimal e seguem dois destinos possíveis: algumas seguem o caminho da NS, atuando como uma reserva de células para esse mecanismo, e o restante entra na via da NJ (Figura 5E). As células que permanecem na NJ modificam sua expressão gênica por meio de sinais desconhecidos, estabelecem um caráter epitelial e reconfiguram o neuroepitélio em conjunto com a população periférica. Após a conclusão desses movimentos, as pregas neurais opostas se fundem, estabelecendo, assim, o TN juncional (Figura 5F) (DADY *et al.*, 2014).

FIGURA 5 – NEURULAÇÃO EM AMNIOTOS



Modelo esquemático da neurulação em grande parte dos amniotos. PP: população periférica. PC: população central. FONTE: adaptado de GILBERT (2016).

1.3 O EMBRIÃO DE *GALLUS GALLUS* COMO MODELO TERATOLÓGICO

O embrião de galinha (*Gallus gallus*) é amplamente utilizado nos estudos da área de biologia do desenvolvimento devido a diversas propriedades vantajosas (RIBATTI; ANNESE, 2023). Dentre elas está o baixo custo de aquisição e manutenção, o que viabiliza a obtenção de amostras robustas para experimentação (SCHOENWOLF, 1999). Além disso, o desenvolvimento embrionário da galinha é curto e detalhadamente descrito, fator que otimiza o planejamento de experimentos em estádios específicos (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; WACHHOLZ *et al.*, 2021). Outro aspecto relevante é o desenvolvimento externo ao organismo materno, o que evita o sacrifício adicional de animais e permite a avaliação dos efeitos de poluentes diretamente no embrião (HENSHEL; DEWITT; TROUTMAN, 2002). Essa característica está em consonância com os 3 R's de Russell-Burch (*replace, reduction e refinement*) (ASKE; WAUGH, 2017). Além disso, o modelo de embrião de galinha apresenta similaridades com mamíferos em relação aos mecanismos de neurulação, atributo necessário para a extrapolação dos efeitos observados (IRIE, 2017). Devido a essas propriedades, o uso do embrião de *Gallus gallus* na teratologia é altamente relevante e promissor para avanços científicos nessa área.

2 JUSTIFICATIVA

O PFOA é um poluente ambiental de alta relevância comercial. Apesar disso, esse composto é neurotóxico, persistente, capaz de transpor as barreiras hematoencefálica e placentária, além de induzir distúrbios cognitivos e alterar os processos de neurulação. A neurulação é uma etapa crítica do desenvolvimento, por arquitetar o sistema nervoso central. Danos durante esses processos podem ocorrer na forma de defeitos no tubo neural e causar doenças congênitas letais. Dentro da neurulação, o PFOA altera a formação do TN das regiões da NP e NS, evidenciado em embriões de aves. Entretanto, não se sabe seus efeitos na NJ, etapa de conexão entre o TN anterior e posterior. Frente a essa lacuna, e levando em consideração os riscos do PFOA à saúde e à neurulação, e a importância e vulnerabilidade desse processo para o desenvolvimento, se torna pertinente investigar os efeitos desse poluente nos mecanismos de constituição do sistema nervoso. As investigações foram realizadas em embriões de *Gallus gallus* no estágio HH11. Esse modelo foi escolhido por apresentar similaridade de desenvolvimento com mamíferos, permitindo certa extrapolação. Também possui fácil acessibilidade e permite observação dos efeitos dos poluentes diretamente sobre o embrião.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do PFOA, administrado em dose única *in ovo*, sobre a morfologia da neurulação juncional em embriões de *Gallus gallus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a morfologia do neuroepitélio em embriões de ave no estágio HH11 expostos ao PFOA;
- Analisar o impacto da exposição ao PFOA na integridade estrutural do tubo neural.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), sob o certificado de número 1098, processo 23075.192793/2017-62.

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Os ovos fertilizados foram recebidos de uma empresa especializada e separados no laboratório quanto à integridade da casca. Os ovos intactos foram higienizados com papel toalha umedecido em etanol 70%, pesados, observados no ovoscópio para a delimitação da câmara de ar e separados em 2 grupos experimentais (Tabela 1). Os ovos danificados foram descartados, visto que rupturas na casca podem comprometer a viabilidade do embrião para o experimento.

TABELA 1 – GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupo Experimental	Concentração
Controle	NaCl 0,9%
Exposto	PFOA 5 ng.ml ⁻¹

FONTE: O Autor (2023)

4.2 EXPOSIÇÃO E INCUBAÇÃO

Foram utilizados 20 ovos (10 controles + 10 expostos). A exposição foi realizada no fluxo laminar previamente esterilizado com luz UV. Dentro do fluxo, os ovos foram perfurados na região da câmara de ar utilizando uma agulha de calibre 1,00x30mm e, com uma micropipeta, o veículo (NaCl 0,9%) ou o contaminante foi injetado de acordo com o peso do ovo (Tabela 2). A câmara de ar foi selecionada como ponto de injeção devido à sua capacidade de facilitar a disseminação do poluente para o embrião (YAMAMOTO *et al.*, 2012). Após os procedimentos, a perfuração foi vedada com fita adesiva e os ovos incubados com a câmara de ar voltada para cima.

Os ovos foram mantidos na incubadora BOD (SL-224 SOLAB Científica, sem motor de viragem) à 38°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$), por um período de 40 a 45 horas, com controle

de umidade e ventilação. O tempo de incubação foi determinado com base nas descrições de Hamburger e Hamilton (1951) para a obtenção de embriões HH11 (Figura 6), que correspondem ao estágio que contempla a NJ (DADY *et al.*, 2014).

FIGURA 6 – EMBRIÃO DE GALINHA (*Gallus gallus*) NO ESTÁDIO HH11



Estádio de interesse do embrião de galinha (*Gallus gallus*). FONTE: O Autor (2023).

TABELA 2 – VOLUME DE INJEÇÃO

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

FONTE: KMECICK (2019)

4.3 COLETA DOS EMBRIÕES

A coleta foi realizada seguindo o método da janela de Korn e Cramer (2007), com modificações. Inicialmente, os ovos foram colocados na posição horizontal por 5

minutos, para que o embrião se reposicionasse na parte superior do ovo, facilitando sua visualização e manipulação. Em seguida, os ovos foram colocados em um suporte, e uma fita adesiva foi aplicada na parte superior da casca. Foram retirados 5ml de albumina enquanto os ovos ainda estavam na posição horizontal. Essa etapa é necessária para abaixar o nível do vitelo, impedindo, assim, sua ruptura durante a abertura do ovo. A seguir, utilizando uma tesoura cirúrgica, foi feita uma abertura de aproximadamente 6 cm² na área da casca coberta pela fita adesiva. A fita é utilizada nesse momento por aderir à casca e impedir que fragmentos caiam sobre o embrião, além de proporcionar estabilidade ao ovo durante o corte. Após a abertura, o embrião foi analisado quanto à sua viabilidade, seguindo critérios propostos por Kmecick e colaboradores (2023). Os embriões inviáveis apresentavam coloração esbranquiçada e ausência de batimentos cardíacos, enquanto os viáveis exibiam coloração rósea e batimentos cardíacos. Os embriões inviáveis foram descartados (3 embriões, 1 controle e 2 expostos) e os viáveis (6 controles + 6 expostos) recortados da membrana vitelínica com o uso de uma tesoura cirúrgica e colocados em placa de Petri contendo PBS 1x para o estadiamento.

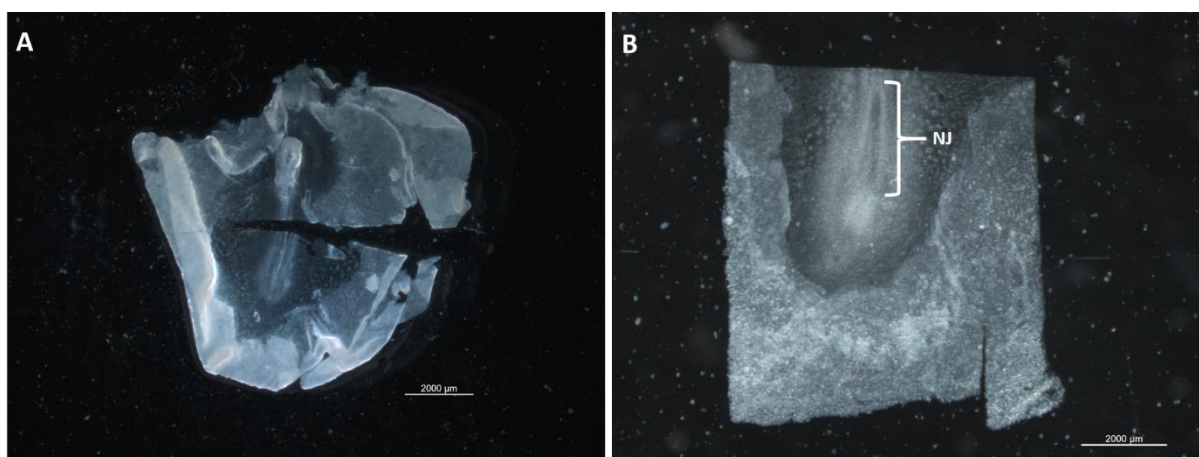
O estadiamento foi realizado em estereomicroscópio, levando em consideração as características morfológicas do embrião, conforme estabelecido por Hamburger e Hamilton (1951). Logo após, os embriões foram alocados cada um em um compartimento da placa de 24 poços, e então fixados em paraformaldeído 2% e armazenados na geladeira a 4°C. Os embriões que não atingiram o estágio requerido foram armazenados para futuras investigações, enquanto os embriões em estágio HH11 seguiram para o processamento histológico.

4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Foram obtidos 6 embriões controle e 6 expostos, porém devido a dificuldades no processamento histológico com a Historesina, somente 3 embriões controle e 3 expostos foram utilizados nas análises. Assim, 6 embriões (3 controles + 3 expostos) foram emblocados de acordo com Santander e colaboradores (1997) e Kmecick e colaboradores (2023). Inicialmente, os embriões fixados foram seccionados abaixo do décimo terceiro somito, utilizando um bisturi, e a região da NJ foi coletada (Figura 7). Esses embriões foram então lavados em solução salina tamponada (PBS) 1x por duas horas e desidratados em série crescente de etanol (30% por 5 minutos, 50 a 100%

por 10 minutos). A seguir, foi preparada uma solução de historesina utilizando o kit de Historesina Leica Biosystems®. Essa solução estoque foi preparada diluindo-se o pó ativador (peróxido de dibenzoila) em 50 ml de resina básica (hidroxietil metacrilato). A partir disso, uma porção do estoque foi adicionada ao etanol 100% na proporção de 1:1 para produzir a solução intermediária utilizada na pré-infiltração, que durou 2 horas. Em seguida, o estoque foi dividido em alíquotas para a infiltração, que ocorreu por pelo menos 12 horas. Após esse período, os embriões foram emblocados em moldes plásticos preenchidos com 600 µl da solução de emblocagem, composta pela solução estoque e endurecedor na proporção de 15:1. Os moldes foram colocados sobre uma placa de gelo e, com auxílio de um pincel, o material foi orientado. Por fim, os blocos foram polimerizados por 48 horas em um dessecador a vácuo com sílica gel e, em seguida, colocados na estufa a 37°C por 24 horas.

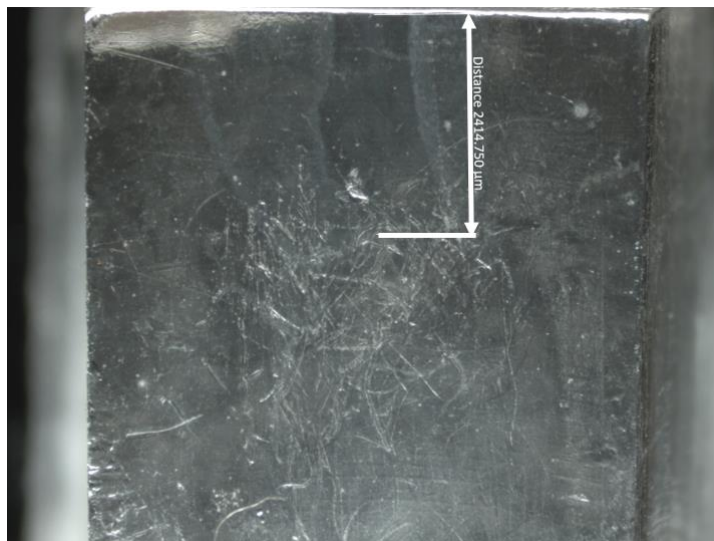
FIGURA 7 – REGIÃO DA NEURULAÇÃO JUNCIONAL



Corte e obtenção da região de interesse em embriões HH11. A: região de corte. B: zona da NJ. NJ: neurulação juncional. FONTE: O Autor (2023).

Após a polimerização, os blocos foram retirados do molde e observados quanto à orientação do material. Em seguida, foram mensurados utilizando o software Zen pro 2.6 (Zeiss®) no estereomicroscópio Discovery.V12 (Zeiss®), com câmera acoplada (Axiocam 503, Zeiss®) (Figura 8). Com base nessas medições e em testes anteriores, foram estabelecidos intervalos de 20 desbastes para cada embrião, abrangendo, assim, nas 5 lâminas em duplicata, o final da NP até o final da NJ. Para cada embrião, esse processo resultou em um total de 10 lâminas, com 12 cortes transversais de 5 µm em cada uma.

FIGURA 8 – OBSERVAÇÃO E MENSURAÇÃO DO EMBRIÃO



Embrião emblocado em historesina sendo mensurado no software Zen pro 2.6 (Zeiss®). FONTE: O Autor (2023).

Os cortes transversais foram obtidos utilizando o micrótomo semiautomático Leica ® RM 2145. Os blocos foram posicionados no suporte, seccionados com navalhas descartáveis e os cortes adicionados em gotas de água nas lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina (1%). Esse tratamento impede que os cortes desprendam da lâmina durante o processamento histológico. Em seguida, as lâminas foram secas em placa aquecida e armazenadas para posterior coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e ácido periódico de Schiff (PAS).

Metade dos cortes foram corados com H&E para análise morfológica qualitativa dos tecidos. Os materiais foram hidratados em água destilada (2 minutos), imersos em Hematoxilina de Harris (1 hora) e, em seguida, enxaguados em água corrente (10 minutos), seguido de imersões em água deionizada por 3 vezes. Posteriormente, os cortes foram imersos em eosina aquosa 1% (12 minutos), lavados em água destilada (6 imersões) e, após secagem, foram montados com Allkian (Allkimia) e lamínula. A outra metade dos cortes foi processada em PAS para evidenciar carboidratos e glicoconjugados presentes no tecido, com o intuito de quantificar de maneira semiquantitativa a integridade estrutural do tecido (LAYTON; BANCROFT, 2019). Para isso, os cortes foram previamente desplastificados em imersões consecutivas de metacrilato (2 horas), xilol-clorofórmio (1:1, 1 hora) e em xilol (30 minutos). Então,

foram hidratados em série alcóolica decrescente (100-95%, 10 minutos cada) e lavados em água destilada por 10 minutos. Após as etapas de preparação iniciais, os cortes foram imersos em ácido periódico (1%, 2 horas), lavados em água corrente (20 minutos), corados com o reativo de Schiff (2 horas) e enxaguados em água corrente (20 minutos) e água destilada (3 minutos). Finalmente, os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Harris (35 minutos) e lavados em água corrente (10 minutos). Uma vez secas, as lâminas foram montadas com Allkian (Allkimia) e lamínula.

4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS EMBRIÕES

Os cortes foram analisados em microscópio de luz quanto à morfologia tecidual e, posteriormente, fotografados para a avaliação qualitativa com H&E, teste qualitativo com *score* morfológico e teste semiquantitativo com a marcação PAS. A análise qualitativa foi realizada baseada em um *score* morfológico (S), referenciado por estudos anteriores (PSYCHOYOS *et al.*, 2008; TREUTING; BOYD, 2019). Foram atribuídos valores aos cortes considerando sua integridade, com base nos seguintes critérios: 1) estruturação da PN; 2) integridade do neuroepitélio; 3) integridade da notocorda; e 4) extravasamento celular. Quando alterações nesses parâmetros eram observadas, 1 S era adicionado ao embrião de forma cumulativa. Portanto, para cada embrião, o valor resultante de S poderia variar de 0, indicando ausência de alterações, até 4, indicando a presença de todos os padrões degenerados.

A análise semiquantitativa com PAS foi realizada de acordo com o protocolo produzido por Crowe e Yue (2019), utilizando o software Fiji. Os cortes foram submetidos à deconvolução de cor e a intensidade (em pixels) foi quantificada pelo software. Em seguida, os valores foram inseridos no Software GraphPad Prism 5, submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, então, analisados no teste t não pareado com pós-teste de Welch. Os grupos controle e exposto foram comparados para avaliar o efeito da exposição ao PFOA, considerando significativo quando $p < 0.05$.

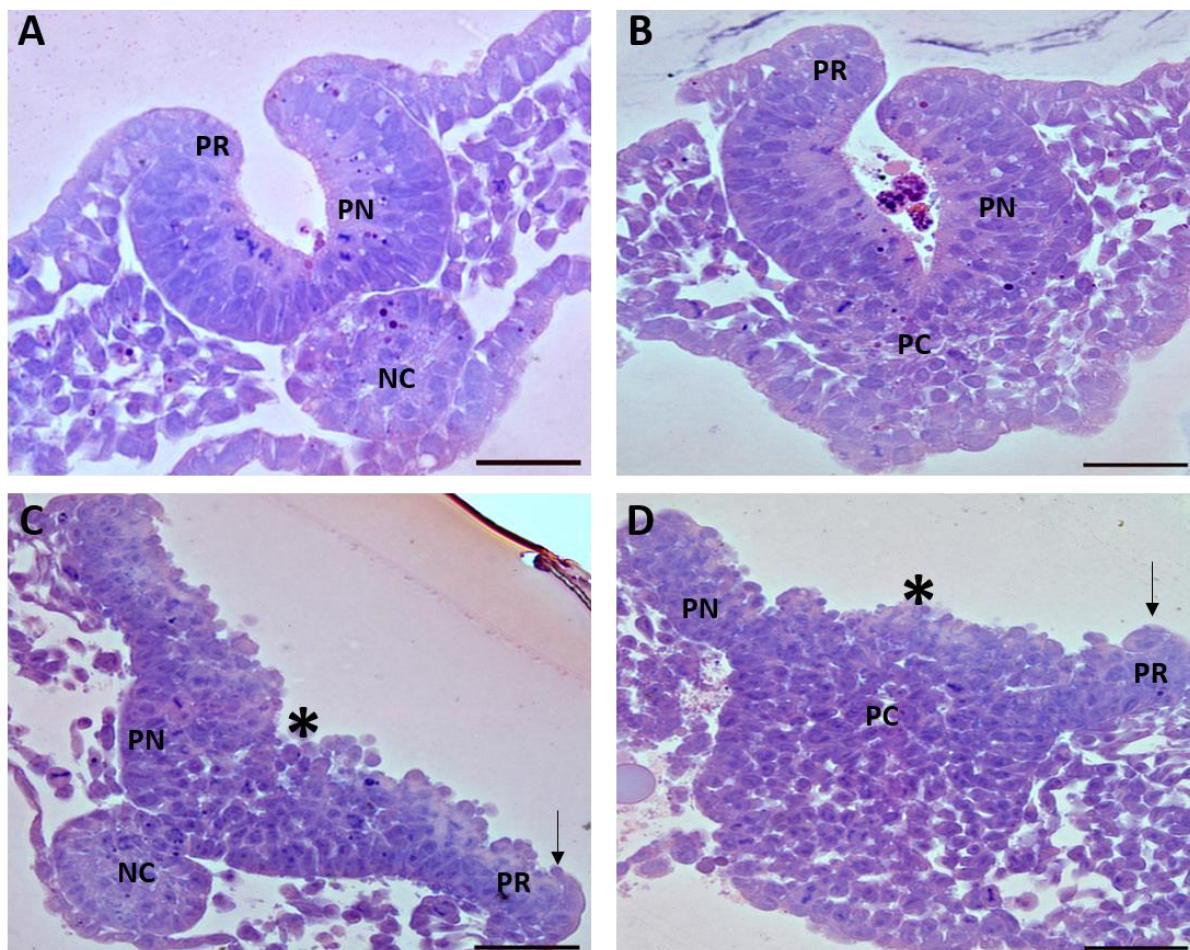
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DISTÚRBIOS ESTRUTURAIS

A análise qualitativa revelou alterações morfológicas nos embriões expostos, resultando em efeitos estruturais na placa neural (PN) no neuroepitélio. A PN se apresentou em forma retilínea, com pregas neurais pouco curvadas ou sem curvatura (Figura 9C e D). Essa estruturação diverge da morfogênese normal pois, no recorte temporal do estágio HH11, as pregas neurais devem ascender e a placa neural se dissociar em duas populações distintas, mantendo uma conformação de vale (DADY *et al.*, 2014), como foi observado nos embriões controle (Figura 9A e B). Esse posicionamento é essencial para que haja o pareamento das pregas neurais opostas, proporcionando a fusão e formação do TN juncional (VIJAYRAGHAVAN; DAVIDSON, 2017). Portanto, considerando a discrepância entre a estruturação observada e a descrita na literatura, pode-se propor que os embriões apresentaram malformações durante a NJ. As malformações na NJ configuram Defeitos do Tubo Neural Juncional (DTNJ), descritos até o momento somente em humanos (EIBACH; PANG, 2020). Os DTNJ ocorrem devido à falha no fechamento do TN juncional ou à interrupção da neurulação no nível toracolombar (PANG, 2020). Esses distúrbios provocam a desconexão funcional e espacial entre a NP e NS, que culmina em uma medula espinhal funcional seccionada em duas porções entre os níveis vertebrais $L_1 \times L_{3/4}$, $T_{12} \times L_1$, e $T_{11} \times L_4/S_1$ (EIBACH *et al.*, 2017). No espaço entre as porções das medulas, uma faixa de tecido não neural é sintetizada pelo organismo, embora sua origem e função ainda não tenham sido elucidadas (EIBACH; PANG, 2020). Essa condição não é letal, porém causa fraqueza muscular dos membros inferiores, incontinência urinária, hipestesia, deformidades, entre outros sintomas (EIBACH *et al.*, 2017; ALI; MCNEELY, 2018; FLOREA *et al.*, 2018). No contexto da toxicologia, as DTNJ ainda não foram relacionadas a nenhum xenobiótico, visto que sua origem é considerada uma consequência de mutações em componentes da via de polarização planar (PCP) (DADY *et al.*, 2014). Entretanto, defeitos semelhantes relacionados ao PFOA foram observados durante a NP e NS (KMECICK, 2022). Portanto, diante das alterações observadas no espaço da NJ, é possível propor que o PFOA também possa causar DTNJ. No entanto, investigações com modelos animais neonatos são necessárias para corroborar essa hipótese. No contexto do desenvolvimento do sistema nervoso

central, esse estudo também se alia aos dados de Kmecick e colaboradores (2019), levando à conclusão de que o PFOA é um poluente capaz de interferir em todas as etapas descritas da neurulação até o momento.

FIGURA 9 – DESESTRUTURAÇÃO DA PLACA NEURAL



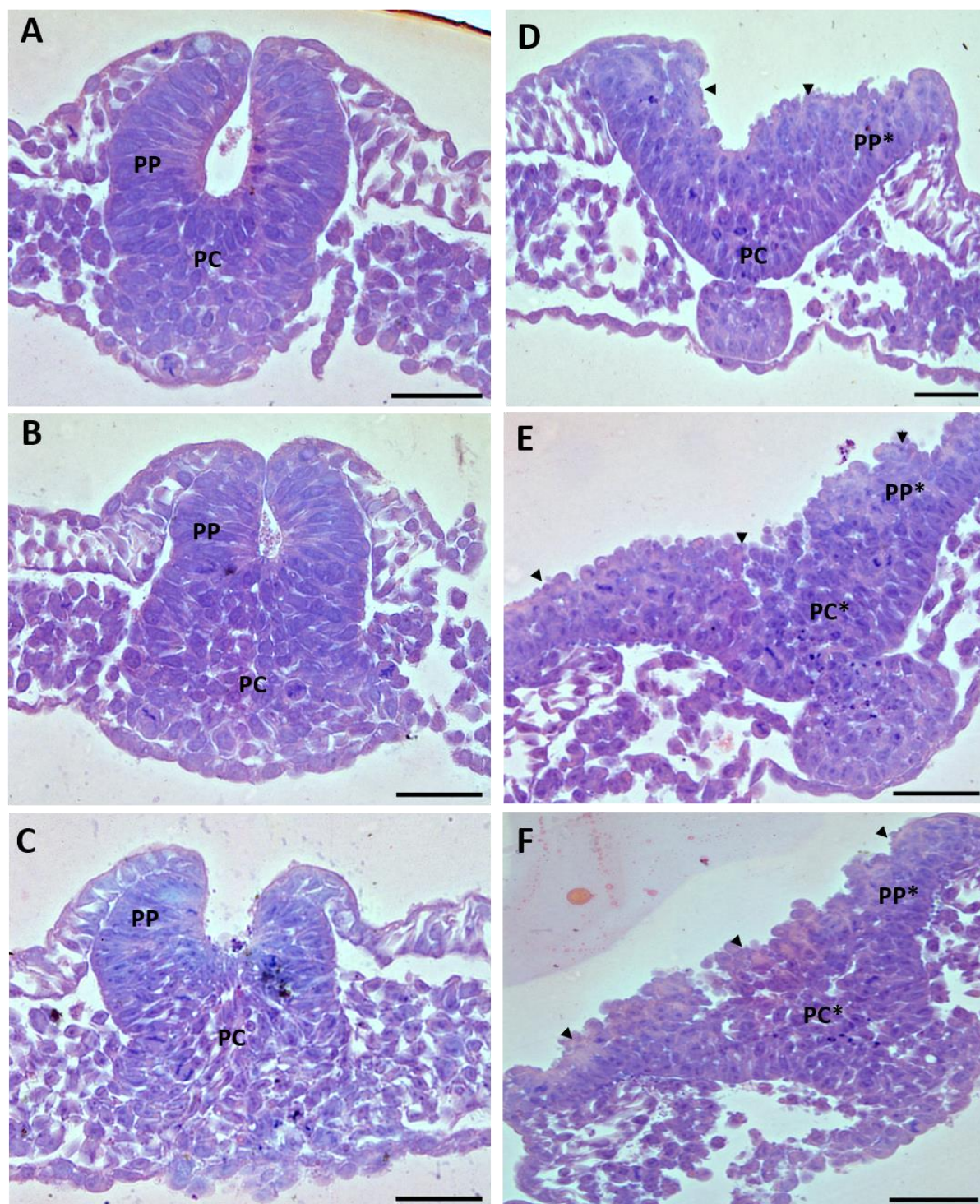
Distúrbio estrutural na PN durante a NJ. A e B: controle. C e D: expostos. A e C: início da diferenciação populacional central da PN; B e D: dissociação da população central e ascendência das pregas neurais. PN: placa neural. NC: notocorda. PR: prega neural. PC: população central mesenquimal. Asterisco: conformação retilínea da PN. Seta: pregas neurais horizontadas. Escala = 100µm. FONTE: O Autor (2023).

5.2 COMPORTAMENTO NEUROEPITELIAL ANÔMALO

Foi observada também invasão celular no sulco neural e falta de organização entre as populações periférica e intermediária em embriões expostos (Figura 10). A delimitação das populações na PN é necessária para garantir um reservatório de células mesenquimais que podem entrar em algumas vias na neurulação, para permitir a conexão entre a NP e NS e garantir o fechamento do TN juncional (DADY *et al.*, 2014; EIBACH *et al.*, 2017). Para que esses processos ocorram

adequadamente, componentes da via PCP são recrutados para mediar movimentos morfogenéticos, em especial a proteína Prickle-1 (pk-1), devido à sua expressão elevada e restrita durante a NJ (DADY *et al.*, 2014). Na extensão convergente de *Xenopus*, pk-1 regula a deposição de fibronectina, que é responsável por interligar as células aos componentes da matriz extracelular, promovendo modificações no citoesqueleto que resultam em movimentos e protrusões celulares (TAO *et al.*, 2009; DZOBO; DANDARA, 2023). Durante a transição epitelial-mesenquimal na migração de células da crista neural em *Zebrafish*, pk-1 influencia a troca de caderina e a dissociação das junções de oclusão, causando o desprendimento das células (AHSAN *et al.*, 2019). Considerando que movimentos semelhantes são empregados na NJ, é possível que a pk-1 esteja desempenhando funções semelhantes nesse processo, e alterações em sua expressão podem resultar em distúrbios na neurulação. Para verificar essa hipótese, Dady e colaboradores (2014) testaram os efeitos da supressão gênica (*knockdown*) de pk-1 durante a NJ e observaram a falha na segregação entre a população periférica e central da PN. Isso resultou na falta de deslocamento entre as células do neuroepitélio, evidenciada por uma massa celular desorganizadas no sulco neural. Essa descoberta está de acordo com estudos anteriores sobre mutações em pk-1, nos quais as células adquirem comportamento mesenquimal, mas não conseguem migrar por estarem presas ao epitélio originário (AMACK, 2021). No presente trabalho, os embriões expostos também apresentaram falta de organização e reconhecimento entre as populações, além de invasões no sulco neural. As células mesenquimais falharam em se condensar na população central e permaneceram aderidas ao neuroepitélio. Isso pode corroborar a interferência do PFOA na expressão ou atividade de pk-1, visto seu potencial genotóxico e a dominância desse gene nesse processo (YAO; ZHONG, 2005; DADY *et al.*, 2014; OJO; PENG; NG, 2022).

FIGURA 10 – DESORGANIZAÇÃO NEUROEPITELIAL

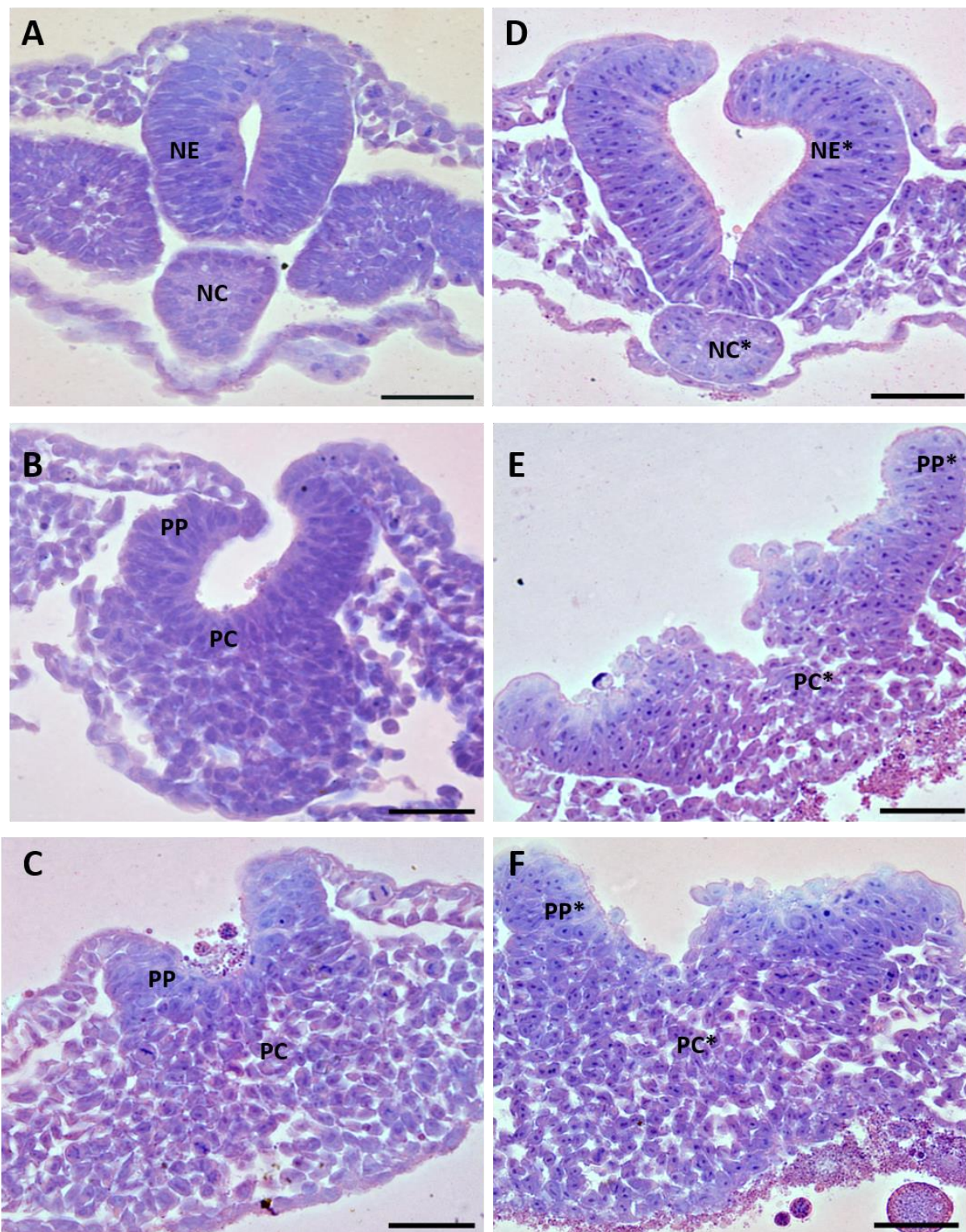


Falha na organização e dissociação da PC de seu neuroepitélio de origem durante as etapas de dissociação neuroepitelial e reconfiguração populacional. A – C: controle; D – F: expostos. PP: população periférica. PP*: população periférica afetada. PC: população central. PC*: população central afetada. Cabeça de seta: massa de células mesenquimais aderidas às populações de origem. Escala = 100µm. Fonte: O Autor (2023).

5.3 DEGENERAÇÃO TECIDUAL

Em associação com a desorganização do neuroepitélio, foi observada atividade apoptótica na extensão da PN e notocorda em embriões expostos. Isso foi verificado pela presença de fragmentos celulares se desprendendo da PN e adentrando o sulco neural, além da presença de células com cromatina circulada e bem condensada (Figura 11). O PFOA é um agente indutor de apoptose, evidenciado em tecido hepático humano e animal (LV *et al.*, WEN; MIRJI; IRUDAYARAJ, 2020). Também foi observado em células reprodutivas e neurais de camundongos, além da promover apoptose em várias linhagens celulares e em embriões de *Gallus gallus* (EGGERT *et al.*, 2019; ; KMECICK *et al.*, 2019; SOUDERS II *et al.*, 2021; FUJIWARA *et al.*, 2023). Além das evidências, modelos foram propostos buscando entender como esses eventos apoptóticos são induzidos (FUJIWARA *et al.*, 2023). A indução mediada pelo PFOA tem início com o aumento da expressão dos genes BAX, proteases e caspase-3 (HAN; PARK, 2023). A expressão anormal de BAX promove a formação de poros na mitocôndria, o que altera seu potencial de membrana e resulta na liberação de citocromo-c e aumento das espécies reativas de oxigênio (PEÑA-BLANCO; GARCÍA-SÁEZ, 2018). O citocromo c se liga ao complexo fator 1 de ativação da protease apoptótica, ativando a caspase-3, que orienta a destruição das estruturas celulares (FIORUCCI *et al.*, 2022). Outro modelo envolve a interação do PFOA com o retículo endoplasmático, onde ataques por radicais livres alteram a polaridade e composição de sua membrana, resultando em alteração funcional dessa organela (HE *et al.*, 2022). Dentre os defeitos, o retículo endoplasmático interrompe o processamento de proteínas e as acumula no lúmen, gerando um estresse que sinaliza o início das vias apoptóticas (YAN *et al.*, 2015). A correlação entre o PFOA e a apoptose está bem estabelecida na literatura, portanto, os achados desse trabalho estão alinhados com estudos anteriores em outros tipos celulares.

FIGURA 11 – APTOSE DURANTE A NEURULAÇÃO JUNCIONAL



Apoptose e degeneração da PN no decorrer da NJ. A – C: controle; D – F: expostos. NE: neuroepitélio. NE*: neuroepitélio em apoptose. NC: notocorda. NC*: notocorda em apoptose. PP: população periférica. PP*: população periférica em apoptose. PC: população central. PC*: população central em apoptose. Escala = 100μm. Fonte: O Autor (2023).

5.4 SCORE MORFOLÓGICO

Foi atribuído um valor aos embriões de acordo com as diferentes alterações observadas. As alterações foram predominantes no grupo exposto e abrangeram danos estruturais no neuroepitélio e notocorda (Tabela 3). Os danos estruturais envolvem a falha da curvatura da PN, evidenciada no grupo expostos (Figura 9). Dentre os elementos responsáveis pela dobra dessa estrutura estão os filamentos do citoesqueleto, em especial a actina (ABUWARDA; PATHAK, 2020). A partir da contração desse filamento na porção apical das células, o neuroepitélio contrai de forma organizada e a PN se dobra ao encontro das pregas neurais opostas, proporcionando a fusão e formação do TN (GALEA *et al.*, 2017). Visto que o PFOA pode interferir na polimerização dos filamentos de actina (SUN *et al.*, 2017), a conformação retilínea da PN observada (Figura 9 C e D) pode estar relacionada com essas alterações biomecânicas. A notocorda também desempenha papéis críticos durante a neurulação, fornecendo sinais de sobrevivência, proliferação e diferenciação (KAHANE; KALCHEIM, 2020). A degeneração dessa estrutura observada nos embriões expostos (Figura 11) pode ter levado à depleção de vários sinais essenciais para o prosseguimento da NJ. Os sinais, como os de polaridade celular e migração, podem ter desencadeado a invasão celular no sulco neural, a falta de transição epitelial mesenquimal da população central e dos pontos de dobra da PN, promovendo a interrupção desse processo.

TABELA 3 – AVALIAÇÃO DOS EMBRIÕES EXPOSTOS AO PFOA

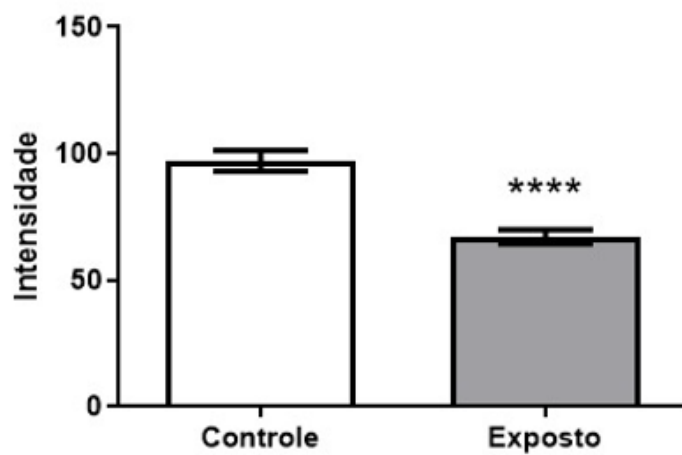
Alteração de Parâmetro	Embriões					
	C1	C2	C3	E1	E2	E3
Estruturação da PN					x	x
Integridade do neuroepitélio		x		x	x	x
Integridade da notocorda						x
Extravasamento celular					x	x
Score	0	1	0	1	3	4

FONTE: O Autor (2023)

5.5 ANÁLISE DE INTEGRIDADE TECIDUAL

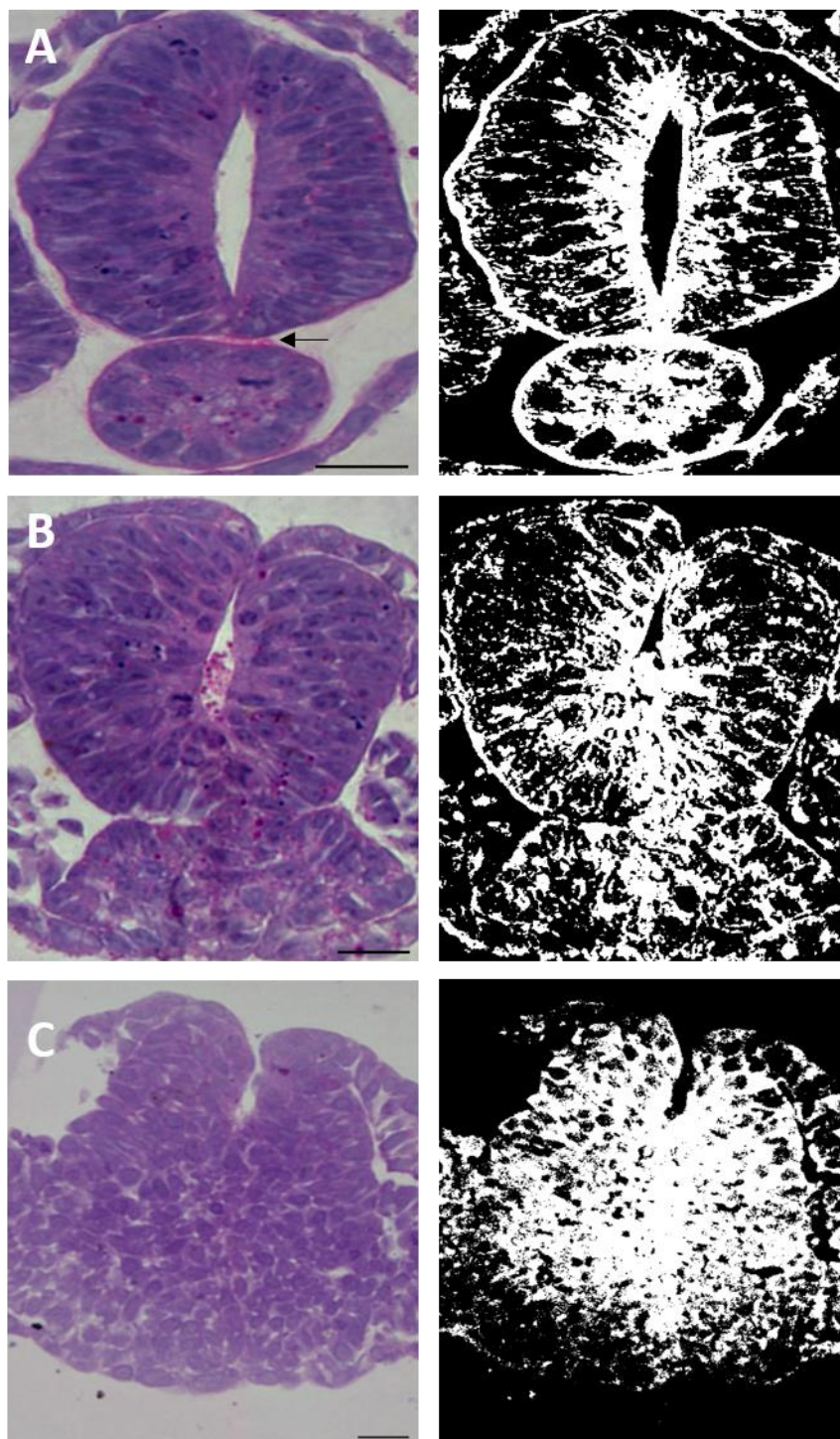
A técnica histoquímica com PAS delineou a notocorda, o neuroepitélio e suas células (Figura 12). A análise semiquantitativa dessa marcação mostrou que os embriões expostos apresentaram menor intensidade média de marcação em comparação ao grupo controle (Gráfico 1). A intensidade de marcação é determinada pela ligação de moléculas receptivas ao PAS, sendo elas componentes da membrana basal (LAYTON; BANCROFT, 2019). Uma vez que a membrana basal é uma matriz que garante a integridade e o suporte biomecânico ao tecido (SEKIGUCHI; YAMADA, 2018), os baixos valores registrados nos embriões expostos indicam uma instabilidade estrutural no neuroepitélio, corroborado pelas alterações morfológicas predominantes destacadas nesse grupo. Esse resultado também se alinha com estudos que investigaram os impactos do PFOA na membrana basal e seus componentes. Essas investigações mostraram que esse poluente induz a expressão da protease MMP-9, uma enzima responsável pela degradação do colágeno IV nativo (SAEJIA *et al.*, 2019). O colágeno IV é um componente fundamental presente em todos os filos animais e desempenha um papel crucial na estruturação da membrana basal (KHALILGHARIBI; MAO, 2021). Com a alteração desses elementos, os tecidos expostos tendem a apresentar disfunção da membrana basal, degradação do colágeno e comprometimento das junções celulares (PENG *et al.*, 2022; MANERA; CASCIANO; GIARI, 2023; YANG *et al.*, 2023). Portanto, considerando os danos causados, esse mecanismo poderia explicar a redução da integridade observada nos embriões expostos ao PFOA, embora essa abordagem ainda não tenha sido explorada no contexto da embriotoxicologia.

GRAFICO 1 – INTEGRIDADE TECIDUAL MÉDIA



Intensidade média de marcação do PAS. Asterisco indica as diferenças estatísticas em relação ao grupo controle: **** $p < 0,0001$. Teste t não pareado com pós teste de Welch. Total cortes analisados: 120. FONTE: O Autor (2023).

FIGURA 12 – MARCAÇÃO COM PAS DURANTE A NJ



Comportamento da marcação histoquímica com PAS no decorrer da NJ. A: início da NJ. B: primeiros movimentos de transição epitelial-mesenchimal. C: dissociação neuroepitelial. Seta: marcação com PAS vista sob microscopia de luz. Área branca: intensidade de marcação PAS quantificada pelo software Fiji. Escala = 50 μ m. FONTE: O Autor (2023).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho investigou os impactos do PFOA na morfologia e estrutura durante a neurulação juncional. Por meio de análise morfológica qualitativa, foram observadas malformações na PN, invasão celular, falha na transição epitelial e ocorrência de apoptose nos embriões expostos. Essas observações foram confirmadas pela análise semiquantitativa de integridade tecidual utilizando a marcação histoquímica PAS. Os dados dessa análise mostraram uma redução na estabilidade estrutural no grupo exposto quando comparado ao grupo controle. Foi possível observar essa diferença durante a investigação utilizando um *score* morfológico, que apresentou valores S mais altos em embriões expostos.

Portanto, levando em consideração os resultados discutidos e o que foi elucidado na literatura, o presente trabalho conclui que o PFOA é um agente neurotóxico capaz de induzir diversas disfunções em todas as etapas da neurulação descritas até o momento. Dado sua periculosidade, é necessário reavaliar o uso de produtos domésticos que contenham esse composto em sua composição.

REFERÊNCIAS

- ABUWARDA, H.; PATHAK, M. M. Mechanobiology of neural development. **Current opinion in Cell Biology**, v. 66, p. 104-111, 2020.
- AGHAEI, Z. et al. The impact of perfluoroalkyl substances on pregnancy, birth outcomes, and offspring development: a review of data from mouse models. **Biology of Reproduction**, v. 106, n. 3, p. 397-407, 2022.
- AHSAN, K. et al. Prickle1 is required for EMT and migration of zebrafish cranial neural crest. **Developmental Biology**, v. 448, n. 1, p. 16-35, 2019.
- ALDERETE, T. L. et al. Perfluoroalkyl substances, metabolomic profiling, and alterations in glucose homeostasis among overweight and obese Hispanic children: A proof-of-concept analysis. **Environment International**, v. 126, p. 445-453, 2019.
- ALI, M.; MCNEELY, P. D. Junctional neural tube defect: a supporting case report. **Child's Nervous System**, v. 34, n. 8, p. 1447-1448, 2018.
- AMACK, J. D. Cellular dynamics of EMT: lessons from live in vivo imaging of embryonic development. **Cell Communication and Signaling**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2021.
- ANDREWS, D. Q.; NAIDENKO, O. V. Population-wide exposure to per-and polyfluoroalkyl substances from drinking water in the United States. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 7, n. 12, p. 931-936, 2020.
- ARMITAGE, J. M. et al. Modeling the global fate and transport of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and precursor compounds in relation to temporal trends in wildlife exposure. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 24, p. 9274-9280, 2009.
- ASKE, K. C.; WAUGH, C. A. Expanding the 3R principles: more rigour and transparency in research using animals. **Embo Reports**, v. 18, n. 9, p. 1490-1492, 2017.
- AUDENAERT, F. et al. Fluorochemical textile repellents—synthesis and applications: A 3M perspective. **Journal of the Textile Institute**, v. 90, n. 3, p. 76-94, 1999.
- AVAGLIANO, L. et al. Overview on neural tube defects: From development to physical characteristics. **Birth Defects Research**, v. 111, n. 19, p. 1455-1467, 2019.
- BARTELL, S. M.; VIEIRA, V. M. Critical review on PFOA, kidney cancer, and testicular cancer. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 71, n. 6, p. 663-679, 2021.
- BENSKIN, J. P.; DE SILVA, A. O.; MARTIN, J. W. Isomer profiling of perfluorinated substances as a tool for source tracking: a review of early findings and future applications. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 208: Perfluorinated Alkylated Substances**, p. 111-160, 2010.
- BOCK, A. R.; LAIRD, B. E. PFAS Regulations: Past and Present and Their Impact on Fluoropolymers. In: AMEDURI, B. Perfluoroalkyl Substance. 1^oed. Londres: **Royal Society of Chemistry**, 2022. pp. 1-21.

BRANDSMA, S. H. et al. The PFOA substitute GenX detected in the environment near a fluoropolymer manufacturing plant in the Netherlands. **Chemosphere**, v. 220, p. 493-500, 2019.

BRENNAN, N. M. et al. Trends in the regulation of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS): a scoping review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 20, p. 10900, 2021.

BUCK, R. C. et al. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 4, p. 513-541, 2012.

BUCK, R. C.; MURPHY, P. M.; PABON, M. Chemistry, properties, and uses of commercial fluorinated surfactants. **Polyfluorinated Chemicals and Transformation Products**, p. 1-24, 2012.

CALVO-FLORES, F. G.; ISAC-GARCÍA, J.; DOBADO, J. A. Emerging pollutants: origin, structure, and properties. **John Wiley & Sons**, 2018.

CAO, Y.; NG, C. Absorption, distribution, and toxicity of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the brain: a review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 23, n. 11, p. 1623-1640, 2021.

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

COLAS, J-F.; SCHOENWOLF, G. C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. **Developmental Dynamics: an Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 221, n. 2, p. 117-145, 2001.

COPERCHINI, F. et al. Thyroid disruption by perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA). **Journal of endocrinological investigation**, v. 40, p. 105-121, 2017.

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

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

DADY, A. et al. Junctional neurulation: a unique developmental program shaping a discrete region of the spinal cord highly susceptible to neural tube defects. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 39, p. 13208-13221, 2014.

DARROW, L. A. et al. Modeled perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure and liver function in a mid-Ohio valley community. **Environmental Health Perspectives**, v. 124, n. 8, p. 1227-1233, 2016.

DE GOEDEREN, V. et al. Hinge point emergence in mammalian spinal neurulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 20, p. e2117075119, 2022.

DE SILVA, A. O. et al. PFAS exposure pathways for humans and wildlife: a synthesis of current knowledge and key gaps in understanding. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 3, p. 631-657, 2021.

DI NISIO, A. et al. Endocrine disruption of androgenic activity by perfluoroalkyl substances: clinical and experimental evidence. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 104, n. 4, p. 1259-1271, 2019.

DI NISIO, A. et al. Impairment of human dopaminergic neurons at different developmental stages by perfluoro-octanoic acid (PFOA) and differential human brain areas accumulation of perfluoroalkyl chemicals. **Environment International**, v. 158, p. 106982, 2022.

DZOBO, K.; DANDARA, C. The Extracellular Matrix: Its Composition, Function, Remodeling, and Role in Tumorigenesis. **Biomimetics**, v. 8, n. 2, p. 146, 2023.

EAST, A. et al. Computational estimates of daily aggregate exposure to PFOA/PFOS from 2011 to 2017 using a basic intake model. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v. 33, n. 1, p. 56-68, 2021.

EGGERT, A. et al. The effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) on fetal and adult rat testis. **Reproductive Toxicology**, v. 90, p. 68-76, 2019.

EIBACH, S. et al. Unjoined primary and secondary neural tubes: junctional neural tube defect, a new form of spinal dysraphism caused by disturbance of junctional neurulation. **Child's Nervous System**, v. 33, p. 1633-1647, 2017.

EIBACH, S.; PANG, D. Junctional neural tube defect. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 63, n. 3, p. 327-337, 2020.

ESPARTERO, L. J. L. et al. Health-related toxicity of emerging per-and polyfluoroalkyl substances: Comparison to legacy PFOS and PFOA. **Environmental Research**, v. 212, p. 113431, 2022.

FIORUCCI, L. et al. Cytochrome c Interaction with Cardiolipin Plays a Key Role in Cell Apoptosis: Implications for Human Diseases. **Symmetry**, v. 14, n. 4, p. 767, 2022.

FLOREA, S. M. et al. A case of junctional neural tube defect associated with a lipoma of the filum terminale: a new subtype of junctional neural tube defect?. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 21, n. 6, p. 601-605, 2018.

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

FUJIWARA, N. et al. Perfluorooctanoic acid-induced cell death via the dual roles of ROS-MAPK/ERK signaling in ameloblast-lineage cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 260, p. 115089, 2023.

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

GALLO, V. et al. Serum perfluoroalkyl acids concentrations and memory impairment in a large cross-sectional study. **BMJ open**, v. 3, n. 6, p. e002414, 2013.

GALLOWAY, J. E. et al. Evidence of air dispersion: HFPO–DA and PFOA in Ohio and West Virginia surface water and soil near a fluoropolymer production facility. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 12, p. 7175-7184, 2020.

GALLOWAY, T. S. et al. PFOA and PFOS are associated with reduced expression of the parathyroid hormone 2 receptor (PTH2R) gene in women. **Chemosphere**, v. 120, p. 555-562, 2015.

GARDINER, J. Fluoropolymers: origin, production, and industrial and commercial applications. **Australian Journal of Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 13-22, 2014.

GEBBINK, W. A.; VAN LEEUWEN, S. P. Environmental contamination and human exposure to PFASs near a fluorochemical production plant: Review of historic and current PFOA and GenX contamination in the Netherlands. **Environment international**, v. 137, p. 105583, 2020.

GHISI, R.; VAMERALI, T.; MANZETTI, S. Accumulation of perfluorinated alkyl substances (PFAS) in agricultural plants: A review. **Environmental Research**, v. 169, p. 326-341, 2019.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 11. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2016

GLÜGE, J. et al. An overview of the uses of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS). **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 22, n. 12, p. 2345-2373, 2020.

GRANDJEAN, P.; CLAPP, R. Perfluorinated alkyl substances: emerging insights into health risks. **New solutions: a Journal of Environmental and Occupational Health Policy**, v. 25, n. 2, p. 147-163, 2015.

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

HAN, J-W; PARK, H-J. Perfluorooctanoic acid induces cell death in TM3 cells via the ER stress-mitochondrial apoptosis pathway. **Reproductive Toxicology**, v. 118, p. 108383, 2023.

HE, X. et al. Perfluorooctanoic acid promotes pancreatic β cell dysfunction and apoptosis through ER stress and the ATF4/CHOP/TRIB3 pathway. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 56, p. 84532-84545, 2022.

HENSHEL, D. S.; DEWITT, J.; TROUTMAN, A. Using chicken embryos for teratology studies. **Current Protocols in Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 13.4. 1-13.4. 19, 2002.

HILL, C.; EASTOE, J. Foams: From nature to industry. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 247, p. 496-513, 2017.

INGELIDO, A. M. et al. Serum concentrations of perfluorinated alkyl substances in farmers living in areas affected by water contamination in the Veneto Region (Northern Italy). **Environment International**, v. 136, p. 105435, 2020.

IQUBAL, A. et al. Environmental neurotoxic pollutants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 41175-41198, 2020.

IRIE, N. Remaining questions related to the hourglass model in vertebrate evolution. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 45, p. 103-107, 2017.

JOHANSSON, N.; ERIKSSON, P.; VIBERG, H. Neonatal exposure to PFOS and PFOA in mice results in changes in proteins which are important for neuronal growth and synaptogenesis in the developing brain. **Toxicological Sciences**, v. 108, n. 2, p. 412-418, 2009.

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

KAHANE, N.; KALCHEIM, C. Neural tube development depends on notochord-derived sonic hedgehog released into the sclerotome. **Development**, v. 147, n. 10, p. dev183996, 2020.

KHALILGHARIBI, N.; MAO, Y. To form and function: on the role of basement membrane mechanics in tissue development, homeostasis and disease. **Open Biology**, v. 11, n. 2, p. 200360, 2021.

KIM, J. I. et al. Association between early-childhood exposure to perfluoroalkyl substances and ADHD symptoms: A prospective cohort study. **Science of The Total Environment**, v. 879, p. 163081, 2023.

KISSA, E. (Ed.). **Fluorinated Surfactants and Repellents**. CRC Press, 2001.

KMECICK, M. **Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico no desenvolvimento do sistema nervoso de embriões de ave *Gallus gallus***. Curitiba: UFPR, 2019. Relatório técnico.

KMECICK, M. et al. Critical Evaluation of Embedding Media for Histological Studies of Early Stages of Chick Embryo Development. **Methods and Protocols**, v. 6, n. 2, p. 38, 2023.

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

KORN, M. J.; CRAMER, K. S. Windowing chicken eggs for developmental studies. **JOVE**, n. 8, p. e306, 2007.

KUNACHEVA, C. et al. Worldwide surveys of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in water environment in recent years. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 12, p. 2764-2771, 2012.

LAKIND, J. S. et al. Per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in breast milk and infant formula: A global issue. **Environmental Research**, p. 115042, 2022.

LIN, Y. et al. Perfluoroalkyl substances in sediments from the Bering Sea to the western Arctic: Source and pathway analysis. **Environment International**, v. 139, p. 105699, 2020.

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

LIU, D. et al. Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure in relation to the kidneys: A review of current available literature. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1103141, 2023.

LIU, X. et al. Possible mechanism of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate on the release of calcium ion from calcium stores in primary cultures of rat hippocampal neurons. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1294-1301, 2011.

LOUIS, G. M. et al. Perfluorochemicals and human semen quality: the LIFE study. **Environmental Health Perspectives**, v. 123, n. 1, p. 57-63, 2015.

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

LUO, J. et al. Prenatal exposure to perfluoroalkyl substances and behavioral difficulties in childhood at 7 and 11 years. **Environmental Research**, v. 191, p. 110111, 2020.

LV, D. et al. Perfluorooctanoic acid exposure induces apoptosis in SMMC-7721 hepatocellular cancer cells. **Environmental Pollution**, v. 247, p. 509-514, 2019.

MANERA, M.; CASCIANO, F.; GIARI, L. Ultrastructural Alterations of the Glomerular Filtration Barrier in Fish Experimentally Exposed to Perfluorooctanoic Acid. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 7, p. 5253, 2023.

MERRILL, A. K. et al. Effects of gestational low dose perfluorooctanoic acid on maternal and "anxiety-like" behavior in dams. **Frontiers in Toxicology**, v. 4, p. 1-10, 2022.

MIDASCH, O. et al. Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 80, p. 643-648, 2007.

MITRO, S. D. et al. Per-and polyfluoroalkyl substance plasma concentrations and metabolomic markers of type 2 diabetes in the Diabetes Prevention Program trial. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 232, p. 113680, 2021.

MOUSSA, M. A. et al. Teratogenic and genotoxic effects of perfluoroalkyl acids on embryonic and neonate mice. In: Animal hygiene and sustainable livestock production. Proceedings of the XVth International Congress of the International Society for Animal Hygiene. **Tribun EU**: Brno. v.3, p. 1163-1166, 2011.

MUIR, D. et al. Levels and trends of poly-and perfluoroalkyl substances in the Arctic environment—An update. **Emerging Contaminants**, v. 5, p. 240-271, 2019.

NASCIMENTO, R. A. et al. Sulfluramid use in Brazilian agriculture: A source of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) to the environment. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 1436-1443, 2018.

OH, J. et al. Prenatal exposure to per- and polyfluoroalkyl substances and cognitive development in infancy and toddlerhood. **Environmental research**, v. 196, p. 110939, 2021.

O'HAGAN, D. Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C–F bond. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 2, p. 308-319, 2008.

OJO, A. F.; PENG, C.; NG, J. C. Genotoxicity assessment of per- and polyfluoroalkyl substances mixtures in human liver cells (HepG2). **Toxicology**, v. 482, p. 153359, 2022.

ONISHCHENKO, N. et al. Prenatal exposure to PFOS or PFOA alters motor function in mice in a sex-related manner. **Neurotoxicity Research**, v. 19, p. 452-461, 2011.

PANG, D. Perspectives on Spinal Dysraphism: Past, Present and Future. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 63, n. 3, p. 266-372, 2020.

PANIERI, E. et al. PFAS molecules: a major concern for the human health and the environment. **Toxics**, v. 10, n. 2, p. 44, 2022.

PEÑA-BLANCO, A.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Bax, Bak and beyond—mitochondrial performance in apoptosis. **The FEBS journal**, v. 285, n. 3, p. 416-431, 2018.

PENG, B-X. et al. Perfluorooctanoic acid alternatives hexafluoropropylene oxides exert male reproductive toxicity by disrupting blood-testis barrier. **Science of The Total Environment**, v. 846, p. 157313, 2022.

PÉREZ, F. et al. Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. **Environment international**, v. 59, p. 354-362, 2013.

PIEKARSKI, D. J.; DIAZ, K. R.; MCNERNEY, M. W. Perfluoroalkyl chemicals in neurological health and disease: human concerns and animal models. **Neurotoxicology**, v. 77, p. 155-168, 2020.

PREVEDOUROS, K. et al. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 1, p. 32-44, 2006.

PSYCHOYOS, D. et al. A cannabinoid analogue of Δ^9 -tetrahydrocannabinol disrupts neural development in chick. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 83, n. 5, p. 477-488, 2008.

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

RICHTEROVÁ, D. et al. PFAS levels and determinants of variability in exposure in European teenagers—Results from the HBM4EU aligned studies (2014–2021). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 247, p. 114057, 2023.

SAEJIA, P. et al. Perfluorooctanoic acid enhances invasion of follicular thyroid carcinoma cells through NF- κ B and Matrix Metalloproteinase-2 activation. **Anticancer Research**, v. 39, n. 5, p. 2429-2435, 2019.

SANTANDER, R. G. et al. The use of different fixatives and hydrophilic embedding media (Historesin™ and Unicryl™) for the study of embryonic tissues. **Microscopy Research and Technique**, v. 36, n. 3, p. 151-158, 1997.

SATBHAI, K.; VOGS, C.; CRAGO, J. Comparative toxicokinetics and toxicity of PFOA and its replacement GenX in the early stages of zebrafish. **Chemosphere**, v. 308, p. 136131, 2022.

SCHMIERMUND, T. **The Chemistry Knowledge for Firefighters**. Springer Nature, 2022.

SCHOENWOLF, G. C. The avian embryo: A model for descriptive and experimental embryology. In: Cell lineage and fate determination. **Academic Press**, 1999. v. 48, p. 429-436.

SCHOENWOLF, G. C.; SMITH, J. L. Mechanisms of neurulation. **Developmental Biology Protocols: Volume II**, p. 125-134, 2000.

SCHOENWOLF, G. C.; SMITH, J. L. Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. **Development**, v. 109, n. 2, p. 243-270, 1990.

SCHULTZ, M. M.; BAROFSKY, D. F.; FIELD, J. A. Fluorinated alkyl surfactants. **Environmental Engineering Science**, v. 20, n. 5, p. 487-501, 2003.

SCIANCELEPORE, G. et al. Evaluation of per- and poly-fluorinated alkyl substances (PFAS) in livers of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) found stranded along the northern Adriatic Sea. **Environmental Pollution**, v. 291, p. 118186, 2021.

SCINICARIELLO, F. et al. Perfluoroalkyl acids, hyperuricemia and gout in adults: Analyses of NHANES 2009–2014. **Chemosphere**, v. 259, p. 127446, 2020.

SEKIGUCHI, R; YAMADA, K. M. Basement membranes in development and disease. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 130, p. 143-191, 2018.

SIEGEMUND, G. et al. Fluorine compounds, organic. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, v. 11, p. 361, 2016.

SKOGHEIM, T. S. et al. Prenatal exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and associations with attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder in children. **Environmental Research**, v. 202, p. 111692, 2021.

SOUDERS II, C. L. et al. Metabolic profiling in human SH-SY5Y neuronal cells exposed to perfluorooctanoic acid (PFOA). **Neurotoxicology**, v. 85, p. 160-172, 2021.

STEENLAND, K. et al. Evolution of evidence on PFOA and health following the assessments of the C8 Science Panel. **Environment International**, v. 145, p. 106125, 2020.

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

SUN, S. et al. Transcriptome analysis of 3D primary mouse liver spheroids shows that long-term exposure to hexafluoropropylene oxide trimer acid disrupts hepatic bile acid metabolism. **Science of The Total Environment**, v. 812, p. 151509, 2022.

SUNDERLAND, E. M. et al. A review of the pathways of human exposure to poly-and perfluoroalkyl substances (PFASs) and present understanding of health effects. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v. 29, n. 2, p. 131-147, 2019.

SZNAJDER-KATARZYŃSKA, K. et al. A review of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in terms of sources, applications, human exposure, dietary intake, toxicity, legal regulation, and methods of determination. **Journal of Chemistry**, v. 2019, 2019.

TAO, H. et al. Mouse prick1, the homolog of a PCP gene, is essential for epiblast apical-basal polarity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 34, p. 14426-14431, 2009.

TORRES, F. B. M. et al. Brazilian overview of per-and polyfluoroalkyl substances listed as persistent organic pollutants in the stockholm convention. **Chemosphere**, v. 291, p. 132674, 2022.

TOSKOS, T.; PANAGIOTAKIS, I.; DERMATAS, D. Per-and polyfluoroalkyl substances—Challenges associated with a family of ubiquitous emergent contaminants. **Waste Management & Research**, v. 37, n. 5, p. 449-451, 2019.

TREUTING, P. M.; BOYD, K. L. Histopathological scoring. **Veterinary Pathology**, v. 56, n. 1, p. 17-18, 2019.

VAALGAMAA, S. et al. Photochemical reactivity of perfluorooctanoic acid (PFOA) in conditions representing surface water. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 16, p. 3043-3048, 2011.

VAN LAREBEKE, N. et al. Per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and neurobehavioral function and cognition in adolescents (2010–2011) and elderly people (2014): results from the Flanders Environment and Health Studies (FLEHS). **Environmental Sciences Europe**, v. 34, n. 1, p. 98, 2022.

VIJAYRAGHAVAN, D. S.; DAVIDSON, L. A. Mechanics of neurulation: From classical to current perspectives on the physical mechanics that shape, fold, and form the neural tube. **Birth defects research**, v. 109, n. 2, p. 153-168, 2017.

WACHHOLZ, G. E. et al. From the farm to the lab: how chicken embryos contribute to the field of teratology. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 666726, 2021.

WANG, Y. et al. Exposure of male mice to perfluorooctanoic acid induces anxiety-like behaviors by increasing corticotropin-releasing factor in the basolateral amygdala complex. **Chemosphere**, v. 287, p. 132170, 2022.

WANG, Y. et al. Neurotoxic effects of perfluoroalkyl acids: Neurobehavioral deficit and its molecular mechanism. **Toxicology Letters**, v. 305, p. 65-72, 2019.

WANG, Z. et al. Fluorinated alternatives to long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs), perfluoroalkane sulfonic acids (PFSA) and their potential precursors. **Environment international**, v. 60, p. 242-248, 2013.

WANIA, F. A global mass balance analysis of the source of perfluorocarboxylic acids in the Arctic Ocean. **Environmental science & technology**, v. 41, n. 13, p. 4529-4535, 2007.

WEN, Yi; MIRJI, N.; IRUDAYARAJ, J. Epigenetic toxicity of PFOA and GenX in HepG2 cells and their role in lipid metabolism. **Toxicology in Vitro**, v. 65, p. 104797, 2020.

WENG, X. et al. Mixed effects of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances exposure on cognitive function among people over 60 years old from NHANES. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-12, 2022.

XIAO, F. et al. Thermal stability and decomposition of perfluoroalkyl substances on spent granular activated carbon. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 7, n. 5, p. 343-350, 2020.

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

YAN, S. et al. Perfluorooctanoic acid exposure induces endoplasmic reticulum stress in the liver and its effects are ameliorated by 4-phenylbutyrate. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 87, p. 300-311, 2015.

YANG, Y. et al. Perfluorooctanoic acid induces tight junction injury of Sertoli cells by blocking autophagic flux. **Food and Chemical Toxicology**, v. 173, p. 113649, 2023.

YAO, X.; ZHONG, L. Genotoxic risk and oxidative DNA damage in HepG2 cells exposed to perfluorooctanoic acid. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 587, n. 1-2, p. 38-44, 2005.

YU, T. et al. Behavioral effects of early-life exposure to perfluorooctanoic acid might synthetically link to multiple aspects of dopaminergic neuron development and dopamine functions in zebrafish larvae. **Aquatic Toxicology**, v. 238, p. 105926, 2021.