



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO ANIMAL

Paulo Goulart

**Alterações teciduais, celulares e histoquímicas provocadas pela exposição ao
metilmercúrio durante o desenvolvimento do fígado e do pulmão**

Florianópolis

2024

Paulo Goulart

Alterações teciduais, celulares e histoquímicas provocadas pela exposição ao metilmercúrio durante o desenvolvimento do fígado e do pulmão

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Evelise Maria Nazari, Dr^a.

Coorientadora: Nathália Ronconi Zilli Krüger, Dr^a.

Florianópolis

2024

Ficha Catalográfica

Goulart, Paulo

Alterações teciduais, celulares e histoquímicas provocadas pela exposição ao metilmercúrio durante o desenvolvimento do fígado e do pulmão / Paulo Goulart ; orientadora, Evelise Nazari, coorientadora, Nathália Ronconi-Krüger, 2024.

66 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

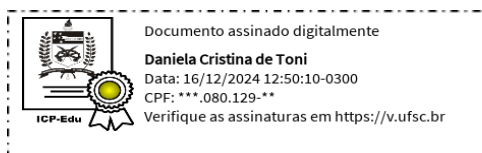
1. Ciências Biológicas. 2. MeHg. 3. Desenvolvimento do fígado. 4. Desenvolvimento do pulmão. 5. Morfometria. I. Nazari, Evelise. II. Ronconi-Krüger, Nathália. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Paulo Goulart

Alterações teciduais, celulares e histoquímicas provocadas pela exposição ao metilmercúrio durante o desenvolvimento do fígado e do pulmão

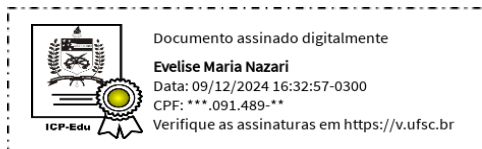
Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado aprovado para obtenção do título de “Licenciado em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 18 de outubro de 2024.

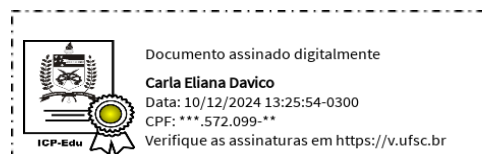


Prof^ª. Daniela Cristina de Toni, Dr^ª.
Coordenadora do Curso

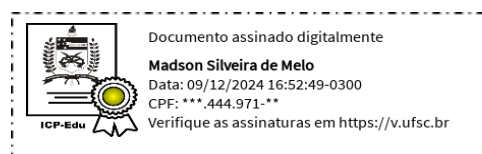
Banca examinadora



Prof^ª. Evelise Maria Nazari, Dr^ª.
Orientadora



Carla Eliana Davico, Dr^ª.



Madson Silveira de Melo, Dr.

Florianópolis, 2024

*Este trabalho é dedicado à mulher que sempre me apoiou
em toda minha vida. Mãe este trabalho é para você.*

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de ter um ensino gratuito e de qualidade, no qual em todos esses seis anos de graduação me proporcionaram viagens de campo, aulas práticas de laboratório, amizades de curso, atividades com a comunidade interagindo com todas as idades e experiência como docente. Não poderia deixar de agradecer também à Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis (PRAE), pela Bolsa Estudantil concedida como incentivo de permanência na universidade. E também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante meu período de iniciação científica.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pela estrutura e carinho dos técnicos em horas de análises. A Fazenda Experimental da Ressacada, do Centro de Ciências Agrárias da UFSC, pelo fornecimento dos ovos fertilizados utilizados nesta pesquisa. E em especial ao Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA), por esses dois anos de lab, pelas amizades feitas, as risadas, o acolhimento, cachaças e cafés.

Agradeço em especial à minha orientadora e mãe científica, responsável pelo LRDA, a Prof^a. Dr^a. Evelise Maria Nazari, que me abriu as portas e me deu oportunidade de ingressar no grupo desde a Vivência em Pesquisa, passando pelo Projeto de TCC, TCC I e TCC II, juntamente com minha graduação. Pelas conversas, os sermões, a paciência em entender minhas dificuldades, já que parte da minha graduação se deu no sistema online em decorrência da pandemia, a discutir e interpretar os resultados de maneira prazerosa e que me fez crescer como pesquisador e cientista. Muito obrigado Eve.

Agradeço em especial também à minha co-orientadora e mãe científica também, a Dr^a Nathália Ronconi Zilli Krüger, que me abraçou no laboratório e me incentivou a continuar no laboratório após a vivência. Pelas brincadeiras, surtos, choros, gritos e a saudade que já estou desde sua defesa de doutorado. Obrigado Nat, por ser mais que co-orientadora e colega de bancada, discussão de dados e resultados, mas também uma amiga/irmã que me ajudou passar por situações de tensão nesse período. Seu carinho, acolhimento e palavras foram fundamentais para eu não me sentir mal com os problemas cotidianos.

Aos integrantes do LRDA, em especial, Nerveson, Maria Fernanda, Madson, Michelle, Gustavo, Aline, Daphine, Giuliam e Maico no qual tive mais contato e intimidade nesse período e pude conhecer melhor as pessoas maravilhosas que são. Muito obrigado pelo

carinho, amizade, brincadeiras... e prometo que um dia eu venho de rosa com vocês na quarta-feira.

Aos meus amigos de graduação que me aturam até os dias de hoje, Giovana, Jota, Joe, Luly, Lulu, Maria Fernanda, Sarah, Vanessa e Vincenzo, que proporcionaram momentos incríveis na graduação como nossas risadas, conversas, amigos secretos, piqueniques, praias, jogos do Brasil na copa. Além da Thais, uma irmã gêmea que a vida me apresentou e esteve todos esses anos de graduação comigo, nas saídas de campo, nas aulas em todos os períodos, na regência da docência e muitos outros roles aleatórios que a vida nos proporcionou. A todos eles, desejo que sejam ótimos biólogos.

Aos meus amigos do fundamental, Taynara, Luana e Taís, aos do médio, Paula, Josy, Fran, Carlos; e aos meus amigos da vida, William e Sollano que me conhecem como ninguém e não me aguentam mais quando começo a falar de biologia. Espero ter vocês ao meu lado para o resto da vida e poder rir, beber, fofocar, chorar e dançar com vocês sempre.

À minha família, vó Marlene e vó Tudy, meu tio Paulo e minha tia Adriana, minha tia Camlia e minha prima Larissa. Em especial a minha madrinha Sabrina que sempre me apoiou, incentivou, me defendeu e nunca deixou que me faltasse algo para minha formação acadêmica. Aos meus sogros que me importunam diariamente e ao meu namorado Matheus que teve paciência em todas as vezes que eu precisei dizer *“agora não, vamos ver RuPaul: Drag Race mais tarde”* para ter que me dedicar a escrita deste trabalho.

E por fim, ao meu irmão e minha mãe, pela amizade, companheirismo, loucuras, brigas, choros, histórias que me fazem ser quem eu sou. Sem a luta, a garra e coragem da minha mãe todos esses anos para dar o melhor possível para meu irmão e eu, esse trabalho não teria saído. Mãe, te amo.

RESUMO

O metilmercúrio (MeHg) é um metal bioacumulativo e é a forma mais tóxica do mercúrio orgânico. A contaminação por MeHg é um problema global que ameaça a integridade dos ambientes naturais e a saúde dos organismos que neles vivem. A principal fonte de contaminação desse metal em humanos se dá pela ingestão de peixes contaminados. Estudos mostram que a toxicidade desse metal no sistema cardiovascular é responsável por danos celulares e teciduais em adultos e embriões. Nos organismos contaminados, o MeHg tende a ser amplamente distribuído pela circulação sanguínea para vários órgãos do corpo. Dessa forma, órgãos vascularizados, como o fígado e o pulmão são impactados, entretanto a toxicidade do MeHg nesses órgãos é pouco compreendida. Assim, neste estudo foram avaliados os efeitos do MeHg no tecido hepático e pulmonar, visando as células e estruturas de origem endodérmica (hepatócitos, células epiteliais pulmonares e brônquios) e mesodérmicas (vasos sanguíneos), durante o desenvolvimento. Para tal, embriões de *Gallus domesticus* foram utilizados como modelo animal de estudo, sendo divididos em dois grupos, (i) expostos a 0,1 µg MeHg/50 µL de solução salina e (ii) exposto exclusivamente a 50 µL de solução salina. A exposição de ambos os grupos ocorreu em E1,5 (1,5 dias embrionário), que corresponde ao período inicial de formação do fígado e do pulmão, e analisados em E10, quando o fígado já apresenta lóbulos e cordões hepáticos e os pulmões apresentam brônquios. Os embriões foram submetidos à histologia de rotina, análises morfológicas e morfométricas, imuno-histoquímicas e histoquímicas. Foi observado que o MeHg causou impacto negativo nas células de origem endodérmica do fígado, evidenciado pelo aumento do tamanho celular dos hepatócitos, acúmulo de gordura nos hepatócitos e desregulação da proliferação desse tipo celular. Além disso, foi observado nas células de origem endodérmica do pulmão, o espessamento das células epiteliais colunares e diminuição do tamanho celular das células epiteliais cúbicas, além da desregulação da proliferação de células epiteliais colunares. O MeHg também impactou as células de origem mesodérmica do fígado e do pulmão, observado pela diminuição do tamanho das células endoteliais hepáticas, aumento do tamanho das células endoteliais pulmonares, alteração no diâmetro dos vasos sanguíneos e desregulação de marcadores celulares envolvidos na formação e integridade vascular. Além disso, foi observado mudança no conteúdo de proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos no tecido hepático e pulmonar. Em conjunto, os resultados demonstram esteatose no tecido hepático e alterações na organização bronquial. Essas evidências expõem os efeitos tóxicos do MeHg em órgãos essenciais para a sobrevivência dos indivíduos, o que reforça a relevância dos estudos sobre a toxicidade deste metal.

Palavras-chave: MeHg; desenvolvimento do fígado; desenvolvimento do pulmão; morfometria.

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) is a bioaccumulative metal and is the most toxic form of organic mercury. MeHg contamination is a global problem that threatens the integrity of the environments and the health of the organisms that live in it. The main source of contamination in humans is through the ingestion of contaminated fish. Studies show that the toxicity of this metal in the cardiovascular system is responsible for cellular and tissue damage in both adults and embryos. In contaminated organisms, MeHg tends to be widely distributed through the bloodstream to various organs in the body. Thus, vascularized organs, such as the liver and lungs, are affected; however, the toxicity of MeHg in these organs is poorly understood. In this study, the effects of MeHg on hepatic and lung tissues were evaluated, focusing on cells and structures of endodermal origin (hepatocytes, pulmonary epithelial cells, and bronchi) and mesodermal origin (endothelial cells and blood vessels) during development. To this end, *Gallus domesticus* embryos were used as an animal model, divided into two groups: (i) exposed to 0.1 µg MeHg/50 µL saline solution and (ii) exposed exclusively to 50 µL saline solution. The exposure of both groups occurred at E1.5 (1.5 embryonic days), which corresponds to the initial period of liver and lung formation, and the embryos were analyzed at E10, when the liver already shows lobes and hepatic cords, and the lungs present bronchi. The embryos underwent routine histology, morphological and morphometric analyses, immunohistochemical, and histochemical analyses. It was observed that MeHg had a negative impact on endodermal-origin liver cells, evidenced by the increase in hepatocyte size, fat accumulation in hepatocytes, and dysregulation of hepatocyte proliferation. Furthermore, in the endodermal-origin lung cells, there was thickening of the columnar epithelial cells and a decrease in the size of cuboidal epithelial cells, as well as dysregulation in the proliferation of columnar epithelial cells. MeHg also affected mesodermal-origin cells in both the liver and lungs, as observed by the decrease in the size of hepatic endothelial cells, the increase in the size of pulmonary endothelial cells, alterations in the diameter of blood vessels, and dysregulation of cellular markers involved in vascular formation and integrity. Additionally, changes in the content of proteins, neutral and acid polysaccharides in both hepatic and lung tissues were observed. Together, the results demonstrate steatosis in the hepatic tissue and an alteration of bronchial organization. These findings highlight the toxic effects of MeHg on essential organs for the survival of individuals, underscoring the importance of studies on the toxicity of this metal.

Keywords: MeHg; liver development; lung development; morphometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Elementos principais do ciclo do mercúrio (Hg) acarretando na exposição ao metilmercúrio (MeHg) no ambiente e nos organismos.....	18
Figura 2: Representação da formação do fígado e dos pulmões de vertebrados, a partir das regiões cefálica e caudal do intestino primitivo anterior.....	21
Figura 3: Representação da diferenciação das células epiteliais pulmonares em embriões de vertebrados.....	23
Figura 4: Delineamento experimental para o estudo dos efeitos da exposição de embriões de <i>Gallus domesticus</i> ao MeHg.....	26
Figura 5: Representação das lâminas montadas com fígado e pulmão de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10 para a realização das análises histológicas.....	27
Figura 6: Representação dos cortes histológicos hepático e pulmonar de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	29
Figura 7: Organização do tecido hepático de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	34
Figura 8: Análise dos hepatócitos de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	35
Figura 9: Análise dos hepatócitos em proliferação de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	37
Figura 10: Organização do tecido pulmonar de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	38
Figura 11: Análise das células epiteliais colunares e cúbicas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	39
Figura 12: Análise das células epiteliais colunares e cúbicas em proliferação de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	41
Figura 13: Análise dos brônquios pulmonares de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	43
Figura 14: Razão entre as células epiteliais totais e em proliferação no pulmão de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	46
Figura 15: Análise dos vasos sanguíneos hepáticos de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	50

Figura 16: Análise dos vasos sanguíneos pulmonares de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	51
Figura 17: Análise por imuno-histoquímica das células VEGF- e VCAM-positivas nos vasos sanguíneos hepáticos de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	53
Figura 18: Análise por imuno-histoquímica das células VEGF- e VCAM-positivas nos vasos sanguíneos pulmonares de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	54
Figura 19: Conteúdo de proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos essenciais no tecido hepático de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg)	57
Figura 20: Conteúdo de proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos essenciais no tecido pulmonar de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	58
Figura 21 Representação da diferenciação das células epiteliais de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	59
Figura 22 Resumo gráfico da toxicidade do MeHg no fígado e pulmões de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10.....	61

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Anticorpos utilizados nas análises por imuno-histoquímica nos tecidos hepático e pulmonar de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....31
- Quadro 2:** Corantes utilizados nas análises histoquímicas nos tecidos hepático e pulmonar de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise da presença de lipídios no fígado de embriões apresentada pelo número de gotículas lipídicas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	35
Tabela 2: Morfometria das células epiteliais colunares e cúbicas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	39
Tabela 3: Diâmetro dos vasos e número de ramificações das classes de brônquios de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	42
Tabela 4: Contagem de células epiteliais através da coloração de HE de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	44
Tabela 5: Contagem de células epiteliais através de células PHH3-positivas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	44
Tabela 6: Morfometria das células endoteliais hepáticas e pulmonares de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	47
Tabela 7: Diâmetro dos vasos e número de classes de vasos sanguíneos hepáticos de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	48
Tabela 8: Diâmetro dos vasos e número de classes de vasos sanguíneos pulmonares de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	49
Tabela 9: Análise das células VEGF- e VCAM-positivas nos vasos sanguíneos hepáticos de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	55
Tabela 10: Análise das células VEGF- e VCAM-positivas nos vasos sanguíneos pulmonares de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	56
Tabela 11: Densidade óptica de proteínas totais, polissacarídeos neutros e ácidos, por área do tecido hepático e pulmonar de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BP	Brônquios Primários
BS	Brônquios Secundários
BT	Brônquios Terciários
C1	Classe 1
C2	Classe 2
C3	Classe 3
CBB	do inglês, <i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DAB	3,3'-diaminobenzidina
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LRDA	Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal
HE	Hematoxilina-Eosina
Hg	Mercúrio
HgCl ₂	Cloreto de mercúrio
HgS	Sulfeto de mercúrio
HH	Hamburger e Hamilton
MeHg	Metilmercúrio
PAS	do inglês, <i>Periodic Acid-Schiff</i>
PBS	do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PHH3	do inglês, <i>Phospho-Histone H3</i>
TBO	do inglês, <i>Toluidine Blue O</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VCAM	do inglês, <i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	24
	2.1 GERAL	24
	2.2 ESPECÍFICOS.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
	3.1 OBTENÇÃO DE OVOS.....	25
	3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
	3.3 INCUBAÇÃO, EXPOSIÇÃO E EUTANÁSIA	26
	3.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	27
	3.4.1 COLORAÇÃO.....	28
	3.4.2 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS.....	28
	3.5 ANÁLISES POR IMUNO-HISTOQUÍMICA	29
	3.6 ANÁLISES POR HISTOQUÍMICAS.....	31
	3.6.1 REAÇÃO DE PROTEÍNAS POR CBB.....	32
	3.6.2 REAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS NEUTROS POR PAS.....	32
	3.6.3 REAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS POR TBO	32
	3.6.4 DENSIDADE ÓPTICA.....	33
	3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
	4.1 EFEITO DO MeHg EM ESTRUTURAS ENDODÉRMICAS HEPÁTICAS	33
	4.2 EFEITO DO MeHg EM ESTRUTURAS ENDODÉRMICAS PULMONAR	35
	4.2.1 ALTERAÇÕES DO MeHg SOBRE A ÁRVORE BRÔNQUICA... ..	41
	4.2.2 ALTERAÇÕES DO MeHg SOBRE A RAZÃO ENTRE AS CÉLULAS EPITELIAIS.....	44
	4.3 EFEITO DO MeHg EM ESTRUTURAS MESODÉRMICAS HEPÁTICAS E PULMONARES	47
	4.3.1 ALTERAÇÕES DO MeHg NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS....	47
	4.3.2 ALTERAÇÕES DO MeHg NOS VASOS SANGUÍNEOS.....	48

4.3.3	ALTERAÇÕES DO MeHg NA FORMAÇÃO E INTEGRIDADE DOS VASOS SANGUÍNEOS	52
4.4	EFEITO DO MeHg NO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS, POLISSACARÍDEOS NEUTROS E ÁCIDOS.....	55
5	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

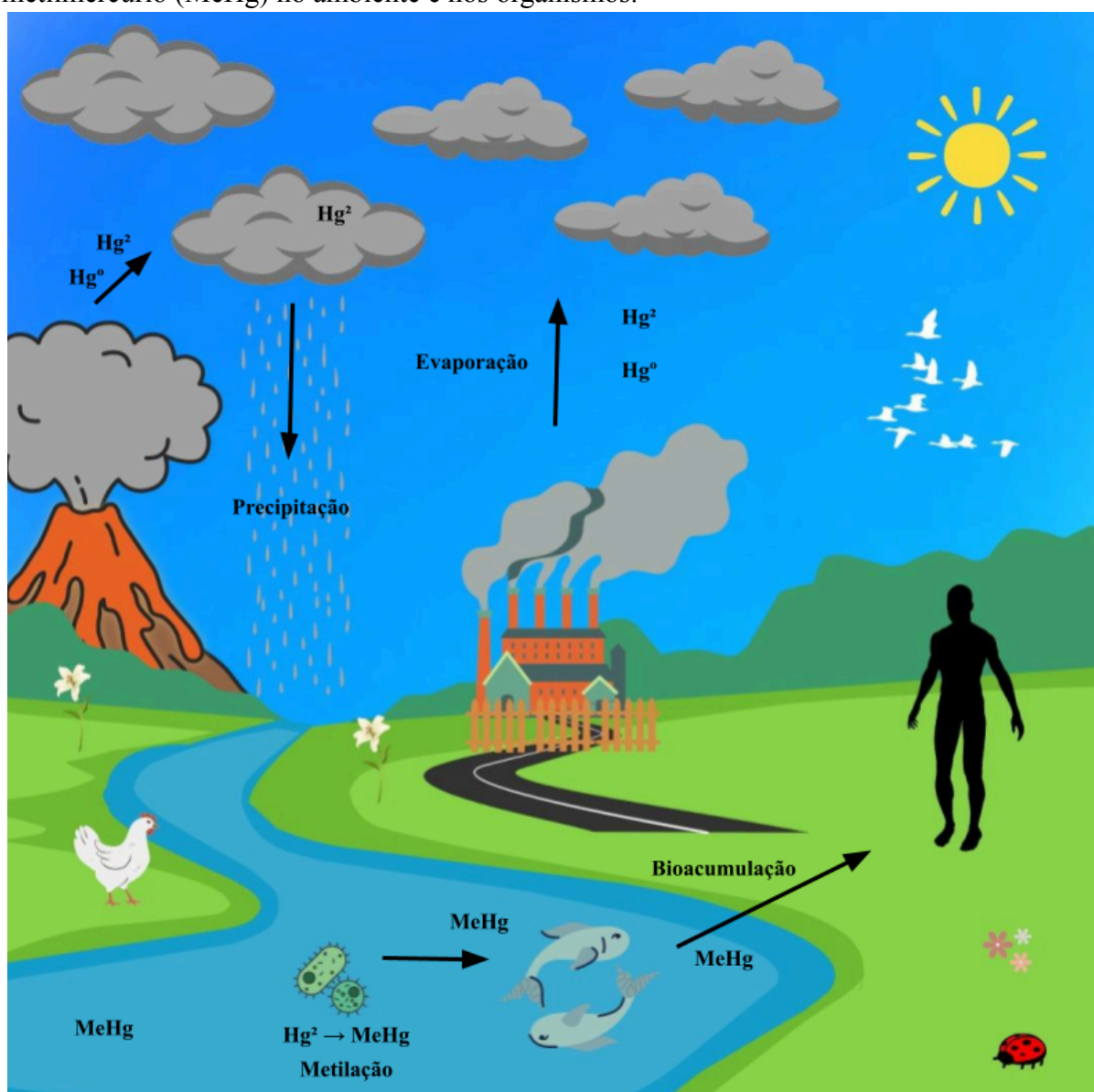
A contaminação pelo metal metilmercúrio (MeHg) é um problema global que ameaça a integridade dos ambientes naturais e a saúde dos organismos que neles vivem (Greenwood, 1985; Micaroni *et al.*, 2000; Hurtado *et al.*, 2023; Canela *et al.*, 2024). Nos organismos, o MeHg circula pelos vasos sanguíneos e o seu grau de toxicidade varia conforme a exposição e as taxas de bioacumulação (de Oliveira *et al.*, 2011). A exposição de MeHg a altas concentrações é capaz de provocar alterações neurológicas, visuais, cardiovasculares e renais (WHO, 2008; Bitencourt *et al.*, 2013). Entretanto, estudos morfológicos demonstram que mesmo com baixas concentrações, o MeHg tem a capacidade de causar danos teciduais e celulares durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (Carvalho *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2018). Assim, o estudo dos efeitos desse metal sobre órgãos em desenvolvimento torna-se de grande interesse científico, devido o impacto e a proporcionalidade global da toxicidade do MeHg (Li *et al.*, 2024),

O mercúrio (Hg) é encontrado na crosta e atmosfera terrestre (**figura 1**), sendo liberado tanto por erupções vulcânicas quanto por ação antropogênica (cerca de 80% das emissões atuais), assim contaminam rios, lagos e seres vivos que neles habitam (Li e Tse, 2015; Yang *et al.*, 2020). Dentre os estados de oxidação do Hg, é possível de ser encontrado como Hg^0 , Hg^1 e Hg^2 e em diferentes formas: as inorgânicas, como: mercúrio metálico ou elementar (Hg^0), íon mercurioso (Hg^2), ligadas com outros íons, como: cloro e enxofre (cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) e sulfeto de mercúrio (HgS)) e às orgânicas, como: fenilmercúrio, etilmercúrio e o MeHg, a forma orgânica mais tóxica para os sistemas biológicos (Micaroni *et al.*, 2000; Li e Tse, 2015; Hurtado *et al.*, 2023).

O Hg^0 inorgânico presente no ar pode permanecer na atmosfera por até 2 anos e ser dispersado para outras regiões do planeta através das correntes de ar (Li e Tse, 2015; Yang *et al.*, 2020). Na atmosfera o Hg^0 pode ser oxidado em Hg^2 , sendo facilmente precipitado e depositado em ambientes aquáticos e terrestres. O Hg^2 é então metilado e forma o MeHg (Ullrich *et al.*, 2001; Li e Tse, 2015; Canela *et al.*, 2024). A metilação em ambientes terrestres, aquáticos (em água doce e salgada) e em sedimentos aquáticos é proporcionado por bactérias redutoras de sulfato, no qual uma molécula doadora realiza uma transferência de um grupo metil para o Hg^2 (Ullrich *et al.*, 2001). Essa reação química ainda não é bem compreendida, especialmente no que se refere à sua ocorrência no meio intra ou extracelular,

como uma possível atividade de exoenzimas das bactérias redutoras de sulfato. No entanto, já se sabe que o aumento desses processos bioquímicos é amplificado com o aumento da temperatura da água (Ullrich *et al.*, 2001), o que gera preocupação global, especialmente considerando o aumento contínuo da temperatura do planeta nos últimos anos (Li *et al.*, 2024). Quando animais e plantas são expostos ao MeHg, este metal tende a se bioacumular no organismo e entrar na cadeia alimentar, causando efeitos prejudiciais à saúde humana (Hong *et al.*, 2012).

Figura 1: Elementos principais do ciclo do mercúrio (Hg) acarretando na exposição ao metilmercúrio (MeHg) no ambiente e nos organismos.



Fonte: elaborado pelo autor.

Estudos sobre a exposição ao MeHg indicam que, em indivíduos adultos, entre 70 a 80% do Hg presente no sangue humano está na forma de MeHg (Yang *et al.*, 2020), com mais de 80% proveniente da ingestão de peixes e moluscos (Hong *et al.*, 2012). Quando ingerido, cerca de 95% do MeHg é absorvido, e no corpo humano a meia-vida do MeHg é de aproximadamente 70 dias (Clarkson, 2002; Bitencourt *et al.*, 2013). Menos de 10% do MeHg é excretado, o que evidencia a persistência desse metal no organismo (Clarkson, 2002; Clarkson *et al.*, 2003). O MeHg no organismo tende a se combinar a glutatona presente nos glóbulos vermelhos e ser amplamente distribuído pela circulação sanguínea para vários órgãos do corpo, incluindo fígado e pulmão (Hong *et al.*, 2012). Além disso, em mulheres grávidas, o MeHg tende a atravessar a placenta e contaminar o feto causando alterações neurológicas e visuais como relatado nos casos de contaminação e pesquisas sobre exposição ao MeHg (Hong *et al.*, 2012).

Casos históricos de envenenamento por MeHg têm sido documentados desde o final do século XIX, quando na Inglaterra foi registrado o primeiro relato de contaminação por MeHg em um acidente laboratorial (Clarkson *et al.*, 2003; Bitencourt, 2013). No entanto, os casos mais estudados foram no Japão e no Iraque, ambos em decorrência da industrialização.

Em 1953, aconteceu o acidente hoje conhecido como doença de Minamata, provocado pela empresa chamada *Chisso Corporation*, na qual descartou na Baía de Minamata, no Japão. A *Chisso Corporation* utilizava o sulfato de mercúrio (Hg_2SO_2) como catalisador para a produção de ácido acético e seus derivados, sendo que o MeHg era um subproduto na produção do ácido acético. O MeHg despejado na baía proporcionou uma alta quantidade de MeHg produzido por bactérias redutoras de sulfato, por consequência as espécies aquáticas da Baía de Minamata tiveram os seus tecidos contaminados por MeHg. Após alguns anos, a comunidade que se alimentava de animais aquáticos começou a manifestar os primeiros sintomas neurológicos, além de outros sintomas, como uma maior incidência de hipertensão na comunidade causados pela bioacumulação do MeHg, deixando uma mortalidade de 887 pessoas provocada pelo envenenamento até o final do século XX (Micaroni *et al.*, 2000; Takahashi e Shimohata, 2019).

Em 1973, ocorreu o incidente provocado pela contaminação de grãos de trigo e cevada através de um fungicida à base de MeHg em várias regiões do Iraque. A colheita resultante foi utilizada para fazer pão e outros produtos, causando intoxicação grave em milhares de pessoas e resultando em milhares de mortes (Greenwood, 1985). Outros acidentes

parecidos ocorreram em outros países como no Irã e Paquistão, também provocados por fungicidas à base de MeHg em plantações (Clarkson, 2002; Bitencourt, 2013).

Na Amazônia Brasileira, atividades de extração de ouro têm provocado despejo de Hg e aumento da contaminação por MeHg em peixes dos rios amazônicos (Achatz *et al.*, 2021; Barbosa *et al.*, 2021). Estudos mostram que a contaminação das populações indígenas e ribeirinhas amazônicas por MeHg vem predominantemente da alimentação de peixes, na qual são a sua principal proteína animal (Micaroni *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2020).

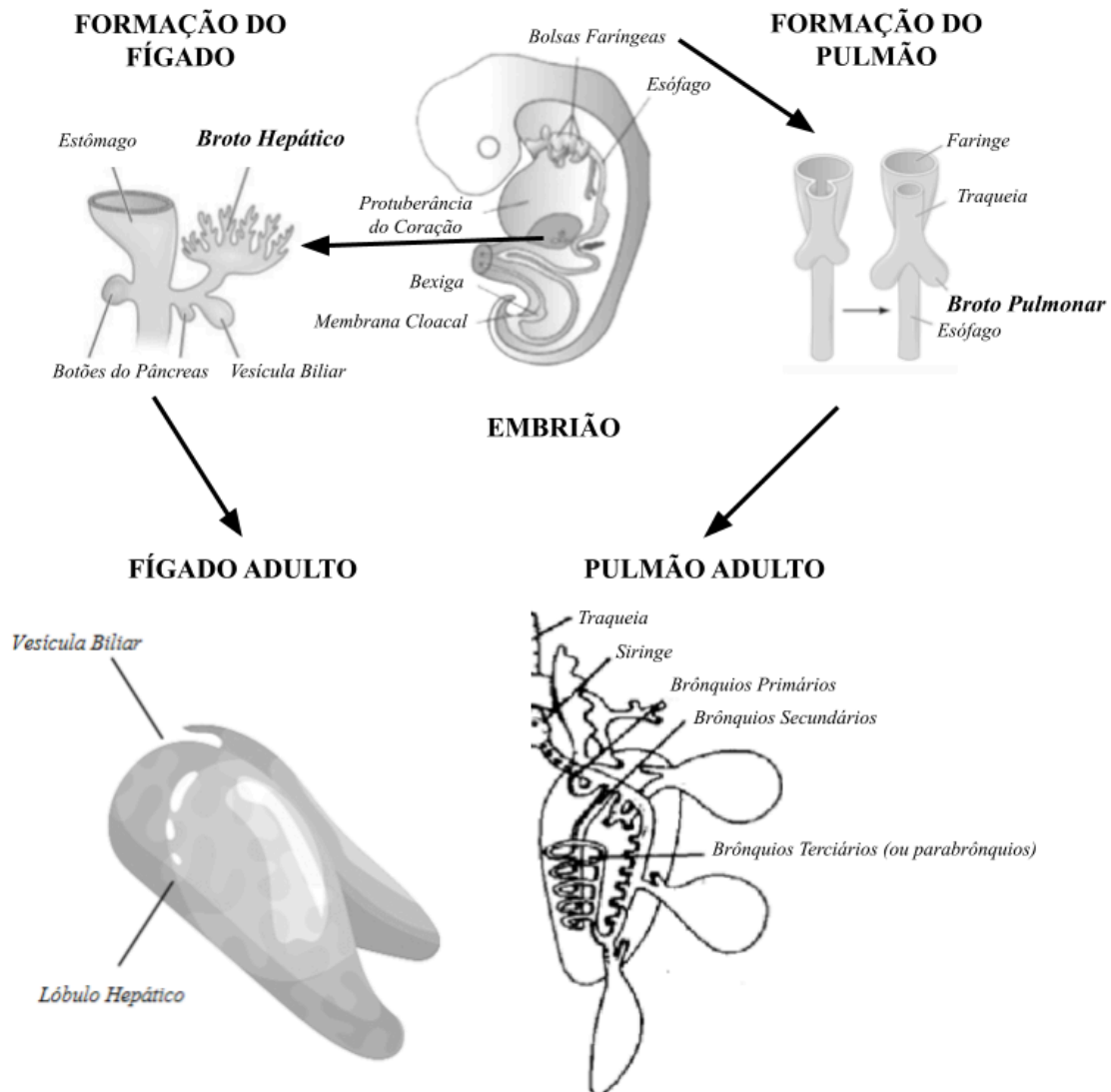
Alguns estudos demonstram a bioacumulação do MeHg no fígado de cetáceos adultos (Barbosa *et al.*, 2021; Ji *et al.*, 2022), animais do topo da cadeia alimentar que tendem a se alimentar de peixes presentes na alimentação humana. Além disso, a exposição prolongada ao MeHg em camundongos adultos, apresentaram disfunção hepática (Macedo-Júnior *et al.*, 2017). Enquanto para o pulmão, o estudo de Yu *et al.* (2015) em cultura de células humanas, as células epiteliais pulmonares apresentaram aumento das espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica, provocando estresse oxidativo nas células epiteliais pulmonares. Entretanto, a falta de estudos que investiguem os efeitos morfológicos no fígado e nos pulmões em desenvolvimento após a exposição ao MeHg ressalta a necessidade de mais pesquisas para entender as possíveis consequências desse metal pesado durante o desenvolvimento.

No desenvolvimento embrionário, a formação do fígado e pulmão ocorre simultaneamente à formação dos demais órgãos, durante o processo de organogênese (**figura 2**). Especificamente, o fígado e o pulmão são formados a partir do intestino primitivo, uma estrutura embrionária transitória, de origem endodérmica, que se organiza no sentido ântero-posterior do embrião. Na região cefálica do intestino primitivo anterior forma-se o broto pulmonar e na região anterior caudal, forma-se o broto hepático (Cardoso e Whitsett, 2008; Gilbert e Barresi, 2019).

Para a formação de ambos os órgãos, é necessária a interação com o folheto embrionário mesoderma. O broto hepático projeta-se em direção ao mesoderma, no qual o mesoderma induz a proliferação e a formação do epitélio glandular endodérmico. Nesse processo, as células começam a expressar α -fetoproteína e albumina, fatores para a formação do fígado (Gualdi *et al.*, 1996; Tremblay e Zaret, 2005). Para a formação do broto pulmonar, o endoderma induzido pelo mesoderma, forma o revestimento da traqueia, dos brônquios e suas

ramificações. A vasculatura (vasos sanguíneos e linfáticos) do fígado e dos pulmões é originada do mesoderma (Shannon e Hyatt, 2004; Bellairs e Osmond, 2005).

Figura 2: Representação da formação do fígado e dos pulmões de embriões de *Gallus domesticus*, a partir das regiões cefálica e caudal do intestino primitivo anterior.



Fonte: elaborado pelo autor.

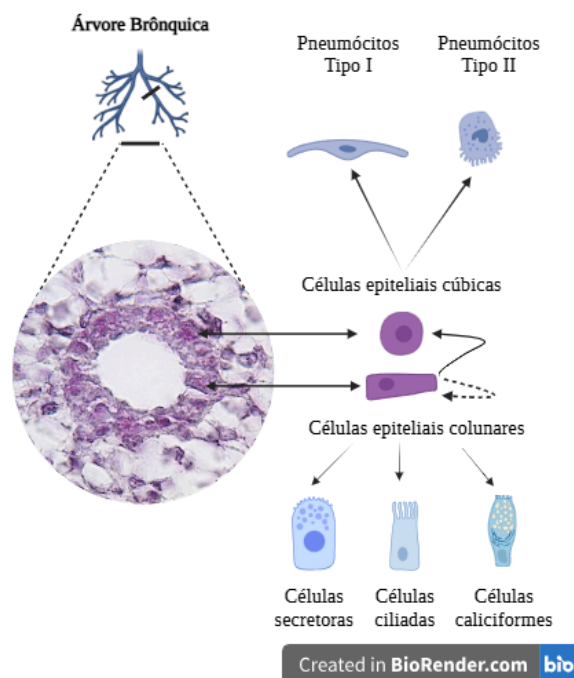
Durante o desenvolvimento embrionário, o fígado desempenha uma função hematopoiética devido à formação de vasos sanguíneos por meio da vasculogênese, que ocorre a partir de células mesodérmicas, e da angiogênese, que se origina de vasos sanguíneos pré-existentes. As células endoteliais dos vasos sanguíneos produzem fatores parácrinos que induzem a especificação de células endodérmicas progenitoras dos hepatócitos, as células mais abundantes no fígado (Gilbert e Barresi, 2019). Porém, durante o desenvolvimento

embrionário, modificações morfológicas e funcionais no fígado ocorrem e a função de produção de células sanguíneas é perdida. Assim, o fígado passa a assumir funções endócrinas e exócrinas, como: produção de ácido biliar e proteínas, estoque de gordura, regulação hormonal do indivíduo e função de detoxificação durante o desenvolvimento embrionário, mas a maturação só ocorre no período pós-natal (Hoffmann *et al.*, 1969; de Souza *et al.*, 2015). A característica de captar, metabolizar e acumular ou eliminar substâncias tóxicas no fígado é de responsabilidade dos hepatócitos, no qual por meio de processos oxidativos dentro do retículo endoplasmático liso torna substâncias tóxicas lipofílicas como o MeHg, em hidrofílicas para eliminação através da bile (Junqueira e Carneiro, 2017)

Por outro lado, durante o desenvolvimento embrionário, os pulmões não possuem funcionalidade, pois a troca gasosa é realizada pela placenta em mamíferos (Moore *et al.*, 2020) e pelo alantoide em aves (Bellairs e Osmond, 2005). Durante o desenvolvimento, os pulmões se preparam morfológicamente para respirar ar (Bjørnstad *et al.*, 2014). A morfogênese dos pulmões é um processo extenso que ocorre ao longo de todo o desenvolvimento. As interações endoderma-mesoderma, envolvidas na ramificação do broto traqueal e pulmonar, fazem com que os brônquios se dividem em primários, secundários, terciários, bronquíolos terminais e alvéolos em mamíferos (Silverthorn, 2017) e em brônquios primários, secundários e terciários (parabrônquios) em aves (Stabellini *et al.*, 2001). Entretanto, em ambas as estruturas terminais (os alvéolos e os parabrônquios), serão o local da troca gasosa.

Durante o desenvolvimento, o epitélio dos brônquios é constituído por células que se diferenciam em células epiteliais cúbicas ou colunares. As células epiteliais cúbicas por sua vez se diferenciam em pneumócitos tipo I, com formato pavimentoso, associados na troca gasosa e em pneumócitos tipo II com formato cúbico, responsáveis pela produção de surfactante (Fehrenbach, 2001; Bjørnstad *et al.*, 2014; Ruaro *et al.*, 2021). As células epiteliais colunares também se diferenciam em três tipos celulares: células secretoras, que produzem muco e mantém o formato colunar; células ciliadas, que movem o muco que reveste os brônquios e também mantém o formato colunar; e células caliciformes, também produtoras e secretoras de muco (Joshi e Kotecha, 2007) (**figura 3**).

Figura 3: Representação da diferenciação das células epiteliais pulmonares em embriões de vertebrados.



Setas contínuas representam a diferenciação que cada célula, enquanto as setas pontilhadas representam a renovação de cada célula. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Sabendo da similaridade no desenvolvimento embrionário do fígado e dos pulmões de vertebrados, este trabalho utilizou embriões de *Gallus domesticus* como organismo de estudo. A documentação dessa espécie sendo utilizada pela ciência, é representada pelos trabalhos históricos na Grécia Antiga. Porém, no final do século XIX e início do século XX, alguns trabalhos publicados sobre os estágios embrionários de *G. domesticus*, já vinham sendo melhor compreendidos (Hamburger e Hamilton, 1951; Gilbert e Barresi, 2019). Dentre estes trabalhos está o estagiamento proposto por Hamburger e Hamilton (1951), a partir do reconhecimento da morfologia externa dos embriões. Além disso, *G. domesticus* possui desenvolvimento embrionário externo do corpo da fêmea que facilita o manuseio e acompanhamento da exposição dos ovos aos compostos químicos, como no caso do MeHg (Bjørnstad *et al.*, 2014); o período de desenvolvimento completo de 21 dias, no qual permite o acompanhamento sistemático dos embriões (Schoenwolf, 1999; Bellairs e Osmond, 2005); o custo financeiro ser baixo e a disponibilidade dos embriões ser alta em relação a outros organismos modelos; além da viabilidade de utilização de marcadores celulares, em análises por imuno-histoquímicas (Jiang *et al.*, 1998; Schoenwolf, 1999; Suksaweang *et al.*, 2004).

Diante desse cenário apresentado sobre a toxicidade do MeHg e a relevância de se compreender melhor os múltiplos efeitos da exposição a este metal, este trabalho de conclusão de curso apresenta uma avaliação da toxicidade do MeHg sobre (i) a organização tecidual, (ii) processos de proliferação celular e vascular e, (iii) conteúdo de proteínas e polissacarídeos do fígado e pulmão, utilizando embriões de *G. domesticus* como modelo animal de estudo propondo as seguintes hipóteses:

- A exposição ao MeHg durante o desenvolvimento embrionário do fígado e do pulmão leva a alterações teciduais, como aumento no tamanho de células hepáticas e pulmonares, nos brônquios pulmonares e nos vasos sanguíneos, alterando o desenvolvimento normal desses órgãos.
- Embriões expostos ao MeHg apresentam redução na proliferação de células hepáticas e pulmonares, induzindo alterações no tecido hepático e pulmonar.
- A exposição ao MeHg causa aumento do conteúdo de proteínas e polissacarídeos essenciais para o desenvolvimento embrionário.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o impacto do MeHg sobre a morfologia, morfometria, proliferação celular e características histoquímicas em dois órgãos de origem endodérmica, utilizando embriões de *G. domesticus* como modelo animal de estudo.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar a morfometria dos hepatócitos, células epiteliais e células endoteliais;
- Quantificar o perfil lipídico nos hepatócitos;
- Investigar o conteúdo de proteínas relacionada ao processo de proliferação celular nos hepatócitos e nas células epiteliais;
- Caracterizar a morfometria dos brônquios e dos vasos sanguíneos hepáticos e pulmonares;

- Verificar o conteúdo de proteínas relacionadas nos processos de formação e integridade vascular nos tecidos hepático e pulmonar;
- Reconhecer a presença do conteúdo de proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos essenciais para o desenvolvimento embrionário nos tecidos hepático e pulmonar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

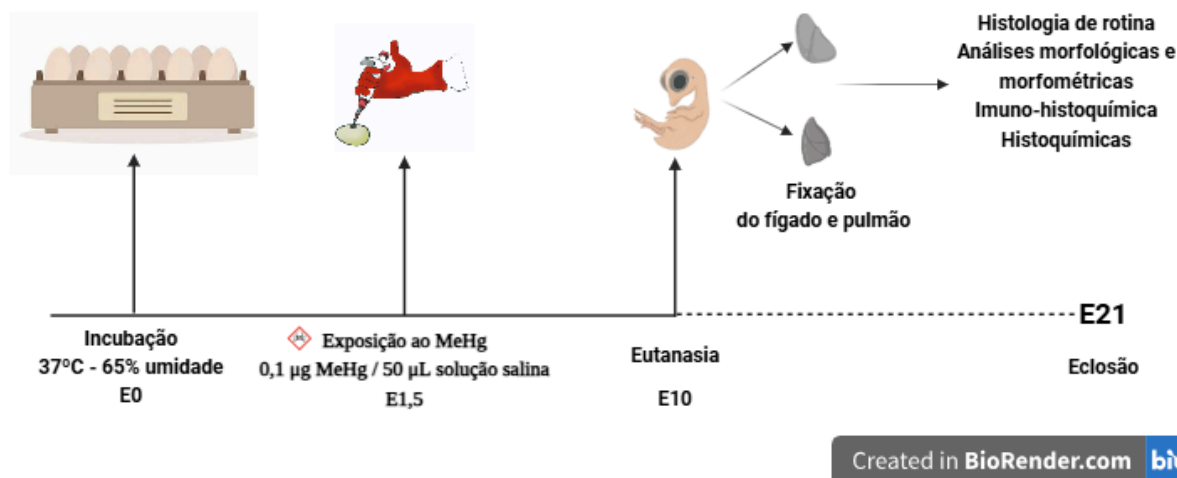
3.1 OBTENÇÃO DE OVOS

Para a realização deste trabalho, ovos de *G. domesticus* (linhagem Hy-Line Brown) foram obtidos do Laboratório de Avicultura, da Fazenda Experimental da Ressacada, do Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFSC) e transportados para o Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA), do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). No LRDA, os ovos permaneceram em repouso por 24 horas a 20°C antes de serem alocados em incubadora. A utilização dos embriões foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - número do protocolo 5843231018/CEUA/UFSC.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental adotado neste trabalho, envolve a utilização de embriões de *G. domesticus* para estudo dos efeitos do MeHg. As idades embrionárias, o tempo de exposição e as análises histológicas, morfométricas, imuno-histoquímicas e histoquímicas do tecido hepático e pulmonar realizadas neste trabalho estão representadas na **figura 4**.

Figura 4: Delineamento experimental para o estudo dos efeitos da exposição de embriões de *Gallus domesticus* ao metilmercúrio (MeHg).



A linha preta contínua representa o período do experimento, enquanto a linha preta pontilhada representa o tempo remanescente para a eclosão de *G. domesticus*, caso não tivesse sido interrompido em E10. **Fonte:** elaborado pelo autor.

3.3 INCUBAÇÃO, EXPOSIÇÃO E EUTANÁSIA

Os ovos de *G. domesticus* foram colocados na incubadora (Golden) a temperatura média de 37,5°C, e umidade de 65%. Após 36 horas de incubação (i.e., dia embrionário E1,5, que corresponde ao estágio HH 10, conforme descrito por Hamburger e Hamilton (1951)), os ovos foram divididos em dois grupos: um exposto ao MeHg e outro controle. Em E1,5, foi realizada uma pequena abertura na casca, na região mais alongada para a exposição. Os embriões foram expostos a 0,1 µg MeHg em 50 µL de solução salina pipetado diretamente sobre o embrião, enquanto os embriões do grupo controle receberam exclusivamente 50 µL de solução salina (n = 11 embriões/grupo). Posteriormente, a abertura da casca foi fechada com fita adesiva transparente atóxica. A concentração de MeHg adotada seguiu o trabalho de Carvalho *et al.* (2008). Os ovos retornaram para a incubadora até o 10º dia de incubação (i.e., dia embrionário E10, estágio HH 36). Após o desenvolvimento interrompido em E10, os embriões foram dessensibilizados a 4°C (15 minutos), removidos dos ovos, lavados em solução salina e eutanasiados por decapitação (Leland *et al.*, 2019).

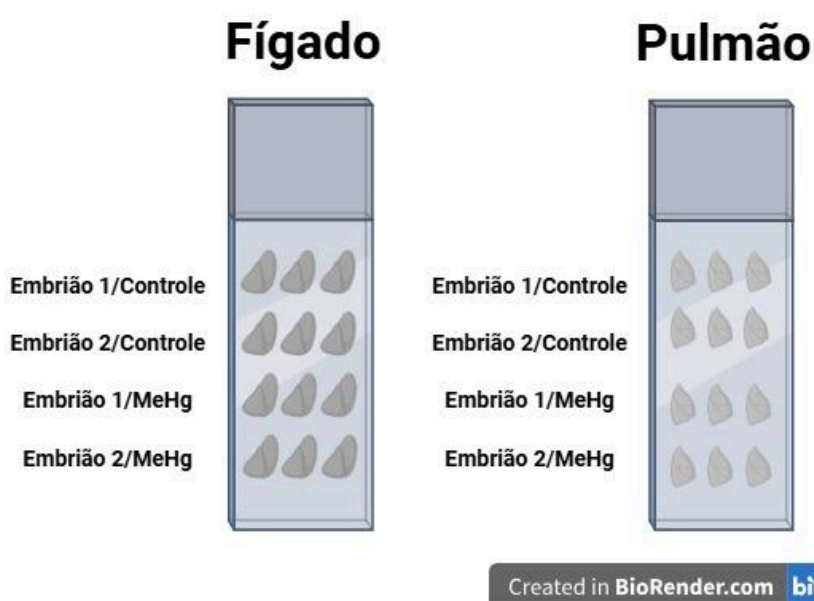
A idade de E1,5 para a exposição ao MeHg foi escolhida pois nesta idade os brotos hepático e pulmonares começam a sua formação, as células endodérmicas estão indiferenciadas e os vasos sanguíneos estão se estruturando. Enquanto, a idade da eutanásia e análise de E10 foi adotada pelo período em que (i) o tecido hepático apresenta lóbulo e

cordões hepáticos e o tecido pulmonar brônquios; (ii) o fígado ainda ser um órgão hematopoiético e; (iii) o pulmão apresenta células em diferenciação (Suksaweang *et al.*, 2004; Bjørnstad *et al.*, 2014; Gilbert e Barresi, 2019).

3.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Os fígados e pulmões foram fixados em formaldeído a 4% (24 horas) e posteriormente mantidos em etanol a 70%. Para a inclusão em parafina, os órgãos foram desidratados em série crescente de etanol (de 70% a 100%, por 1 hora em cada concentração). A diafanização foi realizada com dois banhos de xilol (10 minutos cada), seguidos de três banhos em parafina a 60°C (1 hora e 10 minutos em cada banho) e depois retiradas da estufa para a solidificação em temperatura ambiente. As secções histológicas foram realizadas em micrótomo rotativo (Olympus CUT 2020^a), com espessura de 6 µm. Tanto para o fígado quanto para o pulmão, as secções foram montadas em lâminas histológicas previamente gelatinizadas, individualizadas para cada órgão. As lâminas foram organizadas com secções do mesmo órgão em 3 alturas diferentes obtidas de dois embriões do grupo controle e do exposto ao MeHg (**figura 5**). Foram preparados 6 conjuntos de lâminas para coloração Hematoxilina-Eosina (HE), técnica de imuno-histoquímica e histoquímica.

Figura 5: Representação das lâminas montadas com fígado e pulmão de embriões de *Gallus domesticus* em E10 para a realização das análises histológicas.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.4.1 COLORAÇÃO

Lâminas histológicas foram submetidas à coloração com HE para as análises morfológicas e morfométricas (n = 11 embriões/grupo). Para tal, as lâminas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol puro (2 minutos em cada banho) e re-hidratadas em série decrescente de etanol (100% - 70% de 4 minutos em cada concentração). As lâminas foram lavadas com água corrente (5 minutos), em seguida foi feito banho de Hematoxilina (30 segundos). As lâminas foram novamente lavadas em água corrente (5 minutos) e em seguida foi feito banho de Eosina (30 segundos) e lavadas em água destilada (5 minutos). Após a coloração, as lâminas foram desidratadas em uma série crescente de etanol (70% - 90% de 2 minutos em cada concentração) e duas de etanol (100% de 4 minutos em cada banho). Por fim, as lâminas foram banhadas duas vezes em xilol puro (1 minuto em cada banho) e finalizadas com Entellan e lamínula.

3.4.2 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

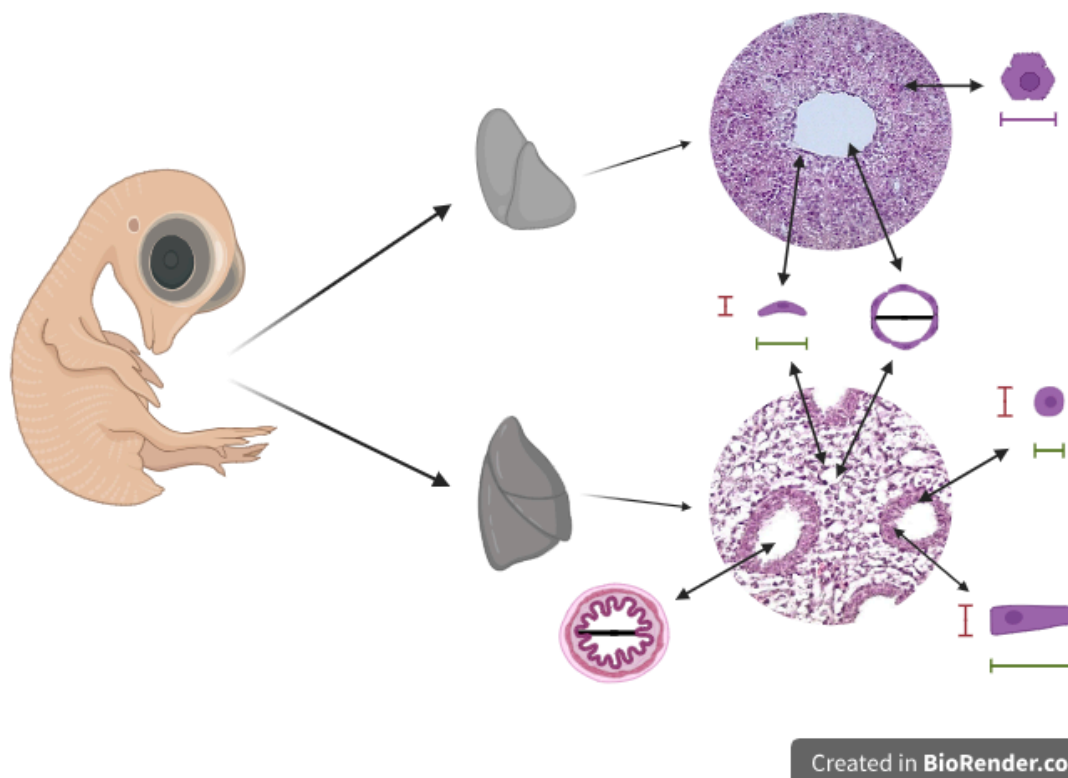
Foi avaliado no fígado e no pulmão o diâmetro e o número de vasos sanguíneos em perfil transversal (n = 11 embriões/1 secção por embrião/grupo). Além disso, foram medidos o menor e o maior eixo das células endoteliais (n = 5 células/vaso sanguíneo/secção/embrião/grupo), para o cálculo do tamanho da célula, pela fórmula:

$$\text{Tamanho da célula} = \frac{\text{menor eixo} + \text{maior eixo}}{2}$$

No fígado foi medido o maior eixo dos hepatócitos, considerando seu formato poliédrico (n = 5 hepatócitos adjacentes e 5 hepatócitos não adjacentes aos vasos sanguíneos/secção/embrião/grupo). Foram medidos, no pulmão, o diâmetro e o número de ramificações da árvore brônquica em perfil transversal (n = 11 embriões/1 secção por embrião/grupo). Além disso, foram medidos o menor e o maior eixo das células epiteliais presentes no epitélio das ramificações da árvore brônquica em perfil transversal (n = 5 células epiteliais colunares e cúbicas/brônquio/secção/embrião/grupo) para o cálculo do tamanho da célula. A análise de esteatose hepática foi realizada pela quantificação do número e tamanho das gotículas lipídicas acumuladas no citoplasma dos hepatócitos. As lâminas foram

fotodocumentadas utilizando microscópio Olympus BX 41 (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia, LAMEB) em diferentes ampliações para a construção das pranchas e a análise de esteatose hepática, através de micrografias (n = 5 micrografias/secção/embrião/grupo) (**figura 6**).

Figura 6: Representação dos cortes histológicos hepático e pulmonar de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



Linha roxa representa o diâmetro dos hepatócitos. Linha verde representa o maior eixo e linha vermelha representa o menor eixo das células endoteliais e das células epiteliais pulmonares. Linha preta representa o diâmetro dos vasos sanguíneos hepáticos e pulmonares e dos brônquios. Figuras não apresentadas em escala.
Fonte: elaborado pelo autor.

3.5 ANÁLISES POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada para identificar proteínas relacionadas à proliferação celular, formação e integridade vascular. As secções histológicas foram desparafinizadas com dois banhos de xilol puro (10 minutos em cada banho) e re-hidratadas em série decrescente de etanol (100% de 10 minutos cada e 90% a 70% de 5 minutos em cada concentração). A inativação das peroxidases endógenas foi realizada em banhos com solução de peróxido de hidrogênio:metanol (1:2) (10 minutos). Para a permeabilização das

membranas celulares, foi feito banho com tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) (5 minutos), seguido de banho com PBS a 0,1 M + Triton X-100 a 0,3% (15 minutos). O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito em banho com soro fetal bovino a 5% (30 minutos). Após, foi feita a incubação com anticorpo primário (12 horas) a 4°C, seguida de dois banhos com PBS a 0,1 M + Triton X-100 a 0,3% (15 minutos). Foram utilizados anticorpos primários para identificar proteínas envolvidas na proliferação celular (anti-PHH3, do inglês, *Phospho-Histone H3*), bem como na formação (anti-VEGF, do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*) e integridade vascular (anti-VCAM, do inglês, *Vascular Cell Adhesion Molecule*) (**quadro 1**). Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (**quadro 1**) (3 horas) em temperatura ambiente, seguido de banho com PBS a 0,1 M (5 minutos), dois banhos com PBS a 0,1 M + Triton X-100 a 0,1% (15 minutos cada banho) e banho com PBS a 0,1 M (5 minutos). A imunomarcação foi revelada com DAB (3,3'-diaminobenzidina) (15 minutos para as lâminas de secções de fígado e 25 minutos para as lâminas de secções de pulmão). Após a revelação, as lâminas foram lavadas em água destilada (5 minutos) e seguidamente desidratadas em uma série crescente de etanol (70% - 100% de 5 minutos em cada concentração). Por fim, as lâminas foram banhadas duas vezes em xilol puro (5 minutos em cada banho) e finalizadas com Entellan e lamínula. Para realizar a contagem das células positivas, foi utilizado microscópio de luz (Olympus CBA) acoplado à gráticula de Weibel nº 2 – M42 (n = 11 embriões/5 campos visuais/secção/grupo). Para realizar a contagem das células positivas nas periferias dos vasos sanguíneos conforme seu diâmetro, foi utilizado microscópio de luz (Olympus CBA) acoplado à ocular micrométrica (n = 5 vasos sanguíneos por classe/secção/embrião/grupo).

Quadro 1: Anticorpos utilizados nas análises por imuno-histoquímica nos tecidos hepático e pulmonar de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

ANTICORPO	ESPÉCIES		ISOTIPO	DILUIÇÃO
	DESENVOLVIDA	ORIGEM		
Anti-Fosfo Histona H3	Coelho	Humana	IgG	1:100
Anti-Fator de Crescimento Endotelial Vascular	Coelho	Humana	IgG	1:100
Anti-Molécula Adesiva de Células Vasculares	Camundongo	Humana	IgG	1:100
Anti-Coelho Conjugado a Peroxidase	Coelho	Humana	IgG	1:200
Anti-Camundongo Conjugado a Peroxidase	Camundongo	Humana	IgG	1:200

Anticorpos primários (em verdes) e secundários (em azuis). **Fonte:** elaborado pelo autor.

3.6 ANÁLISES POR HISTOQUÍMICA

A técnica de histoquímica foi realizada para reconhecer a presença do conteúdo de proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos essenciais para o desenvolvimento embrionário (n = 8 embriões/grupo/histoquímica) (**quadro 2**).

Quadro 2: Corantes utilizados nas análises histoquímicas nos tecidos hepático e pulmonar de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

CORANTE	SIGLA	REAÇÃO COM:
Azul brilhante de Coomassie	CBB, do inglês <i>coomassie Brilliant Blue</i>	Proteínas totais
Ácido periódico de <i>Schiff</i>	PAS, do inglês <i>Periodic Acid-Schiff</i>	Polissacarídeos neutros
Azul de toluidina	TBO, do inglês <i>Toluidine Blue O</i>	Polissacarídeos ácidos

Fonte: elaborado pelo autor.

3.6.1 REAÇÃO DE PROTEÍNAS POR CBB

As secções histológicas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol puro (2 minutos em cada banho) e lavadas em etanol (100% de 4 minutos) e em seguida feito banho de solução de CBB (2 minutos) e lavadas em solução de Clark (5 minutos). As lâminas foram lavadas em água corrente (5 minutos). Após a reação, as lâminas foram desidratadas em uma série crescente de etanol (70% - 100% de 3 minutos em cada concentração). Por fim, as lâminas foram banhadas duas vezes em xilol puro (2 minutos em cada banho) e finalizadas com Entellan e lamínula.

3.6.2 REAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS NEUTROS POR PAS

As secções histológicas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol puro (2 minutos em cada banho) e re-hidratadas em série decrescente de etanol de dois banhos (100% de 2 minutos cada e 90% a 50% de 4 minutos em cada concentração). As lâminas foram lavadas com água corrente (10 minutos) e em seguida feito banho no escuro de ácido periódico (30 minutos). As lâminas foram novamente lavadas em água corrente (20 minutos) e em seguida feito banho no escuro no reativo de *Schiff* (30 minutos) e lavadas em água destilada (20 minutos). Após a reação, as lâminas foram desidratadas em uma série crescente de etanol (70% - 100% de 3 minutos em cada concentração). Por fim, as lâminas foram banhadas duas vezes em xilol puro (2 minutos em cada banho) e finalizadas com Entellan e lamínula.

3.6.3 REAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS POR TBO

As secções histológicas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol puro (2 minutos em cada banho) e re-hidratadas em série decrescente de etanol de dois banhos (100% de 2 minutos cada e 90% a 50% de 4 minutos em cada concentração). As lâminas foram lavadas com água corrente (10 minutos) e em seguida feito banho de TBO diluído a 0,5% com pH de 3,5 (5 segundos) e novamente lavadas em água corrente (10 minutos). Após a reação, as lâminas foram desidratadas em uma série crescente de etanol (70% - 100% de 4

minutos em cada concentração). Por fim, as lâminas foram banhadas duas vezes em xilol puro (2 minutos em cada banho) e finalizadas com Entellan e lamínula.

3.6.4 DENSIDADE ÓPTICA

Para a análise histoquímica, as lâminas foram fotodocumentadas utilizando microscópio (Olympus BX 41, LAMEB). Através de micrografias, foi calculada a densidade óptica da reação usando o software ImageJ (n = 5 micrografias/secção/embrião/grupo). Para o tecido hepático, a área estabelecida foi de $5,27 \times 5,27 \mu\text{m}$, sendo justificado pelo tamanho dos hepatócitos. Para o tecido pulmonar, a área estabelecida foi de $2,64 \times 2,64 \mu\text{m}$, sendo justificada pelo tamanho mínimo encontrado da epitélio dos brônquios.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7.04, sendo a normalidade dos dados testada previamente. Foi realizado o teste T de Student e os dados estão apresentados neste trabalho de conclusão de curso em valores de média \pm erro padrão da média. Por fim, as diferenças significativas foram consideradas, quando $p < 0,05$.

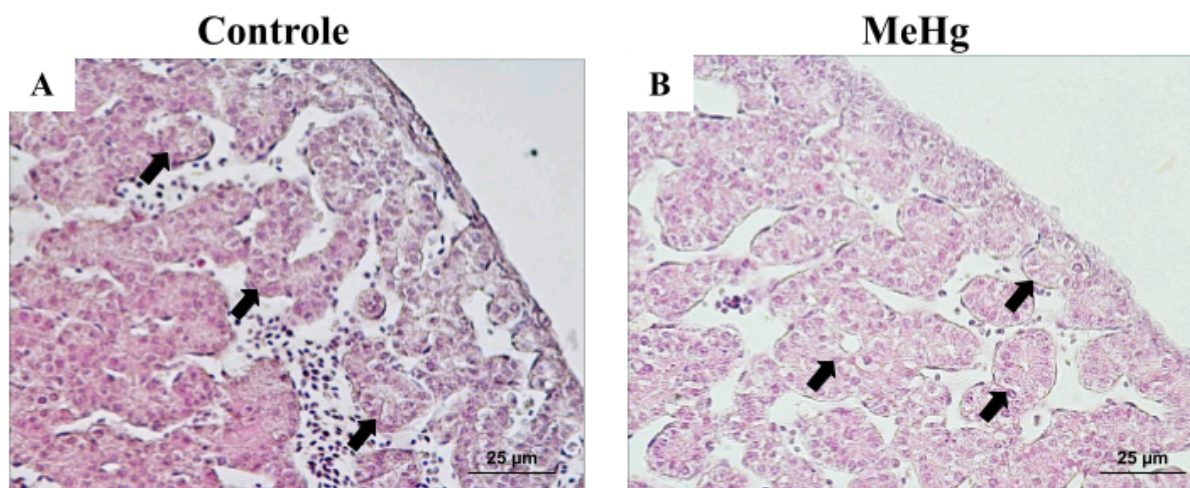
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DO MeHg EM ESTRUTURAS ENDODÉRMICAS HEPÁTICAS

A partir da análise histológica do fígado (**figura 7**), foi possível observar cordões hepáticos, com capilares separando-os, e pequenos lóbulos hepáticos tanto nos embriões expostos ao MeHg, quanto nos embriões controle. Entretanto, foi observado que no tecido hepático dos embriões expostos ao MeHg, os hepatócitos aparentam ser mais volumosos quando comparados com o controle. Durante o desenvolvimento embrionário, as células endodérmicas do fígado, os hepatócitos, proliferam e formam os cordões hepáticos, que já estão presentes na idade de E10 em *G. domesticus* (Suksaweang *et al.*, 2004), o arranjo dos hepatócitos em cordões hepáticos em forma radial com os capilares entre eles, dá origem aos lóbulos hepáticos. Os hepatócitos, durante o desenvolvimento embrionário, são responsáveis

pela produção de proteínas que auxiliam a hematopoiese. Ao longo do desenvolvimento, a função hematopoiética é perdida e os hepatócitos passam por maturação tardia para o preparo da função de metabolização e eliminação de substâncias tóxicas no período pós-natal (Junqueira e Carneiro, 2017; Moore *et al.*, 2020).

Figura 7: Organização do tecido hepático de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



Setas representam lóbulos hepáticos. **Fonte:** elaborado pelo o autor.

Assim, foi verificado que nos embriões expostos ao MeHg houve um aumento do tamanho dos hepatócitos ($8,06 \mu\text{m} \pm 0,06$), quando comparados ao grupo controle ($7,05 \mu\text{m} \pm 0,04$ $p < 0,0001$). O aumento do tamanho celular está relacionado ao conteúdo intracelular, uma vez que o MeHg é um composto bioacumulativo, que pode alterar o metabolismo do fígado induzindo o acúmulo de lipídico dentro dos hepatócitos como já apresentados em outros trabalhos (Marumoto *et al.*, 2022; Desjardins *et al.*, 2024) e com outros metais pesados, como o cádmio, que também apresenta característica lipofílica (Chen *et al.*, 2021).

O aumento do tamanho celular e a característica lipofílica do MeHg, nos levou a investigar se este metal pesado induziu à esteatose. As análises demonstraram que houve um aumento no número de gotículas lipídicas no citoplasma dos hepatócitos em embriões expostos ao MeHg (2.146 gotículas $\pm 75,67$), quando comparados ao grupo controle (1.118 gotículas $\pm 45,41$ $p < 0,0001$), sendo em média por área do fígado amostrado. Adicionalmente, houve um aumento no número de hepatócitos com gotículas lipídicas em embriões expostos ao MeHg ($29,78$ hepatócitos $\pm 0,97$), quando comparados ao grupo controle ($18,01$ hepatócitos $\pm 0,63$ $p < 0,001$). Além disso, observou-se que as gotículas

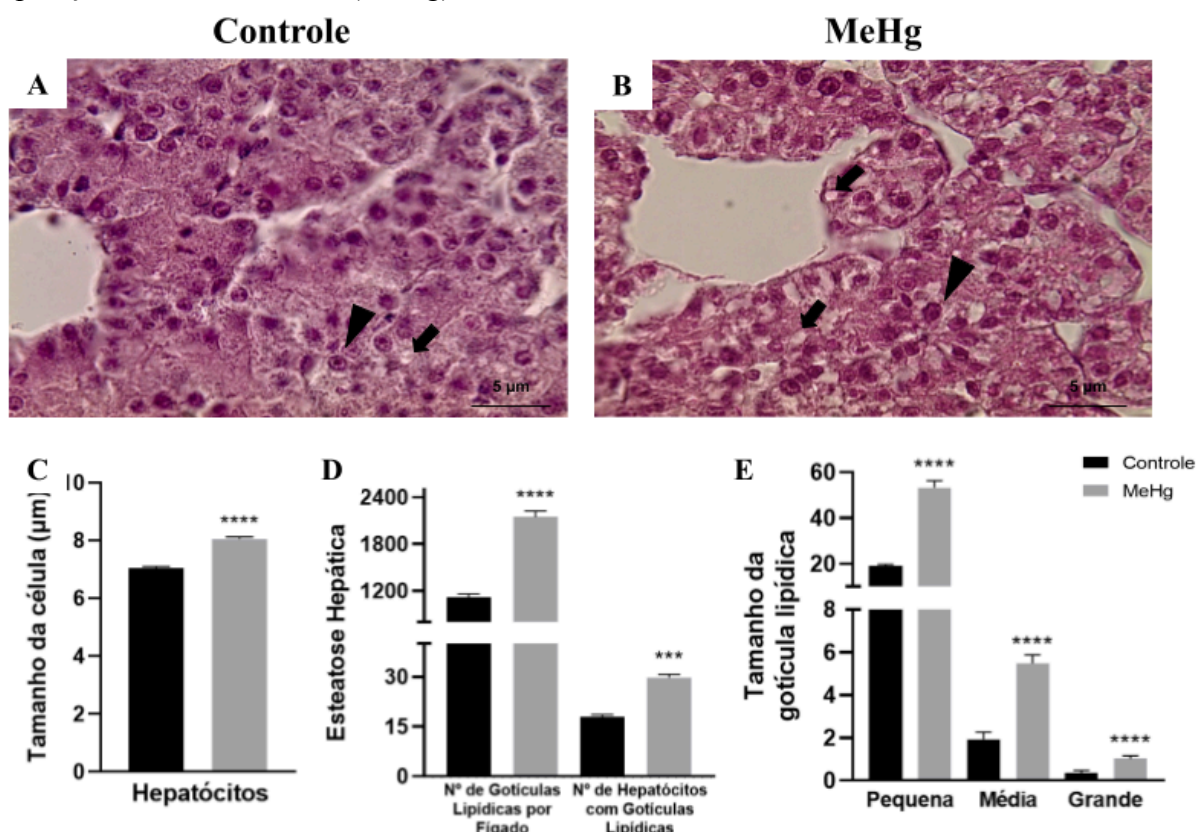
lipídicas não eram homogêneas e que o MeHg induziu ao aumento no número de gotículas lipídicas por tamanho (tabela 1 e figura 8).

Tabela 1: Análise da presença de lipídios no fígado apresentada pelo número de gotículas lipídicas de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

	Controle	MeHg
Gotículas pequenas (1 μm)	18,80 \pm 0,83	53,29 \pm 3,08****
Gotículas médias (3 μm)	1,93 \pm 0,33	5,48 \pm 0,40****
Gotículas grandes (5 μm)	0,36 \pm 0,12	1,02 \pm 0,14****

****p < 0,0001, quando comparado ao grupo controle. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 8: Análise dos hepatócitos de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

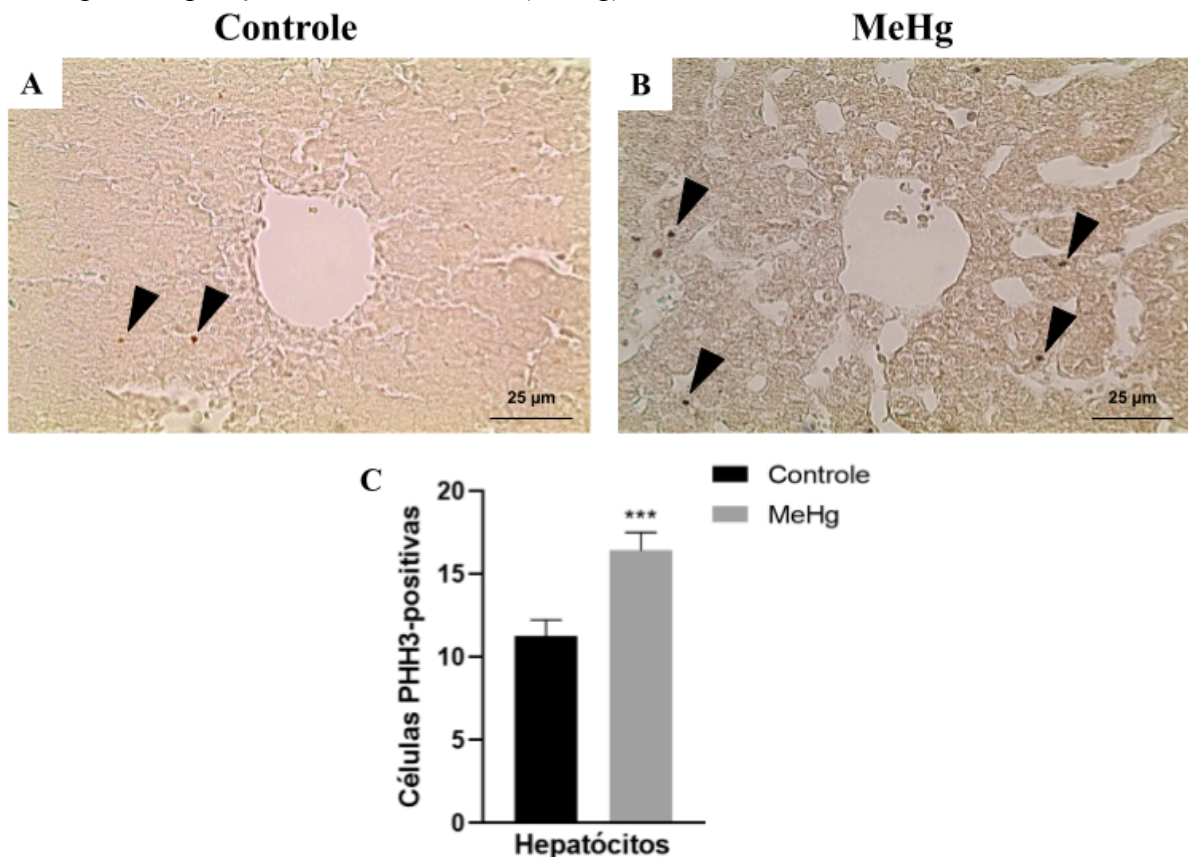


(A, B) coloração HE. Cabeça de seta representam hepatócitos e setas representam hepatócitos com gotículas lipídicas. ***p < 0,001, ****p < 0,0001, quando comparado ao grupo controle. Fonte: elaborado pelo autor.

O aumento de gordura nos hepatócitos, pode estar relacionado a uma desregulação do metabolismo lipídico (Chen *et al.*, 2021). Essa desregulação compromete o desenvolvimento do fígado e de outros órgãos. Estudos mostram que a exposição ao MeHg reduz a capacidade aeróbica muscular e a oxidação de ácidos graxos, diminuindo a resistência muscular a longo prazo, dificultando o fornecimento constante de energia e oxigênio (Ronconi-Krüger *et al.*, 2022; Seewagen *et al.*, 2022). Assim a não metabolização de triglicerídeos que podem ser utilizados como fornecimento de energia a longo prazo pode impactar no desenvolvimento do indivíduo.

Em estudos de toxicidade a análise da proliferação celular é uma ferramenta que auxilia na avaliação de alterações teciduais. Neste estudo foi observado um aumento no número de hepatócitos em proliferação nos embriões expostos ao MeHg (16,40 células PHH3-positivas \pm 1,09), quando comparados ao grupo controle (11,27 células PHH3-positivas \pm 0,97 $p < 0,001$). A proteína PHH3 age na condensação da cromatina no processo do ciclo celular, especificamente na mitose, ou fase M (Hendzel *et al.*, 1997; Miyaoka *et al.*, 2012). Estudos de exposição ao MeHg em outros órgãos mostraram que a exposição ao MeHg diminui a proliferação celular (Burke *et al.*, 2006; Ronconi-Krüger *et al.*, 2022). Entretanto, o fígado respondeu de maneira contrária, assim o aumento da proliferação nas células hepáticas pode ser decorrente da alta capacidade regenerativa dos hepáticos, quando lesionados tendem a se recuperarem rapidamente (Overturf *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2019). Outros fatores podem estar associados também, trabalhos indicam que o estresse oxidativo está mais presente em células em proliferação (Burke *et al.*, 2006), uma vez que processos oxidativos também são responsáveis pela metabolização de substâncias lipofílicas, para transformá-las em hidrossolúveis (Junqueira e Carneiro, 2017) (**figura 9**).

Figura 9: Análise dos hepatócitos em proliferação em embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



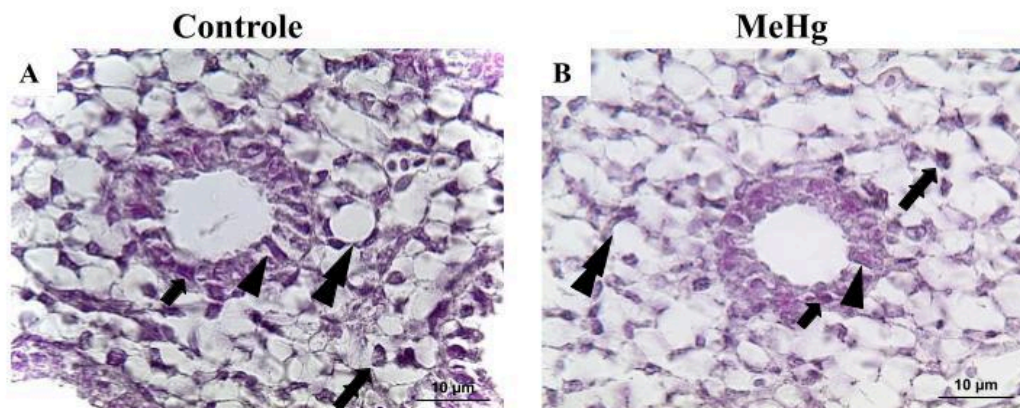
(A, B) imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-PHH3 para células em proliferação. Contagem através da graticula de Weibel n° 2 – M42. Cabeça de seta representam hepatócitos PHH3-positivas. *** $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

4.2 EFEITO DO MeHg EM ESTRUTURAS ENDODÉRMICAS PULMONAR

A partir da análise histológica do pulmão (**figura 10**), foi possível observar células mesenquimais e vasos sanguíneos distantes dos brônquios. Além disso, os brônquios apresentaram lúmen de diferentes tamanhos, no qual é possível identificar os tipos de células endodérmicas epiteliais distintas, colunar e cúbica. Durante o desenvolvimento embrionário de *G. domesticus*, a traqueia se ramifica em brônquios primários, que se subdividem em brônquios secundários e terciários (Maina, 2003). À medida que a maturação dos brônquios ocorre, os vasos sanguíneos e as ramificações menores dos brônquios se aproximam. Durante o desenvolvimento embrionário em humanos, o pulmão passa por diferentes estágios de maturação: pseudoglandular, canalicular, sacular e alveolar (Moore *et al.*, 2015; Junqueira e Carneiro, 2017; Moore *et al.*, 2020). Para o desenvolvimento de aves, esses estágios não

foram estabelecidos, mas por semelhança histológica, pode-se definir que em E10, o pulmão dos embriões de aves corresponde ao estágio de maturação pseudoglandular. Neste estágio em aves, ocorre ramificação e diferenciação das células epiteliais colunares em células cúbicas (Joshi e Kotecha, 2007).

Figura 10: Organização do tecido pulmonar de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



Cabeça de setas representam as células epiteliais colunares, setas pretas representam as células epiteliais cúbicas, dupla setas representam as células mesenquimais e dupla cabeça de setas representam as células endoteliais e vasos sanguíneos se aproximando dos brônquios terciários. **Fonte:** elaborado pelo autor.

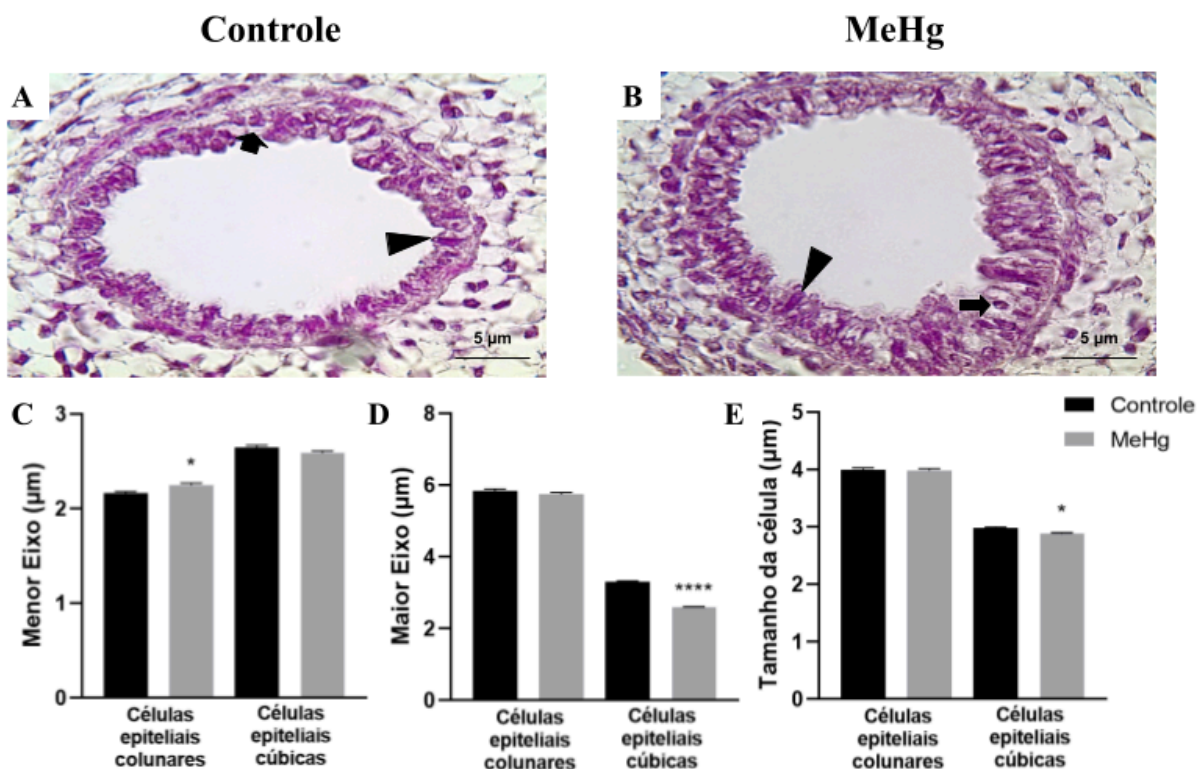
A partir da identificação de tipos de células endodérmicas epiteliais distintas, foram realizadas morfometrias para esses tipos celulares. Os resultados indicam que embriões expostos ao MeHg apresentam alteração no menor eixo das células epiteliais colunares e alteração no maior eixo das células epiteliais cúbicas, no qual impactou diretamente o tamanho desse tipo celular, quando comparados ao grupo controle (**tabela 2 e figura 11**).

Tabela 2: Morfometria das células epiteliais colunares e cúbicas de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

	Células epiteliais colunares		Células epiteliais cúbicas	
	Controle	MeHg	Controle	MeHg
Menor eixo	2,16 µm ± 0,02	2,25 µm ± 0,02*	2,65 µm ± 0,02	2,59 µm ± 0,02
Maior eixo	5,84 µm ± 0,06	5,74 µm ± 0,06	3,30 µm ± 0,03	2,59 µm ± 0,02****
Tamanho da célula	4,00 µm ± 0,03	3,99 µm ± 0,03	2,98 µm ± 0,02	2,88 µm ± 0,02*

*p < 0,05, ****p < 0,0001, quando comparado ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Figura 11: Análise das células epiteliais colunares e cúbicas de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

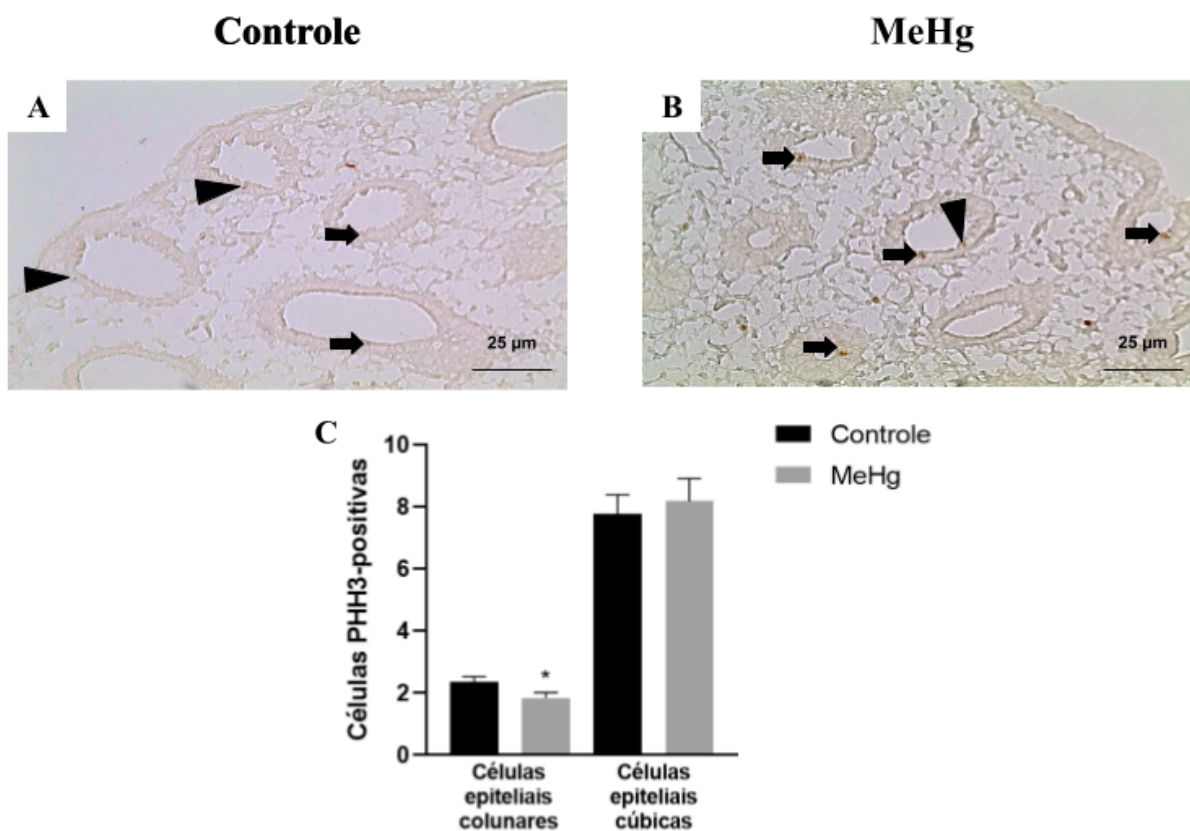


(A, B) coloração HE. Cabeça de seta representam células epiteliais colunares e setas representam células epiteliais cúbicas. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, quando comparado ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo o autor.

Durante o desenvolvimento embrionário, a diferenciação das células epiteliais colunares em cúbicas ocorre no epitélio dos brônquios, principalmente durante o estágio pseudoglandular, às células epiteliais colunares além de diferenciarem nas células epiteliais cúbicas, elas darão origem às células do epitélio dos brônquios (células secretoras, células ciliadas e células caliciformes), enquanto as células epiteliais cúbicas darão origem às células que auxiliam a troca gasosa (pneumócitos tipo I e tipo II) (Herriges e Morrisey, 2014). Por mais que as células epiteliais cúbicas apresentem um formato cuboide, nessa idade embrionária, esse tipo celular ainda apresenta um leve alongamento nos embriões do grupo controle, uma vez que são células sucessoras das células epiteliais colunares (Mullassery e Smith, 2015). Entretanto, a redução do maior eixo impactou diretamente na redução do tamanho da célula, tornando as células cúbicas, podendo ser até uma maturação celular antecipada, uma vez que a diferenciação das células epiteliais colunares em cúbicas ocorre durante o estágio pseudoglandular.

Do mesmo modo como foi realizado para o fígado, as alterações encontradas no tamanho das células epiteliais, nos levou a investigar se este metal pesado induziu alterações na proliferação celular desses tipos celulares (**figura 12**). Foi observado que nos embriões expostos ao MeHg, houve diminuição no número de células epiteliais colunares em proliferação do grupo exposto ao MeHg (1,84 células PHH3-positivas \pm 0,17), quando comparados ao grupo controle (2,35 células PHH3-positivas \pm 0,17 $p < 0,05$). Enquanto, as células epiteliais cúbicas não apresentaram alteração no número de células em proliferação do grupo exposto ao MeHg (8,18 células PHH3-positivas \pm 0,73), quando comparados ao grupo controle (7,76 células PHH3-positivas \pm 0,63). A diminuição da proliferação celular das células epiteliais colunares nos embriões expostos ao MeHg pode responder a diferenciação antecipada desse tipo celular em células epiteliais cúbicas, como mostram as alterações morfológicas. Entretanto as colunares também são precursoras de células que formam o epitélio dos brônquios, como as células secretoras, as células ciliadas e as células caliciformes (Tompkins *et al.*, 2011), o que pode impactar em alterações no epitélio dos brônquios, como no diâmetro do lúmen e na ramificação da árvore brônquica. Porém, não foi observada alteração na proliferação das células epiteliais cúbicas. Esse resultado pode ser explicado pelo estágio morfológico de desenvolvimento do pulmão, pois as células epiteliais cúbicas proliferam principalmente no estágio canalicular originando os pneumócitos tipo I e tipo II, presentes no indivíduo adulto e envolvidas no processo de troca gasosa.

Figura 12: Análise das células epiteliais colunares e cúbicas em proliferação em embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



(A, B) imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-PHH3 para células em proliferação. Contagem através da graticula de Weibel nº 2 – M42. Cabeça de seta representam células epiteliais colunares em proliferação e setas representam células epiteliais cúbicas em proliferação. * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

4.2.1 ALTERAÇÕES DO MEHG SOBRE A ÁRVORE BRÔNQUICA

A partir da visualização do lúmen de brônquios da árvore brônquica, foi possível observar brônquios de tamanhos distintos, na qual se percebeu que o diâmetro das ramificações de perfil transversal diversificaram de 1 a 60 µm. Considerando a morfologia e morfometria das ramificações da árvore brônquica, foi estabelecido intervalos para três classes distintas: brônquios primários (BP; 31 µm - 60 µm), brônquios secundários (BS; 16 µm - 30 µm) e brônquios terciários (BT; 1 µm - 15 µm) (**tabela 3** e **figura 13**). A classificação de BP, BS e BT seguiu o padrão estabelecido no trabalho de Maina (2003) para embriões de *G. domesticus* em E10.

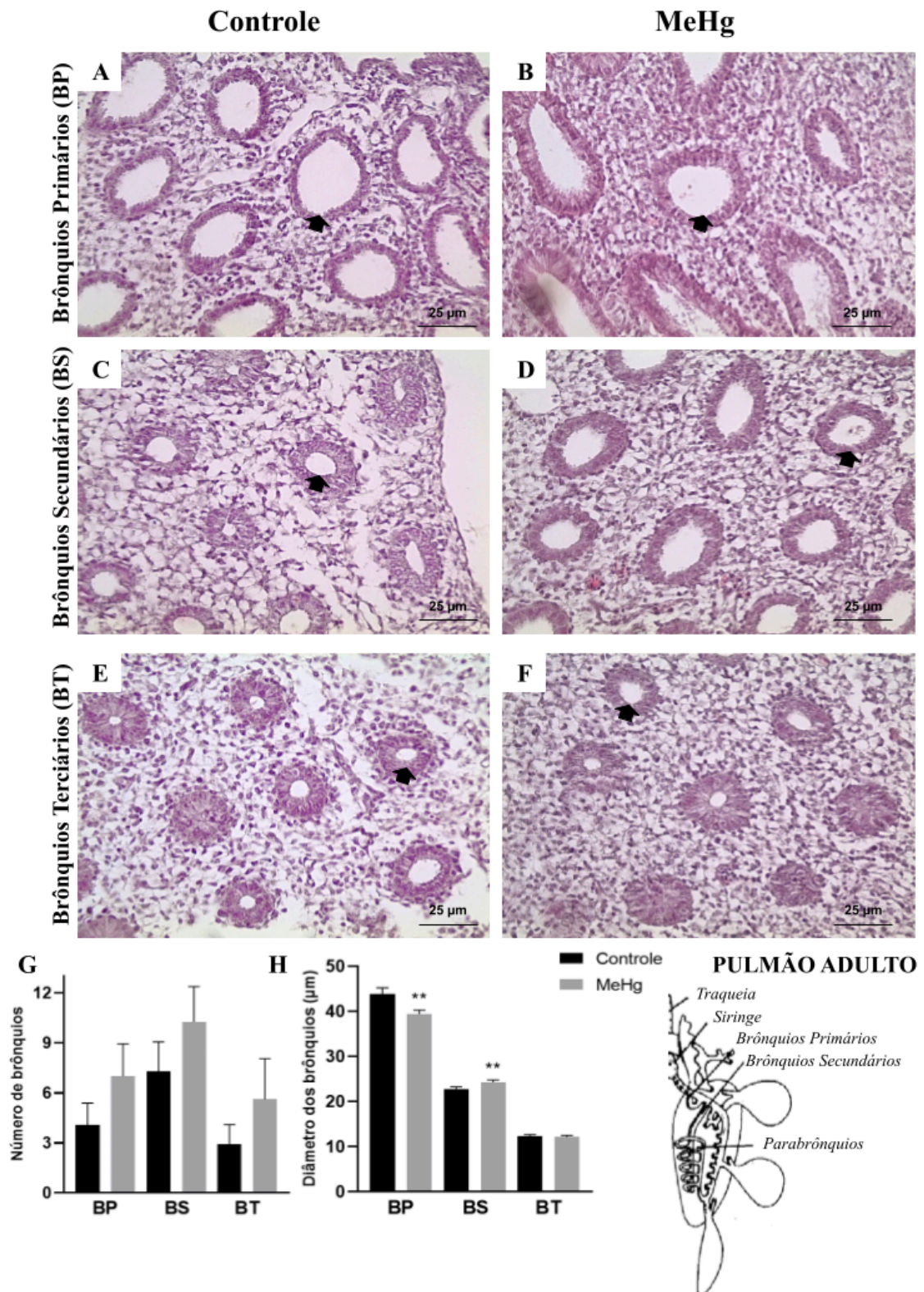
Tabela 3: Diâmetro dos vasos e número de ramificações das classes de brônquios de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

	Diâmetro do lúmen dos brônquios		Número de cortes transversais de brônquios	
	Controle	MeHg	Controle	MeHg
BP	43,83 $\mu\text{m} \pm 1,41$	39,44 $\mu\text{m} \pm 0,82^{**}$	4,07 $\pm 1,31$	7,00 $\pm 1,93$
BS	22,81 $\mu\text{m} \pm 0,48$	24,33 $\mu\text{m} \pm 0,50^{**}$	7,30 $\pm 1,75$	10,25 $\pm 2,12$
BT	12,31 $\mu\text{m} \pm 0,38$	12,14 $\mu\text{m} \pm 0,40$	2,92 $\pm 1,17$	5,62 $\pm 2,42$

p < 0,01, quando comparado ao grupo controle. **Fonte: elaborado pelo autor.

O estágio pseudoglandular é reconhecido pelo processo mais intenso de ramificação da árvore brônquica (Mullassery e Smith, 2015). Estudos mostram que o brotamento dos brônquios terciários já começa por volta de E8-10 (Maina, 2003), o que explica pela média dos BS ser maior do que BT em ambos os grupos. Porém, a exposição ao MeHg não afetou o número de ramificações da árvore brônquica. Além disso, o aumento do BS e a diminuição do BP pode estar diretamente relacionado com a formação prematura das células epiteliais cúbicas e com a diminuição da proliferação das células epiteliais colunares presentes no epitélio dos brônquios nesse estágio embrionário, já que alterações em partes da árvore brônquica durante o desenvolvimento podem resultar em alterações nas vias aéreas, na qual dificulta a respiração e conseqüentemente a troca gasosa após a eclosão do embrião (Mullassery e Smith, 2015). Assim, verificamos que o efeito do MeHg sobre as células endodérmicas presentes na árvore brônquica, impactou no lúmen dos brônquios e não no número de suas ramificações.

Figura 13: Análise dos brônquios pulmonares de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



(A a F) coloração HE. Setas representam os perfis transversais de brônquios. ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

4.2.2 ALTERAÇÕES DO MeHg SOBRE A RAZÃO ENTRE AS CÉLULAS EPITELIAIS

Foram analisados se o número de células epiteliais colunares e cúbicas (**tabelas 4 e 5**) poderia impactar diretamente no diâmetro do lúmen dos brônquios utilizando duas formas: (i) através do número total de células epiteliais e (ii) através do número de células epiteliais em proliferação, ambas contagens separadas por classe de brônquios (**figura 14**).

Tabela 4: Contagem de células epiteliais através da coloração de HE de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

		Controle	MeHg
Células epiteliais colunares	BP	12,40 ± 0,54	9,16 ± 0,58***
	BS	8,81 ± 0,99	7,56 ± 0,50*
	BT	7,61 ± 0,34	6,11 ± 0,34**
Células epiteliais cúbicas	BP	25,90 ± 0,93	28,70 ± 1,04*
	BS	20,41 ± 0,64	22,58 ± 0,64*
	BT	16,40 ± 0,67	17,52 ± 0,78

*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, quando comparado ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Tabela 5: Contagem de células epiteliais através de células PHH3-positivas de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

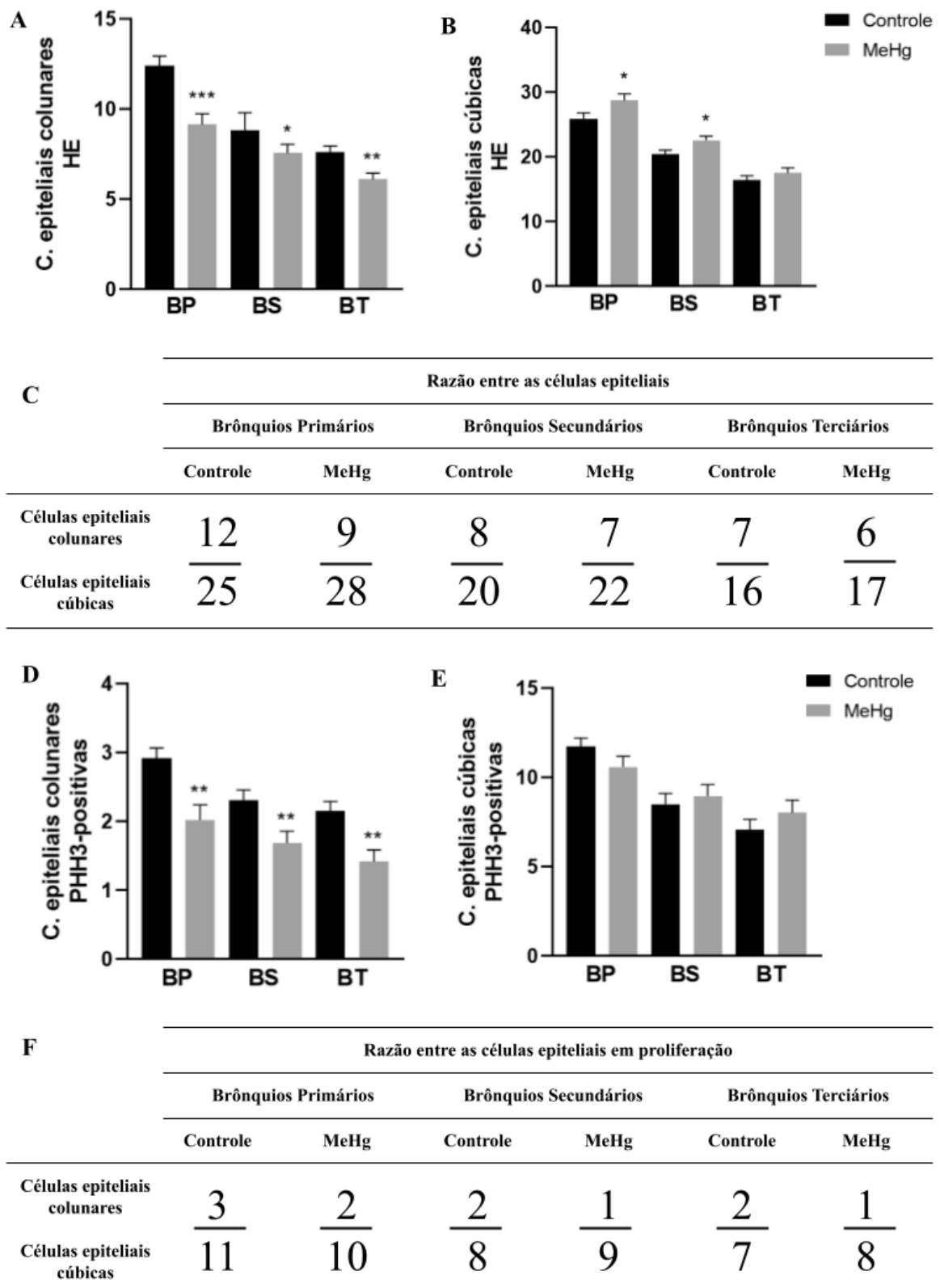
		Controle	MeHg
Células epiteliais colunares	BP	2,92 ± 0,15	2,02 ± 0,22**
	BS	2,31 ± 0,15	1,69 ± 0,17**
	BT	2,15 ± 0,14	1,42 ± 0,17**
Células epiteliais cúbicas	BP	11,74 ± 0,46	10,60 ± 0,60
	BS	8,51 ± 0,60	8,97 ± 0,63
	BT	7,08 ± 0,57	8,02 ± 0,71

p < 0,01, quando comparado ao grupo controle. **Fonte: elaborado pelo autor.

A alteração significativa na diminuição no diâmetro dos BP e o aumento no diâmetro dos BS, pode estar relacionada na quantidade de células presentes no epitélio dos brônquios. A contagem de células epiteliais através de imuno-histoquímica nos dá uma ideia de quantos dessas células estão proliferando em cada classe de brônquios. Com ela podemos perceber que a diminuição da proliferação celular das células epiteliais colunares impactou diretamente no número desse tipo celular que está menor em todas as classes de brônquios. Entretanto, não percebemos uma alteração da proliferação das células epiteliais cúbicas, como já esperado para esse estágio embrionário do pulmão (Mullassery e Smith, 2015), mas nos brônquios de maior diâmetro (BP e BS) dos embriões expostos ao MeHg houve uma maior quantidade desse tipo celular, na qual são brônquios mais antigos, onde a maturação das células epiteliais cúbicas está ocorrendo a mais tempo.

Assim, o aumento na quantidade de células epiteliais cúbicas e a diminuição de células epiteliais colunares, não se mostrou responsiva sobre a alteração do diâmetro do lúmen dos BP e BS, pois em ambas as classes aumentam o número total de células epiteliais cúbicas. Então, aceitamos que o efeito no diâmetro do lúmen dos brônquios de embriões expostos ao MeHg pode ser decorrente das alterações morfométricas das células epiteliais e nos processos de diferenciação envolvidos.

Figura 14: Razão entre as células epiteliais totais e em proliferação no pulmão de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

4.3 EFEITO DO MeHg EM ESTRUTURAS MESODÉRMICAS HEPÁTICAS E PULMONARES

Após a análise histológica das estruturas mesodérmicas de embriões de *G. domesticus* em E10, não foi possível distinguir veias e artérias no fígado e no pulmão, devido à similaridade morfológica dessas estruturas em estágio embrionário. Assim, adotamos a nomenclatura "vasos sanguíneos" para descrever as estruturas vasculares observadas e apresentadas nos resultados a seguir.

4.3.1 ALTERAÇÕES DO MeHg NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

A partir da identificação das alterações nas estruturas e células endodérmicas, foram realizadas morfometrias para as células mesodérmicas. Os resultados indicam que embriões expostos ao MeHg apresentam alteração no menor eixo, maior eixo e conseqüentemente no tamanho das células endoteliais hepáticas. Enquanto nas células endoteliais pulmonares, os resultados indicam que embriões expostos ao MeHg apresentam alteração do menor eixo e no tamanho da célula, quando comparados ao grupo controle (**tabela 6**).

Tabela 6: Morfometria das células endoteliais hepáticas e pulmonares de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

	Células endoteliais hepáticas		Células endoteliais pulmonares	
	Controle	MeHg	Controle	MeHg
Menor Eixo	4,31 $\mu\text{m} \pm 0,10$	3,39 $\mu\text{m} \pm 0,09$ ****	2,62 $\mu\text{m} \pm 0,03$	2,84 $\mu\text{m} \pm 0,03$ ****
Maior Eixo	7,30 $\mu\text{m} \pm 0,10$	6,45 $\mu\text{m} \pm 0,08$ ****	6,15 $\mu\text{m} \pm 0,07$	6,25 $\mu\text{m} \pm 0,07$
Tamanho da Célula	5,81 $\mu\text{m} \pm 0,07$	4,88 $\mu\text{m} \pm 0,05$ ****	4,34 $\mu\text{m} \pm 0,04$	4,54 $\mu\text{m} \pm 0,04$ **

p < 0,01, **p < 0,0001, quando comparado ao grupo controle, nos órgãos correspondentes. **Fonte:** elaborado pelo autor.

As células endoteliais são fundamentais para a manutenção do fluxo sanguíneo e evitar o desenvolvimento de lesões e inflamações (Goldenberg e Kuebler 2011; Cerutti e Ridley, 2017). Estudos mostram que alterações nas células endoteliais são indicadores de

alterações no tecido (Kishimoto *et al.*, 1995). A exposição ao MeHg nas células endoteliais nos órgãos respondeu diferentemente, no tecido hepático causou atrofia celular - diminuição total da célula, enquanto no tecido pulmonar causou uma hipertrofia celular - aumento total da célula. A resposta diferente pode ser devido à metabolização do fígado, uma vez que as células endoteliais hepáticas diminuíram de tamanho, o que provavelmente possibilitou a passagem do MeHg da circulação sanguínea para os tecidos, levando a alterações morfológicas significativas. Enquanto no pulmão, o aumento do menor eixo influencia diretamente na permeabilidade seletiva das células endoteliais, uma forma de impedir que o MeHg aumente a intoxicação no tecido. Entretanto, se esse espessamento continuar após a eclosão dos embriões de *G. domesticus*, também pode dificultar as trocas gasosas, uma vez que a troca gasosa terá uma barreira maior para o oxigênio chegar na corrente sanguínea.

4.3.2 ALTERAÇÕES DO MEHG NOS VASOS SANGUÍNEOS

A partir da visualização do lúmen dos vasos sanguíneos hepáticos e pulmonares, foi possível observar vasos sanguíneos de perfil transversal de tamanhos distintos, na qual se percebeu que se diversificaram de 0,8 a 89,0 μm . Considerando a morfologia e morfometria das vasos sanguíneos de perfil transversal, foi estabelecido intervalos para três classes distintas: classe 1 (C1 - 0 μm - 29 μm), classe 2 (C2 - 30 μm - 59 μm), classe 3 (C3 - 60 μm - 89 μm) (tabelas 7 e 8) (figuras 15 e 16).

Tabela 7: Diâmetro dos vasos e número de classes de vasos sanguíneos hepáticos de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

	Diâmetro do lúmen dos vasos sanguíneos hepáticos		Número de cortes transversais de vasos sanguíneos hepáticos	
	Controle	MeHg	Controle	MeHg
C1	11,61 $\mu\text{m} \pm 0,32$	13,43 $\mu\text{m} \pm 0,37^{***}$	23,22 $\pm 1,97$	15,78 $\pm 2,43^*$
C2	43,26 $\mu\text{m} \pm 2,09$	45,60 $\mu\text{m} \pm 1,85$	2,5 $\pm 0,62$	2,62 $\pm 0,96$
C3	70,58 $\mu\text{m} \pm 2,06$	69,37 $\mu\text{m} \pm 2,40$	1,50 $\pm 0,18$	1,42 $\pm 0,29$

*p < 0,05, ***p < 0,001, quando comparado ao grupo controle, nos órgãos correspondentes. **Fonte:** elaborado pelo autor.

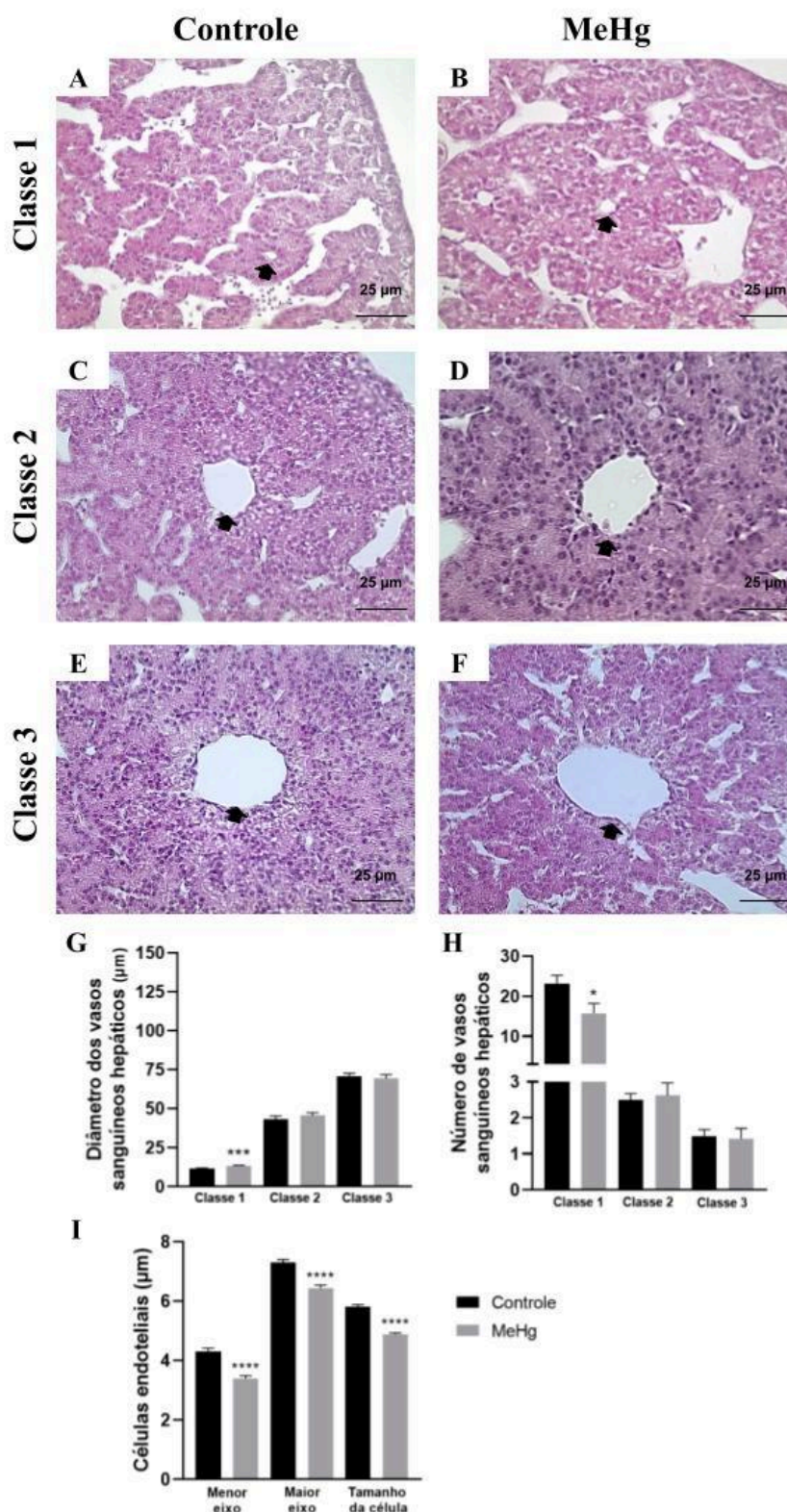
Tabela 8: Diâmetro dos vasos e número de classes de vasos sanguíneos pulmonares de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

	Diâmetro do lúmen dos vasos sanguíneos pulmonares		Número de cortes transversais de vasos sanguíneos pulmonares	
	Controle	MeHg	Controle	MeHg
C1	12,71 $\mu\text{m} \pm 0,18$	13,57 $\mu\text{m} \pm 0,18^{***}$	49,00 $\pm 3,00$	49,86 $\pm 6,16$
C2	34,77 $\mu\text{m} \pm 2,74$	37,45 $\mu\text{m} \pm 1,57$	1,25 $\pm 0,25$	1,80 $\pm 0,37$

***p < 0,001, quando comparado ao grupo controle, nos órgãos correspondentes. **Fonte:** elaborado pelo autor.

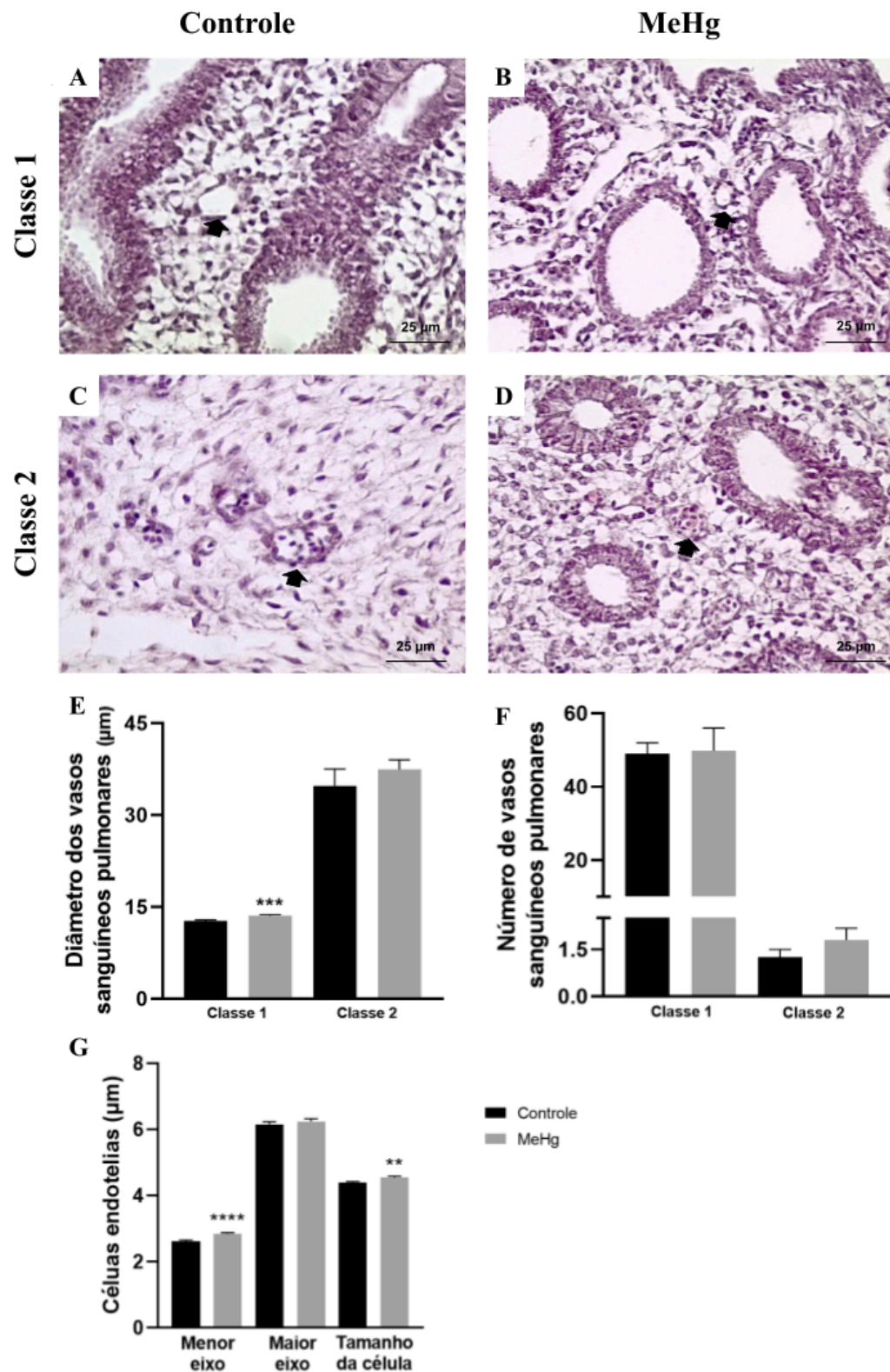
A alteração no diâmetro dos vasos sanguíneos hepáticos e pulmonares da C1 de ambos os órgãos pode ser decorrente das alterações do tamanho celular das células endoteliais, por mecanismos de vasodilatação. Estudos em outros órgãos demonstram que o MeHg induziu hipóxia, na qual a vasodilatação em pequenos vasos supriria a demanda de oxigênio e nutrientes (Gladwin *et al.*, 2005; Cyr *et al.*, 2020; Ronconi-Krüger *et al.*, 2024). Além disso, a vasodilatação hepática nos embriões expostos ao MeHg, pode estar relacionado a atrofia das células endoteliais hepática e uma maior produção de óxido nítrico como já mostrado em estudos de exposição ao MeHg em outros órgãos (Ronconi-Krüger *et al.*, 2022; Ronconi-Krüger *et al.*, 2024), uma vez que uma maior permeabilidade desse tipo celular e uma vasodilatação induzida pelo óxido nítrico, possibilita uma maior filtragem do MeHg para que detoxificação ocorra nos hepatócitos. Entretanto, uma maior vasodilatação nos vasos sanguíneos pulmonares pode auxiliar em uma futura maior superfície de contato entre vaso/parabrônquio. Assim, quanto maior a área de superfície entre o parabrônquio e o vaso sanguíneo, maior a quantidade de oxigênio para a troca gasosa.

Figura 15: Análise dos vasos sanguíneos no tecido hepático de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



(A a F) coloração HE. Setas representam os perfis transversais de vasos sanguíneos. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, quando comparado ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Figura 16: Análise dos vasos sanguíneos no tecido pulmonar de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

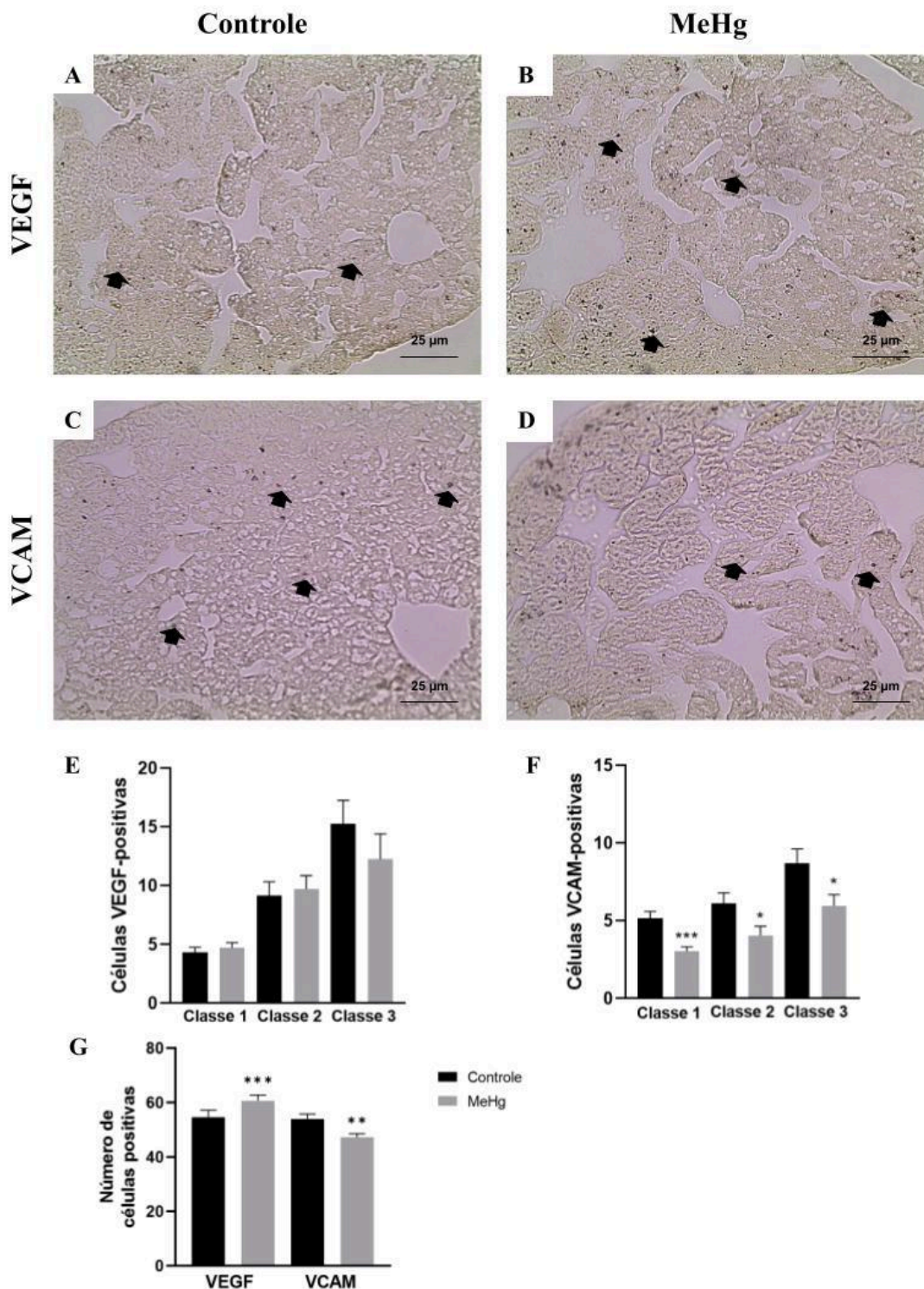


(A a D) coloração HE. Setas representam os perfis transversais de vasos sanguíneos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, quando comparado ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

4.3.3 ALTERAÇÕES DO MeHg NA FORMAÇÃO E INTEGRIDADE DOS VASOS SANGUÍNEOS

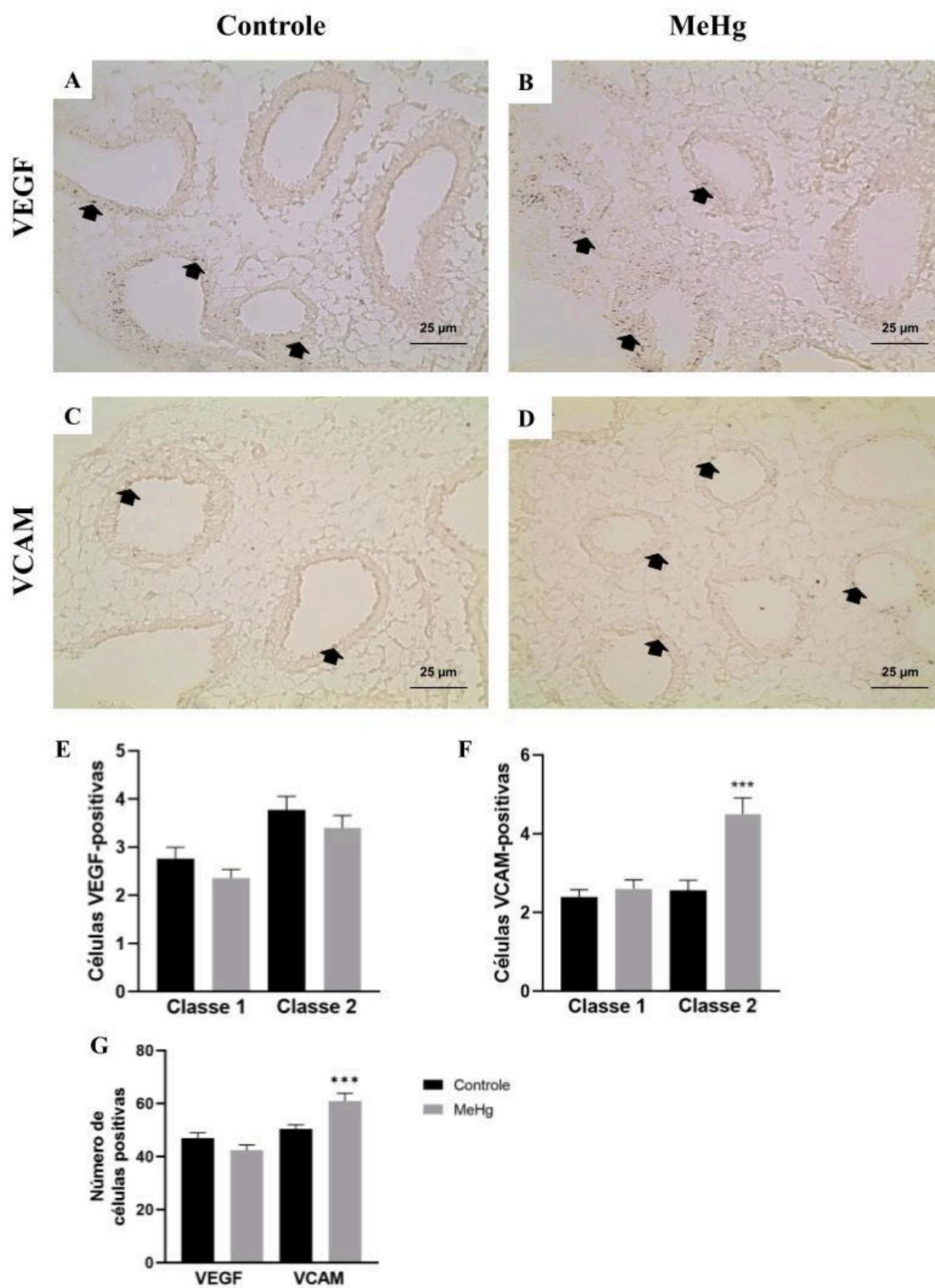
Após identificarmos alterações no diâmetro dos vasos sanguíneos hepáticos e pulmonares, avaliamos proteínas relacionadas à formação (VEGF) e integridade vascular (VCAM) (**figuras 17 e 18**). No tecido hepático, embriões expostos ao MeHg apresentaram aumento significativo nas marcações de VEGF do grupo exposto ao MeHg (60,72 células VEGF-positivas \pm 2,05), quando comparados ao grupo controle (54,70 células VEGF-positivas \pm 2,5 $p < 0,001$). Para as marcações de VCAM, foi observada uma diminuição significativa do grupo exposto ao MeHg (47,23 células VCAM-positivas \pm 1,34), quando comparados ao grupo controle (54,06 células VCAM-positivas \pm 1,69 $p < 0,01$). No tecido pulmonar, embriões expostos ao MeHg não apresentaram mudança significativa nas marcações de VEGF do grupo exposto ao MeHg (42,48 células VEGF-positivas \pm 1,95), quando comparados ao grupo controle (46,90 células VEGF-positivas \pm 2,11). Entretanto, embriões expostos ao MeHg apresentaram aumento significativa nas marcações de VCAM do grupo exposto ao MeHg (60,94 células VCAM-positivas \pm 2,99), quando comparados ao grupo controle (50,44 células VCAM-positivas \pm 1,56 $p < 0,001$). Estudos demonstram que alterações nas células endoteliais provocam aumento na produção de óxido nítrico e vasodilatação nos vasos sanguíneos (Gladwin *et al.*, 2005; Ronconi-Krüger *et al.*, 2024), como também encontrado neste estudo. A vasodilatação pode desencadear processos de vasculogênese e angiogênese para compensar processos inflamatórios e diminuição de oxigênio (Wautier e Wautier, 2022; Ronconi-Krüger *et al.*, 2024). Assim, resolvemos avaliar a quantidade de células marcadas próximas aos vasos sanguíneos separados por classe, para ver se a vasodilatação da C1 no tecido hepático e pulmonar (**tabelas 9 e 10**).

Figura 17: Análise por imuno-histoquímica das células VEGF- e VCAM-positivas nos vasos sanguíneos hepáticos de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



(A, B) Setas representam células VEGF-positivas. (C, D) Setas representam células VCAM-positivas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle com o grupo MeHg. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Figura 18: Análise por imuno-histoquímica das células VEGF- e VCAM-positivas nos vasos sanguíneos pulmonares de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



(A, B) Setas representam células VEGF-positivas. (C, D) Setas representam células VCAM-positivas. *** $p < 0,001$, quando comparado o grupo controle com ao grupo MeHg. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Tabela 9: Análise das células VEGF- e VCAM-positivas nos vasos sanguíneos hepáticos de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

	Células VEGF-positivas		Células VCAM-positivas	
	Controle	MeHg	Controle	MeHg
C1	4,32 ± 0,43	4,71 ± 0,43	5,17 ± 0,43	3,03 ± 0,29***
C2	9,14 ± 1,2	9,7 ± 1,16	6,11 ± 0,68	4,05 ± 0,59*
C3	15,28 ± 1,97	12,24 ± 2,16	8,68 ± 0,94	5,95 ± 0,73*

*p < 0,05, ***p < 0,001, quando comparado o grupo controle com o grupo MeHg. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Tabela 10: Análise das células VEGF- e VCAM-positivas nos vasos sanguíneos pulmonares de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

	Células VEGF-positivas		Células VCAM-positivas	
	Controle	MeHg	Controle	MeHg
C1	2,76 ± 0,24	2,36 ± 0,18	2,4 ± 0,18	2,6 ± 0,23
C2	3,77 ± 0,29	3,4 ± 0,26	2,56 ± 0,26	4,5 ± 0,41***

***p < 0,001, quando comparado o grupo controle com o grupo MeHg. **Fonte:** elaborado pelo autor.

No tecido hepático, células próximas aos vasos da C1, C2 e C3 apresentaram um alteração da marcação por VCAM, o que pode estar induzindo a vasodilatação da C1. Enquanto no tecido pulmonar, a vasodilatação dos vasos da C1 não parece estar extremamente ligada à desregulação dessas moléculas, mas sim a C2, classe de vasos maiores e mais bem definidos de tamanho.

4.4 EFEITO DO MeHg NO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS, POLISSACARÍDEOS NEUTROS E ÁCIDOS

Nas análise dos conteúdos de proteínas totais, polissacarídeos neutros e ácidos (tabela 11 e figuras 19 e 20), os embriões expostos ao MeHg apresentaram mudanças significativas nas reações histoquímicas para essas três biomoléculas, quando comparados ao grupo controle.

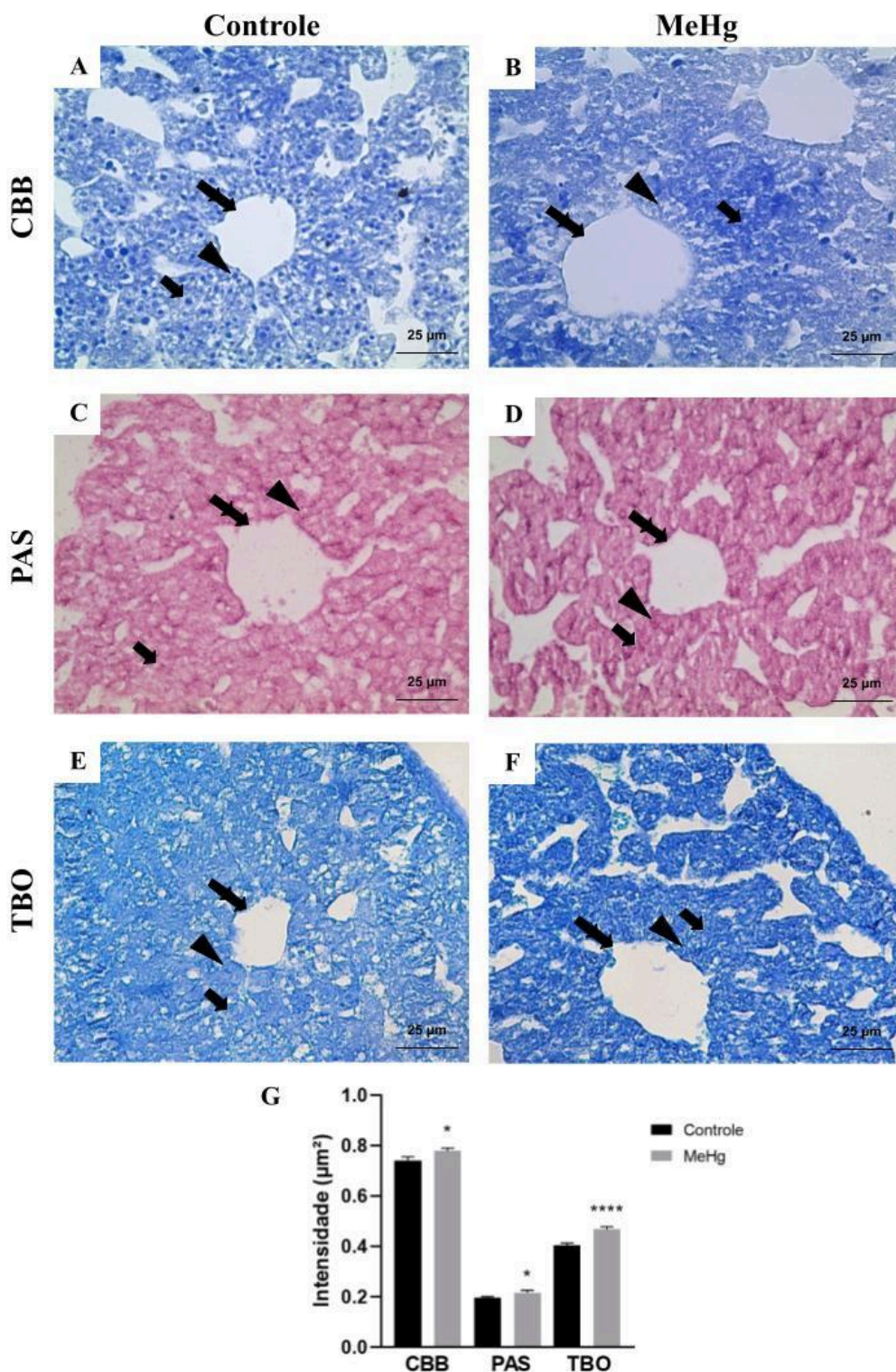
Tabela 11: Densidade óptica de proteínas totais, polissacarídeos neutros e ácidos, por área do tecido hepático e pulmonar de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).

	Fígado		Pulmão	
	Controle	MeHg	Controle	MeHg
Proteínas totais	0,742 μm^2 $\pm 0,014$	0,779 μm^2 $\pm 0,011^*$	0,986 μm^2 $\pm 0,009$	0,957 μm^2 $\pm 0,010^*$
Polissacarídeos neutros	0,195 μm^2 $\pm 0,006$	0,217 μm^2 $\pm 0,009^*$	0,366 μm^2 $\pm 0,005$	0,444 μm^2 $\pm 0,008^{****}$
Polissacarídeos ácidos	0,405 $\mu\text{m}^2 \pm$ 0,009	0,468 $\mu\text{m}^2 \pm$ 0,011 ^{****}	1,181 μm^2 $\pm 0,016$	1,720 μm^2 $\pm 0,020^{****}$

* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, quando comparado ao grupo controle, nos órgãos correspondentes. **Fonte:** elaborado pelo autor.

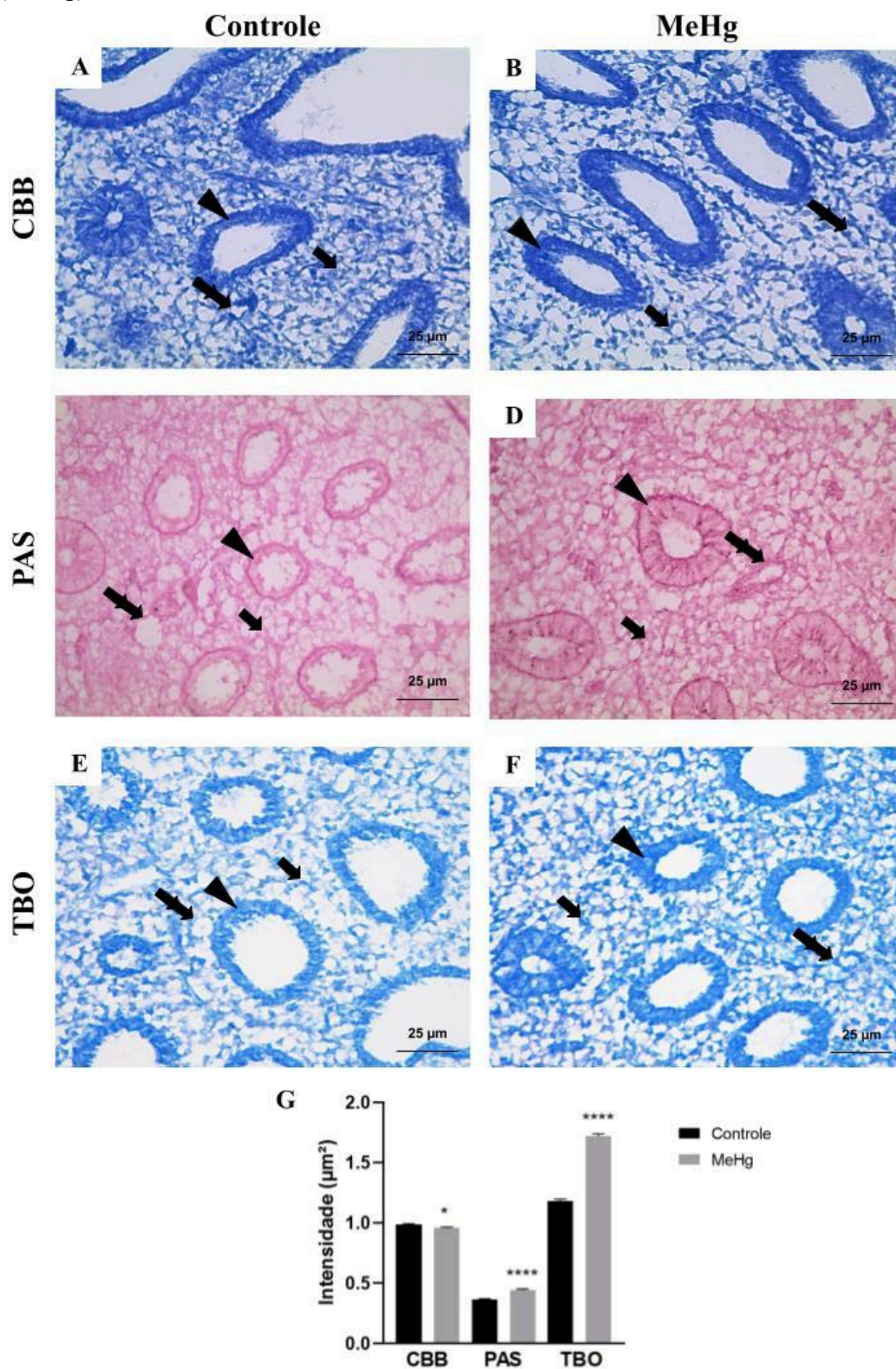
Foi observado alterações na reação com proteínas totais principalmente na região dos hepatócitos adjacentes aos vasos sanguíneos. O estudo de Mochizuki e Furukawa (1987) em cultura de hepatócitos demonstra que a reação com CBB mostra-se uma boa ferramenta para avaliar proteínas no tecido hepático. Os resultados demonstraram que houve um aumento do tamanho dos hepatócitos e da sua proliferação celular, o que pode estar relacionado com aumento dos componentes do citoesqueleto, já que os hepatócitos apresentam hipertrofia celular e também podendo ter um aumento na produção de proteínas envolvidas no processo de divisão celular, como as ciclinas e as tubulinas (Alberts *et al.*, 2017). Enquanto no tecido pulmonar, nossos resultados demonstraram que houve diminuição significativa na reação com proteínas totais, principalmente nas células mesenquimais, o que pode estar relacionado com uma provável desregulação de processos intracelulares essenciais para o desenvolvimento, como sinalização, proliferação e diferenciação (Herriges e Morrissey, 2014).

Figura 19: Conteúdo de proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos essenciais no tecido hepático de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



Dupla seta representa vasos sanguíneos, cabeça de seta representa hepatócitos adjacentes e cabeça de seta representa hepatócitos não-adjacentes. *p < 0,05, ****p < 0,0001, quando comparado ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

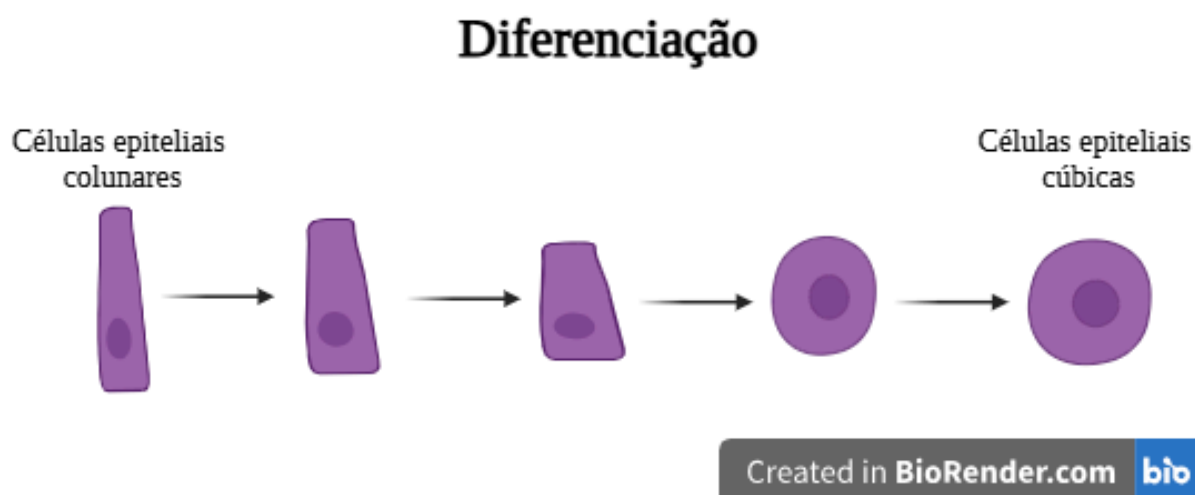
Figura 20: Conteúdo de proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos essenciais no tecido pulmonar de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



Dupla seta representa vasos sanguíneos, cabeça de seta representa brônquios e cabeça de seta representa células mesenquimais. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, quando comparado ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Para a reação de PAS, foi observado que houve aumento significativo na reação com polissacarídeos neutros, principalmente nos hepatócitos adjacentes aos vasos sanguíneos. Estudos apontam que no tecido hepático, o glicogênio, um polissacarídeo neutro presente nos hepatócitos na forma de agregados no citoplasma que geralmente estão associados ao retículo endoplasmático liso, são fatores de diferenciação das células hepáticas (Warren e Hamilton, 1981; Suksaweang *et al.*, 2004). Nossos resultados demonstram que o MeHg pode ter induzido uma desregulação desse polissacarídeo, o que pode estar relacionado com a diferenciação dos hepatócitos, uma vez que os mais alterados são os hepatócitos adjacentes aos vasos sanguíneos. No tecido pulmonar, foi observado que houve um aumento significativo na reação com polissacarídeos neutros, principalmente nos perfis transversais de brônquios, onde se encontram as células epiteliais. O glicogênio tem um papel fundamental induzindo a diferenciação das células epiteliais cúbicas em pneumócitos tipo I e tipo II, no estágio morfológico canalicular em mamíferos (Andreeva *et al.*, 2007; Agassandian e Mallampalli, 2013; Mullassery e Smith, 2015). A maior presença de glicogênio encontrada neste estudo, pode estar relacionada com a maior produção realizada pelas células epiteliais cúbicas, o que vai ao encontro com os resultados morfométricos deste trabalho, no qual foi observado que o MeHg pode ter induzido a diferenciação das células epiteliais colunares (com o aumento do menor eixo) em cúbicas (com a diminuição do maior eixo e do tamanho celular) (**figura 21**).

Figura 21: Representação da diferenciação das células epiteliais de embriões de *Gallus domesticus* em E10, após a exposição ao metilmercúrio (MeHg).



Fonte: elaborado pelo autor.

Para a reação de TBO, os polissacarídeos ácidos presentes no tecido hepático geralmente estão relacionados a componentes da matriz extracelular (Frantz *et al.*, 2010). Este estudo demonstrou que houve um aumento significativo na reação com polissacarídeos ácidos, o que pode estar relacionado ao tamanho celular. Isso se deve ao fato de que os polímeros da matriz extracelular são produzidos no meio intracelular (Alberts *et al.*, 2017). Enquanto no tecido pulmonar, estudos mostram que o aumento da intensidade de polissacarídeos ácidos é decorrente de uma maior quantidade de surfactante, uma substância lipoproteica com um grupamento ácido, que é produzido pelos pneumócitos tipo II (Jozsa e Reffy, 1975; Moore *et al.*, 2015). O surfactante auxilia na diminuição da tensão superficial do alvéolo (em mamíferos) e do parabrônquio (em aves) (Fehrenbach, 2001; Bjørnstad *et al.*, 2014). Porém, em E10 de *G. domesticus*, ainda não é possível a identificação desse tipo celular e conseqüentemente essa lipoproteína, pois no estudo de Bjørnstad, *et al.* (2014) é apontado que a produção de surfactante só começa perto da eclosão (em E17). Entretanto, em mamíferos, o glicogênio presente nas células epiteliais cúbicas é consumido no estágio canalicular para a produção de surfactante pelos pneumócitos tipo II e para a diferenciação entre os pneumócitos (Andreeva *et al.*, 2007; Agassandian e Mallampalli, 2013; Mullasery e Smith, 2015). Assim, o MeHg pode ter induzido a produção de glicogênio, que participa como um dos precursores na síntese de surfactante.

5 CONCLUSÃO

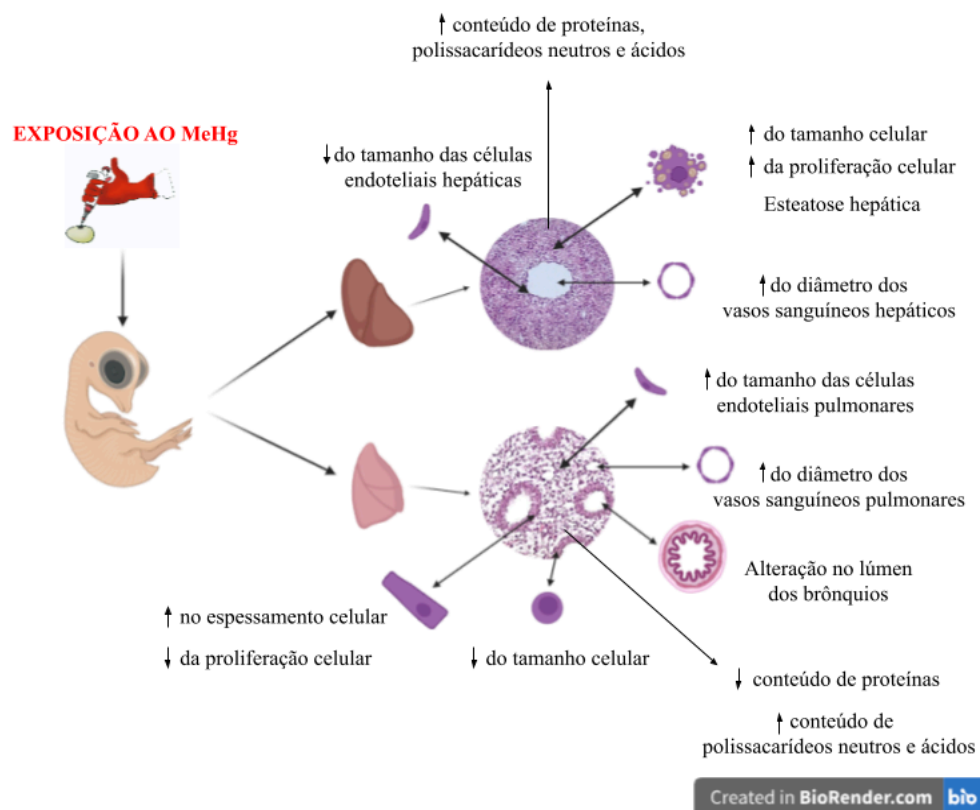
A exposição ao MeHg mostrou efeitos significativos tanto nas células de origem endodérmica quanto mesodérmica nos tecidos hepático e pulmonar em embriões de *G. domesticus*.

No fígado, houve aumento celular e acúmulo de gotículas lipídicas, resultando em esteatose hepática, além de aumentar o conteúdo de proteínas e polissacarídeos.

No pulmão, o MeHg induziu diminuição das células epiteliais cúbicas e a diminuição da proliferação das células epiteliais colunares, associada a redução do número total das células epiteliais colunares e aumento das células epiteliais cúbicas, impactando os brônquios primários e secundários.

Tanto no fígado quanto no pulmão, o MeHg induziu aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos e afetou o tamanho das células endoteliais de forma diferencial em ambos os órgãos.

Figura 22: Resumo gráfico da toxicidade do metilmercúrio (MeHg) no fígado e pulmões de embriões de *Gallus domesticus* em E10.



Figuras não apresentadas em escala. **Fonte:** elaborado pelo autor.

REFERÊNCIAS

- Achatz, R. W., de Vasconcellos, A. C. S., Pereira, L., Viana, P. V. D. S., & Basta, P. C. (2021). Impacts of the goldmining and chronic methylmercury exposure on the good-living and mental health of Munduruku native communities in the Amazon Basin. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(17), 8994.
- Agassandian, M., & Mallampalli, R. K. (2013). Surfactant phospholipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(3), 612-625.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter P., Wilson, J., & Hunt, T. (2017). *Biologia molecular da célula*. Artmed Editora. pp. 1464.
- Andreeva, A. V., Kutuzov, M. A., & Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2007). Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(2), L259-L271.
- Barbosa, M. S., Carvalho, D. P., Gravena, W., de Almeida, R., Mussu, M. H., Sousa, E. A., Holanda, I. B. B., de Sousa-Filho, I. F., & Bastos, W. R. (2021). Total mercury and methylmercury in river dolphins (Cetacea: Iniidae: *Inia* spp.) in the Madeira River Basin, Western Amazon. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 45121-45133.
- Bellairs, R., & Osmond, M. (2005). *Atlas of chick development*. Elsevier. pp. 669.
- Bitencourt, P. R., Abdalla, F. H., de Bona, K. S., & Moretto, M. B. (2013). Exposição aguda ao Metilmercúrio em ratos em desenvolvimento: mini-revisão. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 34(2), 137-148.
- Bjørnstad, S., Paulsen, R. E., Erichsen, A., Glover, J. C., & Roald, B. (2014). Type I and II pneumocyte differentiation in the developing fetal chicken lung: conservation of pivotal proteins from birds to human in the struggle for life at birth. *Neonatology*, 105(2), 112-120.
- Burke, K., Cheng, Y., Li, B., Petrov, A., Joshi, P., Berman, R. F., Reuhl, K. R., & DiCicco-Bloom, E. (2006). Methylmercury elicits rapid inhibition of cell proliferation in the developing brain and decreases cell cycle regulator, cyclin E. *Neurotoxicology*, 27(6), 970-981.
- Canela, T. A., Monteiro, L. C., Cabral, C. D. S., Ximenes, F. D. S., Oliveira, I. A. D. S., Bernardi, J. V. E., de Almeida, R. & Bastos, W. R. (2024). Mercury in fish and human hair and estimated dietary intake in a riverside community of the Madeira River Basin in the Brazilian Amazon. *Toxics*, 12(3), 208.
- Cardoso, W. V., & Whitsett, J. A. (2008). Resident cellular components of the lung developmental aspects. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(7), 767-771.
- Carvalho, M. C., Nazari, E. M., Farina, M., & Muller, Y. M. (2008). Behavioral, morphological, and biochemical changes after *in ovo* exposure to methylmercury in chicks. *Toxicological Sciences*, 106(1), 180-185.
- Cerutti, C., & Ridley, A. J. (2017). Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Experimental Cell Research*, 358(1), 31-38.
- Chen, D., Ran, D., Wang, C., Liu, Y., Ma, Y., Song, R., Gao, Y. & Liu, Z. (2021). Role of mitochondrial dysfunction and PINK1/Parkin-mediated mitophagy in Cd-induced hepatic lipid accumulation in chicken embryos. *Life Sciences*, 284, 119906.

- Chen, Y., Hata, T., Rehman, F., Kang, L., Yang, L., Kim, B. Y., & Nguyen, J. H. (2019). Visualization of hepatocellular regeneration in mice after partial hepatectomy. *Journal of Surgical Research*, 235, 494-500.
- Clarkson, T. W. (2002). The three modern faces of mercury. *Environmental Health Perspectives*, 110, 11-23.
- Clarkson, T. W., Magos, L., & Myers, G. J. (2003). The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations. *New England Journal of Medicine*, 349(18), 1731-1737.
- Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S., & Zuckerbraun, B. S. (2020). Nitric oxide and endothelial dysfunction. *Critical Care Clinics*, 36(2), 307-321.
- da Silva, S. F., Pereira, J. P. G., Oliveira, D. C., & Lima, M. D. O. (2020). Methylmercury in predatory and non-predatory fish species marketed in the Amazon Triple Frontier. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 104, 733-737.
- de Oliveira, D. S., Nunes, C. V. B., de Jesus, L., Loiola, S. A. S., & de Oliveira Santos, A. C. A. (2011). Impactos do mercúrio no meio ambiente e na saúde. Faculdade Alfredo Nasser, p. 5.
- de Sousa, D. C., de Oliveira, N. L. A., Dourado, L. R. B., & de Campos Ferreira, G. J. B. (2015). Sistema digestório das aves e o glicerol na dieta de frangos de corte: Revisão. *PubVet*, 9, 348-399.
- Desjardins, K., Ponton, D. E., Bilodeau, F., Rosabal, M., & Amyot, M. (2024). Methylmercury in northern pike (*Esox lucius*) liver and hepatic mitochondria is linked to lipid peroxidation. *Science of the Total Environment*, 931, 172703.
- Fehrenbach, H. (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory Research*, 2, 1-20.
- Ferreira, F. F., Ammar, D., Bourckhardt, G. F., Kobus-Bianchini, K., Müller, Y. M., & Nazari, E. M. (2015). MeHg Developing exposure causes DNA double-strand breaks and elicits cell cycle arrest in spinal cord cells. *Journal of Toxicology*, 2015(1), 532691.
- Ferreira, F. F., Nazari, E. M., & Müller, Y. M. (2018). MeHg causes ultrastructural changes in mitochondria and autophagy in the spinal cord cells of chicken embryo. *Journal of Toxicology*, 2018(1), 8460490.
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(24), 4195-4200.
- Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. (2019). *Biologia do desenvolvimento*. Artmed Editora. pp. 911.
- Gladwin, M. T., Schechter, A. N., Kim-Shapiro, D. B., Patel, R. P., Hogg, N., Shiva, S., Cannon, R. O. III, Kelm, M., Wink, D. A., Espey, M. G., Oldfield, E. H., Pluta, R. M., Freeman, B. A., Lancaster, J. R. Jr., Feelisch, M., & Lundberg, J. O. (2005). The emerging biology of the nitrite anion. *Nature Chemical Biology*, 1(6), 308–314.
- Goldenberg, N. M., & Kuebler, W. M. (2011). Endothelial cell regulation of pulmonary vascular tone, inflammation, and coagulation. *Comprehensive Physiology*, 5(2), 531-559.
- Greenwood, M. R. (1985). Methylmercury poisoning in Iraq. An epidemiological study of the 1971—1972 outbreak. *Journal of Applied Toxicology*, 5(3), 148-159.
- Gualdi, R., Bossard, P., Zheng, M., Hamada, Y., Coleman, J. R., & Zaret, K. S. (1996). Hepatic specification of the gut endoderm *in vitro*: cell signaling and transcriptional control. *Genes & Development*, 10(13), 1670-1682.
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88(1), 49-92.

- Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R. & Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106, 348-360.
- Herriges, M., & Morrisey, E. E. (2014). Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development*, 141(3), 502-513.
- Hoffmann, G., Völker, H., & Romero Muñoz de Arenillas, J. (1969). Anatomía y fisiología de las aves domésticas. Editorial Acribia. 190 p.
- Hong, Y. S., Kim, Y. M., & Lee, K. E. (2012). Methylmercury exposure and health effects. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 45(6), 353.
- Hurtado, T. C., de Medeiros Costa, G., de Carvalho, G. S., Brum, B. R., & Ignácio, Á. R. A. (2023). Mercury and methylmercury concentration in the feathers of two species of Kingfishers *Megaceryle torquata* and *Chloroceryle amazona* in the Upper Paraguay Basin and Amazon Basin. *Ecotoxicology*, 32(8), 1084-1095.
- Ji, X., Yang, L., Wu, F., Yao, L., Yu, B., Liu, X., Yin, Y., Hu., L., Qu, G., Fu, J., Yang, R., Wang, X., Shi, J. & Jiang, G. (2022). Identification of mercury-containing nanoparticles in the liver and muscle of cetaceans. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127759.
- Jiang, T.X., Stott, N.S., Widelitz, R.B., & Chuong, C.M. (1998). Current methods in the study of avian skin appendages. *In: Moody, S. A. Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis*. Editora R.G. Landes. pp. 395–408.
- Joshi, S., & Kotecha, S. (2007). Lung growth and development. *Early Human Development*, 83(12), 789-794.
- Jozsa, L., & Reffy, A. (1975). Light and electron microscopic studies of the pulmonary alveolar surfactant. *Acta Histochemica*, 53(1), 58-69.
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (2017). *Histologia básica*. Editora Guanabara Koogan. pp. 568.
- Kishimoto, T., Oguri, T., Abe, M., Kajitani, H., & Tada, M. (1995). Inhibitory effect of methylmercury on migration and tube formation by cultured human vascular endothelial cells. *Archives of Toxicology*, 69, 357-361.
- Leland, S. E., Straeter, P. A., & Gnadt, B. J. (2019). The role of the IACUC in the absence of regulatory guidance. *ILAR journal*, 60(1), 95-104.
- Li, M. L., Thackray, C. P., Lam, V. W., Cheung, W. W., & Sunderland, E. M. (2024). Global fishing patterns amplify human exposures to methylmercury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(40), e2405898121.
- Li, W. C., & Tse, H. F. (2015). Health risk and significance of mercury in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 192-201.
- Macedo-Júnior, S. J., Luiz-Cerutti, M., Nascimento, D. B., Farina, M., Soares Santos, A. R., & de Azevedo Maia, A. H. (2017). Methylmercury exposure for 14 days (short-term) produces behavioral and biochemical changes in mouse cerebellum, liver, and serum. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(19-21), 1145-1155.
- Maina, J. N. (2003). A systematic study of the development of the airway (bronchial) system of the avian lung from days 3 to 26 of embryogenesis: a transmission electron microscopic study on the domestic fowl, *Gallus gallus* variant *domesticus*. *Tissue and Cell*, 35(5), 375-391.
- Marumoto, M., Sakamoto, M., Nakamura, M., Marumoto, K., & Tsuruta, S. (2022). Organ-specific accumulation of selenium and mercury in Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *Acta Veterinaria Scandinavica*, 64(1), 1.

- Micaroni, R. C. D. C. M., Bueno, M. I. M. S., & Jardim, W. D. F. (2000). Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química Nova*, 23, 487-495.
- Miyaoka, Y., Ebato, K., Kato, H., Arakawa, S., Shimizu, S., & Miyajima, A. (2012). Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current Biology*, 22(13), 1166-1175.
- Mochizuki, Y., & Furukawa, K. (1987). Application of coomassie brilliant blue staining to cultured hepatocytes. *Cell Biology International Reports*, 11(5), 367-371.
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2015). *The developing human*. Elsevier Health Sciences. pp. 544.
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2020). *Before we are born: essentials of embryology and birth defects*. Elsevier Health Sciences. pp. 359.
- Mullassery, D., & Smith, N. P. (2015). Lung development. *In* Moody, S. A. *Seminars in pediatric surgery*. WB Saunders. pp. 152-155.
- Overturf, K., Al-Dhalimy, M., Ou, C. N., Finegold, M., & Grompe, M. (1997). Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *The American Journal of Pathology*, 151(5), 1273.
- Ronconi-Krüger, N., Müller, Y. M. R., & Nazari, E. M. (2024). Exploring developmental MeHg impact on extraembryonic and cardiac vessels and its effect on cardiomyocyte contractility. *Journal of Applied Toxicology*, 1-10.
- Ronconi-Krüger, N., Pinheiro, J., Simioni, C., & Nazari, E. M. (2022). Methylmercury toxicity during heart development: A combined analysis of morphological and functional parameters. *Cardiovascular Toxicology*, 22(12), 962-970.
- Ruaro, B., Salton, F., Braga, L., Wade, B., Confalonieri, P., Volpe, M. C., Baratella, E., Maiocchi, S., & Confalonieri, M. (2021). The history and mystery of alveolar epithelial type II cells: focus on their physiologic and pathologic role in lung. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2566.
- Schoenwolf, G. C. (1999). The avian embryo: A model for descriptive and experimental embryology. *In*: Moody, S. A. *Cell lineage and fate determination*. Academic Press. pp. 429-436.
- Seewagen, C. L., Elowe, C. R., Gerson, A. R., Groom, D. J., Ma, Y., Yildirim, M., & Guglielmo, C. G. (2022). Short-term mercury exposure disrupts muscular and hepatic lipid metabolism in a migrant songbird. *Scientific Reports*, 12(1), 11470.
- Shannon, J. M., & Hyatt, B. A. (2004). Epithelial-mesenchymal interactions in the developing lung. *Annual Review of Physiology*, 66, 625.
- Silverthorn, D. U. (2017). *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. Artmed Editora. pp. 960.
- Stabellini, G., Locci, P., Calvitti, M., Evangelisti, R., Marinucci, L., Bodo, M., Caruso, A., Canaider, S. & Carinci, P. (2001). Epithelial-mesenchymal interactions and lung branching morphogenesis. Role of polyamines and transforming growth factor β 1. *European Journal of Histochemistry*, 45(2), 152-62.
- Suksaweang, S., Lin, C. M., Jiang, T. X., Hughes, M. W., Widelitz, R. B., & Chuong, C. M. (2004). Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of β -catenin/Wnt in size regulation. *Developmental Biology*, 266(1), 109-122.
- Takahashi, T., & Shimohata, T. (2019). Vascular dysfunction induced by mercury exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2435.
- Tompkins, D. H., Besnard, V., Lange, A. W., Keiser, A. R., Wert, S. E., Bruno, M. D., & Whitsett, J. A. (2011). Sox2 activates cell proliferation and differentiation in the

- respiratory epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45(1), 101-110.
- Tremblay, K. D., & Zaret, K. S. (2005). Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Developmental Biology*, 280(1), 87-99.
- Ullrich, S. M., Tanton, T. W., & Abdrashitova, S. A. (2001). Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31(3), 241-293.
- Warren, M. F., & Hamilton, P. B. (1981). Glycogen storage disease type X caused by ochratoxin A in broiler chickens. *Poultry Science*, 60(1), 120-123.
- Wautier, J. L., & Wautier, M. P. (2022). Vascular permeability in diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3645.
- World Health Organization (WHO). (2008). *Guidance for Identifying Populations at Risk from Mercury Exposure*; WHO: Geneva, Switzerland. pp. 176.
- Yang, L., Zhang, Y., Wang, F., Luo, Z., Guo, S., & Strähle, U. (2020). Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*, 245, 125586.
- Yu, Y., Duan, J., Li, Y., Yu, Y., Jin, M., Li, C., Wang, Y., & Sun, Z. (2015). Combined toxicity of amorphous silica nanoparticles and methylmercury to human lung epithelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112, 144-152.